



Ospedale
"Sacro Cuore - Don Calabria"

Incontri di aggiornamento del Dipartimento Oncologico

Responsabile Scientifico:
Dott.ssa Stefania Gori

5° INCONTRO - Mercoledì 11 novembre 2015

*Oncologia traslazionale: nuove vie del segnale
e nuovi inibitori (1ª edizione)*

SEDE

CENTRO FORMAZIONE

Ospedale "Sacro Cuore - Don Calabria"
Via Don Angelo Sempreboni, 5 - 37024 Negrar (Verona)



Mutazioni di EGFR nel carcinoma polmonare: epidemiologia e metodi di valutazione

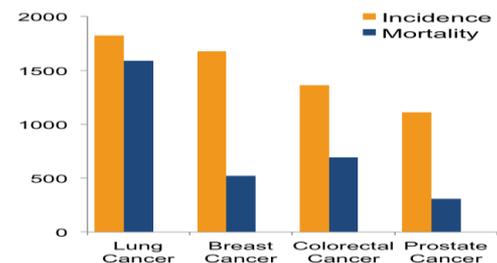


Ludovini Vienna
Laboratorio di biologia molecolare
SC Oncologia Medica
Azienda Ospedaliera-Universitaria
Perugia

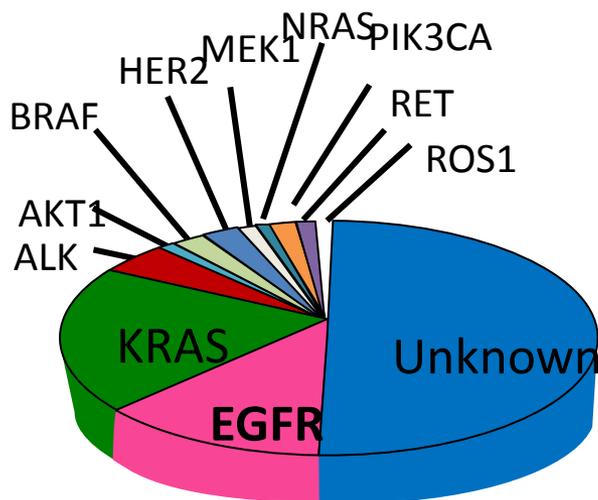
Il tumore del polmone

- Prima causa di morte cancro-relata nel mondo
- In oltre i 2/3 dei casi viene diagnosticato in stadio localmente avanzato (IIIB) o metastatico (IV) quando l'unico approccio terapeutico è di tipo sistemico e ad intento palliativo
- Circa l'85% di tutti i tumori del polmone è rappresentato dal carcinoma polmonare non microcitoma (NSCLC). Il 50% istotipo adenocarcinoma

GLOBOCAN 2012 (worldwide, both sexes)^{1,2}



“Driver Mutations” nell’ adenocarcinoma polmonare Tumore “oncogene-addicted”



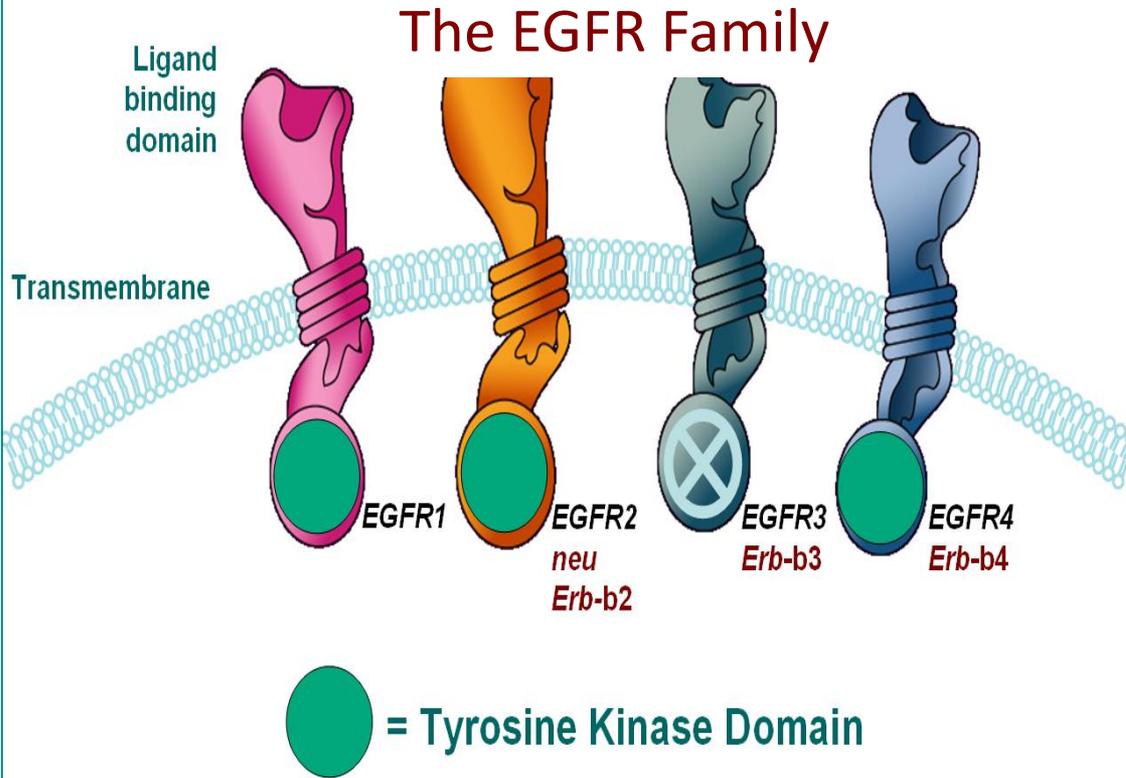
Frequency of Driver Mutations in NSCLC, %	
AKT1	1
ALK	3-7
BRAF	1-3
EGFR	10-35
HER2	2-4
KRAS	15-25
MEK1	1
NRAS	1
PIK3CA	1-3
RET	1-2
ROS1	1

1. Ferlay J, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11[Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. Accessed March 2014;

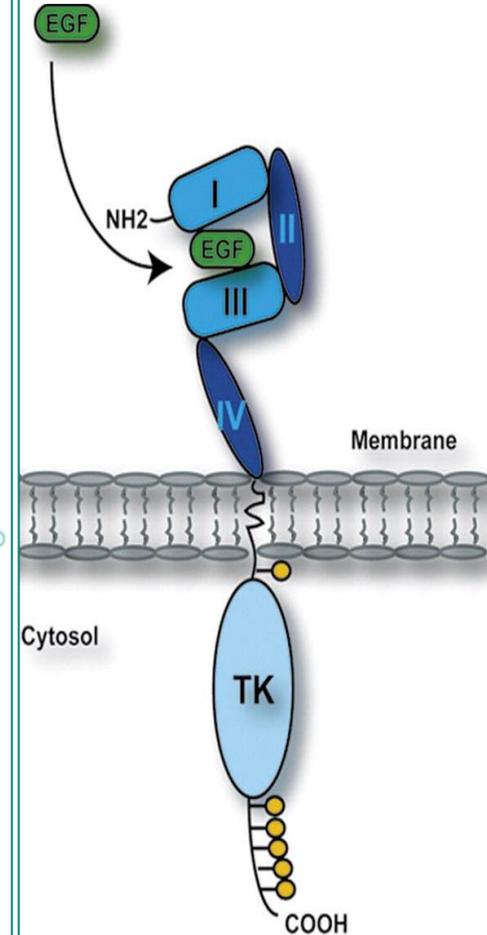
2. Ferlay J, et al. *Eur J Cancer*. 2013;49:1374–1403.

