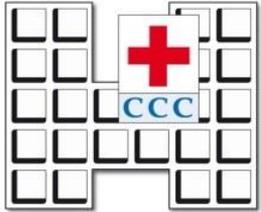


Sacro Cuore
Don Calabria



Cancer Care Center

Negrar - Verona

Incontri di aggiornamento oncologico 2016

Caratterizzazione biomolecolare dei carcinomi del colon-retto

Laura Bortesi

Anatomia Patologica

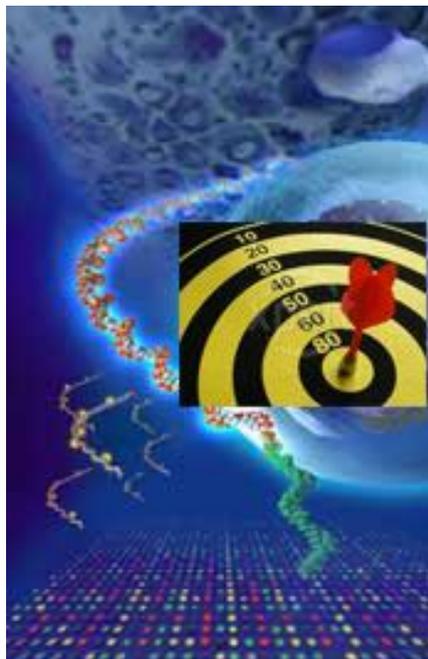
laura.bortesi@sacrocuore.it

Targeted Therapy: The Hype

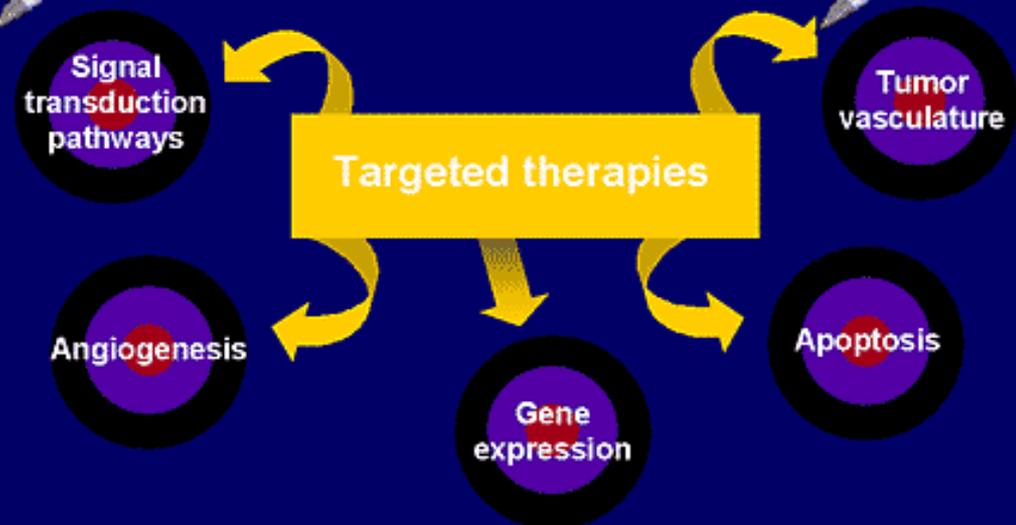


Medicina personalizzata

Massimizzare l'efficacia riducendo la tossicità



New biologic agents



Aim to be more effective and less toxic than current standards

ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer

E. Van Cutsem^{1*}, A. Cervantes², R. Adam³, A. Sobrero⁴, J. H. Van Krieken⁵, D. Aderka⁶, E. Aranda Aguilar⁷, A. Bardelli⁸, A. Benson⁹, G. Bodoky¹⁰, F. Ciardiello¹¹, A. D'Hoore¹², E. Diaz-Rubio¹³, J.-Y. Douillard¹⁴, M. Ducreux¹⁵, A. Falcone^{16,17}, A. Grothey¹⁸, T. Gruenberger¹⁹, K. Haustermans²⁰, V. Heinemann²¹, P. Hoff²², C.-H. Köhne²³, R. Labianca²⁴, P. Laurent-Puig²⁵, B. Ma²⁶, T. Maughan²⁷, K. Muro²⁸, N. Normanno²⁹, P. Österlund^{30,31}, W. J. G. Oyen³², D. Papamichael³³, G. Pentheroudakis³⁴, P. Pfeiffer³⁵, T. J. Price³⁶, C. Punt³⁷, J. Ricke³⁸, A. Roth³⁹, R. Salazar⁴⁰, W. Scheithauer⁴¹, H. J. Schmoll⁴², J. Taberero⁴³, J. Taïeb²⁵, S. Tejpar¹, H. Wasan⁴⁴, T. Yoshino⁴⁵, A. Zaanan²⁵ & D. Arnold⁴⁶

¹Digestive Oncology, University Hospitals Gasthuisberg Leuven and KU Leuven, Leuven, Belgium; ²Medical Oncology Department, INCLIVA University of Valencia, Valencia, Spain; ³Hepato-Biliary Centre, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France; ⁴Medical Oncology, IRCCS San Martino Hospital, Genova, Italy; ⁵Research Institute for Oncology, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; ⁶Division of Oncology, Sheba Medical Center, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel; ⁷Medical Oncology Department, University Hospital Reina Sofia, Cordoba, Spain; ⁸School of Medicine, University of Turin, Turin, Italy; ⁹Division of Hematology/Oncology, Northwestern Medical Group, Chicago, USA; ¹⁰Department of Oncology, St László Hospital, Budapest, Hungary; ¹¹Division of Medical Oncology, Seconda Università di Napoli, Naples, Italy; ¹²Abdominal Surgery, University Hospitals Gasthuisberg Leuven and KU Leuven, Leuven, Belgium; ¹³Medical Oncology Department, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain; ¹⁴Medical Oncology, Institut de Cancérogénie de l'Ouest (ICO), St Herblain; ¹⁵Department of Medical Oncology, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France; ¹⁶Department of Medical Oncology, University of Pisa, Pisa, Italy; ¹⁷Division of Medical Oncology, Department of Oncology, University Hospital 'S. Chiara', Istituto Toscano Tumori, Pisa, Italy; ¹⁸Division of Medical Oncology, Mayo Clinic, Rochester, USA; ¹⁹Department of Surgery I, Rudolfstiftung Hospital, Vienna,

Biomarcatore

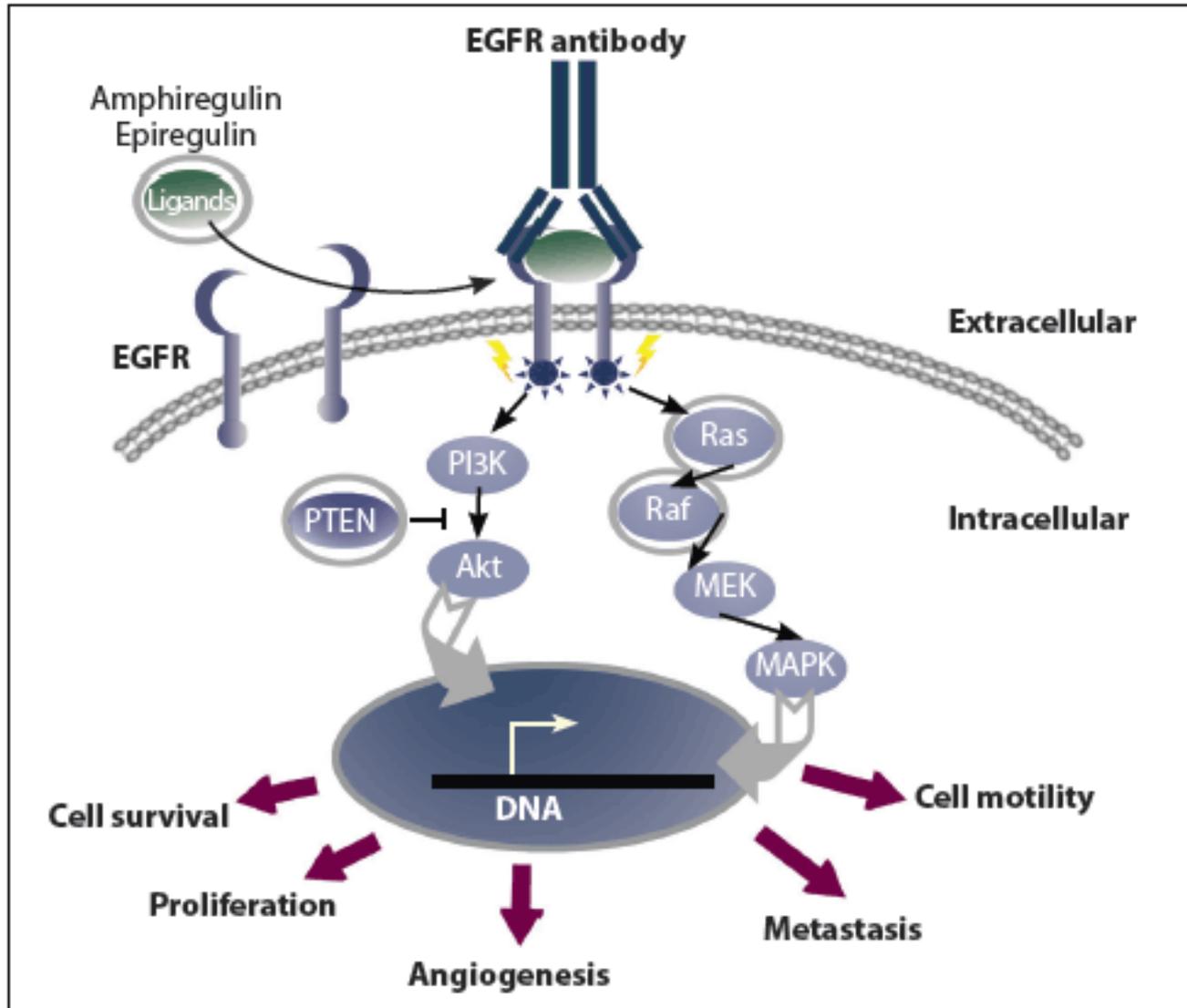
Diagnostici: usati per selezionare e diagnosticare un tipo di cancro

