NSCLC: dalle mutazioni di EGFR alla traslocazione di ROS1

Silvia Novello silvia.novello@unito.it

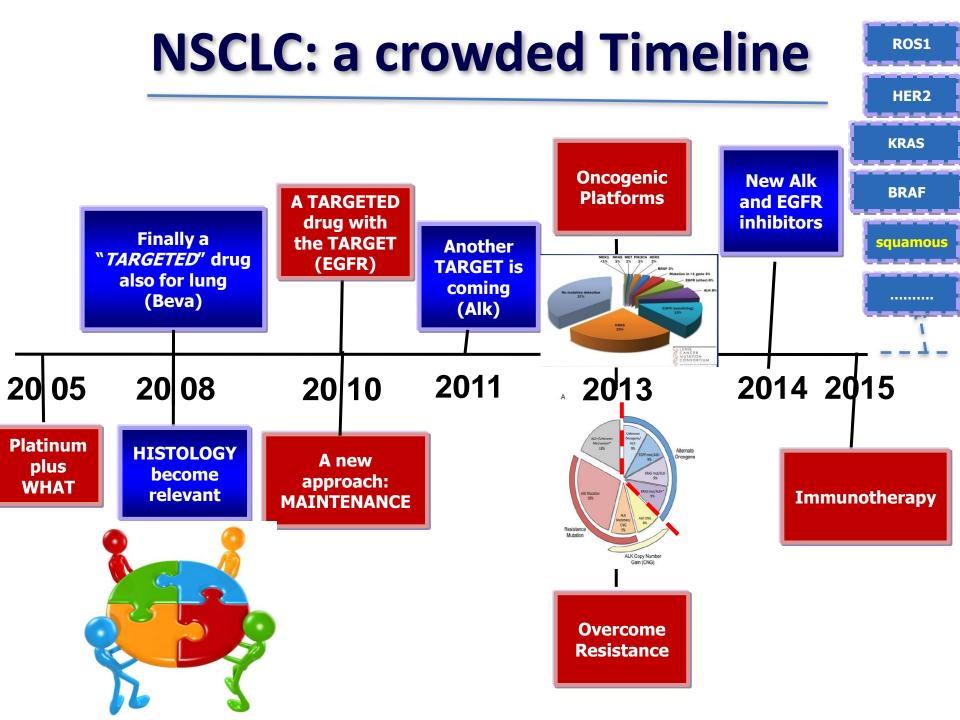




ONCOLOGIA AL FEMMINILE 2015

Un filo sottile per coniugare i progressi scientifici con la pratica clinica, le linee guida e l'etica







La multisciplinarietà alla diagnosi





I Gruppi Interdisciplinari Cure (GIC)







Il Gruppo Interdisciplinare Cure (GIC) riunisce al proprio interno medici di diversa specializzazione appartenenti a differenti Unità Operative che, attraverso una visione complessiva della persona malata e dunque grazie all'interdisciplinarità dell'annoccio clinico, stabiliscono i nercorsi di cura niù annonriati



LA RICERCA HA BISOGNO DI GRANDI CAPITALI. QUELLO UMANO LO METTIAMO NOI.

GIC (Gruppi Interdisciplinari Cure)

Per garantire al paziente il più efficace approccio assistenziale sono stati istituiti i Gruppi Interdisciplinari Cure (GIC).

I GIC sono strumenti operativi della Rete Oncologica Piemontese e sono composti da medici di diverse specializzazioni (oncologi, radioterapisti, chirurghi, specialisti d'organo, ecc.) che, in tempi diversi, durante l'iter della malattia, prendono in carico il paziente e lo sottopongono al trattamento terapeutico più appropriato, deciso collegialmente con approccio multidisciplinare.

I G.I.C. sono composti dagli specialisti afferenti a tutte le specialità coinvolte nelle diverse tipologie di percorsi clinici dei pazienti oncologici e garantiscono:

Impact of Lung MDT



Table 3 Impact of MDT meetings on management plans $(n^{\dagger} = 55)^{\ddagger}$

| | N | % |
|---|----|----|
| Change in management plans | 32 | 58 |
| Radical cases | 23 | 72 |
| Palliative cases | 9 | 28 |
| Change due to: | | |
| Additional investigations | 19 | 59 |
| Imaging | 8 | |
| Biopsy | 4 | |
| Imaging + biopsy | 3 | |
| Others [§] | 4 | |
| Change in | | |
| Treatment modality | 6 | 19 |
| Treatment intent | 3 | 9 |
| Tumor histology | 2 | 6 |
| Tumor stage | 2 | 6 |
| No change in management plans | 23 | 42 |
| No change due to: | | |
| No change in management plans | 20 | 87 |
| Unable to make decision (lack of information) | 3 | 13 |

[†]n, number. [‡]13 patients were excluded. [§]Other investigations include respiratory function test, n = 1; molecular testing, n = 1; tuberculosis testing, n = 1; transthoracic echocardiogram, n = 1. MDT, multidisciplinary team.

- Il controllo qualitativo viene effettuato mediante assemblaggio delle sequenze con un software dedicato all'analisi delle sequenze, lettura dell'elettroferogramma e confronto con la sequenza
- l software per l'analisi di sequenza devono essere impostati con livelli soglia più bassi di quelli utilizzati per l'analisi dei polimorfismi nel DNA della linea germinale.
- Un campione può essere definito positivo per mutazione se questa è presente in almeno due diverse sequenze (una forward ed una reverse) ottenute da PCR indipendenti. Nel caso venga evidenziata una nuova mutazione (mai riportata
- precedentemente) o una mutazione rara (riportata 1-2 volte nei database internazionali) questa deve essere verificata in due ulteriori amplificati PCR.
- · Ad intervalli di 25-30 sequenze, deve essere sequenziato un DNA di controllo per verificare l'assenza di contaminazioni e la

Raccomandazioni per altre metodiche d'analisi Analisi mediante REAL-TIME PCR

Diverse metodiche basate sull'impiego della Real Time PCR posso-no essere utilizzate per la individuazione delle mutazioni dell'EG-FR. È attualmente disponibile in commercio un kit basato sulla tecnologia ARMS/Scorpion in grado di individuare 29 diverse mutazioni dell'EGFR tra cui quelle più frequentemente descritte in letteratura nei pazienti con NSCLC (TheraScreen: EGFR29 Mutation Kit). La sensibilità teorica della metodica è tale da individuare mutazioni quando le copie di DNA mutato rappresentano circa l'1% del DNA totale, Tuttavia, è da sottolineare che la metodica individua una mutazione se nel campione sono presenti almeno 5-10 copie di DNA mutato. Pertanto, l'analisi effettuata su di un numero esiguo di cellule potrebbe comunque risultare in un fals

È possibile sviluppare metodiche alternative di Real Time PCR basate su discriminazione allelica per la individuazione di mutazion dell'EGFR. Queste dovrebbero essere in grado di individuare le principali mutazioni dell'EGFR riportate in letteratura negli esoni 19 e 21 ed, eventualmente, negli esoni 18 e 20.

Raccomandazioni generali:

- Le reazioni devono essere allestite sotto cappa a flusso laminare, in un ambiente diverso da quello utilizzato per l'analisi dei prodotti di amplificazione, impiegando materiali dedicati e con le opportune precauzioni onde evitare contaminazioni (guanti, puntali con filtro, ecc.)
- Appropriati controlli positivi e negativi devono essere inclusi in ogni singola determinazione
- Le reazioni devono di norma essere eseguite in duplicato. Per
 il kit Therascreen, provvisto di una serie di controlli interni, i centri possono anche eseguire la determinazione su singolo pozzetto, dopo una opportuna fase di apprendimento Ogni laboratorio dovrebbe validare la metodica di Real Time
- PCR in via preventiva utilizzando diluizioni di DNA mutato in DNA non-mutato da linee cellulari il cui stato mutazionale di EGFR sia conosciuto. La sensibilità delle metodiche basate sulla tecnologia ARMS dovrebbe raggiungere l'196; per i saggi basati sulla discriminazione allelica è stata descritta una sensibilità di

Analisi mediante Pirosequenziamento

Il Pirosequenziamento è una tecnologia di sequenziamento me diante sintesi. La tecnica consente il monitoraggio in tempo reale della sintesi di DNA mediante il rilevamento della bioluminescenza prodotta al termine di una cascata di reazioni enzimatiche innescata dall'incorporazione di un nucleotide.

Le metodiche di pirosequenziamento hanno in teoria alcuni van-taggi rispetto al sequenziamento standard, tra cui la maggiore sensibilità (riportata tra il 5 ed il 10%) e la possibilità di sequen-ziare frammenti piuttosto corti di DNA, superando in tal modo eventuali problematiche legate alla frammentazione del DNA.

Sono stati recentemente commercializzati anche kit per uso clinico per la determinazione dello stato mutazionale dell'EGFR mediante tecniche di pirosequenziamento. Tuttavia, non sono disponibili in letteratura esperienze già condotte con tale metodica, la cui sensibilità e specificità dovrebbero pertanto essere determinate in ogni singolo laboratorio prima di procedere al loro impiego clinico. Come per le metodiche sopradescritte, particolare attenzione deve essere tenuta nella preparazione dei campioni ed opportuni con-trolli positivi e negativi devono essere impiegati in ogni reazione.

- La refertazione è parte integrante della procedura diagnostica e dovrebbe contenere le seguenti info
- L'identificazione del paziente e del medico/struttura che ha ri-
- Il materiale utilizzato per l'analisi e la percentuale di cellule
- La metodica impiegata per l'esecuzione dell'analisi.
- Le mutazioni indagate nel caso delle metodiche a bersaglio mo-
- I risultati del test, con specificazione del tipo di mutazione even-
- Il referto deve essere compilato su un modello prestabilito e fir Il reerro deve essere compiuato su un modeio prestatuiro e manto dall'anatomo patologo e dall'esecutore del test molecolare. In considerazione dell'impatto sulla strategia terapeutica, il tempo per la refertazione non deve superare le due settimane dalla ri-chiesta della determinazione

Referenze bibliografiche
Clardiello F, Tortora G: EGFR antagonists in cancer treatment. N Engl J Med

Cladeline F, Tortura G; EDFR antagonitrs in cancer treatment. N Engl J Med Debrated DA, Quicome G, Johnson BR. 1905. Small-Cell Ling Gloric Working Group, Bionarkers of response to epideranal growth factor receptor inhibitors. Non-Small-Cell Ling Gloric periodic Region of the Company of the



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

Aggiornamento Marzo 2014

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

AIOM: Nicola Normanno (Napoli), Andrea Ardizzoni (Parma), Lucio Crinò (Peruaia), Cesare Gridelli (Avellino), Giorgio Scagliotti (Torino), Carmine Pinto (Bologna)

SIAPEC-IAP: Antonio Marchetti (Chieti), Massimo Barberis (Milano), Claudio Clemente (Milano), Eugenio Maiorano (Bari), Mauro Papotti (Torino), Giulio Rossi (Modena), Gianluigi Taddei (Firenze), Gaetano De Rosa (Napoli)





tumore primitivo e/o della metastasi. 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 ulterio re prelievo bioptico per permettere la successiva determinazion molecolare quando clinicamente indicato.