Recettore per il fattore di crescita dell'epidermide (EGFR)

The EGFR Family



EGFR 1



- Glycosylation
- Phosphorylation

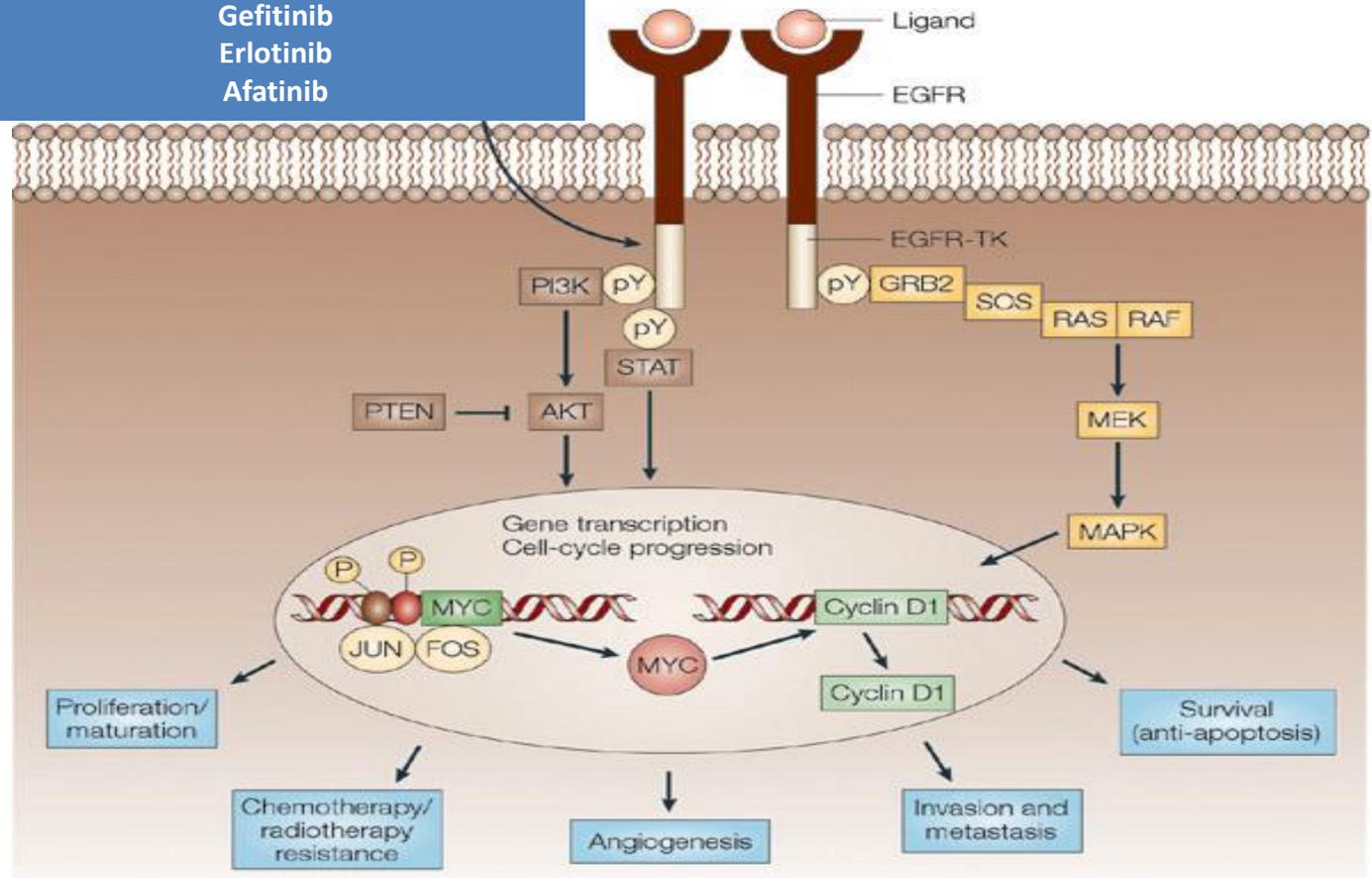
Chromosome 7

Attivazione di EGFR

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

EGFR-TK inhibitors di I e II generazione

Gefitinib
Erlotinib
Afatinib



Mutazioni di EGFR e incidenza

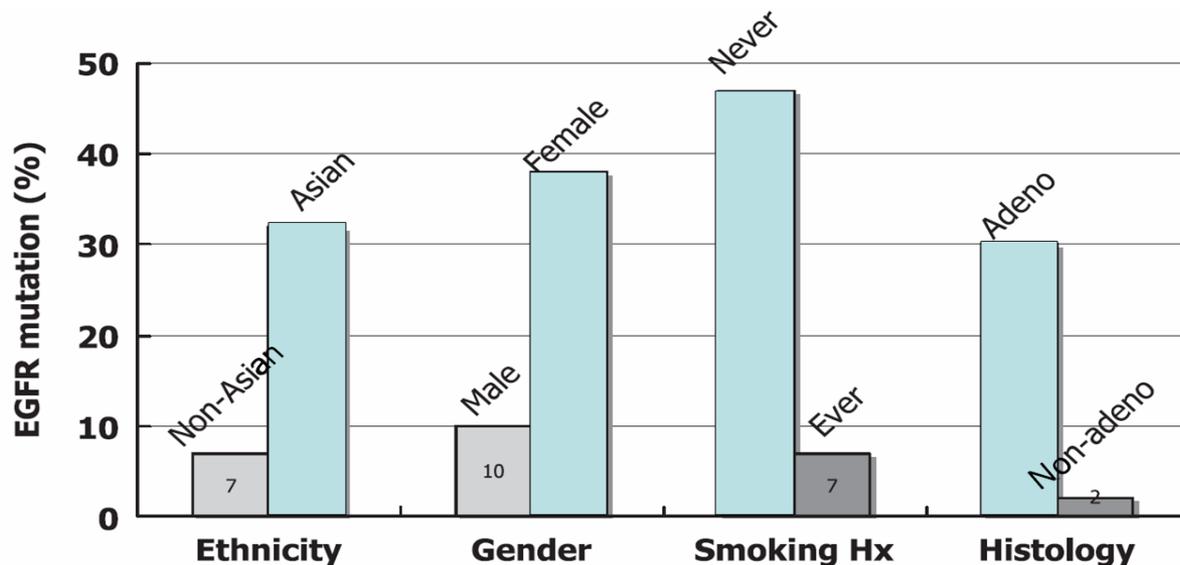
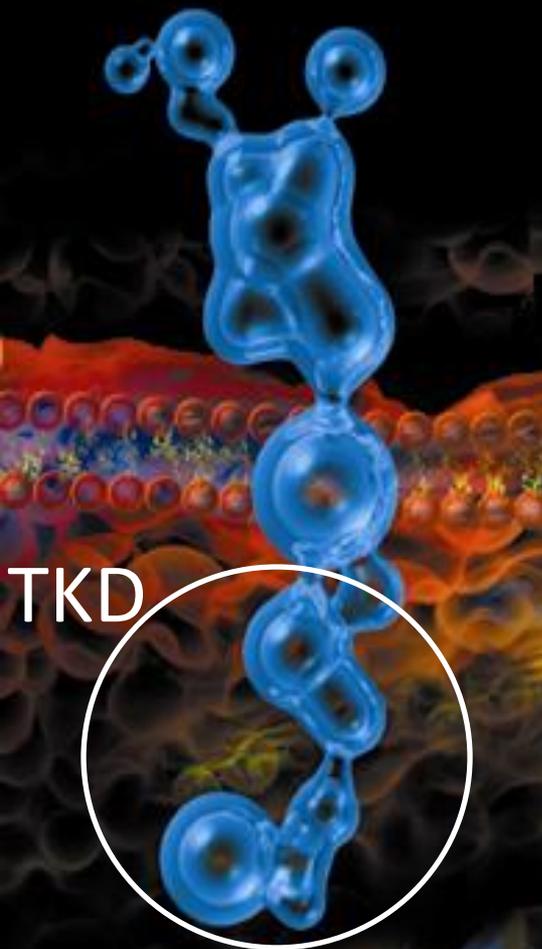