Prognostici: forniscono indicazioni sull'evoluzione della malattia

Predittivi: valutano il possibile beneficio di uno specifico trattamento

Attivazione EGFR

- stimolazione proliferazione cellulare (attivazione via RAS)
- inibizione dell'apoptosi (attivazione PI3K)



Biomarcatori

RAS

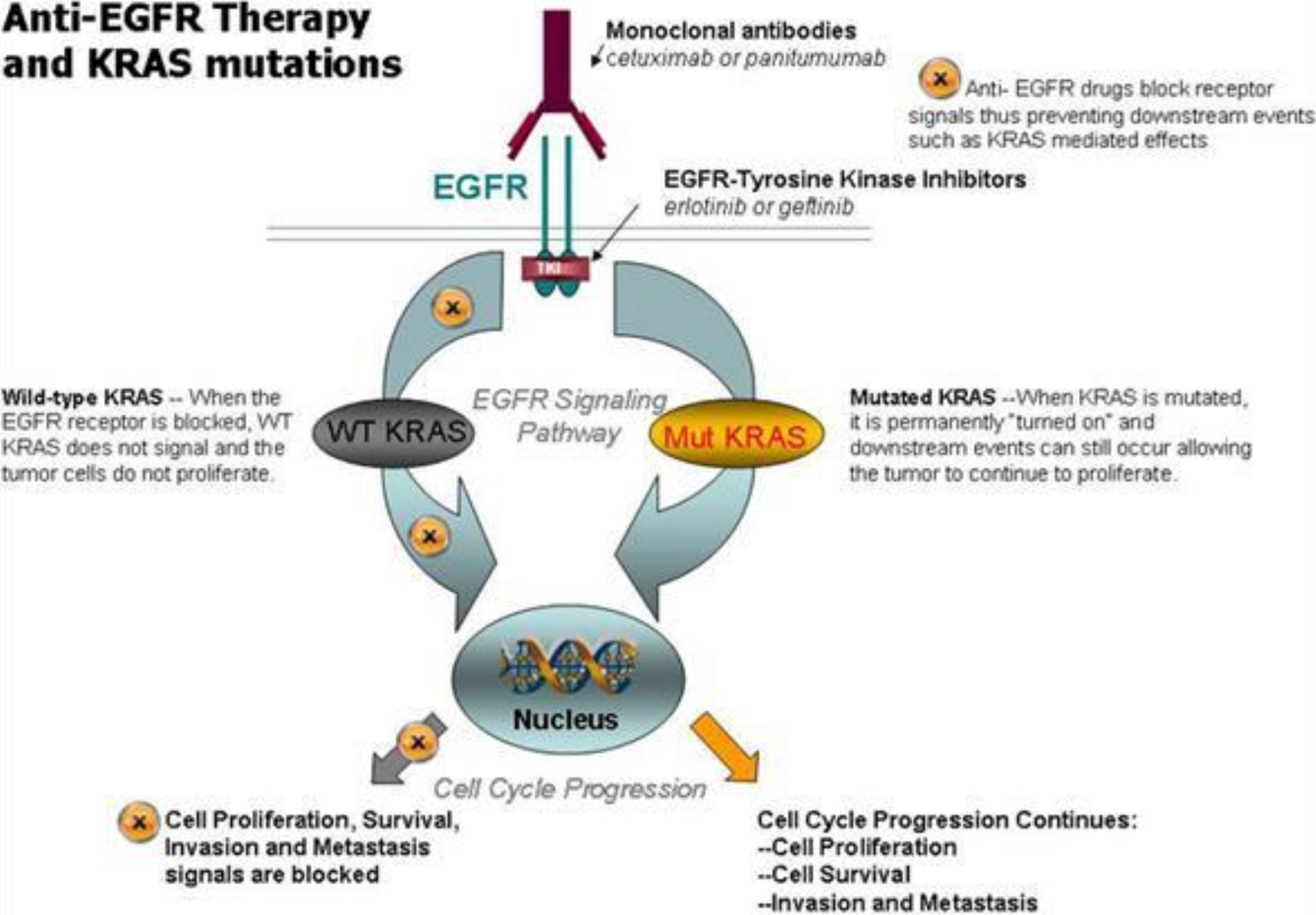
BRAF

MSI (raccomandato)

Biomarcatori

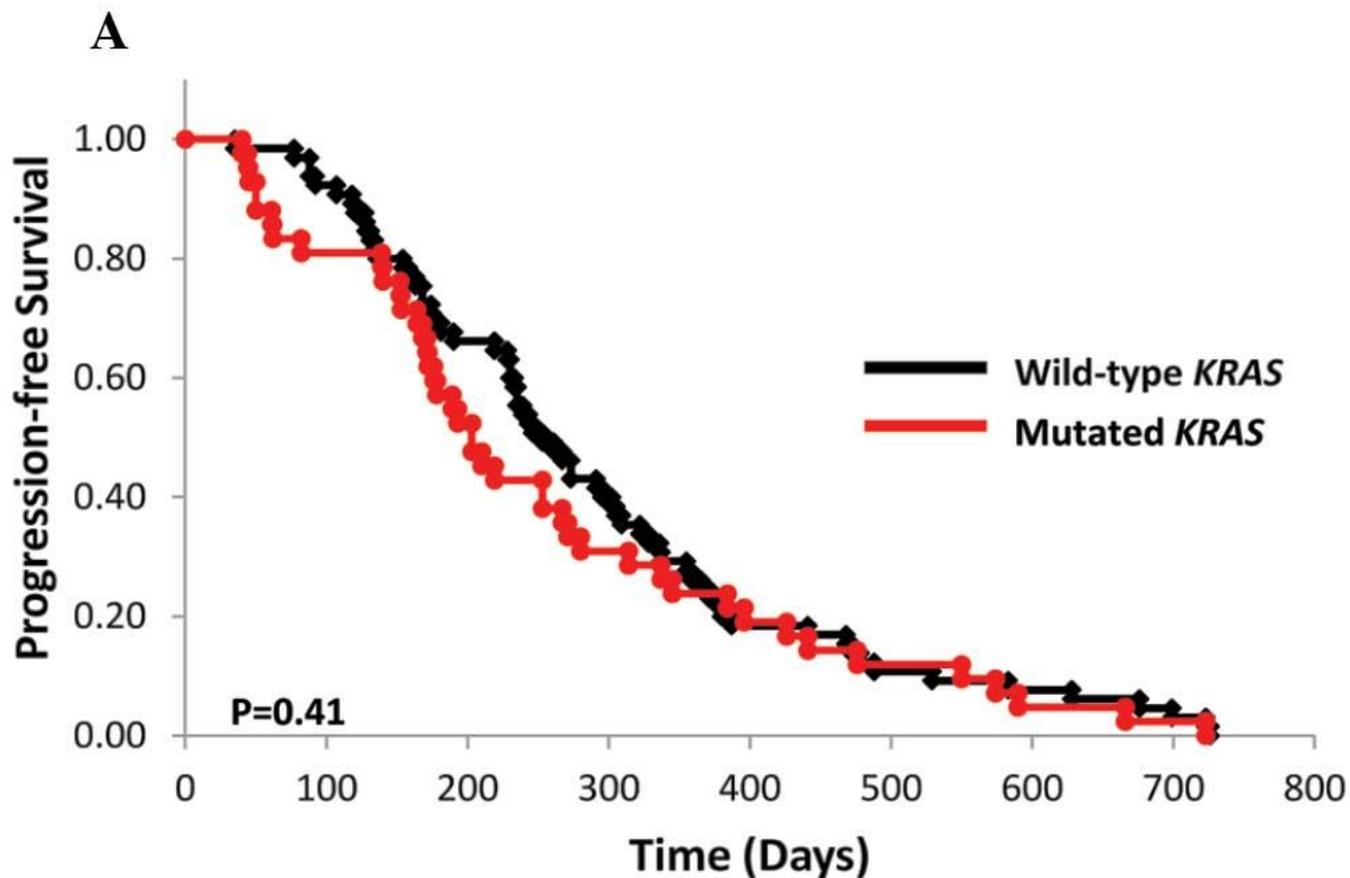
RAS

Anti-EGFR Therapy and KRAS mutations



Biomarcatori

RAS è un biomarcatore predittivo di Risposta alla terapia anti EGFR



MUTAZIONI KRAS

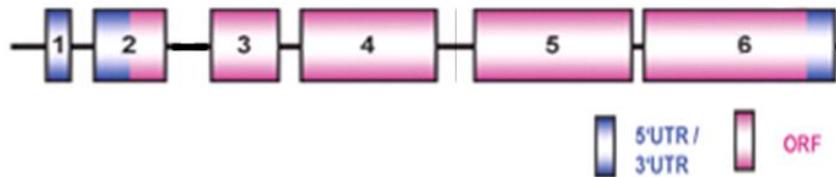
- Mutazioni puntiformi missenso che portano alla sostituzione di un AA
- Presenti nel 35-45% dei carcinomi
- Le più frequenti nel codone 12 (esone 2: G12D, G12V)
- Esistono anche nei codoni 59, 61(esone 3), 117 e 146 (esone 4)

GENE K-RAS

- K-RAS Gene 12p12.1 38 kb
- 6 exons, alternative splicing in the exon 5



Chromosome 12





Raccomandazioni per l'analisi mutazionale del gene KRAS nel carcinoma del colon-retto