Il materiale biologico per l'anglisi molecolare

Un campione di tessuto è disponibile in circa il 50% dei pazien-ti con NSCLC ed è ottenuto al momento della diagnosi (biopsia bronchialel, o nel corso di intervento chirurgico (campione chi-rurgico). Il tessuto, fissato in formalina ed incluso in blocco di paraffina, è indispensabile per la diagnosi istologica ed è conservato negli archivi delle Anatomie Patologiche. Purtroppo, in una elevata percentuale di pazienti non è disponibile un campione tessutale. In molti di questi casi dispone di materiale citologico, ottenuto mediante agoaspirazione, lavaggio broncoalveolare o "scra-ping" bronchiale. I campioni citologici possono essere archiviati diversamente a seconda dei centri: striscio citologico su vetrino citoinclusione, cellule in sospensione in fissativi a base alcolica (cytolit). In rari casi nessun materiale biologico è disponibile.

L'esame mutazionale di EGFR può essere condotto, con alta proba-bilità di successo, su tessuti fissati ed inclusi. L'assenza di tessuti disponibili per molti pazienti, ha indotto ad esplorare la possibilità di effettuare esami molecolari su materiale citologico, siero o plasma. Relativamente ai prelievi citologici, i risultati ottenuti in alcuni studi esplorativi sono incoraggianti tanto da suggerire l'introduzione delle procedure nella pratica clinica, almeno nei casi con maggiore disponibilità di cellule neoplastiche. Pertanto i campioni citologici possono essere utilizzati, se adeguati secondo l'esperienza del centro di analisi. A tale riguardo, va però sottolineato che l'analisi di campioni con basso contenuto di cellule neoplastiche può produrre falsi negativi, legati ai limiti di detezione delle metodiche impiegate, e falsi positivi, per la elevata probabilità di artefatti. I dati ottenuti su siero e plasma sono ancora da considerarsi solo di interesse speculativo per una seri di motivi quali la sensibilità delle analisi risultata non superiore al 50-60%, l'assenza di validazione dei dati in ampi studi, la necessità di utilizzare tecnologie al momento di complessa gestione e ad alto costo

Quantità di tessuto/cellule neoplastiche per l'analisi molecolare Le comuni metodiche per la determinazione di mutazioni soma-

tiche su tessuto prevedono la purificazione e la quantificazione del DNA prima dell'amplificazione mediante PCR. Ciò è possibile solo se si dispone di una sufficiente quantità di tessuto neoplastico, in pratica corrispondente a circa cinque sezioni di 10 micron di una biopsia bronchiale di medie dimensioni. In presenza di poche cellu-

Il campione di tessuto da sottoporre ad analisi molecolare risulta frequentemente eterogeneo: accanto ad aree di carcinoma polmonare possono essere presenti aree di necrosi, aree flogistiche e componenti tessutali normali. La possibilità di individuare mutazioni geniche è condizionata dalla percentuale di cellule neoplastiche nel campione. La percentuale minima per l'espletamento dell'esame non è facilmente quantificabile e dipende dalla sensibilità della metodica d'analisi. Se si utilizzano procedure di analisi mutazionale standard (sequenziamento diretto) si suggerisce la presenza di almeno il 50% di cellule neoplastiche. Pertanto, prima dell'estrazione de DNA, l'anatomopatologo deve valutare le caratteristiche del tessuto in esame ai fini di una eventuale macrodissezione e, nel caso questa si rendesse necessaria, selezionare le aree del campione più ricche di cellule tumorali. La macrodissezione viene eseguita su sezioni di tessuto paraffinato dello spessore di 10 micron montate su vetrino portaoggetto. La raccolta delle sezioni su vetrino si effettua in acqua distillata priva di gelatina in recipienti monouso (capsula Petri. beaker) per evitare inquinamenti. Quindi le sezioni vengono fatte essiccare sul vetrino a temperatura ambiente e sottoposte a macrodissezione manuale mediante la lama di un bisturi o un ago da siringa. Il tessuto dissezionato viene raccolto in un tubo Eppendorf, sparaffinato in appropriato solvente, lavato in alcool e disidratato prima di iniziare l'estrazione del DNA. Nel caso di piccole biopsie sotrebbe rendersi necessaria la microdissezione laser. Quest'ultima netodica, per quanto utile in mani esperte, ha al momento alcune principali limitazioni: a) prevede una costosa strumentazione e personale dedicato (anatomopatologi) con esperienza nel settore specifico; b) richiede lunghi tempi di esecuzione; c) può favorire l'insorgenza di artefatti, (falsi positivi e falsi negativi) per la scarsa quantità e la qualità non ottimale del DNA ot

Preparazione del campione citologico

Il materiale d'archivio è di solito rappresentato da preparati citolo gici strisciati, colorati e montati su vetrino o da materiale citologico incluso in blocchi di paraffina (citoincluso). Nel caso del materiale strisciato su vetrino, è necessaria la rimozione del coprioggetto in cilolo per circa 72 ore seguita da lavaggi delle cellule in etanolo. Le aree del vetrino contenenti il maggior numero di cellule neopla-stiche vengono quindi demarcate e le cellule presenti in tali aree rimosse dal vetrino mediante la lama di un bisturi o un ago da sininga e poste in un tubo Eppendorf. Se il campione contiene isolati gruppi microscopici di cellule tumorali la migliore soluzione è la ne laser, purtroppo non disponibile in tutti i centri.

Per il materiale citoincluso si effettua un congruo numero di sezioni da 10 micron che vengono raccolte in un tubo Eppendorf. Le sezioni vengono sparaffinate (vedi sopra), lavate in alcool e disidratate pri-



ma di proseguire con le procedure di analisi. Anche in questo caso, se necessario possono essere effettuate dissezioni manuali o laser.

Metodi di estrazione e quantificazione del DNA

La qualità e la quantità del DNA estratto dai campioni biologici è di notevole importanza per le successive analisi molecolari. Un DNA di scadente qualità può ostacolare l'amplificazione PCR e inficiare il risultato dell'analisi generando risultati falsi negativi o falsi positivi. Il metodo di estrazione deve essere molto affidabile e deve generare quanto più DNA possibile dal campione in esame. Per l'estrazione e la purificazione del DNA da tessuto paraffinato sono oggi disponibili vari kit commerciali, in genere basati sul principio della cromatografia, che hanno il vantaggio di accorciare notevolmente i tempi tecnici rispetto alla metodica classica basata sull'estrazione in fenolo-cloroformio e la purificazione mediante precipitazione in alcool. Sono anche disponibili kit per estrazione di DNA da micro campioni quali piccole biopsi o materiale citologico. Il vantaggio principale nell'utilizzo di tali kit è che essi sono corredati di protocolli di semplice esecuzione e consentono una standardizzazione delle procedure. Una volta

estratto, il DNA viene risospeso in un tampone adeguato. La quantificazione del DNA è una pratica utile perché può permettere di ottimizzare il processo di amplificazione e di conoscere quanti esami sono possibili a partire dal DNA estratto. Tuttavia la procedura non è indispensabile e può essere evitata nel caso in cui la quanti tà di DNA disponibile sia molto limitata. Per la quantificazion DNA estratto da tessuti in paraffina, una PCR quantitativa è molto più accurata della spettrofotometria, in quanto permette di valutare direttamente l'amplificabilità del DNA estratto.

Protocolli alternativi in carenza di materiale.

Qualora le cellule neoplastiche nel materiale bioptico o citologico siano ritenute insufficienti per la purificazione del DNA è possibile procedere con metodiche alternative che prevedono la sospensione e lisi delle cellule tumorali in tamponi contenenti proteasi (95°C). Dopo inattivazione enzimatica tramite calore [10 min a 95°C] il campion viene direttamente sottoposto ad amplificazione mediante PCR.

Amplificazione mediante PCR del gene EGFR

La presenza di mutazioni attivanti il dominio tirosino-chinasico del gene EGFR è attualmente indispensabile per l'uso di farmaci anti-EGFR nella I linea di trattamento del NSCLC. Poiché mutazioni attivanti sono state descritte negli esoni 18-21, questi 4 esoni dovrebbero essere sottoposti ad amplificazione mediante PCR e successiva analisi mutazionale. Considerata la scarsità del materiale biologico disponibile in alcuni casi, la priorità va data alla determinazione delle mutazioni degli esoni 19 e 21 che risultano le più frequenti; in caso di negatività e di disponibilità di DNA, anche gli esoni 18 e 20 dovreb bero essere analizzati. Il prodotto della PCR può essere utilizzato per il sequenziamento diretto del tratto amplificato o sottoposto ad altre metodiche per l'identificazione di mutazioni geniche.

Metodiche per lo studio delle mutazioni. Varie tecniche sono disponibili per l'analisi delle mutazioni del gene EGFR. Queste possono essere distinte in metodiche di scre-ening che possono evidenziare tutte le mutazioni, incluse nuove azioni e metodiche a bersaglio mutazionale che permettono la diagnosi di specifiche mutazioni già note. Tra le più diffuse

metodiche di screening ricordiamo nell'ordine a) il sequenziamento diretto del prodotto della PCR secondo il metodo di Sanger;

b) il pirosequenziamento;

c) metodiche basate sulla denaturazione "melting" del DNA, come l'HRMA (high resolution melting analysis);

d) l'analisi SSCP (single strand conformition polymorphism). Il sequenziamento diretto ed il pirosequenziamento permettono di effettuare diagnosi del tipo specifico di mutazione, mentre l'HRMA e l'SSCP forniscono solo il dato di assenza o presenza di mutazione che dovrà essere poi caratterizzata. Essendo queste ultime due me-todiche rapide e sensibili, esse possono risultare utili per selezionare i casi da sequenziare, riducendo notevolmente la mole di lavoro. La caratterizzazione della mutazione risulta comunque indispensabile, sia perché mutazioni diverse possono avere differente significato biologico, sia perché sono state descritte in letteratura false positività con la metodica HRMA, quantomeno per le mutazioni di KRAS. Tra le metodiche a bersaglio molecolare le più diffuse risultano essere la Scorpion-ARMS (TheraScreen: EGFR29 Mutation Kitl. la PNA/ LNA clamp, la SNAPshot PCR e la mutant-Enriched PCR. In genere queste metodiche sono più rapide e sensibili del sequenziamen-to diretto, presentano, tuttavia, lo svantaggio di evidenziare solo le mutazioni previste a priori. Inoltre, sono meno diffuse e i costi per i reagenti sono in genere superiori a quelli utilizzati per le metodiche di screening. Al momento la metodica più diffusa nei laboratori e, pertanto, da considerarsi di riferimento, è il sequenziamento diretto del prodotto della PCR. Le altre metodiche possono essere

recomandazioni per il protocollo PCR-sequenziamento

utilizzate secondo l'esperienza dei centri.

 Le reazioni devono essere allestite sotto cappa a flusso laminare, in un ambiente diverso da quello utilizzato per l'analisi dei prodotti di amplificazione, impiegando materiali dedicati e con le opportune precauzioni onde evitare contaminazioni (guanti,

puntali con filtro, ecc.).