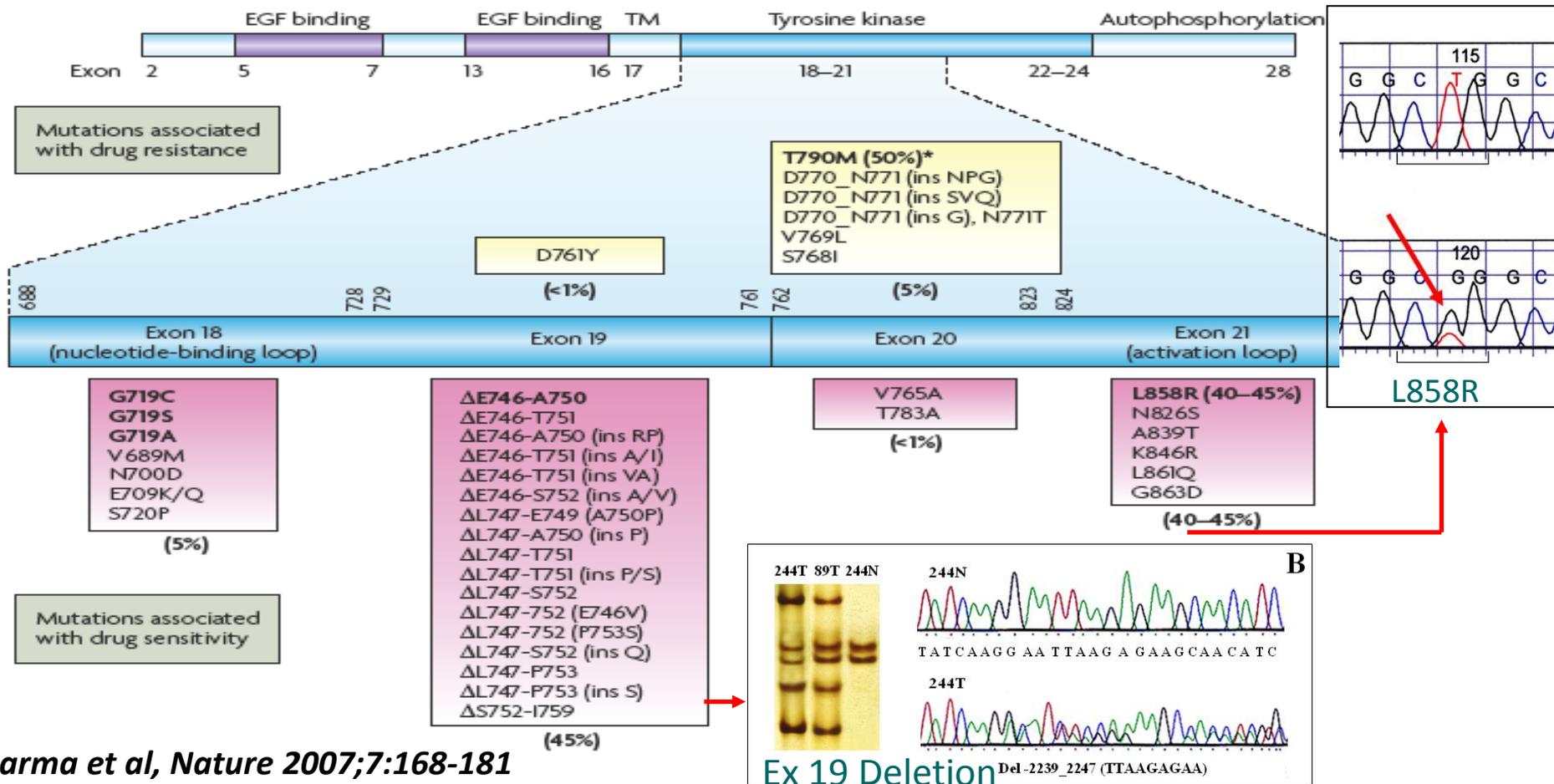
Fig. 2. Incidence of epidermal growth factor receptor gene (*EGFR*) mutations by ethnicity, gender, smoking history and histology. Data were compiled from the published reports ($n = 2880$).

Yamamoto Y et al. Lung Cancer 2009

Mutazioni di EGFR

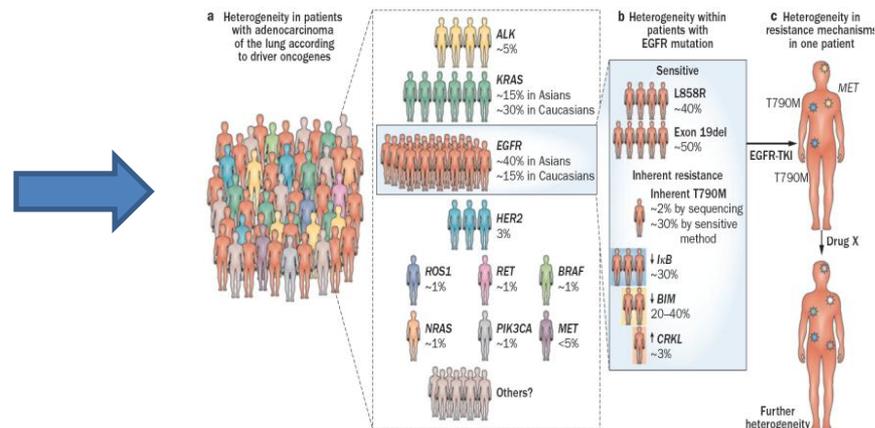
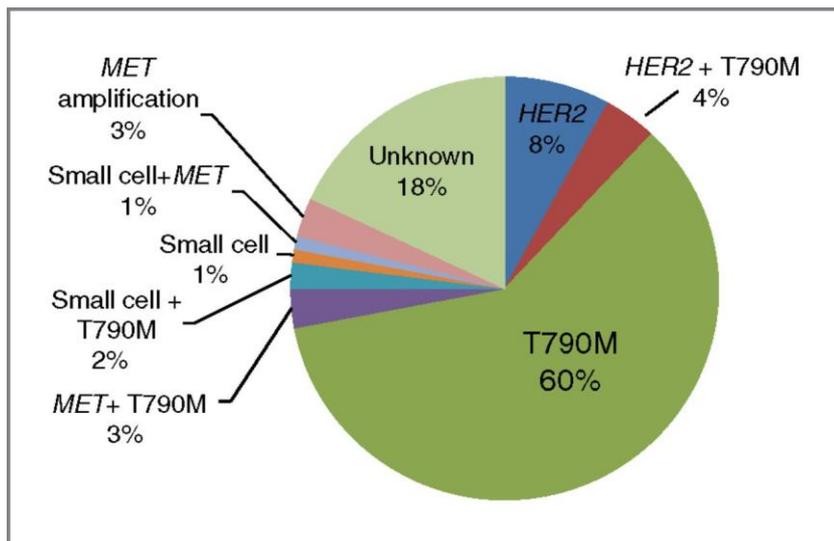
July 2009. The European Commission approved the marketing of gefitinib (Iressa) for selected patients with nonsmall cell lung cancer.

- Gefitinib will be used only in patients with **certain mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene** that make them sensitive to the drug.



“Dark side” della terapia a target molecolare

Sviluppo della resistenza acquisita alla terapia con EGFR-TKI (9-14 mesi)
Progressione tumorale



Sviluppo di nuovi inibitori in grado di inibire il recettore con mutazione T790M definiti di 3° generazione

	Drug	IC50 nM EGFR WT	IC50 nM EGFR mut	IC50 nM EGFR _{L858R} / T790M	MTD	RR T790M+ (%)	RR T790M- (%)
3 rd generation EGFR-TKI	Rociletinib (CO-1686)	4275	7	33	Not reached	58%	-
	AZD 9291	480	17	15	Not reached	65%	22%*
2 nd generation EGFR-TKI	HM61713	2225	9	10	Not reached	29%	12%**
	Afatinib	60	0.7	99			
1 st generation EGFR-TKI	Erlotinib	449	3.2	2253			

*11% in patients with prior TKI as last regimen
**All patients had received prior TKI as last regimen

Raccomandazioni AIOM e SIAPEC-IAP per l'analisi mutazionale del gene EGFR nel carcinoma polmonare

Aggiornamenti

A cura del Gruppo

AIOM: Nicola Barroca, Lucio Crinà (Perugia), Giorgio Scagliardi (Forlì)

SIAPEC-IAP: Antonio M. Claudio Clemente (Mila), Mauro Pignotti (Forlì), Gianluigi Taddei (Firenze)

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 15, No. 4, July 2013



See related Guest Editorial on page 413.