Aggiornamento, 10 Novembre 2010

A cura del gruppo di lavoro AIOM - SIAPEC-IAP

*Antonio Marchetti, Nicola Normanno, Carmine Pinto,
GianLuigi Taddei, Alberto Bardelli, Carlo Barone,
Stefano Cascinu, Fortunato Ciardiello, Angelo Paolo Dei Tos,
Francesco Di Costanzo, Alfredo Falcone, Marcello Gambacorta,
Giampietro Gasparini, Stefano Iacobelli, Roberto Labianca,
Evaristo Maiello, Oscar Nappi, Antonio Russo,
Salvatore Siena, Giuseppe Viale*



INDICAZIONI AIOM SIAPEC 2010

KRAS

- Pz con K colon-retto **metastatico** per i quali è indicato un trattamento in I linea o successive con regimi contenenti un anticorpo monoclonale
- Indifferentemente su primitivo o metastasi vista l'alta concordanza di mutazioni (evento precoce e stabile)
- **ATTENTA** valutazione del campione: analizzare il fronte di avanzamento, evitare più possibile la necrosi e il normale
- Il carcinoma deve rappresentare almeno il 50% delle cellule o almeno 100 cellule neoplastiche
- Codoni 12 e 13 dell' **esone 2**
- http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf

ORIGINAL ARTICLE

Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer

Jean-Yves Douillard, M.D., Ph.D., Kelly S. Oliner, Ph.D., Salvatore Siena, M.D.,
Josep Tabernero, M.D., Ronald Burkes, M.D., Mario Barugel, M.D.,
Yves Humblet, M.D., Ph.D., Gyorgy Bodoky, M.D., Ph.D.,
David Cunningham, M.D., Jacek Jassem, M.D., Ph.D., Fernando Rivera, M.D., Ph.D.,
Ilona Kocákova, M.D., Ph.D., Paul Ruff, M.D., Maria Błasińska-Morawiec, M.D.,
Martin Šmakal, M.D., Jean Luc Canon, M.D., Mark Rother, M.D.,
Richard Williams, M.B., B.S., Ph.D., Alan Rong, Ph.D., Jeffrey Wiezorek, M.D.,
Roger Sidhu, M.D., and Scott D. Patterson, Ph.D.

2013

VOLUME 33 · NUMBER 7 · MARCH 1 2015

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

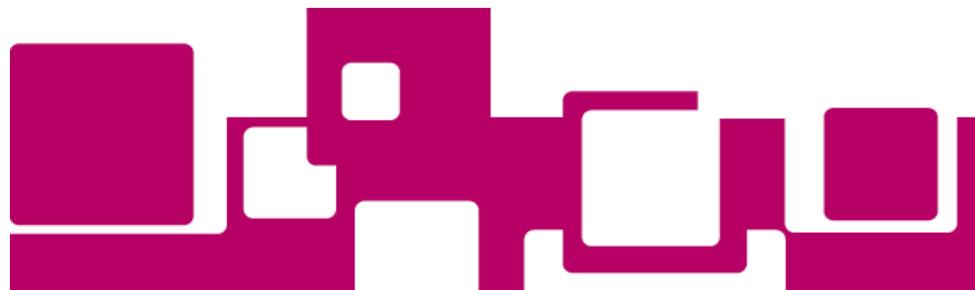
ORIGINAL REPORT

Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Plus Cetuximab Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer

Eric Van Cutsem, Heinz-Josef Lenz, Claus-Henning Köhne, Volker Heinemann, Sabine Tejpar, Ivan Melezínek, Frank Beier, Christopher Stroh, Philippe Rougier, J. Han van Krieken, and Fortunato Ciardiello

- **NOTA INFORMATIVA IMPORTANTE CONCORDATA CON LE AUTORITA' REGOLATORIE EUROPEE E L'AGENZIA ITALIANA DEL FARMACO (AIFA)**
- **Gennaio 2014**
- **Comunicazione diretta agli Operatori Sanitari sull'importanza di dimostrare lo stato senza mutazioni di RAS (*wild-type*) (esoni 2, 3 e 4 di KRAS e NRAS) prima del trattamento con Erbitux® (cetuximab)**

- Merck Serono, in accordo con l'Agencia Europea dei Medicinali e l'Agencia Italiana del Farmaco (AIFA), desidera informarla della seguente modifica apportata all'indicazione terapeutica approvata per Erbitux nel trattamento del carcinoma metastatico del colon-retto (mCRC).
- **In sintesi**
- • Prima di iniziare il trattamento con Erbitux è richiesta l'evidenza dello stato senza mutazioni (wild type) di RAS (esoni 2, 3 e 4 di KRAS e di NRAS) .Lo stato mutazionale deve essere determinato da un laboratorio competente che utilizzi un metodo di analisi validato per la diagnosi delle mutazioni di RAS (esoni 2, 3 e 4 di KRAS e di NRAS) .
- • Lo stato senza mutazioni (wild-type) di KRAS sull'esone 2 è già richiesto per iniziare il trattamento con Erbitux, ma dati ulteriori dimostrano che lo stato RAS senza mutazioni (wild-type), come sopra definito, è necessario affinché Erbitux sia efficace.
- • Nei pazienti con mutazioni RAS (esoni 2, 3 e 4 di KRAS e di NRAS), che hanno ricevuto Erbitux in associazione ad una chemioterapia a base di FOLFOX4, sono stati osservati un tempo di sopravvivenza globale (OS), un tempo di sopravvivenza libero da progressione (PFS) ed un tasso di risposta obiettiva (ORR) inferiori rispetto a quelli che hanno ricevuto FOLFOX4 da solo.
- • La controindicazione all'uso di Erbitux in associazione ad una chemioterapia a base di oxaliplatino (ad es. FOLFOX4) include ora tutti i pazienti affetti da mCRC con RAS mutato (esoni 2, 3 e 4 di KRAS e di NRAS) o stato RAS sconosciuto.



Raccomandazioni AIOM e SIAPEC-IAP per la valutazione delle mutazioni di RAS nel carcinoma del colon-retto

A cura del Gruppo di Lavoro di AIOM e SIAPEC-IAP **2015**

*AIOM: Nicola Normanno (Napoli), Carmine Pinto (Parma),
Carlo Barone (Roma), Roberto Labianca (Bergamo),
Salvatore Siena (Milano), Alberto Zaniboni (Brescia)*

*SIAPEC-IAP: Antonio Marchetti (Chieti), Gaetano De Rosa (Napoli),
Massimo Barberis (Milano), Gabriella Fontanini (Pisa),
Francesca Castiglione (Firenze), Gian Luigi Taddei (Firenze)*

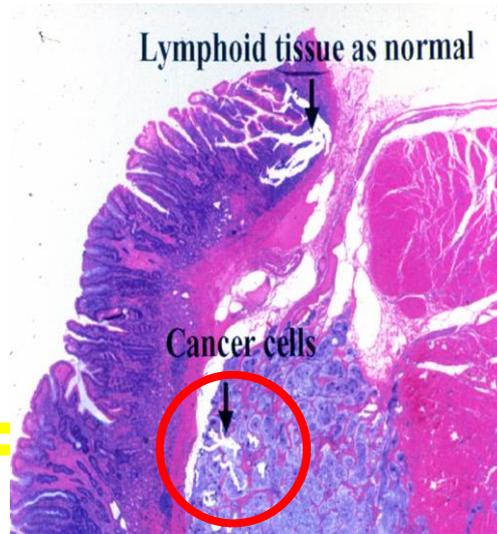


INDICAZIONI AIOM SIAPEC 2015

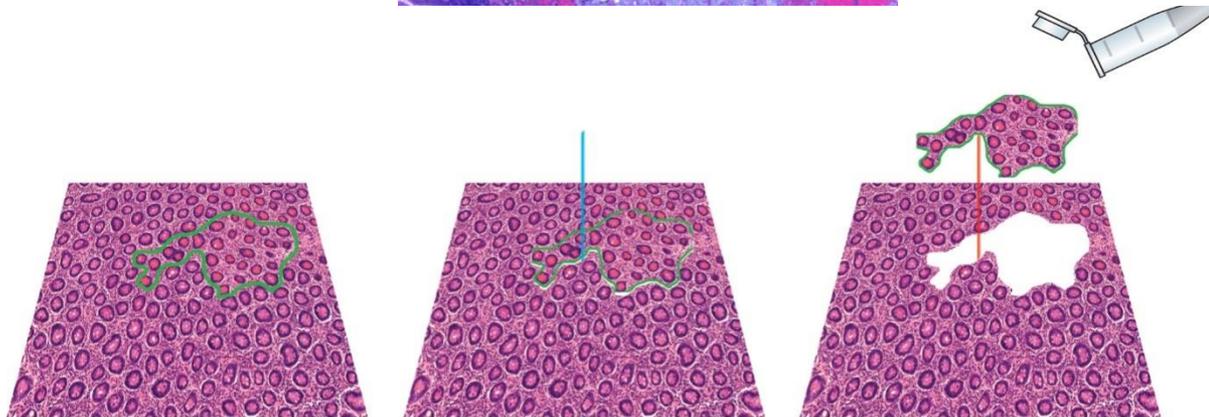
RAS

- Analizzare gli **esoni 2,3 4** di KRAS e NRAS
- Indifferentemente su primitivo e metastasi epatiche. Si è vista una discordanza tra metastasi linfonodali (25%) e sembra anche polmonari soprattutto se metacrone e in pz trattati con anti-EGFR
- Reflex testing (su tutti alla 1 dx) in base alla possibilità dei centri
- E' responsabilità del PATOLOGO valutare la componente tumorale del campione
- La refertazione non dovrebbe superare le due settimane dalla richiesta