Per ogni determinazione devono essere previsti almeno un controllo positivo di amplificazione (campione di DNA genomico precedentemente validato) ed un controllo negativo (miscela di

reazione priva di templato). Per ogni campione da analizzare è opportuno produrre due am-

plificati, in modo da effettuare la sequenza di due distinti prodotti di PCR. Il controllo qualitativo/quantitativo del prodotto della reazione

viene effettuato mediante elettroforesi in gel di agarosio e colorazione con etidio bromuro o con altro intercalante, che consente di valutare l'efficienza della PCR e la specificità del risultato. Ogni laboratorio dovrebbe validare la metodica di PCR/sequenziamento in via preventiva utilizzando diluizioni di DNA mutato in DNA non-mutato da linee cellulari il cui stato mutazionale di EGFR sia conosciuto. La sensibilità della metodica dovrebbe essere tale da individuare mutazioni quando le copie di DNA mutato rappresentano il 25% circa del totale.

I prodotti di due distinte PCR devono essere sequenziati in forward e reverse, in modo da ottenere un numero di 3-4 sequenze per campione.

destinare all'esame FISH in modo che quest'ultima possa essere facilmente individuata durante l'osservazione con il microscopio a fluorescenza. Per quanto concerne i preparati citologici, si possono allestire campioni in modo ottimale e mirato alla tecnica FISH, oppure usare strisci colorati già allestiti, e quindi smontati e decolorati. I preparati citologici routinari ottenuti per striscio, fassati in alcool e colorati con Papanicolaou, Diff-Quick o May-Grûnwald-Giemsa, sono frequentemente l'unico materiale disponibile. In questo caso le aree del vetrino contenenti il maggior numero di cellule neoplastiche vanno preventi-vamente circoscritte con matita vetrografica. I citoinclusi devono essere trattati

come preparati istologici routinari. L'allestimente del L'allestimento del campione per l'ibridizzazione, prevede un pretrattamento delle sezioni in due fasi distinte: la prima con calore, la seconda enzimatica. A tal fine, sono disponibili Kit commerciali. Poiché il pretrattamento dipende dalla natura del tessuto, ed in particolare dalla quantità di tessuto connettivo presente nel campione, si suggerisce l'uso di Kit dedicati al pretrattamento dei tumori polmonari (es. Abbott Vysis paraffin pretreatment 4, Abbott Molecular, Inc., IL, USA). La procedura di pretrattamento deve essere messa a punto e validata in ogni laboratorio, in quanto è strettamente correlata alla procedura di fissazione ed inclusione.

La tecnica FISH per scopi diagnostici viene generalmente effettuata mediante kit commerciali dedicati che hanno il vantaggio di standardizzare le procedure riducendo le differenze intra e interlaboratorio. Poiché i kit contengono protocolli dettagliati per le procedure tecniche, queste ultime non vengono in questa sede discusse in dettaglio. La formazione del personale coinvolto nelle fasi di lavoro (dalla selezione del materiale, all'allestimento, lettura e refertazione) svolge un ruolo chiave per l'accuratezza dell'esame. È assolutamente sconsigliabile destinare risorse all'ottimizzazione di questa tecnica se le richieste diagnostiche sono sporadiche, poiché il rischio di non raggiungere standard operativi adeguati a fronte di notevoli spese è elevato. È stato valutato che un laboratorio può garantire un'adeguatezza tecnologica solo se effettua un minimo di 150 determinazioni FISH annuali.

Tipologie di sonde Sono disponibili in commercio diversi tipi di sonde specifiche per il locus 2p23 contenente il gene ALK. Negli Stati Uniti la sonda Vysis LSI ALK Break Apart Rearrangement Probe, all'interno di un KIT diagnostico, è stata approvata da FDA come "companion test" di crizotinib. Essa è costituita da due sonde a DNA marcate con due fluorocromi differenti (orange e green) premescolate e ottimizzate in un buffer di ibridazione. Le sonde riconoscono specifiche seenze di DNA poste a monte e a valle del sito di rottura e con l'osservazione quenze di DNA poste a monte e a vano dei di di della posizione dei due fluorocromi si può identificare la rottura. Infatti, se il gene è integro i fluorocromi sono vicini e si percepiscono come appaiati o fusi, mentre se il gene è interrotto essi si allontanano e si osservano chiarament distanziati (più di due diametri dei segnali luminosi in fluorescenza). Anche la presenza isolata del flourocomo orange in assenza di green, e non viceversa, deve essere considerata come indice di riarrangiamento. Prima del montaggio del vetrino per l'osservazione, i preparati vengono contro-colorati con DAPI

Lettura del preparato

Decums des preparatus.

L'analité i effettusta con un microscopio a fluorescenza, dotato di filtri adatti per i fluorescenzi usui, adeguata lumpada per la fluorescenza e obiettivi ad alto ingrandimento (40x, 60x o 100x in immersione ad clio). La prima osservazione deve essere condecta con filtro per DAPI, a 20x identificando le arec moplastiche sulle quali valutare il gene. In queste aree si aumenta l'ingrandimento e si osservano i segnali luminosi intranucleari, contandoli e tabulando i dati. L'esame viene effettuato sull'intera sezione valutando almeno 50 nuclei neoplastici per stabilire il cut-off di positività: il paziente è considerato positivo e candidato alla terapia con crizotinib se la neoplasia presenta >50% dei nuclei con riamangiamento e negativa se presenta <10% dei nuclei riamangiati. Un

campione è considerato ambiguo se presenta una percentuale di nuclei con riarrangiamento compresa tra il 10% e il 50%. In questi casi il preparato dev essere valutato da un secondo operatore. Se la media delle percentuali di ri-arrangiamento riportate nelle due osservazioni è superiore o uguale al 15%, il caso è considerato positivo.

Nel 5-10% dei casi non si osserva il riarrangiamento, bensì un aumento delle copie del gene. Il significato di questa alterazione ai fini del trattamento con inihitori di ALK non è ancora noto.

La refertazione è parte integrante della procedura diagnostica e dovrebbe contenere le seguenti informazioni:

- L'identificazione del paziente e del medico/struttura che ha richiesto l'analisi Il materiale utilizzato per l'applisi.
- La metodica impiegata per l'esecuzione dell'analisi e la tipologia del test
- I risultati del test, espressi in termini di negatività o positività per il riarrangiamento del gene ALK ed in quest'ultimo caso deve essere indicata la percentuale di ruclei con riarrangiamento sul numero totale dei nuclei
- Il referto deve essere compilato su un modello prestabilito e firmato dall'anatomopatologo e dall'esecutore del test molecolare.
- In considerazione dell'impatto sulla strategia terapeutica, il tempo per la refertazione non deve superare le due settimane dalla richiesta della deter-

Butlett Al, Surryenski J, Robson T, et al: Heterogeneous HER2 gene amplification: impact on patient outcome and a clinically relevant definition. Am J Clin Fathol 2011; 136: 266-74 Camildon DR, Rong YJ, Kwit FL, et al: Progression, free survival (PPS) from a phase I study of crizofiaib (PF-0234066) in patients with ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC). J Clin Oucol 2011; 20: Abstract 2501.

Christensen 15, Zon WY Arango ME et al.: Oxforeductive antiturnor activity of PE-Chindres St., 20 Mr., Anago Mr., et al. Cytometere animate accessly of 2341096, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experime models of anaplastic large-cell lymphoma Moi Cancer Ther 2007; 6: 3314-22. Crinó I.: Initial phase Il results with crizotinib in advanced ALK-positive non-small cell

lung cancer (NSCLC): PROFILE 1005. J Clin Oncol 2011; 29: Abstract 7514 Kwak, El, Bang YJ, Camidge DR, et al: Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer." N Engl J Med 2010, 363: 1693-703.

Soda, M., Choi YI., Enomoto M, et al.: dentification of the transforming EML4-ALK fusion

gene in non-small-cell lung cancer, Nature 2007; 448; 561-6. Show AT Year BY Salamon B1 et al: Effect of crizottells an averall survival in rations with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement trospective analysis. Lancet Oncol 2011; 12: 1004-12

Travis, WD, Brambilla E, Noguchi M, et al: The new IASLC/ATS/ERS international mul-

US Food and Drug Administration, FDA labeling information - Xalkori, FDA website jonline), http://www.accessdata.fria.gov/drugsatfria_docs/ label/2011/202570s000lbl.pdf (2011) Zou, HY, Lee JH, Arango ME, et al: An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antianglogesic mechanisms. Cancer Res 2007; 67: 4408-17.

Raccomandazioni per l'analisi dei riarrangiamenti del gene ALK nel carcinoma polmonare non a piccole cellule

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

AIOM: Andrea Ardizzoni, Lucio Crinò, Cesare Gridelli, Nicola Normanno, Giorgio Scagliotti, Carmine Pinto (Coordinatore)

SIAPEC-IAP: Antonio Marchetti, Mauro Papotti, Giulio Rossi, Massimo Barberis, Eugenio Maiorano, Gian Luigi Taddei, Claudio Clemente (Coordinatore)

Questo materiale è stato realizzato grazie ad un grant incondizionato di



fizer Oncology

linea in poi, ha ottenuto un controllo di malattia del 90%, con una risposta complessiva del 50% ed una sopravvivenza libera da progressione (PFS) non ancora raggiunta con un follow up mediano di oltre 10 mesi. Questo studio, PROFILE 1005, prevedeva la determinazione centralizzata con FISH del riarrangiamento di AIK. Il crizotinib è in valutazione in due studi randomizzati di fase III in pazienti con NSCLC ALK-positivi, PROFILE 1007 e PROFILE 1014, che confrontano l'efficacia e la tossicità di crizotinib con la chemioterapia standare come seconda e prima linea di terapia, rispettivamente.

Indicazioni all'analisi dei riarranaiamenti di ALK

l'esame di ALK trova indicazione nei pazienti con NSCLC con istotipo adenocarcinoma, carcinoma a grandi cellule, carcinoma misto con adenocarcinoma, o NSCLC non altrimenti specificato (not otherwise specified: NOS) che presentano la più alta probabilità di riscontro di riarrangiamenti del gene. In base alle conoscenze attuali, la determinazione delle alterazioni di ALK può essere eseguita su perzo operatorio oppure su prelevo bioptico o diologico del turnore primitivo elo della metastasi. Il riarangiamento di ALK è presente nel 2.7% dei NSCLC. Nei pazienti a più alta probabilità in assoluto di alterazioni di ALK, ovvero non fumatori, deboli fumatori [« 15 pucchetti/atmo o « 5 sigarette al giorno) ed ex-fumatori (da ≥ 15 anni) con gli istotipi suddetti, per i quali non sia disponibile un adeguato materiale, può essere indicato un ulteriore prelie-

l'inserimento dell'analisi di ALK in un algoritmo diagnostico per i pazienti con NSCLC è ancora materia di discussione nella comunità scientifica internazio. nale. Per i casi con ampia disponibilità di tessuto, l'esame immunoistochim potrebbe essere inserito tra le indagini iniziali, in quanto potenzialmente utile per una prima selezione dei casi da approfondire mediante HSH. Secondo un'altra linea di nensiero, in assenza attualmente di un KIT disanostico validato. per l'espressione del gene ALK nel tumore polmonare, l'analisi immunoistochi mica dovrebbe essere utilizzata per studio e/o ricerca e non a fini diagnostici. Dato che le mutazioni di EGFR e di KRAS ed il riarrangiamento di ALK sono in tanto, un accurato inquadramento istopatologico risulta oggi essenziale nell'iter (nostico e tempeutico dei pazienti con neoplasia polmonare

adramento diagnostico isto-citopatologico

Il NSCIC rappresenta oggi un'area diagnostica impegnativa per l'anatomopa-tologo, per diverse ragioni: 1. la definizione dell'istotipo è diventata un punto importante nell'approccio terapeutico al paziente con NSCLC, 2. l'incidenza dell'adenocarcinoma è aumentata a partire dagli inizi degli anni '90 e questo istotipo è significativamente correlato ad alterazioni molecolari (mutazioni di EGFR, BRAF, HER2/neu, KRAS, fusione di ALK) che rappresentano bersagli per selettivi imbitori; 3. è necessario oggi formulare una diagnosi sempre pi precisa di istotipo e d'altra parte ottimizzare la gestione del materiale tumoral (spesso molto limitato) per fomire tutte le informazioni necessarie per la mi-