The Journal of Molecular Diagnostics

jmd.amjpathol.org

SPECIAL ARTICLE

Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors

Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology

Giuseppe Giaccone,¹ Joseph A. Sparano,^{2,3,4} and Marc Ladanyi^{1,5}

Annals of Oncology 25: 1681–1690, 2014

doi:10.1093/annonc/mdu145

Published online 8 April 2014

special article

Second ESMO conference on pathology and molecular biology of lung cancer

K. M. Kerr^{1*}, L. Bubendorf², R. Stahel³, S. Peters¹⁰, E. Felip⁴

VOLUME 22 - NUMBER 22 - NOVEMBER 10 2014

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ASCO SPECIAL ARTICLE

Molecular Testing for Selection of Patients With Lung Cancer for Epidermal Growth Factor Receptor and Anaplastic Lymphoma Kinase Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Guideline

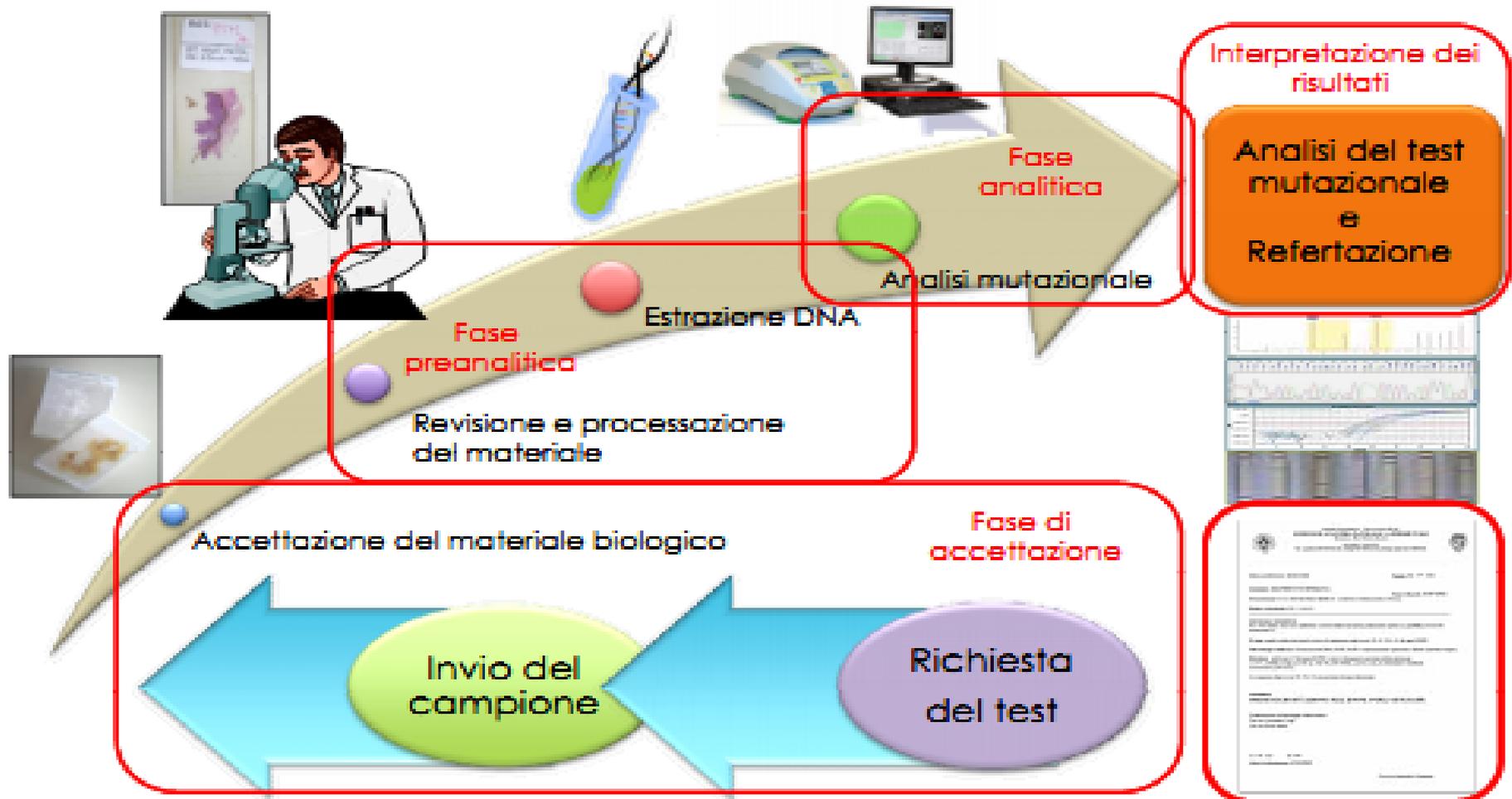
Natasha B. Leighl, Natasha Rehkman, William A. Biermann, James Huang, Mari Mino-Kenudson, Sunsh S. Ramalingam, Howard West, Sara Whitlock, and Mark R. Somerfield

Il percorso di analisi molecolare di EGFR nel NSCLC



Patient

**Equipe multidisciplinare per la gestione del paziente oncologico:
oncologo, patologo e biologo molecolare**



Il materiale biologico per l'analisi molecolare

➤ Campioni Istologici

2014: Pezzo operatorio
Prelievo bioptico del tumore primitivo e/o della metastasi

➤ Campioni citologici

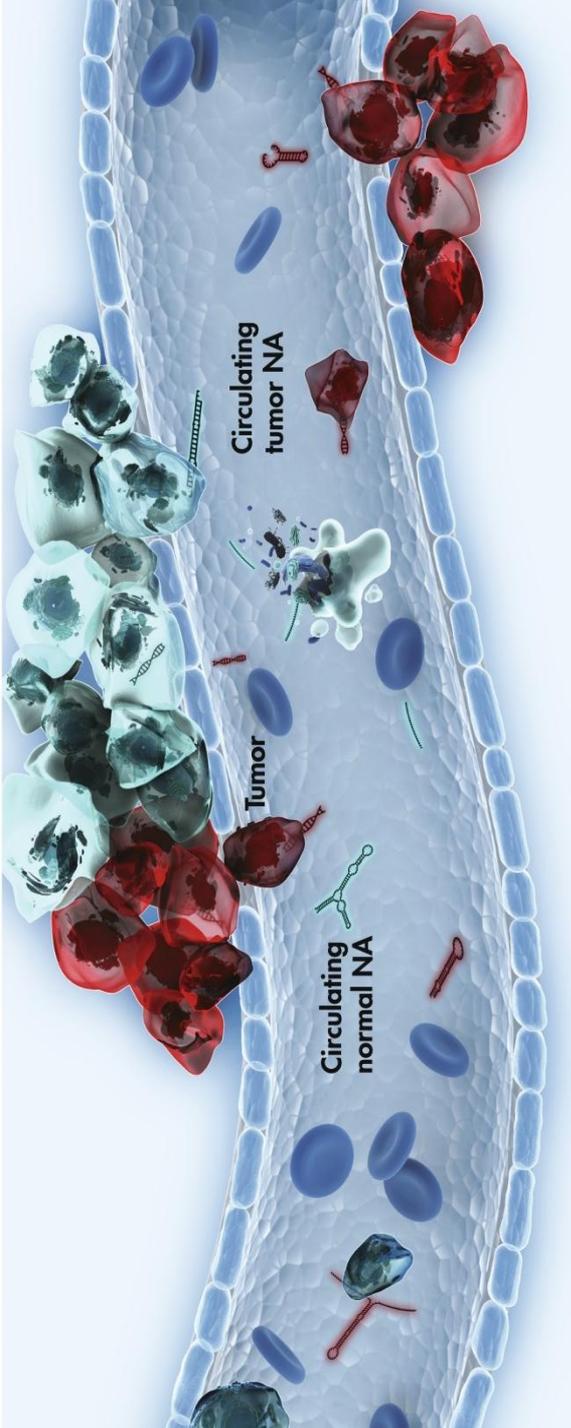
2014 : ...si incoraggia la diffusione del citoincluso. Limite minimo di 100 cellule tumorali per l'esecuzione dell'analisi mutazionale di EGFR