ARRICCHIMENTO TISSUTALE



Macrodissezione Manuale



Laser

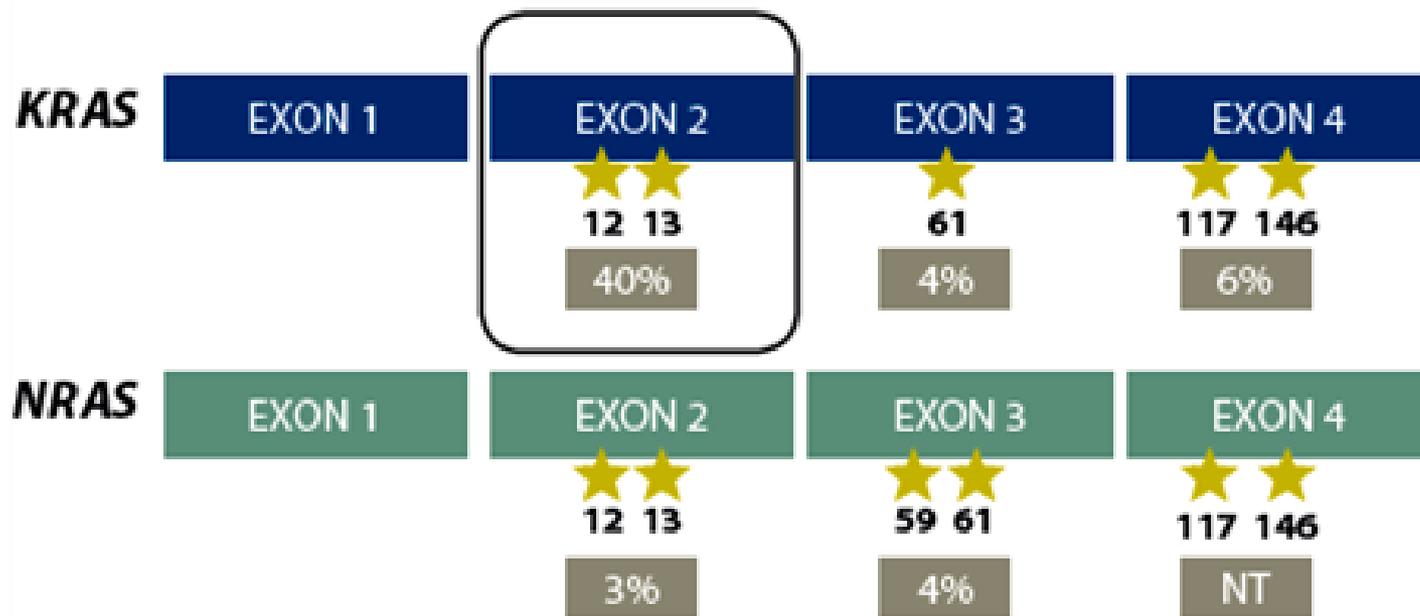
1 Select the region of interest

2 Cut the region of interest

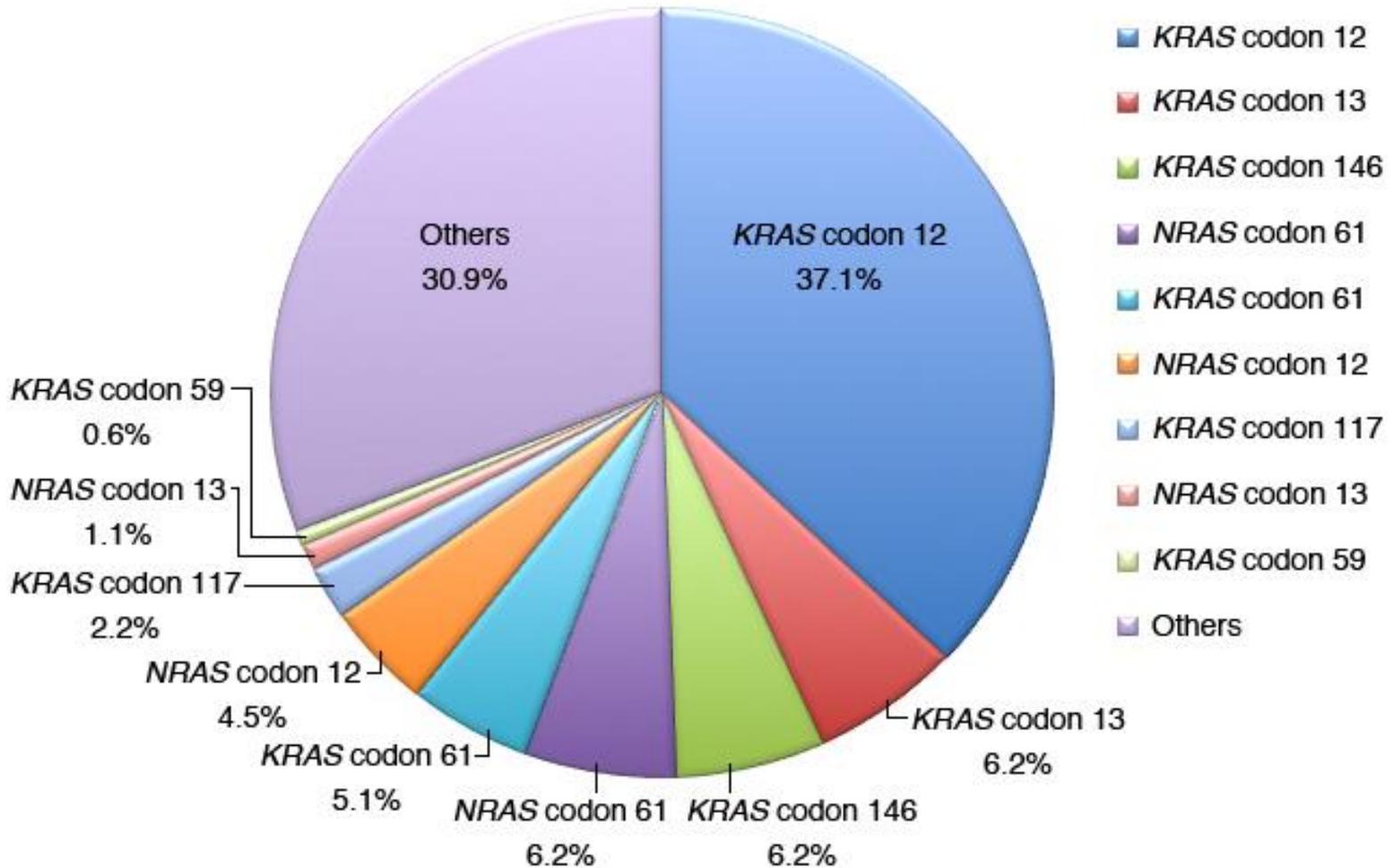
3 Harvest the cut region for further analysis
(PCR, RT-PCR, Western Blots...)

MUTAZIONI NRAS

Mutato nel 3% CRC (> codone 61 poi 12 e 13).



MUTAZIONI RAS



TECNICHE DI ANALISI MUTAZIONALE

Tecniche di screening:

Rilevazione di tutte le mutazioni presenti

Tecniche a bersaglio molecolare:

Rilevazione di mutazioni specifiche

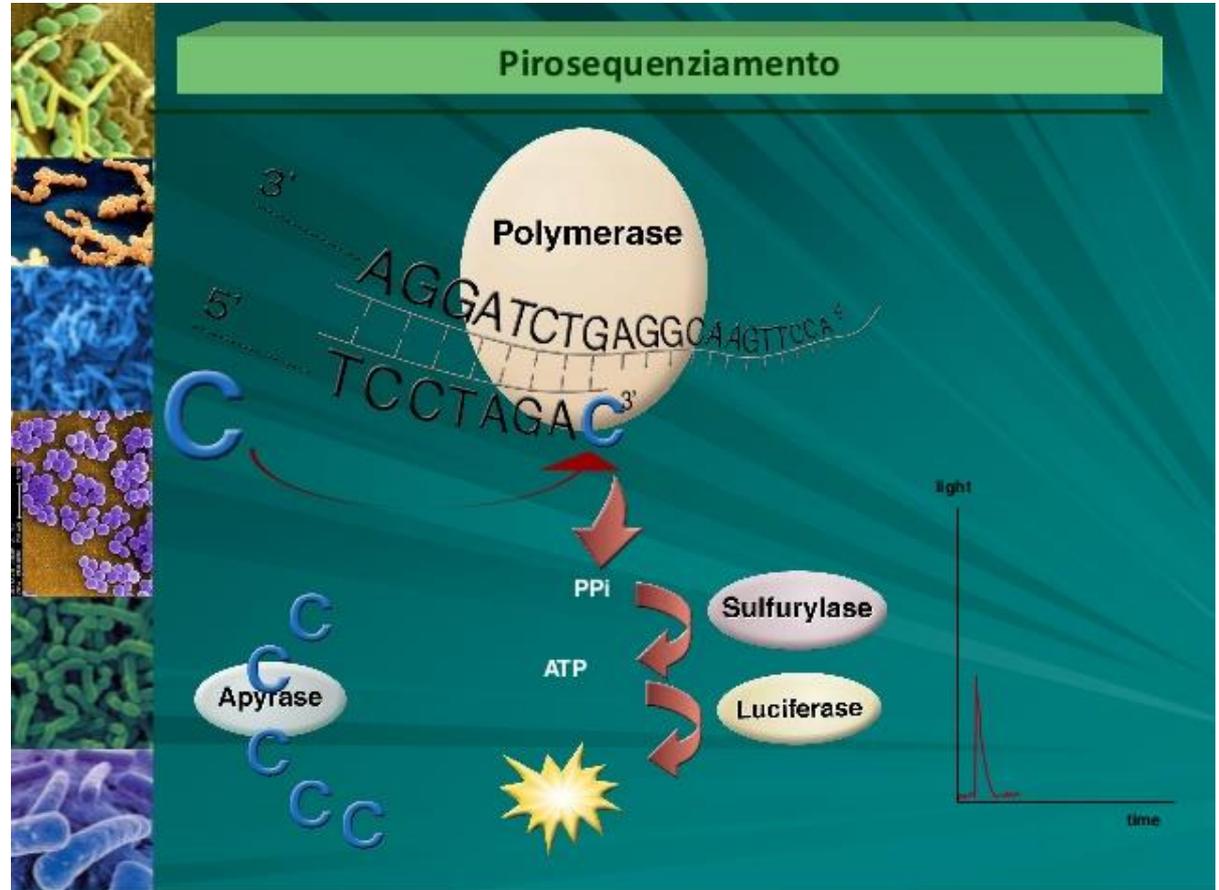
	Metodo	Sensibilità (% di DNA mutato)
Tecniche di screening	Sequenziamento diretto (Sanger)	10-20%
	Pirosequenziamento	5-10%
	High resolution melting analysis	5%
Tecniche a bersaglio molecolare	ARMS Real-Time PCR	1-5%
	Strip hybridization	1%
	PNA/LNA Clamp	0.1%-1%
	ME PCR/Sequencing	0.1%-1%
	Digital PCR	0.1%