La diagnosi di NSCLC non ha mai rappresentato una reale entità per il putologo; in realtà si tratta di un termine coniato dalla comunità oncologica negli anni '70 si fini del trattamento. La terapia nei carcinomi polmonari si basava sulla distinzione dicotomica tra carcinoma a piccole cellule e NSCLC. l'uso del termine in diagnostica è stato mantenuto fino ai primi anni 2000, ma l'in troduzione di formaci efficaci di nuova generazione e di molecole a bernadio molecolare ha di fatto reso necessaria una più precisa classificazione del carcinoma polmonare, in particolare per quanto concerne il gruppo di neoplasie con caracteristiche clinico-patologiche e molecolari completamente differenti, che costituiscono il NSCLC. Come emerge dalla recente classificazione degli adenocarcinomi polimonari, è necessario affrontare ogni caso attraverso un apaerskoirt nom pombilair, e necessare airiculare igui cos un iniverso un approcio integracio meter la patologo nelle migliori nondizio procio integrazio mettere il patologo nelle migliori nondizio il per definine gli saperli monfologici de eventualmente per richiedre opportune indagini ancillar. I dati essenziali che di ovolebbero escere presenti nella richiesta di un esame cilo-siologico comprendono lo stuto di funatore, il dati assumuestici significativi el sologico comprendono lo stuto di funatore, il dati assumestici significativi el

i risultati delle indagini di laboratorio e radiologiche. Per la diagnosi di carcinoma polmonare (primitivo vs metastatico; epiteliale vs non-epiteliale) e la sottotipizzazione del NSCLC, è fondamentale un accurato



isto-citopatologica

Eristinon numerous metodiche per ottenere campioni cili-ol-bolgici per dilgnosi di NCLC. Per raggiungier i massimo risultate è fondamentale la sectia della texciac dell'olo di campione in approto al quando ristino del patiente affetto da patiologia poltonome ed alla diagnosi differentiale posta inizialmente sulla base dei dati cilino-laboratoristici e radiologici.

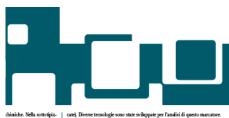
Per quanto concerne i preparati citologici, il liquido pleurico ed il lavaggio broncoalveolare devono essere trasportati in provette sterili entro un'ora al Laboratorio per essere allestiti immediatamente (oppure in caso di impossibilità vanno conservati momentanesmente in frigorifero a +4-5 °Ci, me aspirati vanno strisciati su vetrini e fissati (con alcool 95° o cytofix) immediatamente quando si utilizzino colorazioni quali ematossilina-eosina o Papanicolaou. Una fissazione all'aria è idonea per colorazioni vitali quali May-Grunwald-

Giemsa e Diff-Quick. Quando possibile, è buona pratica cercare di ottenere un citoincluso (ovverosia la possibilità di ricavare un blocchetto in paraffina a partire da materiale aspirato citologico) ed assistere con esame estemporaneo del citologico il broncoscopista o il radiologo in caso di aspirati transbronchiali o transtoracici, rispettivamente (cosiddetta ROSE, rapid-on-site evaluation) per valutare la rappresentatività del materiale.

Le biopsie vanno poste in contenitori con fissativo a base di formaldeide tamponata al 10% per non meno di 12 ore e non più di 24 ore. Le biopsie saranno poi incluse in blocchetti di paraffina che consentiranno il taglio di sezioni sottili [tra 2 e 4 micron di spessore] che, colorate in ematossilina-eosina, potranno essere esaminate al microscopio. Conservare materiale fresco da congelare ("rissue bank") è utile solamente attantioner, contestera unitanta nelso at congrete († Inste-bank") è utile solamente quando si dispone di campioni operatori in grado di fornire sia tesuto per diagnosi, statiazione e indagdin indecoluri di routine ma anche di nateriale per eventura fiture riscetche. Du una biognie a dal clinicatione è in giener possibile ottenere un dicreto numem di tulterori sesioni bianche da utilitzare per indagini speciali di intochinica (PAS, periodic-caci-Soliff, Akizu) Blue-PAS per evilenziare le musine) o di immunositochimia.

Metodologie per l'analisi di ALK

Per guidare le decisioni terapeutiche in pazienti con NSCLC l'analisi genetica di ALK si affianca alla ricerca di mutazioni del gene EGFR (vedi linee guida dedi-



chimiche. Nella sottotipiz-orfologia non sia risultata romale da utilizzare è rap-noma, il TTF-1, ed uno di L'Ibridizzazione in situ in fluorescenza (FISH) rappresenta in questo momento il Lucinizzazione in sui in funorecenza planti, rappesenza in questo inomento in metodo dettivo per la ricerca di riarrangiamenti del gene ALK. Questo metodo, infatti, è stato utilizzato nei tralis clinici che hanno portato all'approvazione del trattamento con crizotinih. L'attuale protocollo diagnostico-terapeutico insitività per TTF-1 (anche e indicativa di un fenotipo ità per TTF-1 e positività dei transmento com incritoriani. Lunara protection angiosato-temperation in-dividua nel 15% di nuclei riamrangiati in EISH la soglia per potere considerara il caso come "positivo" e il paziente candidabile al trattamento. La tecnologia è disponible in Kit commerciali svilapata i per son diagnostico, tra cui, il litt diagnostico certificato dall'EDA Abbott Vysis (ALK Break Apart FISH Probe mocellulare. La negatività agnostica. In questo caso inoma poco differenziato esmocollina-3 e/o CK5/6). Kit, Abbott Molecular, Inc.), Tale Kit è corredato di un protocollo dettagliato astiche fusate e/o gistanti). sulle procedure tecniche e l'interpretazione dei dati. Sono disponibili altri kit ne o una neoplasia meta-nare poco differenziato in commerciali non ancora approvati da FDA (es. ZytoLight® SPEC ALK/EML4 TriCheck® Probe, ZytoVision, Bremerhafen, Germany). In osini caso, la determinazione dei riarrangiamenti ALK dovrebbe essere validata accuratamente nei nisukati non dirimenti, è singoli laboratori diagnostici, con l'analisi di un adeguato numero di controlli stima che un Laboratorio

logico, purché il materiale licabili solo su campione

enere la soglia di diagnosi il 10% di tutte le diagnosi

tenute fattibili su prelievo

L'espressione della proteina ALK potrebbe rappresentare un potenziale nar-catore di avvenuto riarrangiamento del gene e/o di risposta agli inibitori di ALK. l'introduzione nei laboratori di Amatomia Patologica di un metodo di screening di facile utilizzo e a costo sostenibile, quale una immunocolorazione, è assolutamente auspicabile. Sono stati a tal fine svilupputi, utilizzati a scopo di studio e riportati in letteratura, tre anticorpi monoclonali anti-ALK, il clone 5A4 (Leica/Novocastra, e pre-dikato Abcam), il clone ALK1 (Dako) e il clone DSF3 (Cell Signalling Technology). Al momento attuale, dei tre anticorpi solo i primi due sono commercialmente disponibili, mentre il clone DSF3 è dispo-nibile solamente per scopi di ricerca. I risultati ottenuti con questi anticorpi in studi comparativi con la metodica FISH sono promettenti, particolarmente quelli ottenuti con il clone SA4 che riconosce una proteina ricombinante, ma al momento insufficienti per trarre conclusioni definitiv

positivi e negativi, prima di implementare l'attività clinica.

Analisi mediante Reverse-trascription PCR (RT-PCR). L'RT-PCR può essere effettuata su DNA complementare (cDNA) ottenuto per sintesi dall'RNA messaggero (mRNA) per evidenziare direttamente il processo di fuzione di ALK con EML4 o altre proteine utilizzando primers dedicati. La tecnologia risulta estremamente sensibile e molto specifica. Pertanto, negli studi è stata utilizzata come gold standard per valutare la senzibilità dell'ana-lisi FISH e immunoistochimica. Tuttavia, la RT-PCR ha numerosi svantaggi per una applicazione nella pratica clinica: a) è richiesto un mRNA di alta qualità non ottenibile da tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina; b) sono richiesti dei sistemi complessi di amplificazione PCR multiplex a seguito della grande variabilità dei tipi di fusione; c) solo le alterazioni note

Preparazione dei campioni per l'esame FISH

Il materiale biologico su cui viene eseguita la FISH per lo studio delle fusioni del gene ALK può essere costituito sia da campioni istologici che citologici rappresentativi del tumore primitivo e/o della metastasi. Tuttavia, è opportuno considerare che i kit diagnostici sono stati sviluppati e validati solo su campioni istologici fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE). Per quanto concern i campioni istologici, si considia di effettuare sezioni leggermente più spesse campion isonogoi, a consigna in entenuare section regerenate por spesse (5 micron) di quelle utilizzate per l'istopatologia, al fine di ottenere miglion risultati in cono di lettura. Le secioni devono essere montate su vettini pre-tuttati per FISH e le secioni devono essere fatte adenire nediante essic camento per un ora a 60°C o overnight a 45°C. Prina della valutazione con FISH, è sario controllare una sezione contigua a quella da analizzare colorata o Ematostilina-Forina in modo da riconoscere e valutare le arre neoplastiche di interesse. Nel caso in cui la componente neoplastica sul campione sia esigua, è considiabile segnare con matita vetrografica l'area da esaminare sul vetrino da

Giugno 2012



- La multisciplinarietà alla diagnosi
- L'ottimizzazione del materiale diagnostico









Neoplasie toraco - polmonari



Indicazioni organizzative e raccomandazioni

Area Operatori

Rete e Aziende Sanitarie

G.I.C. incontri di Rete

G.I.C. per patologia

Gruppi di Lavoro

Gruppi di Studio per patologia

Staff di Rete

Guida ai Servizi di Rete

Linee guida e protocolli

Indicazioni organizzative e raccomandazioni per i servizi di endoscopia bronchiale:

documento elaborato dal gruppo di lavoro (GdL) composto da: Angelo Albano, Ida Colantonio, Maurizio Mancuso, Pier Luigi Piovano, Mario Salio, Claudio

Zamprogna. Documento

Prata di refertazione TC di lesioni neoplastiche polmonari:

nto elaborato dal gruppo di lavoro (GdL) composto da: Bretti Sergio, Donati Zimerutti Giorgio, Russo Filippo, Tonda Laura, Sillano Alberto.