➤ Cellule Tumorali Circolanti

Determinazione mutazioni di EGFR usata ancora solo per ricerca

➤ Siero/plasma

2014:... EMA (European Medicines Agency) approva , per la somministrazione dell'IRESSA, l'uso della determinazione delle mutazioni di EGFR nel **ctDNA** (circulating tumour DNA) ottenuto dal **sangue**, in quei pazienti dove il **tessuto tumorale non è disponibile o è esaurito**.



therascreen EGFR plasma RGQ PCR Kit

Kit Purpose

The *therascreen* EGFR Plasma RGQ PCR Kit is a **real-time PCR test** for the qualitative detection of mutations of the EGFR gene in circulating DNA derived from plasma from whole blood collected in EDTA tubes of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients.

The test is intended to be used as an aid to identify patients with NSCLC for whom Gefitinib, an EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI), may be indicated.

Kit format

21 mutations covered with the kit

Most frequent and clinically proven mutations:

- **exon 19 deletions**
- **L858R point mutation**
- **T790M point mutation – Resistance mutation**

Extraction Kit

QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (cat#: 55114)

Tumor/plasma EGFR status concordance in the IFUM study

Tumour and plasma 1 – screened patients evaluable for both samples (N = 652)					
	Plasma 1 <i>EGFR</i> mutation status (n)				
	Positive		Negative		Total
Adjusted baseline tumour <i>EGFR</i> mutation status, n					
Positive	69		36		105
Negative	1		546		547
Total	70		582		652
	Exon 19 deletions	L858R	L858R and T790M	Negative	Total
Exon 19 deletions	48	0	0	23	71
L858R	0	21	0	12	33
L858R and T790M	0	0	0	1	1
Negative	0	1	0	546	547
Total	48	22	0	582	652
	N		Rate (%)		95% CI
Concordance	652		94.3		92.3–96.0
Sensitivity	105		65.7		55.8–74.7
Specificity	547		99.8		99.0–100.0
PPV	70		98.6		92.3–100.0
NPV	582		93.8		91.5–95.6
<p>For the comparison of tumour and plasma data, the tumour DNA mutation status was adjusted for the mutations analysed in cfDNA from plasma (i.e. for exon 19 deletions, L858R point mutations and T790M point mutations only). Abbreviations: cfDNA = circulating free tumour DNA; CI, confidence interval; <i>EGFR</i> = epidermal growth factor receptor; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value.</p>					

Percentuale di cellule neoplastiche e sensibilità delle metodiche

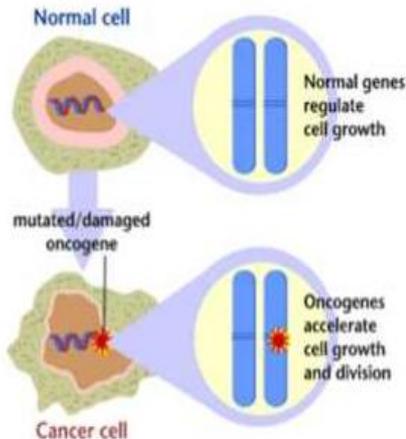
Caratteristiche del campione istologico

(Raccomandazioni 2010)

“ Se si utilizzano procedure di analisi mutazionale standard (sequenziamento diretto) è necessario che siano presenti almeno il 50% di cellule neoplastiche nel campione ”

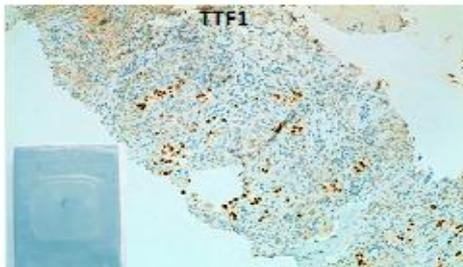
(Raccomandazioni 2014)

“Tuttavia , in presenza di una percentuale di cellule tumorali inferiore al 30% è indispensabile impiegare metodiche a più elevata sensibilità “



Piccoli campioni o Biopsie

Expert Consensus Opinion

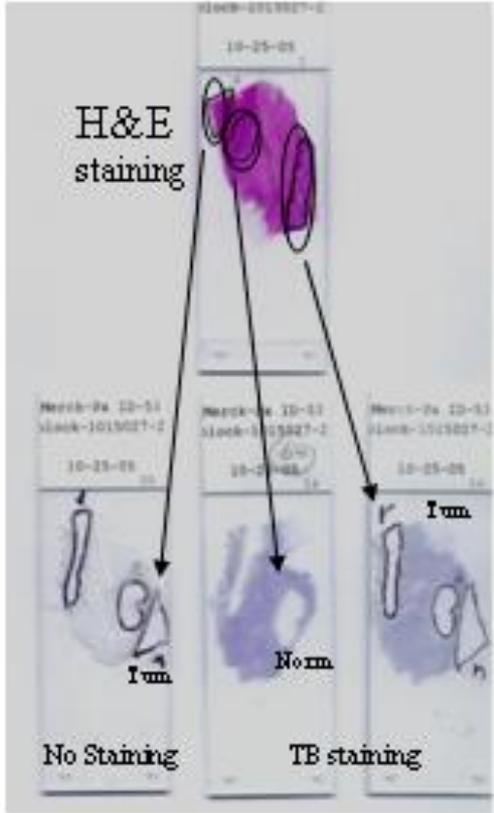


The main problem with small specimens is the possibility of **False-negative results**

Avoid Sanger sequencing on these samples

Tissue dissection before DNA extraction

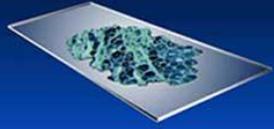
Manual
(macrodissection)



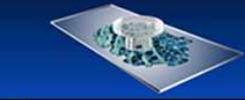
Laser capture
microdissection



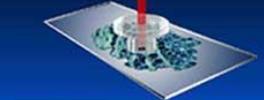
Step 1
A small plastic cap (4 mm diameter) is placed over the area containing the target cells



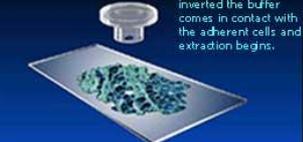
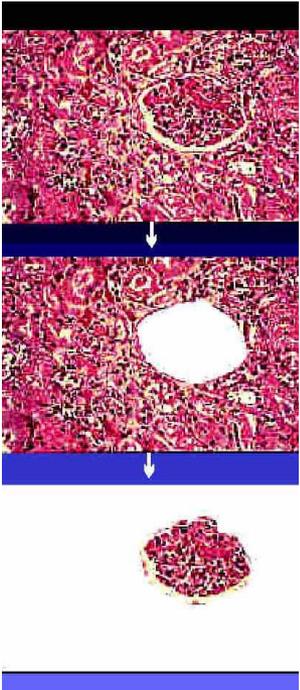
Step 2
A brief pulse from a low-energy laser is used to melt the thermoplastic membrane at the bottom of the cap so that the targeted cells become adherent to the membrane. Maximal resolution is approximately 7.5 microns.