* Le differenze in sensibilità non danno risultati diversi quando il tessuto è ben selezionato

TECNICHE DI ANALISI MUTAZIONALE

diatech
pharmacogenetics

dalla biologia molecolare alle cure personalizzate



Possibilità di sequenziare frammenti corti di Dna
Maggiore sensibilità rispetto al sequenziamento standard

TECNICHE DI ANALISI MUTAZIONALE

- **Anti-EGFR response® (Rileva le principali mutazioni dei geni):**
 - KRAS (codoni 12, 13, 59, 61, 117, 146)
 - BRAF (esoni 11 e 15)
 - NRAS (codoni 12, 13, 59, 61, 117, 146)
 - PIK3CA
 - EGFR (esoni 18, 19, 20, 21)

Esempio di analisi mutazionale

20180921_KRAS - Well A1

Entry: KRAS cod 12-13 pos 2

Sample: 1618490A

Notes: 1

Position 1: G: 95.0% / A: 0.0% / C: 2.4% / T: 2.6% (Check)

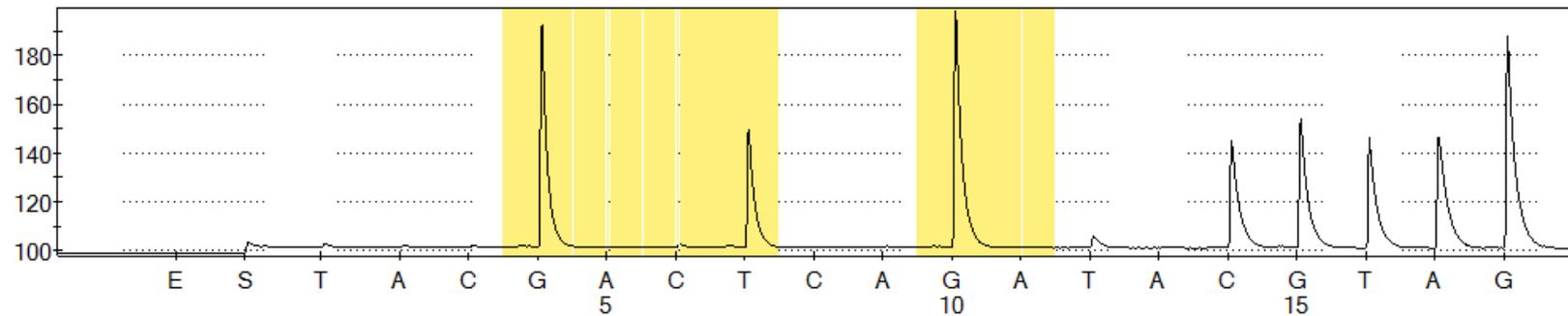
Position 2: G: 100.0% / A: 0.0%

(Passed)

GGT GGC GTA GGC

G:95.0%
A:0.0%
C:2.4%
T:2.6%

G:100.0%
A:0.0%



20180921_KRAS - Well A2

Entry: KRAS cod 12-13 pos 2

Sample: 1618757A

Notes: 2

Position 1: G: 58.9% / A: 35.1% / C: 2.4% / T: 3.6% (Check)

Position 2: G: 96.6% / A: 3.4%

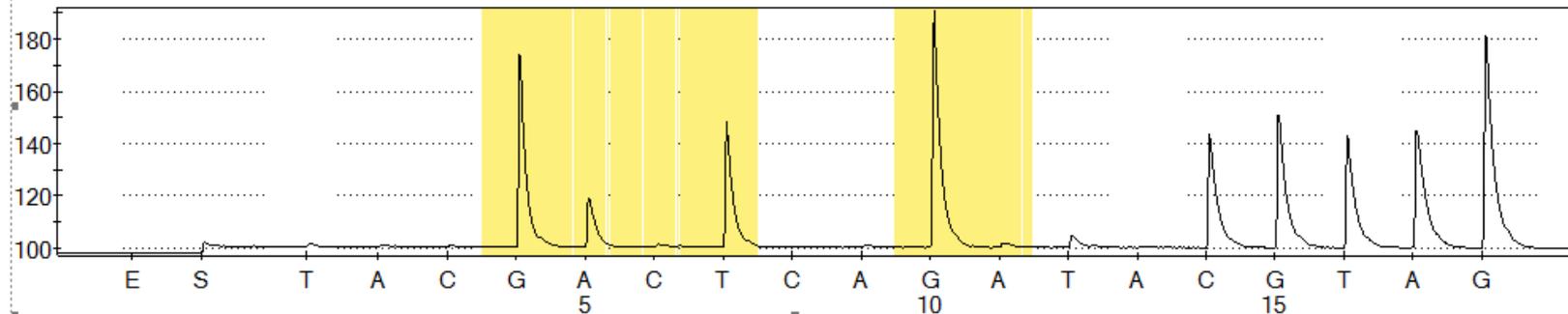
(Passed)

GAT GGC GTA GGC

G12D

G:58.9%
A:35.1%
C:2.4%
T:3.6%

G:96.6%
A:3.4%



DATI RAS NEGRAR

(da aprile 2015 al 7-10-2016)

KRAS 110 casi mutati 42/110 (38%)

- **G12D 33%**
- **G12V 16%**
- **G13D 16%**

NRAS 100 casi mutati 7/100 (7%)

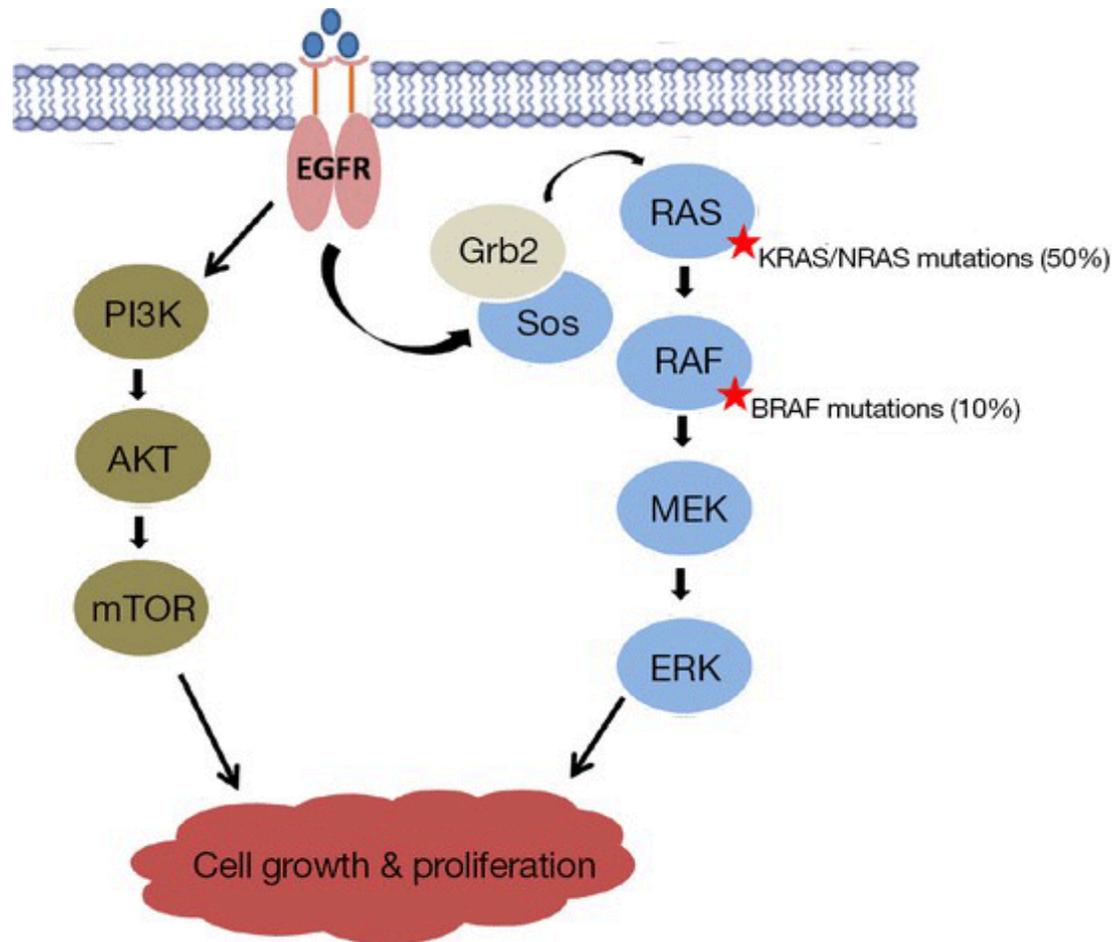
- G12D 3 casi**
- Q61H 2 casi**
- G12S 1 caso**
- Q61H 1 caso**