mento

Indicazioni e raccomandazioni per la core biopsy eco o TC-guidata di lesione polmonare sospetta per neoplasia:

documento elaborato dal gruppo di lavoro (GdL) composto da: Caterina Casadio, Silvia Novello, Lucio Buffoni, Paolo Carbonato, Andrea Ferraris, Mauro Papotti, Paola Franciadicelle, Luisa Delsedime. Documento

Chi è online

87 visitatori online

Cerca nel sito

cerca... Cerca

Area Cittadini

I Poli Oncologici

I Centri Accoglienza e Servizi

I Gruppi Interdisciplinari Cure

Guida ai Servizi di Rete

Diritti dei pazienti

Info&Letture

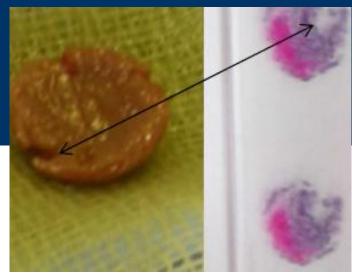
Actedi alle cure

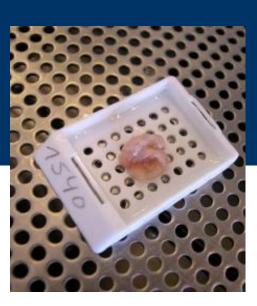
.A.S. Polo di Torino

C.A.S. Polo Nord-Ovest

 "cell-block" preparation from effusion and aspiration cytology is essential to increase quality of diagnostic and predictive tests



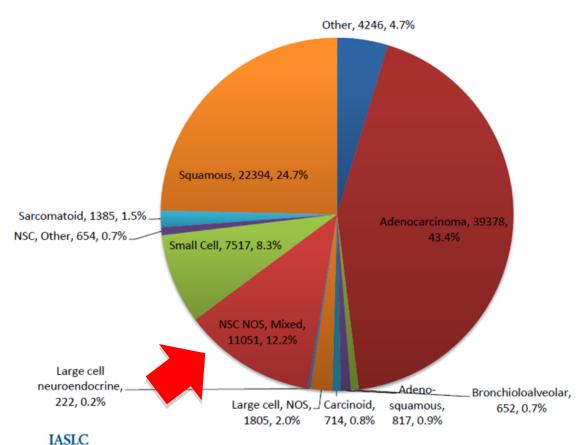




IASL

10. We recommend that the term NSCLC-NOS be used as little as possible, and we recommend it be applied only when a more specific diagnosis is not possible by morphology and/or special stains (strong recommendation, moderate quality evidence).

Travis W et al, Journal of Thoracic Oncology • Volume 6, Number 2, February 2011





The 2015 World Health Organization Classification of **Lung Tumors** Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification

William D. Travis, MD,* Elisabeth Brambilla, MD,† Andrew G. Nicholson, MD,‡ Yasushi Yatabe, MD,§ John H. M. Austin, MD, || Mary Beth Beasley, MD, ¶ Lucian. R. Chirieac, MD, # Sanja Dacic, MD, **

NSCC, favor squamous cell carcinomac

NSCC NOSd

On Behalf of the WHO Panel

clearly present

p40-positive)

pattern

Morphologic squamous cell patterns not

present but supported by stains (i.e.,

No clear adenocarcinoma, squamous or

neuroendocrine morphology or staining

Edwina Duhig, MD,†† Douglas B. Flieder, MD,‡‡ Kim Geisinger, MD,§§ Fred R. Hirsch, MD, || || Yuichi Ishikawa, MD, ¶¶ Keith M. Kerr, MD,## Masayuki Noguchi, MD,*** Giuseppe Pelosi, MD,††† Charles A. Powell, MD,‡‡‡ Ming Sound Tsao, MD,§§§ and Ignacio Wistuba, MD, || || ||

J Thorac Oncol. 2015;10: 1243–1260

Squamous cell carcinoma (nonkeratinizing pattern may be a

component of the tumor)

Large cell carcinoma

| New Small Biopsy/Cytology Terminology | Morphology/Stains | 2015 WHO Classification in Resection Specimens |
|--|--|---|
| Adenocarcinoma (describe identifiable patterns present) | Morphologic adenocarcinoma patterns clearly present | Adenocarcinoma predominant pattern: lepidic, acinar, papillary solid, and micropapillary |
| Adenocarcinoma with lepidic pattern (if pure, add note: an invasive component cannot be excluded) | | Minimally invasive adenocarcinoma, adenocarcinoma in situ, or an invasive adenocarcinoma with a lepidic component |
| Invasive mucinous adenocarcinoma (describe patterns present; use term mucinous adenocarcinoma with lepidic pattern if pure lepidic pattern) | | Invasive mucinous adenocarcinoma |
| Adenocarcinoma with colloid features | | Colloid adenocarcinoma |
| Adenocarcinoma with fetal features | | Fetal adenocarcinoma |
| Adenocarcinoma with enteric features ^b | | Enteric adenocarcinoma |
| NSCC, favor adenocarcinoma ^c | Morphologic adenocarcinoma patterns not present but supported by special stains (i.e., TTF-1 positive) | Adenocarcinoma (solid pattern may be just one component of the tumor) |
| Squamous cell carcinoma | Morphologic squamous cell patterns | Squamous cell carcinoma |



- La multisciplinarietà alla diagnosi
- L'ottimizzazione del materiale diagnostico
- La necessità di stare al passo con i tempi



amous Carcinoma

FGFR1 ampl FGFR2 mut

■ PI3KCA mut

■ PTEN mut/del

CCND1 ampl

■ CDKN2A del/mut

PDGFRA ampl/mut

■ EGFR amp

MCL1 ampl

BRAF mut DDR2 mut

■ FRBB2 ampl



Lung Cancer Mutation Consortium 2.0 6% Cases with Aberrations in >1 Driver (39/687)

| # Single Mutation s | AL K | AK T | BRA F | EGF R | HER 2 | KRA S | MAP2 K1 | ME T | NRA S | PIK3C A | RET | RO S |
|---------------------------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|------------|---------|----------|------------|-----|---------|
| ALK (27) | Χ | | | 1 | | | | | | 1 | | |
| BRAF (20) | | | Χ | | | 1 | | 2 | | | | |
| EGFR (87) | | | | Χ | | 3* | | 4** | | 4* | 2** | |
| HER2 (8) | | | | | Х | | | | | | | |
| KRAS (167) |) | | | | | Х | | 7 | 1 | 7* | | |
| MAP2K1 (1 |) | | | | | | Χ | | | | | |
| MET AMP (34) | | | | | | 1 | 1** | 2 | | | | |
| NRAS (4) | | | | | | | | | | | | |
| PIK3CA (16) X | | | | | | 1 | | | | | | |
| RET (19) | | | | | | Х | 1 | | | | | |
| ROS (12) | | | | | | | | | | | | Χ |

Cases with 3 drivers: *EGFR-KRAS-PIK3CA (2), **EGFR-MET AMP-RET(1)

EGFR-TKIs and EGFR MutationFront - Line Studies



| Study | Entry Criteria | HR for PFS (EGFR mut +) | HR for OS (EGFR mut +) |
|---|---|---|--|
| IPASS Mok 2009 | Asiatic, never- & light –smokers, adenocarcinoma (EGFR mut + 59.7%) | 0.48 (0.36-0.66) | 0.91 * (0.76-1.10) *overall population |
| First – SIGNAL Han JY 2012 | Adenocarcinoma, Never-smokers (EGFR mut + 44%) | 0.61 (0.30-1.22) | 0.82 (0.35-1.92) |
| NEJ002 Maemondo 2010 Proc. ASCO 2011 | EGFR Mutation + (all) | 0.35 (0.25-0.50) | 0.887 (0.634-1.241) |
| WJTOG3405 Mitsudomi 2010 | EGFR Mutation + (all) | 0.520 (0.378-0.715) | 1.185 (0.767-1.829) |
| EURTAC (EU) Rosell 2012 Benlloch 2014 | EGFR Mutation + (all) | 0.42 (0.27-0.64) | 0.86 (0.54-1.38) |
| OPTIMAL (China) Zhou 2012 | EGFR Mutation + (all) | 0.16 (0.10-0.26) | 1.04 (0.69–1.58) |
| LUX-LUNG 3 Sequist 2013 Yang 2015 | EGFR Mutation + (all) | 0.58 (0.43–0.78) 0.47 ((0.34–0.65)*) | 0.88 (0.66-1.17) |
| Wu 2014 Yang 2015 | EGFR Mutation + (all) | 0.28 (0.20–0.39) | 0.93 (0.72-1.22) |

gefitinib

afatinib



NATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LUNG CANCER

Rare and Uncommon Mutations.....even an issue to define it properely

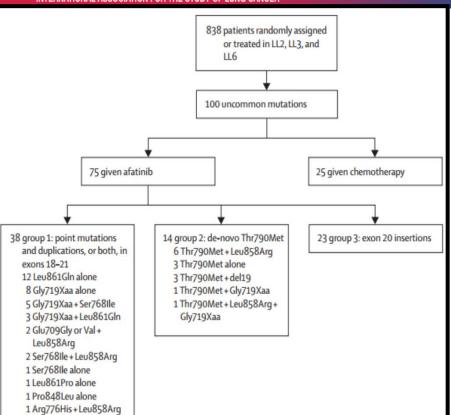
- ✓ Exon-19 del and L858R are described as classic EGFR mutations
- ✓ **Uncommon mutations** with known clinical significance: G719X, S768I, T790M, insertions in exon-20, and L861Q
- ✓ Rare EGFR mutations are considered all other EGFR mutations

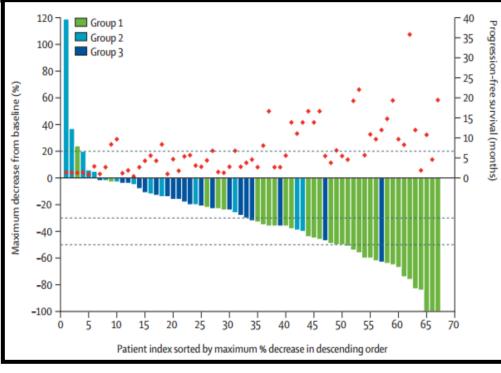
1 Leu861Gln+del19

16TH WORLD CONFERENCE ON LUNG CANCER

SEPTEMBER 6-9, 2015 → DENVER, COLORADO, USA

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LUNG CANCER





| | Objective response | Duration of response (months) | Disease control | Progression-free survival (months) | Overall survival (months) |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------------|
| Group 1 (n=38)* | 27 (71-1%, 54-1-84-6) | 11-1 (4-1-15-2) | 32 (84-2%, 68-7-94-0) | 10-7 (5-6-14-7) | 19-4 (16-4-26-9) |
| Group 2 (n=14)† | 2 (14-3%, 1-8-42-8) | 8-2 (4-1-12-4) | 9 (64-3%, 35-1-87-2) | 2.9 (1.2-8.3) | 14.9 (8.1-24.9) |
| Group 3 (n=23)‡ | 2 (8.7%, 1.1-28.0) | 7-1 (4-2-10-1) | 15 (65.2%, 42.7-83.6) | 2.7 (1.8-4.2) | 9.2 (4.1-14.2) |



INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LUNG CANCER

Incidence of the rare

mutations reported in **25,898**EGFR mutations in the **COSMIC** database

- While E709K (N=44, 0.17%), G724S(N=12, 0.046%) and T751I(N=10, 0.039%) are relatively common, most of the others are <5 (0.019%).</p>
- E709K is sensitizing mutation (Kobayashi et al., CCR, 2015)
- All of the mutations with description of base change were C/G-T/A transitions

Mitsudomi T Discussion WCLC 2015

16TH WORLD CONFERENCE ON LUNG CANCER

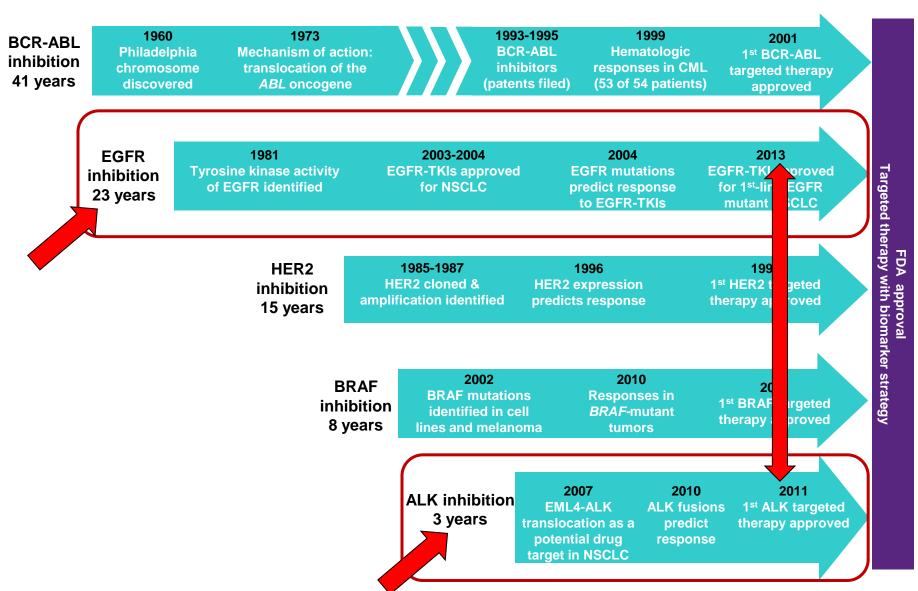


| Catalogue of somatic mutations in cance | | | | | |
|---|-------------|-------------|--|--|--|
| Rare mutation | N in Cosmic | Base change | | | |
| R841K | 2 | G-A | | | |
| P699S | 1 | C-T | | | |
| L703P | 5 | T-C | | | |
| 1706V | 0 | | | | |
| M766T | 1 | T-C | | | |
| G735S | 4 | G-A | | | |
| Q812R | 1 | | | | |
| R836H | 2 | G-A | | | |
| E697K | 0 | | | | |
| D761M /V765M | 0/6 | /G-A | | | |
| R748G | 1 | A-G | | | |
| W731Stop | 4 | G-A | | | |
| E865K | 1 | G-A | | | |
| E804K | 3 | G-A | | | |
| L703P | 5 | T-C | | | |
| V742A | 4 | T-C | | | |
| R835H | 0 | | | | |

We have to be careful when we see very very rare mutation using FFPE specimens, especially small biposies

| S695N | | |
|-------|---|-----|
| E709K | 4 | a-A |
| W731X | 4 | G-A |
| D855G | 1 | A-G |
| | | |

Il target e il suo farmaco: una storia in rapida evoluzione



^{1.} Chin L, et al. Nat Med. 2011;17:297-303.

[.] Chong CR and Jänne PA. *Nature Med.* 2013; 19:1389-1400.



DETERMINA 25 marzo 2013

Inserimento del medicinale Crizotinib (Xalkori) nell'elenco dei medicinali erogabili a totale carico del Servizio sanitario nazionale ai sensi della legge 23 dicembre 1996, n. 648, per il trattamento di pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule pretrattato e con traslocazione del gene ALK. (Determina n. 317/2013). (13A02987)

(GU n.83 del 9-4-2013)

.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LUNG CANCER

Impact of time to drug approval on potential years of life lost: the compelling need for improved trial and regulatory efficiency

- Used phase III trials in incurable cancers published 2000-2015:

With statistically significant increase in survival

- Drug approved by the FDA in that malignancy
- 21 drugs in 11 malignancies as illustrative examples

Calculated:

Life-years lost per year of approval delay:

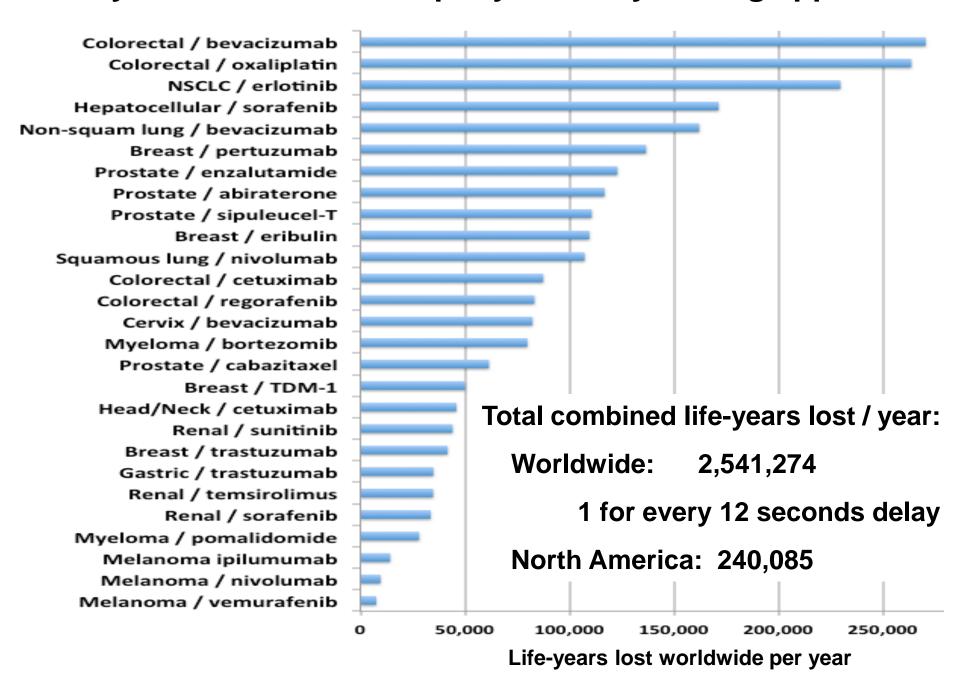
Multiplied no. deaths per year (for specific subgroups included in phase III trial) x median survival gain (yrs):

- Life-years lost between drug discovery and approval:

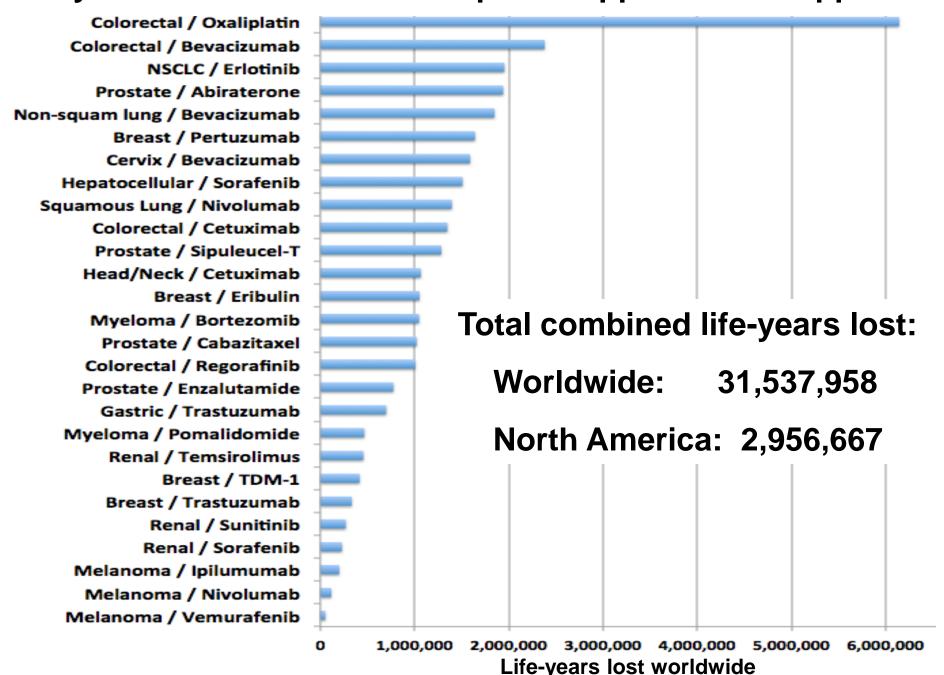
Used US dates as surrogate for worldwide

- Life-years that would have been saved if time from discovery to approval reduced to \leq 5 years
- Life-years saved by improved trial safety

Life-years lost worldwide per year delay in drug approval



Life-years lost worldwide from patent application to approval





- La multisciplinarietà alla diagnosi
- L'ottimizzazione del materiale diagnostico
- La necessità di stare al passo con i tempi
- Nuovi farmaci, differente gestione del pz

New biomarkers, new drugs....new toxicity profile

- Targeted agents exhibit the same frequency (and sometimes severity) of toxicities as traditional cytotoxic agents, with the main difference being the nature of the toxic effects
- Some classical chemotherapy toxicities (such as nausea, diarrhea, fatigue) are still present, while in other cases toxicities have been replaced by vascular, dermatologic, endocrine, coagulation, immunologic, ocular, and pulmonary toxicities.
- Do we always describe these toxicities in the proper way, well **reporting pt outcomes**?

Italian Survey in pts & referral oncologists

Novello S, Orbassano

Valmadre G, Sondalo

N=90 (41 had only T0 and T1) efitinib

Casartelli C, Como

Cortinovis DP, Monza

Seebacher C, Bolzano

Bria E, Verona

Binato S, Vicenza

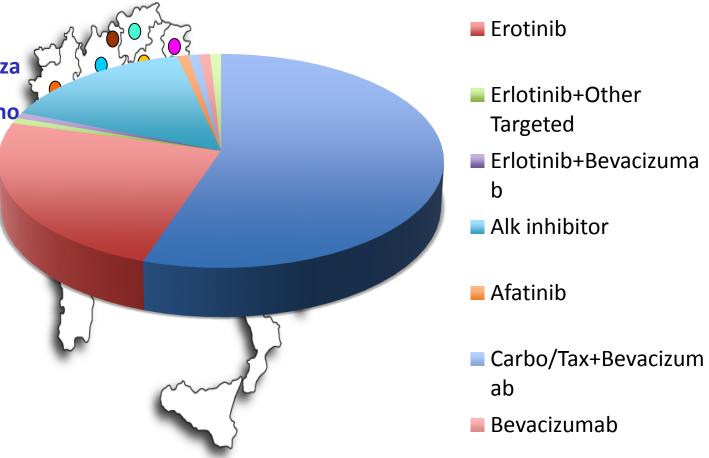
Tiseo M, Parma

Merlo V, Udine

Di Maio M, Napoli

Rossi A, Avellino

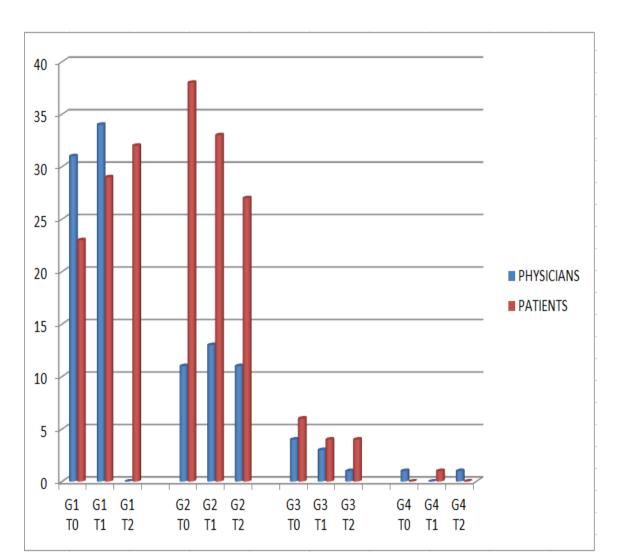
Galetta D, Bari





During the previous days of therapy, did you develop skin toxicity of any type (ie: dryness, flaking and/or fissuring of the skin, erythema, pruritus, acneiform rash, infection or nail abnormalities)?