Step 3
When the cap is removed, the adherent cells are lifted away from the remainder of the section



Step 4
a. The cap, with adherent cells, is transferred to a 0.5 ml eppendorf tube containing extraction buffer.
b. When the tube is inverted the buffer comes in contact with the adherent cells and extraction begins.

EGFR: tecniche di analisi mutazionale

Recommendation

“laboratories may use any validated EGFR testing method (possibility used in previous clinical trial - subjected to EQA schemes)”

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%

Sequenziamento diretto (Sanger)

Sanger Sequencing method

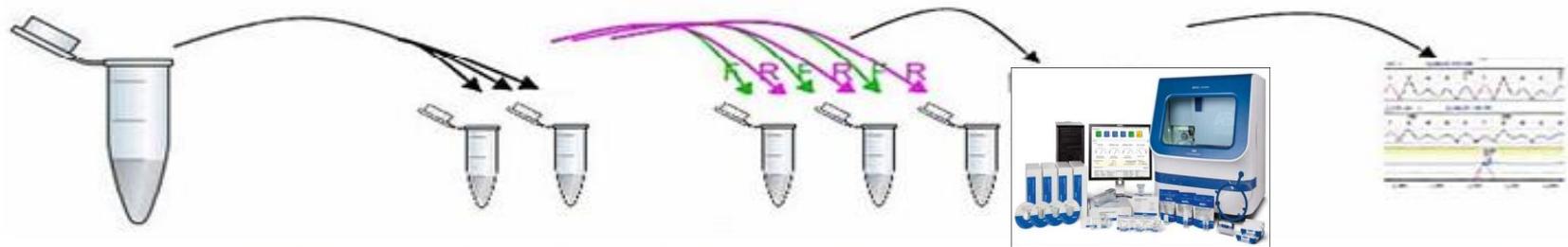
Advantages

- Technology is available in many molecular biology labs
- All mutations, including novel mutations, may be detected

Disadvantages

- Laborious and Time consuming
- Sensitivity tends to be lower than targeted methods (20%)
- The method is not standardized (several critical steps)

Recommendations for PCR sequencing



PCR

Two independent PCR reactions should be carried out

Sequencing

Forward and reverse sequencing reactions should be carried out

Sequence analysis

If novel mutations are identified, they must be verified

PCR Real Time

Diagnostic Kits

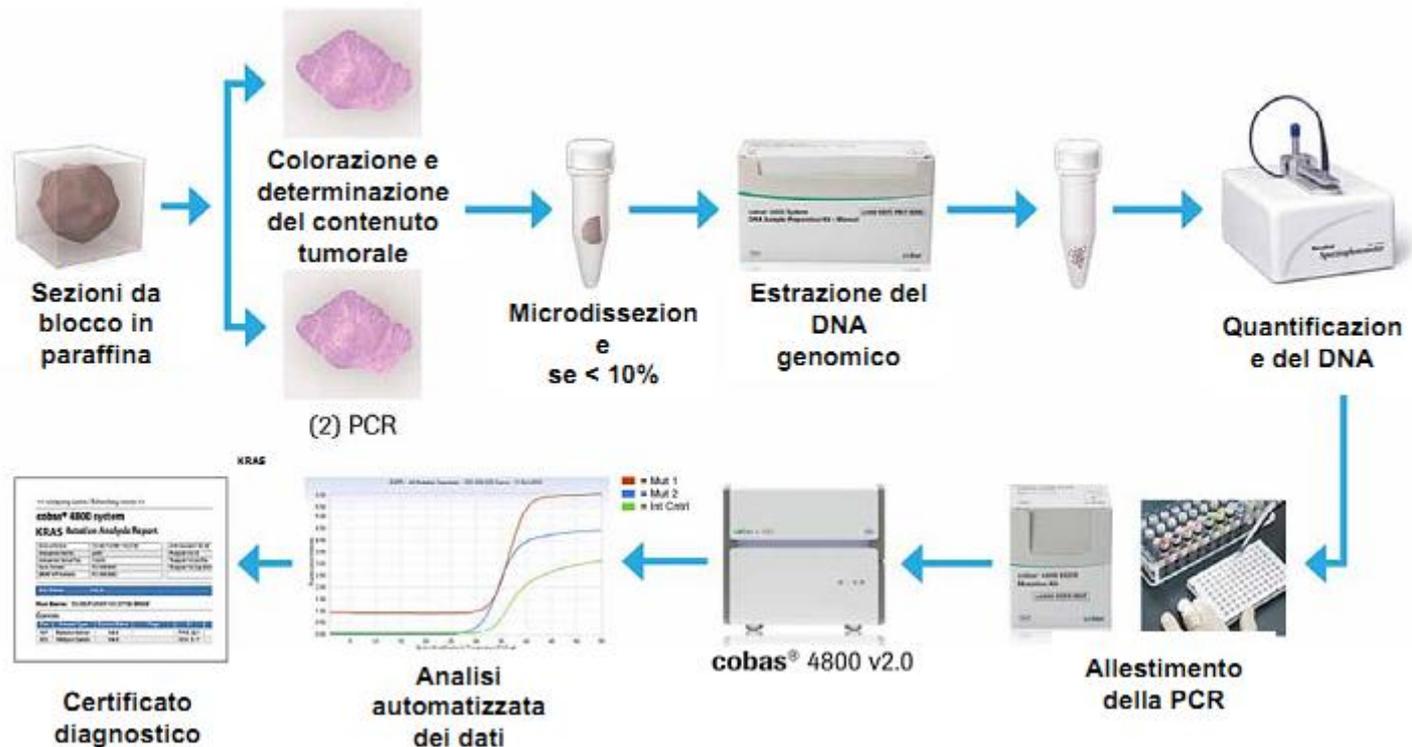
Advantages

- Kits are based on standardized protocols
- More rapid and sensitive
- Positive and negative controls are provided
- Generally, Europe CE-IVD approved

Disadvantages

- Mutations not assayed for may be missed
- Reagents may be more expensive

PCR Real Time workflow Cobas EGFR Mutation Test in <8 ore



Therascreen EGFR

Real time PCR con tecnologia ARMS e Scorpio
Therascreen® mutation kit

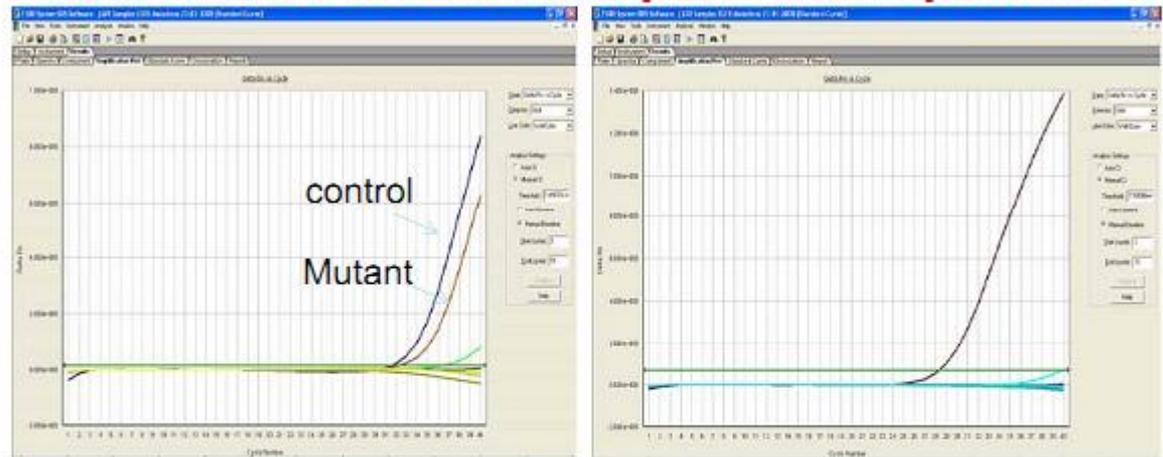


Kit validato:
EGFR29 Mutation Kit
 per identificazione di 29 mutazioni



Rotor Gene

Real-time PCR with scorpion-ARMS primers



Mutated

Wild type

- Simple to interpret
- Labs with no experience of real-time PCR may find it takes longer to become familiar with the assays