Biomarcatori

BRAF

Biomarcatori

BRAF protooncogene che codifica per una protein chinasi B-Raf



BRAF Mutations and Anti-EGFR Therapy

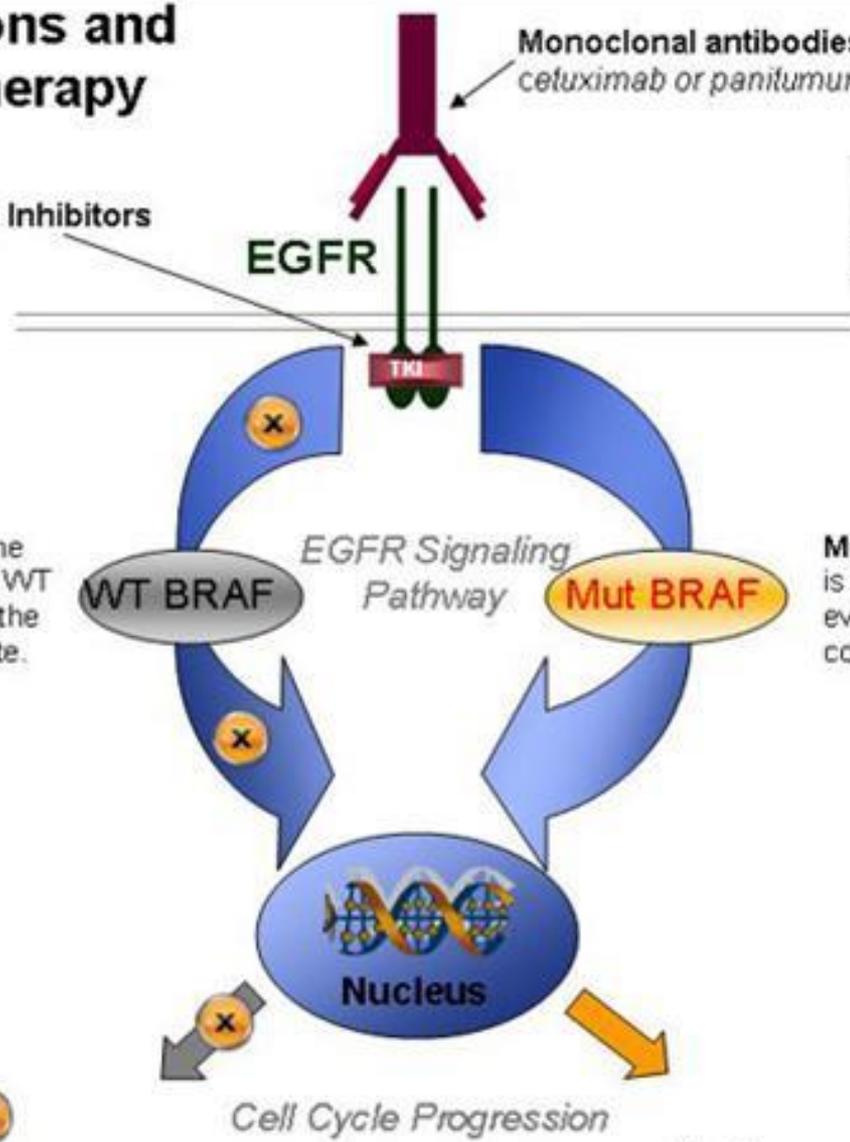
EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors
erlotinib or gefitinib

Monoclonal antibodies
cetuximab or panitumumab

✘ Anti-EGFR drugs block receptor signals thus preventing downstream events such as BRAF mediated effects.

Wild-type BRAF - When the EGFR receptor is blocked, WT BRAF does not signal and the tumor cells do not proliferate.

Mutated BRAF - When BRAF is mutated, it is permanently "turned on" and downstream events can still occur, allowing the tumor to continue to proliferate.

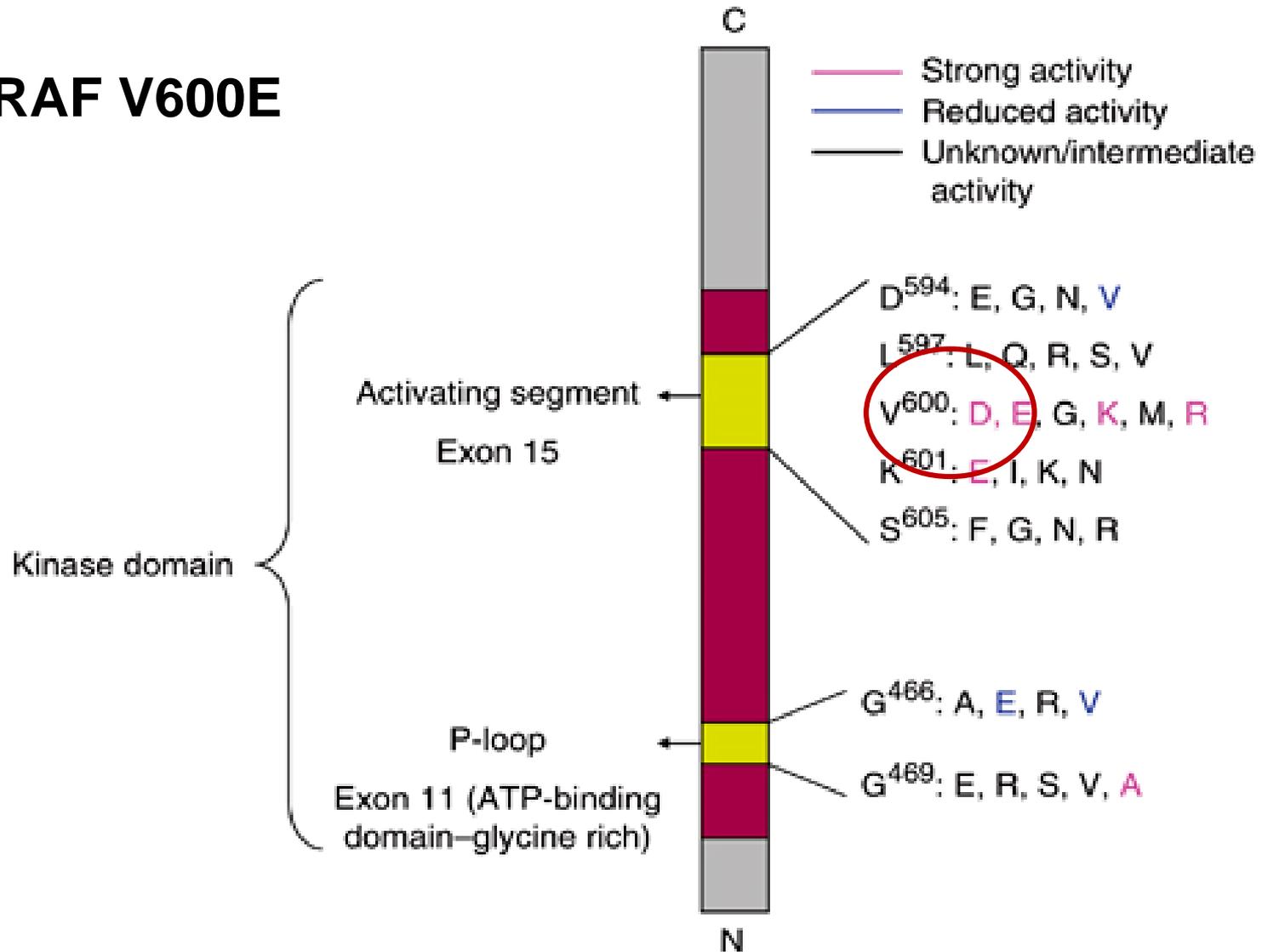


Response to Drug: Cell proliferation, survival, invasion and metastasis signals are blocked.

No Response to Drug: Cell cycle progression continues including proliferation, survival, invasion and metastasis.

MUTAZIONI BRAF

BRAF V600E



BRAF V600E 8-12% mCRC (2/3 colon dx)

Mutuamente esclusiva con le mutazioni di RAS

Marcatore prognostico negativo
(sopravvivenza media di 10.4 m vs 34.7 *Tran et al*)



NIH Public Access

Author Manuscript

Clin Colorectal Cancer. Author manuscript, available in PMC 2015 September 01.

Published in final edited form as:

Clin Colorectal Cancer. 2014 September ; 13(3): 164–171. doi:10.1016/j.clcc.2014.06.001.

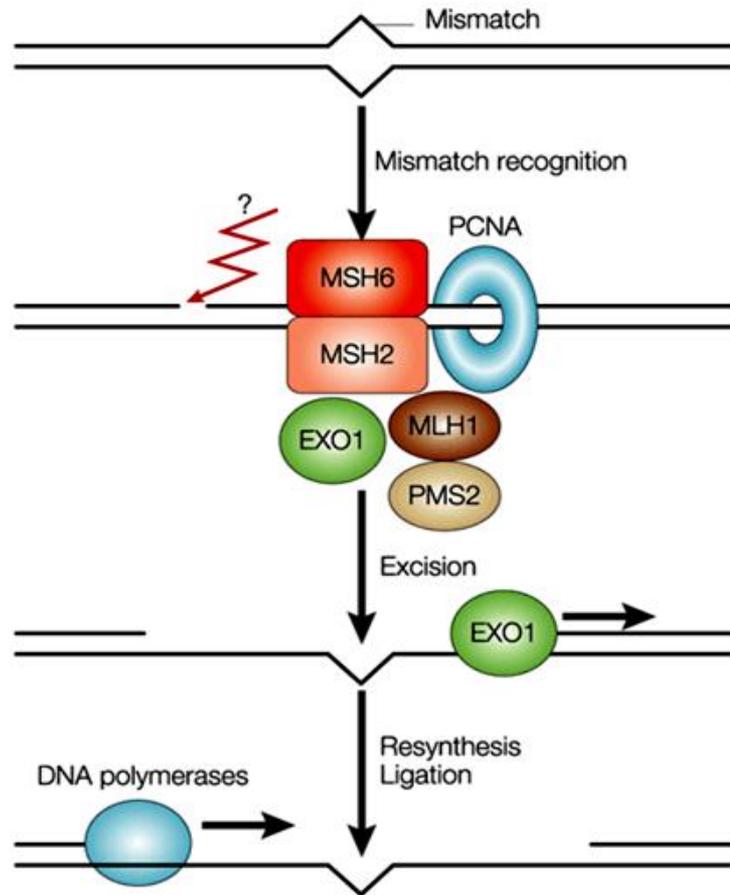
**Progression-Free Survival Remains Poor Over Sequential Lines
of Systemic Therapy in Patients with *BRAF*-mutated Colorectal
Cancer**