If YES, please provide the degree of severity:

- Grade 0 (absent)
- Grade 1 (mild, without need of treatment)
- Grade 2 (moderate, need of minimum local treatment)
- Grade 3 (severe, need of medical treatment with restriction of daily activities)
- Grade 4 (severe, need of urgent medical treatment)



Novello S et al, Transl Lung Cancer Res 2014



WORK IN PROGRESS

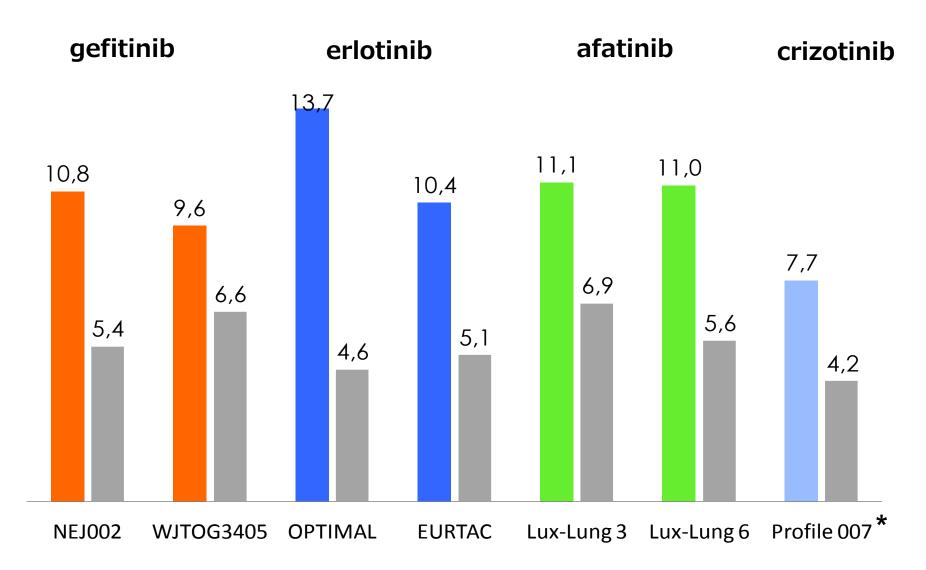


A cura della Drssa Sara Pilotto e Drssa Ausilia Mara Manganoni



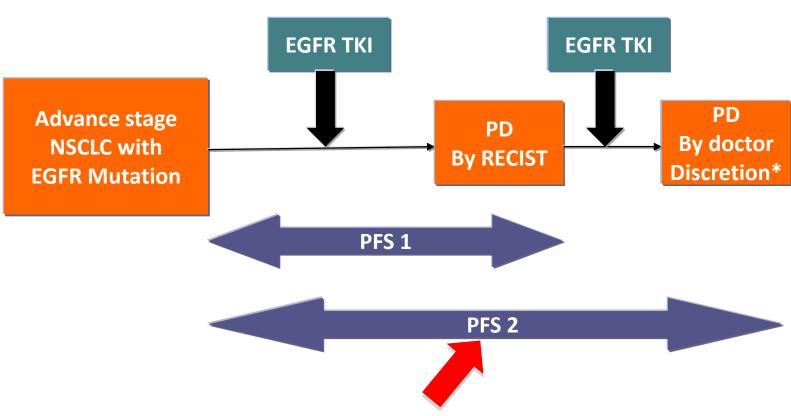
- La multisciplinarietà alla diagnosi
- L'ottimizzazione del materiale diagnostico
- La necessità di stare al passo con i tempi
- Nuovi farmaci, differente gestione del pz
- La consapevolezza del risultato "a termine"

PFS of patients treated with TKis with mutation/rearrangement within clinical trails





Defining resistance by RECIST may lead to premature termination of TKI



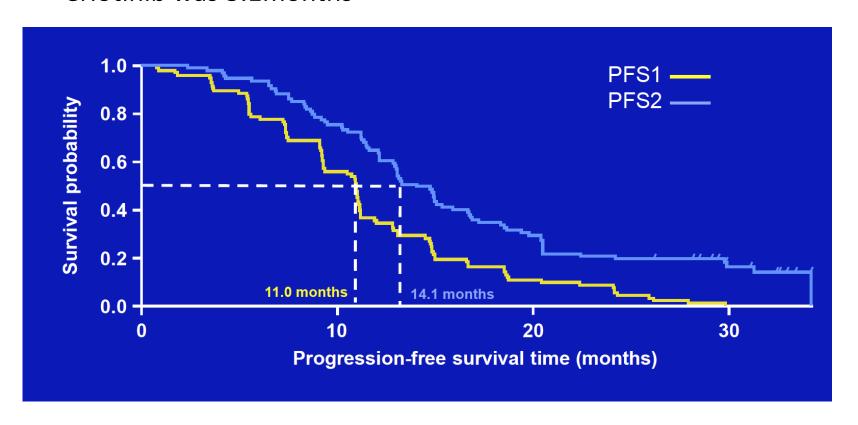
*Doctor Discretion: Symptomatic progression, multiple progression Threat to major organ...etc

PI: K Park

ASPIRATION trial-key results



- Of 207 patients, 171 had RECIST PD; 93 continued post-PD erlotinib
- PFS1 median was 11.0 months (95% CI 9.2, 11.1)
- PFS2 median was 14.1 months (95% CI 11.5, 14.8)
- Difference between PFS1 and PFS2 in patients receiving post-PD erlotinib was 3.1months



clinical practice guidelines

Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[†]

S. Peters¹, A.A. Adjei², C. Gridelli³, M. Reck⁴, K. Kerr⁵ & E. Felip⁶ on behalf of the ESMO Guidelines Working Group^{*}

¹Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Lausanne, Switzerland; ²Department of Medicine, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, USA; ³Department of Medical Oncology, 'S.G. Moscati' Hospital, Avellino, Italy; ⁴Department of Thoracic Oncology, Hospital Grosshansdorf, Grosshansdorf, Germany; ⁵Aberdeen Royal Infirmary, Aberdeen, UK; ⁶Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain

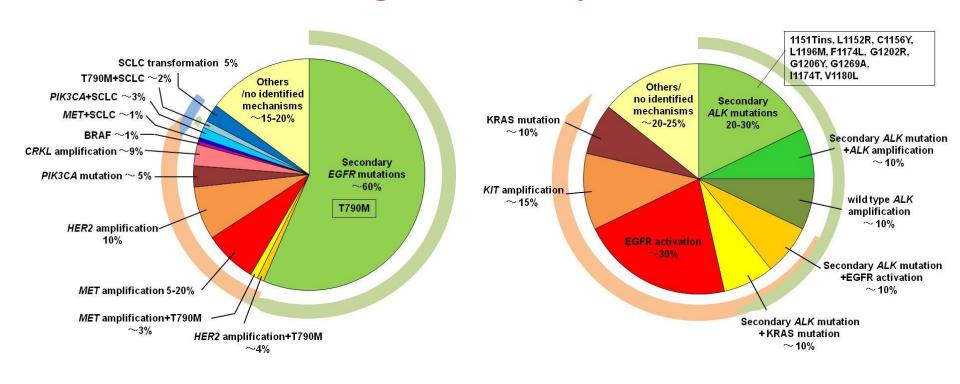
Re-biopsy at disease

progression should be considered [7].