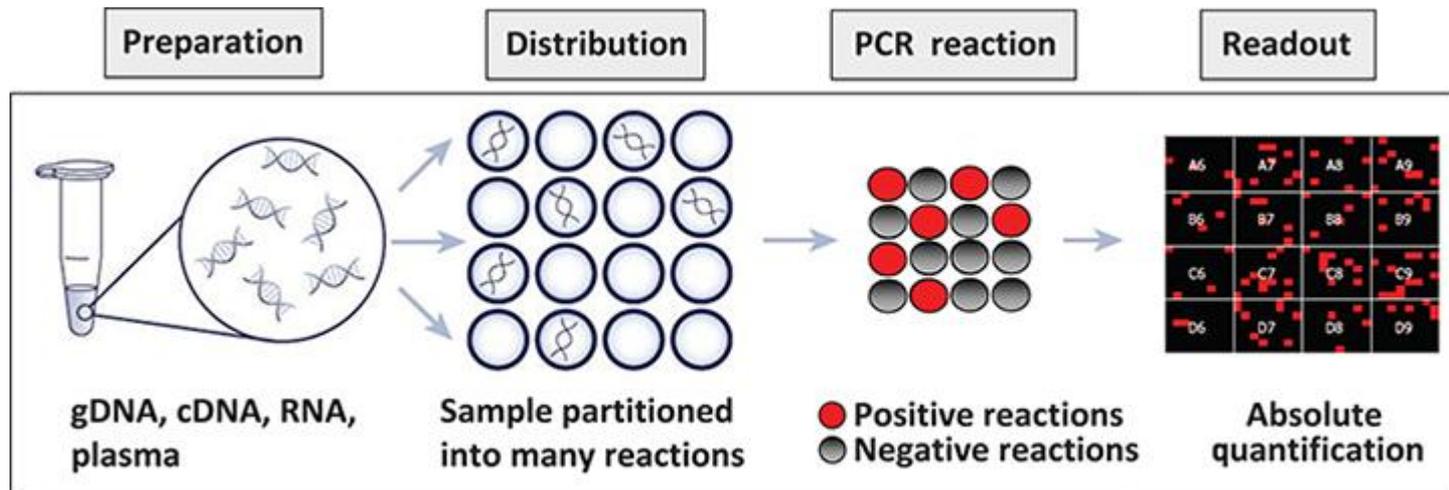
Pannello di mutazioni rilevata dal kit

Mutation	Exon	Base Change	Conic Et
L758P	20	2265 C>T	6280
L858R	21	2573 T>C	6024
L861Q	21	2583 C>A	6023
T790M	20	2205 G>T	6281
G719A	18	2150 C>C	6279
G719S	18	2150 C>A	6282
G719C	18	2150 C>T	6283
Inversione	20	2202_2203del	12176
		2219_2220delCAG	12177
		2220_2221insGGCT	12178
Delezione	19	2235_2249del13	6272
		2235_2252del (complex)	1251
		2236_2254del19	7278
		2237_2254del13	12678
		2237_2254del18	12682
		2237_2255del (complex)	12684
		2238_2254del13	6271
		2238_2254del19	6285
		2238_2248del (complex)	12472
		2238_2252del (complex)	12473
		2239_2254del	6278
		2239_2254del13	6274
		2239_2254del18	6283
		2239_2248TTAGGAGAGC (complex)	12282
		2239_2239delCA (complex)	12287
		2240_2254del13	6275
		2240_2254del18	12370
2240_2254del13	12369		
2229_2231delC (complex)	12281		

Digital PCR



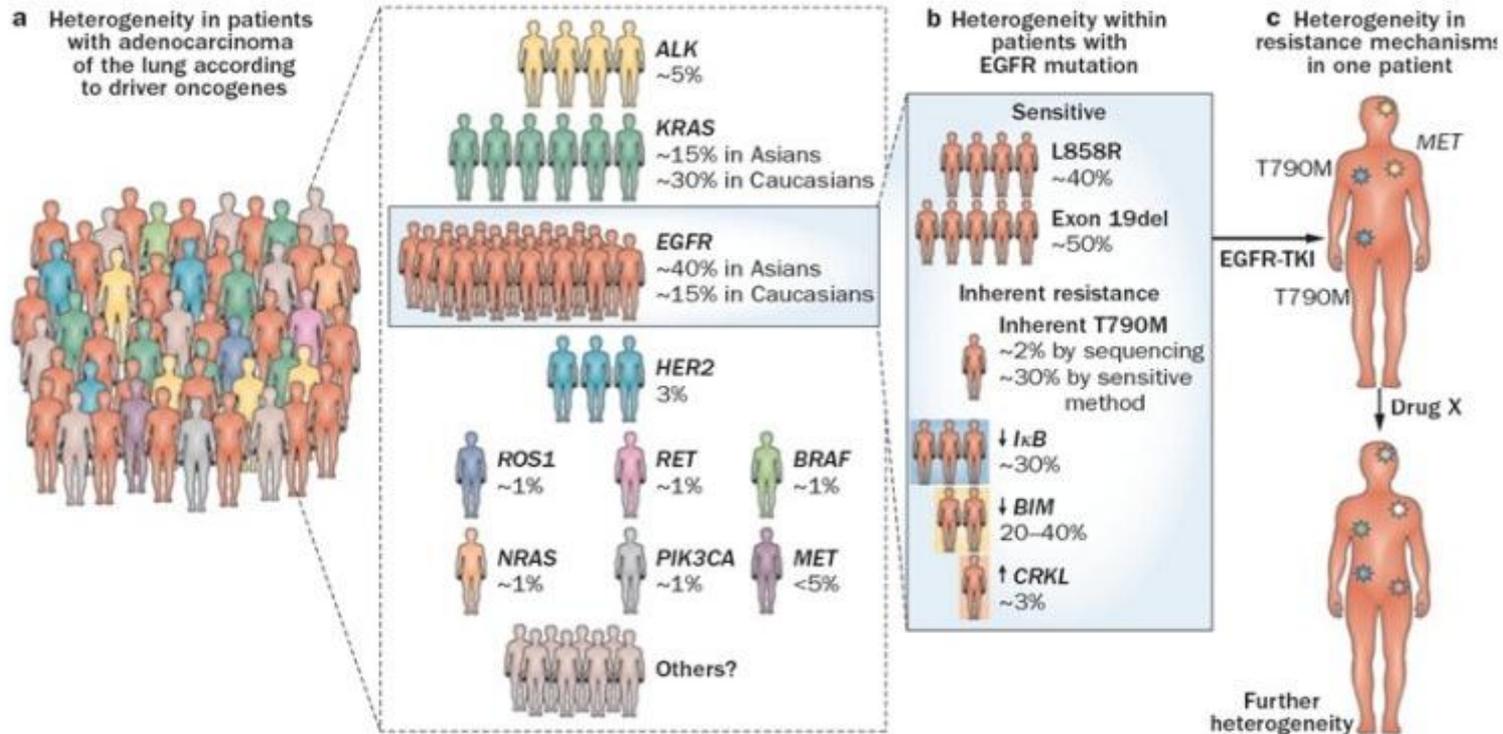
- Quantificazione assoluta
- Quantità minima di DNA (2ng)
- Sensibilità 0.1%



Eterogeneità tumorale

The efficacy of targeted therapy is affected by

TUMOR HETEROGENEITY



Multimarker Assays



Next generation sequencing



NGS-based Cancer Panels

Necessari studi di validazione e controlli di qualità prima dell'inserimento di queste nuove tecnologie nella pratica clinica.

Serie di problematiche riguardanti la gestione dei dati:

- interpretazione del significato di mutazioni rare
- estensione della caratterizzazione molecolare oltre i parametri normalmente richiesti dalla pratica clinica.