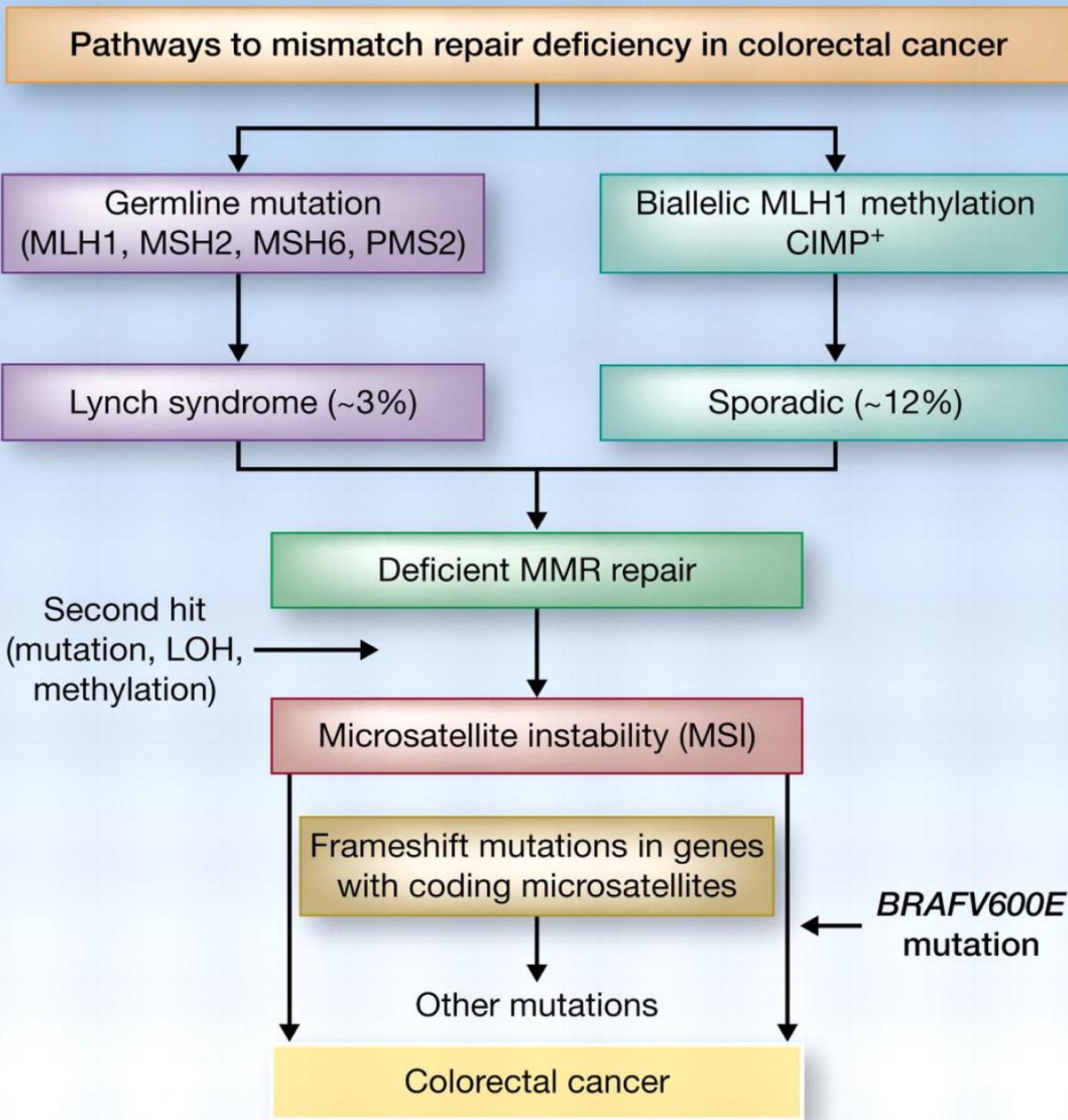
Ancora non del tutto chiaro un ruolo predittivo

Biomarcatori

MSI

Geni riparatori





© 2012 American Association for Cancer Research

MSI

- 4-8% dei CRC metastatici
- 30% BRAF mutati (sporadici)
- Raccomandato per:
- indirizzare il clinico nel richiedere un consulto genetico
- Forte **valore predittivo** di beneficio clinico utilizzando farmaci inibitori dei check point immunologici.



Author manuscript

N Engl J Med. Author manuscript; available in PMC 2016 June 25.

Published in final edited form as:

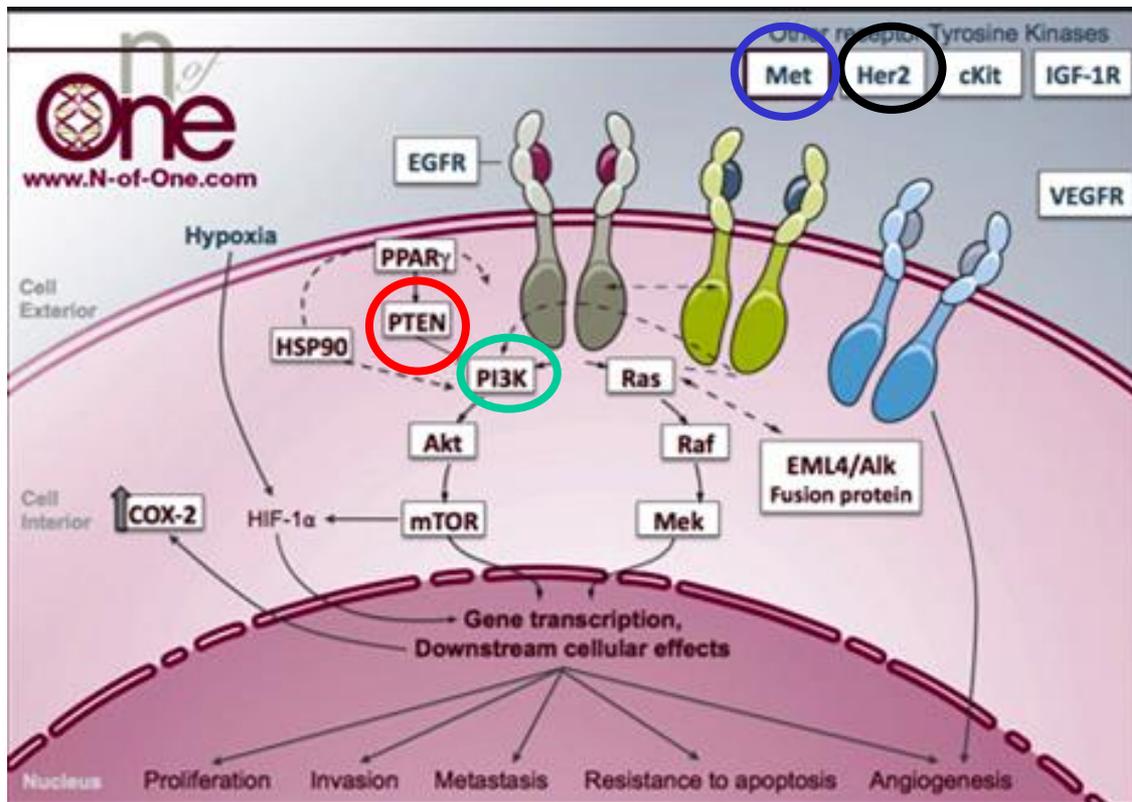
N Engl J Med. 2015 June 25; 372(26): 2509–2520. doi:10.1056/NEJMoa1500596.

Pembrolizumab

PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency

D.T. Le, J.N. Uram, H. Wang, B.R. Bartlett, H. Kemberling, A.D. Eyring, A.D. Skora, B.S.

Biomarcatori emergenti



-HER2 (amplificazione)

-MET (amplificazione)

-PI3KCA (mutazioni esone 20)

-PTEN (perdita ICH)

Tecnologie emergenti



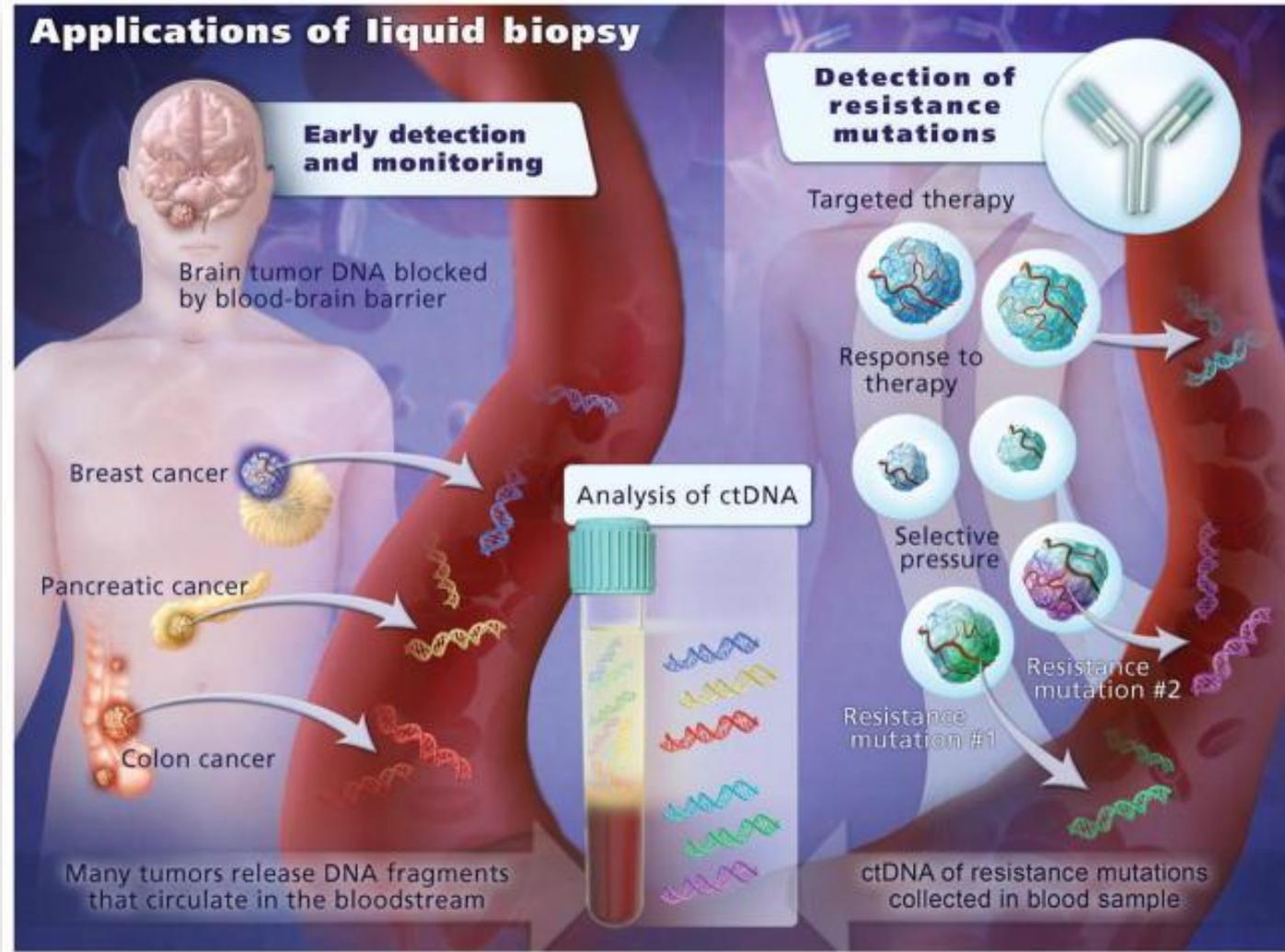
Ct DNA (Biopsia liquida)



NGS (Sequenziamento di II generazione)



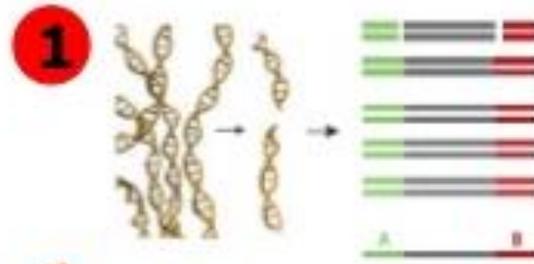
BIOPSIA LIQUIDA





Next –generation DNA sequencing

- 1** Library preparation
- 2** Clonal amplification
- 3** Cyclic array sequencing



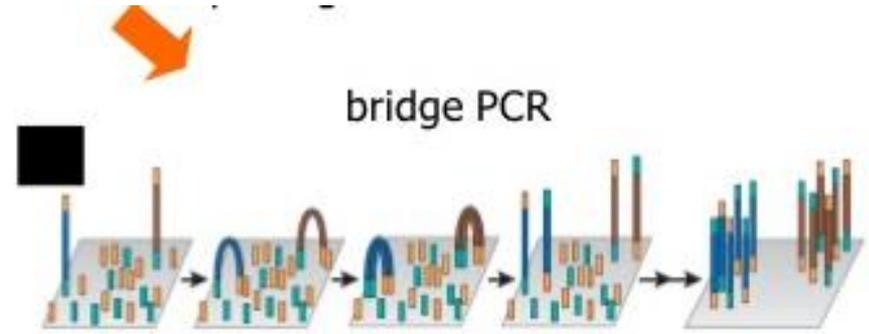
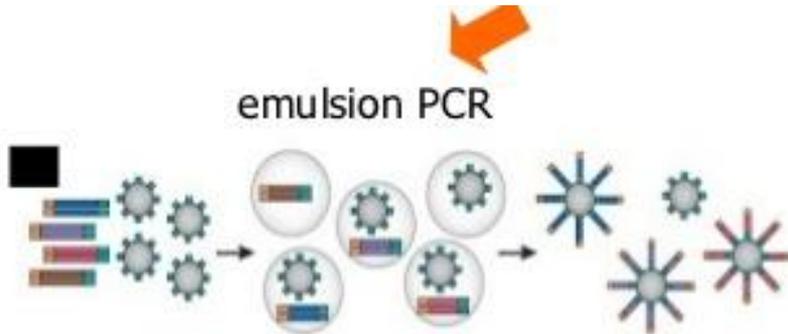
DNA
fragmentation
and in vitro
adaptor ligation





Next-generation DNA sequencing

2

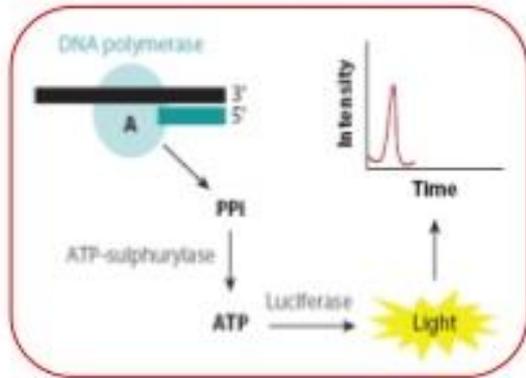




Next –generation DNA sequencing

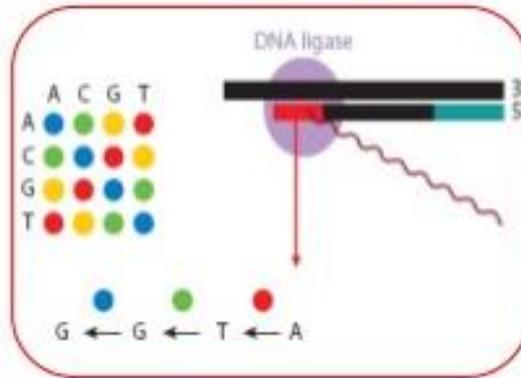
3

Pyrosequencing



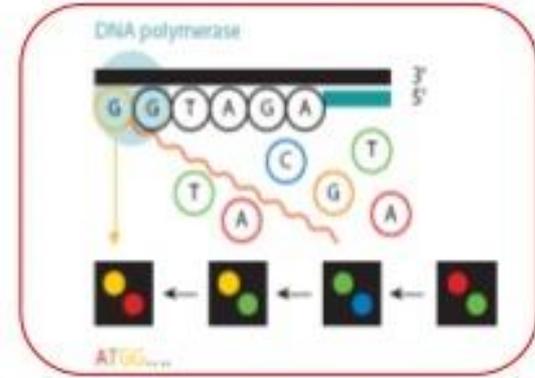
454 sequencing

Sequencing-by-ligation



SOLiD platform

Sequencing-by-synthesis



Solexa technology



Next –generation DNA sequencing

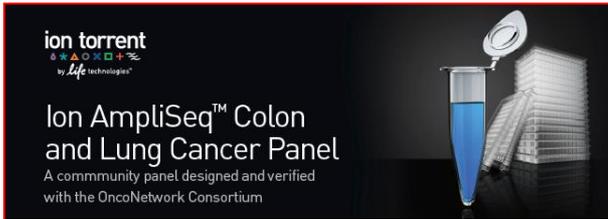
Sequenziamento ad alta resa (sequenzia moltissimi frammenti in parallelo)

Rapido (può sequenziare l'intero genoma in un giorno)

Costi minori rispetto al sequenziamento tradizionale

Darà importanti info circa l'eterogeneità tumorale e l'evoluzione clonale del tumore

NGS: Hot spot panel



OncoNetwork Consortium: a European Collaborative Research study on the development of a colon and lung cancer genes hot spot panel with Ion AmpliSeq™ technology on the Ion PGM™ sequencer

KRAS	BRAF	EGFR	TP53	PIK3CA	PTEN
NRAS	AKT1	STK11	ALK	ERBB4	DDR2
CTNNB1	MET	SMAD4	FBXN7	FGFR3	FGFR1
FGFR2					

www.invitrogen.com

Next-Generation Sequencing of Matched Primary and Metastatic Rectal Adenocarcinomas Demonstrates Minimal Mutation Gain and Concordance to Colonic Adenocarcinomas

Suzanne M. Crumley, MD; Kristi L. Pepper, MB(ASCP); Alexandria T. Phan, MD; Randall J. Olsen, MD, PhD; Mary R. Schwartz, MD; Bryce P. Portier, MD, PhD

RESEARCH ARTICLE

Clinical Validation of Targeted Next Generation Sequencing for Colon and Lung Cancers

Nicky D'Haene¹, Marie Le Mercier¹, Nancy De Nève¹, Oriane Blanchard¹, Mélanie Delaunoy², Hakim El Housni², Barbara Dessars², Pierre Heimann², Myriam Rimmelink¹, Pieter Demetter¹, Sabine Tejpar³, Isabelle Salmon^{1*}

Laboratorio Biologia Molecolare



Dott.ssa Laura Bortesi
Dott.ssa Anna Pesci

Biologo Giulio Settanni

Tec. LB Sara Lonardi
Tec. LB Silvia Sandrini