Truseq Amplicon Cancer Panel

Table 1: TSACP Cancer-Related Genes

ABL1	EGFR	GNAS	MLH1	RET
AKT1	ERBB2	HNF1A	MPL	SMAD4
ALK	ERBB4	HRAS	NOTCH1	SMARCB1
APC	FBXW7	IDH1	NPM1	SMO
ATM	FGFR1	JAK2	NRAS	SRC
BRAF	FGFR2	JAK3	PDGFRA	STK11
CDH1	FGFR3	KDR	PIK3CA	TP53
CDKN2A	FLT3	KIT	PTEN	VHL
CSF1R	GNA11	KRAS	PTPN11	
CTNNB1	GNAQ	MET	RB1	

Cancer-related genes represented in the TSACP. For a full list of target regions, see the manifest file* (Myillumina login required).

Ion Ampliseq Cancer Panel v2

ABL1	EZH2	JAK3	PTEN
AKT1	FBXW7	IDH2	PTPN11
ALK	FGFR1	KDR	RB1
APC	FGFR2	KIT	RET
ATM	FGFR3	KRAS	SMAD4
BRAF	FLT3	MET	SMARCB1
CDH1	GNA11	MLH1	SMO
CDKN2A	GNAS	MPL	SRC
CSF1R	GNAQ	NOTCH1	STK11
CTNNB1	HNF1A	NPM1	TP53
EGFR	HRAS	NRAS	VHL
ERBB2	IDH1	PDGFRA	
ERBB4	JAK2	PIK3CA	

I criteri per lavorare in sicurezza

Laboratorio

- Accreditato
- Superamento controlli di Qualità AIOM-SIAPECi/Europei

Campioni

- Campione più rappresentativo
- Definire la % delle cellule tumorali
- Procedere alla macrodissezione se necessario

Analisi molecolare

- Scelta della metodologia/tecnologia
- Sensibilità del metodo
- tempo di refertazione tra 7-10 giorni

Report

- Chiaro e completo di informazioni

Conclusioni

- **L'analisi mutazionale di EGFR è un importante aspetto per le decisioni terapeutiche nei pazienti affetti da NSCLC**
- **I risultati del test devono essere validati e riproducibili per essere applicati in clinica (CQ esterni)**
- **E' possibile determinare le mutazioni di EGFR nel plasma**
- **Nuove tecnologie di NGS permetteranno di individuare nuove mutazioni per selezionare quei pazienti che possano beneficiare di nuovi farmaci**

“è più importante conoscere che tipo di persona ha una malattia, piuttosto che conoscere il tipo di malattia che una persona ha”

Ippocrate

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

oncolab@hotmail.com

Programma di Controllo di qualità per l'Analisi Mutazionale di EGFR promosso da AIOM e SIAPEC-IAP



The Italian AIOM-SIAPEC quality assurance program for EGFR testing

- Selection of NSCLC specimens with at least 50% tumor cells
- Analysis of tissues in at least three different reference laboratories with at least two different techniques
- Selection of 10 cases (3 small biopsies, 7 surgical biopsies) for which 100% concordance was reached among reference laboratories
- Shipment of 1 slide (10 μ M) for each case to the centers that joined the program
- Centers can run the molecular analysis with the technique that they routinely use

	EGFR NSCLC 2011	EGFR NSCLC 2013
Centri aderenti	47	86
Centri validati	41 (87%)	69 (75%)

La lista dei centri che hanno superato il CQ è pubblicato sul sito web di AIOM e SIAPEC www.aiom.it, portale Biogate



CONTROLLO DI QUALITA' EGFR

II

**Laboratorio di Biologia Molecolare – S.C. di Oncologia Medica
dell'A.O. Santa Maria della Misericordia di Perugia**

*ha superato il controllo di qualità per la determinazione dello stato
mutazionale del gene EGFR nel carcinoma polmonare, promosso
da AIOM e SIAPEC-IAP nel 2011.*

Dr. Carmelo Iacono

Presidente AIOM

Prof. Claudio Clemente

Presidente SIAPEC-IAP

Palermo, 27 ottobre 2011



CONTROLLO DI QUALITA' NAZIONALE PER LA DETERMINAZIONE DELLE MUTAZIONI DI EGFR NEL CARCINOMA POLMONARE 2013

**Laboratorio di Biologia Molecolare - S.C. di Oncologia Medica
Azienda Ospedaliera Santa Maria della Misericordia di Perugia**

*ha superato il controllo di qualità per la determinazione delle
mutazioni di EGFR nel carcinoma polmonare, promosso da AIOM
e da SIAPEC-IAP nel 2013*

Prof. Stefano Cascinu

Presidente AIOM

Prof. Claudio Clemente

Presidente SIAPEC-IAP

Roma, 30 ottobre 2013

Casistica EGFR

Gennaio 2011-Novembre 2015

CAMPIONI RICHIESTI:1209

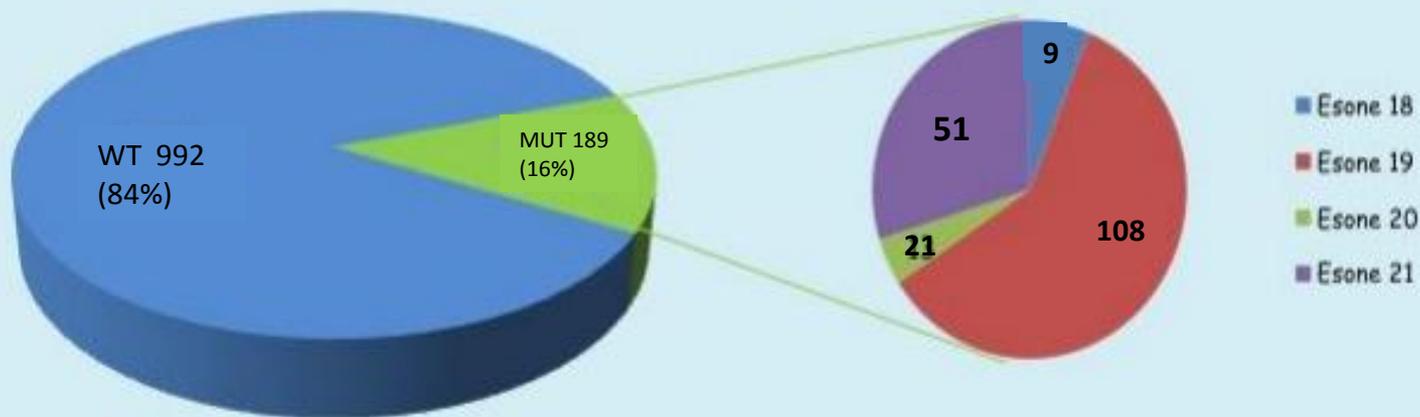
B. Bronchiali: 423 (35,8%)

Chirurgici: 207 (17.5%)

Agobiopsie: 342 (29%)

Metastasi: 209 (17.7%)

Campioni analizzati: 1181



Anno 2015 (n. 245): Materiale insuff: 21(8.5%)

Raccomandazioni AIOM-SIAPEC 2014

Indicazioni cliniche

- **Pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) in stadio IIIB e IV.**
- **Istotipo adenocarcinoma, carcinoma a grandi cellule, carcinoma misto con adenocarcinoma, e NSCLC non altrimenti specificato (NAS).**
- **Nei pazienti non fumatori, deboli fumatori (< 15 pacchetti/anno o ≤ 5 sigarette al giorno) ed ex-fumatori (da ≥ 15 anni) con gli istotipi suddetti, in cui non è disponibile un adeguato materiale, può essere indicato un ulteriore prelievo bioptico.**

Quali metodi dovrebbero essere usati per il test di EGFR?

Esiste una metodologia analitica ottimale?

.....**NO**

La pratica clinica dovrebbe prevedere più metodologie di analisi

•La scelta della metodica da impiegare per le analisi mutazionali dipende da una serie di parametri:

- % di cellule presenti nel campione
- quantità di DNA a disposizione
- tipo di mutazione che dobbiamo ricercare