Diagnosis (and tests) do not end at the time of diagnosis

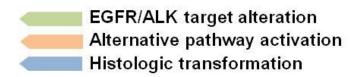


Mechanisms of drug resistance to EGFR and ALK targeted therapies



EGFR mutant

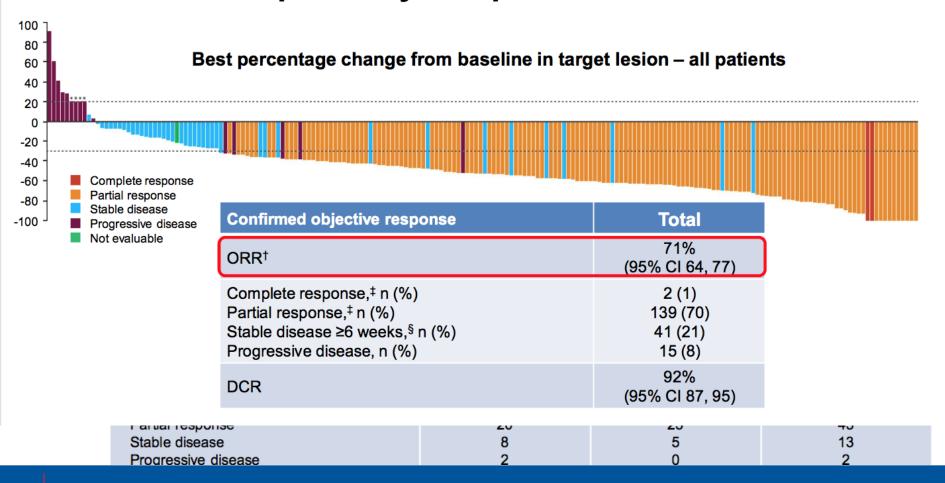
ALK rearranged





INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LUNG CANCER

Tumor response by independent central review



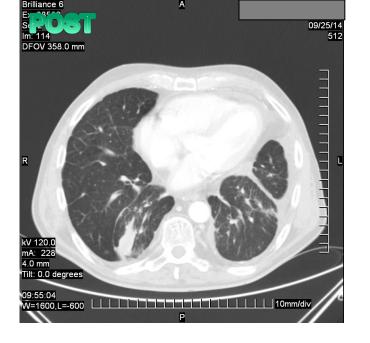


Data with AZD9291

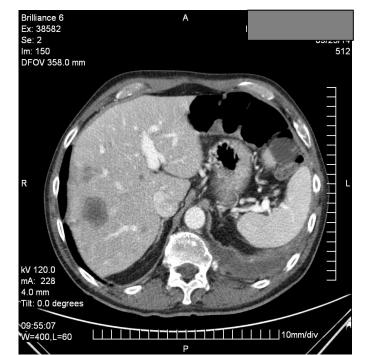
Adverse events: all causality

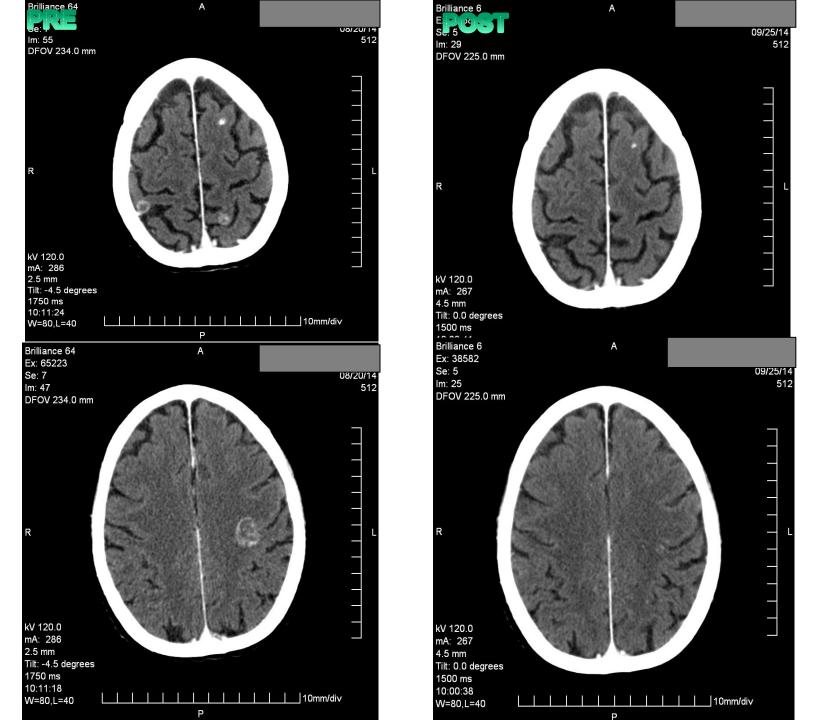
| AEs by preferred term, occurring in ≥15% of patients overall* | Grade 1 n (%) | Grade 2 n (%) | ≥Grade 3 n (%) | Total n (%) |
|---|------------------|------------------|-------------------|----------------|
| Any AE [†] | 59 (30) | 79 (39) | 60 (30) | 198 (99) |
| Diarrhea | 76 (38) | 13 (7) | 2 (1) | 91 (45) |
| Rash (grouped terms) | 69 (34) | 11 (6) | 1 (1) | 81 (40) |
| Dry skin | 40 (20) | 3 (2) | 0 | 43 (21) |
| Paronychia | 28 (14) | 12 (6) | 0 | 40 (20) |
| Decreased appetite | 27 (13) | 7 (4) | 2 (1) | 36 (18) |
| Nausea | 27 (13) | 6 (3) | 2 (1) | 35 (17) |
| Cough | 28 (14) | 3 (2) | 0 (0) | 32 (16) |
| Constipation | 20 (10) | 6 (3) | 1 (1) | 30 (15) |
| Select AEs of interest | | | | |
| ILD (grouped terms) | 2 (1) | 0 | 5 (3) | 7 (4) |
| Hyperglycemia | 1 (1) | 0 | 1 (1) | 2 (1) |
| QT prolongation | 5 (3) | 1 (1) | 0 | 6 (3) |







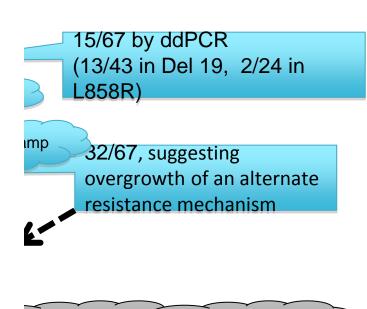






Mechanisms of Acquired Resistance in 2015

| | | MECHAINSINS OF A | 10 |
|--|---------------------------|--|----|
| | | 1G EGFR-TKI | |
| seconday mutation amplificati on/loss | T790M | | |
| | • | others (rare) L747S, D761Y, T854A | |
| | • | EGFR amp/loss | |
| Bypass/accessory | bypass track | c-MET, HER2, HER3, IGF1R, AXL, DAPK, HER3, JAK HGF, FGF, VEGF | |
| | down stream pathway | BRAF、CRKL, PIK3CA, PTEN, MEK1, NF-kB, PUMA | |
| Histologic transformation | | EMT (TGFb, MED12, AXL, Notch1) | |
| | | SCLC | |



92914

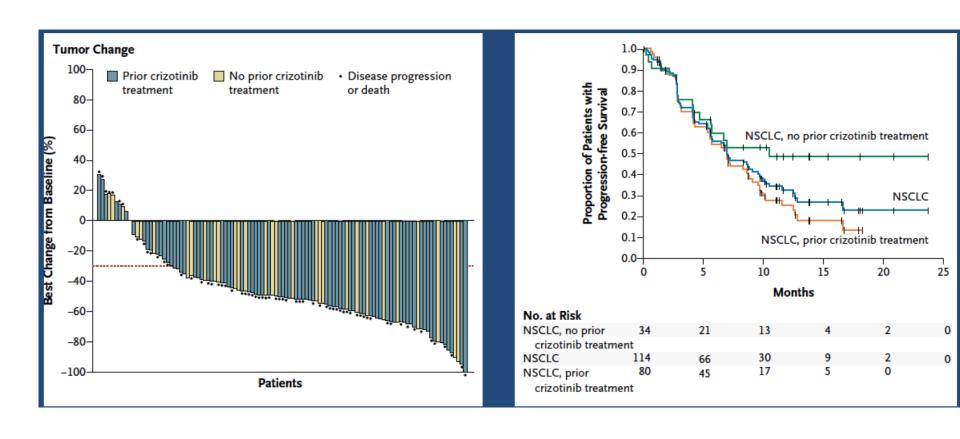
K1/2 activation

1. Piotrowska, Cancer Discov, 2015,

NRAS mu to WZ,

- 2. Ercan et al., Clin Cancer Res., 2015,
- 3. Tricker et al., Cancer Discov, 2015,
 - 4. Eberlein et al., Cancer Res, 2015

Ceritinib already approved by FDA





Crizotinib outcome and post-progression management in *ALK*+ NSCLC: IFCT-1302 CLINALK Post-progression management

- At time of data cut off, 262 (82.4%) patients had experienced progressive disease during crizotinib treatment.
- Median Duration of Treatment with crizotinib after disease progression was 56 days (IQR, 29-203).
- Subsequent systemic therapies were documented in 242 patients, 141 patients received subsequent systemic therapies.

| Systemic therapies after crizotinib failure | | | | | | | |
|---|------------------------|---|--|--|--|--|--|
| Drugs used | Patient exposed, n (%) | First line of therapy after crizotinib failure, n | | | | | |
| Crizotinib rechallenge | 36 (25.5) | 19 | | | | | |
| 2 nd G ALKi | 60 (42.5) | 58 | | | | | |
| Chemotherapy | 101 (71.6) | 61 | | | | | |
| Pemetrexed | 29 (20.6) | 20 | | | | | |
| Docetaxel | 23 (16.3) | 13 | | | | | |
| Platin-Pemetrexed | 13 (9.2) | 9 | | | | | |
| Platin-Paclitaxel | 6 (4.3) | 5 | | | | | |
| Others | 29 (20.6) | 12 | | | | | |
| Others | 17 (12.0) | 3 | | | | | |

2nd G ALKi: second-generation ALK inhibitor

Factors associated with an increased risk of death



| Variable | Tested | Reference | Univariate HR (95%CI) | Р | Multivariate HR (95%Cl) | Р |
|------------------------------------|-----------------|---|--------------------------|---------|----------------------------|---------|
| Age | ≥median | <median< td=""><td>0.97 (0.72-1.30)</td><td>0.83</td><td></td><td></td></median<> | 0.97 (0.72-1.30) | 0.83 | | |
| Gender | Female | Male | 1.05 (0.78-1.42) | 0.73 | | |
| ECOG PS | 2-4 | 0-1 | 2.90 (2.08-4.05) | <0.0001 | 2.90 (2.03-4.13) | <0.0001 |
| Setting of administration | EAP | Approved | 0.84 (0.59-1.20) | 0.33 | | |
| Smoking status | Former /Current | Never | 1.34 (0.99-1.81) | 0.05 | | |
| Current smoker at crizo initiation | Yes | No | 2.63 (1.70-4.07) | <0.0001 | 2.57 (1.62-4.07) | <0.0001 |
| Stage | IV | III | 0.94 (0.62-1.42) | 0.76 | | |
| Brain metastases | Yes | No | 0.93 (0.68-1.27) | 0.63 | | |
| Line of therapy before crizotinib | 2 | 1 | 1.32 (0.89-1.97) | 0.1622 | | |
| | 3 | 1 | 1.56 (0.98-2.48) | 0.06 | | |
| | 4 | 1 | 1.29 (0.81-2.06) | 0.29 | | |

^{*} Overall survival is measured from the start of first treatment with crizotinib; analysis cut-off April 8 2015; 2nd G ALKI; second-generation ALK inhibitor; NR: not reached



- La multisciplinarietà alla diagnosi
- L'ottimizzazione del materiale diagnostico
- La necessità di stare al passo con i tempi
- Nuovi farmaci, differente gestione del pz
- La consapevolezza del risultato "a termine"
- La comunicazione al pz: test e suoi risultati

Cancer patients' acceptance, understanding, and willingness-to-pay for pharmacogenomic testing Sinead Cuffe^a, Henrique Hon^a, Xin Qiu^b, Kimberly Tobros^a, Chung-Kwun Amy Wong^a, Bradley De Souza^a, Graham McFarlane^a, Sohaib Masroor^a, Abul K. Azad^a, Ekta Hasani^a, Natalie Rozanec^a, Natasha Leighl^a, Shabbir Alibhai^c, Wei Xu^b, Amalia M. Issa^d and Geoffrey Liu^a



Pharmacogenetics and Genomics 2014, Vol 24 No 7

| | Adjuvant (N=123) | Metastatic (N=121) |
|--|--|--|
| Sex Male Female | 56 (46) 67 (54) | 78 (64) 43 (36) |
| Age Median Range | 58 (21-90) | 62 (27-82) |
| Cancer Type Lung&Head and neck GI & Hepatobiliar Brest Other | 29 (24) 47 (38) 24 (20) 23 (18) | 42 (35) 39 (32) 8 (7) 32 (36) |
| Clinical Trial Experience Yes No | 100 (81) 23 (19) | 75 (62) 46 (38) |
| Previous Genetic Testing Yes No | 119 (97) 4 (3) | 110 (91) 11 (9) |

Cancer patients' acceptance, understanding, and willingness-to-pay for pharmacogenomic testing



Sinead Cuffe^a, Henrique Hon^a, Xin Qiu^b, Kimberly Tobros^a, Chung-Kwun Amy Wong^a, Bradley De Souza^a, Graham McFarlane^a, Sohaib Masroor^a, Abul K. Azad^a, Ekta Hasani^a, Natalie Rozanec^a, Natasha Leighl^a, Shabbir Alibhai^c, Wei Xu^b, Amalia M. Issa^d and Geoffrey Liu^a

Pharmacogenetics and Genomics 2014, Vol 24 No 7

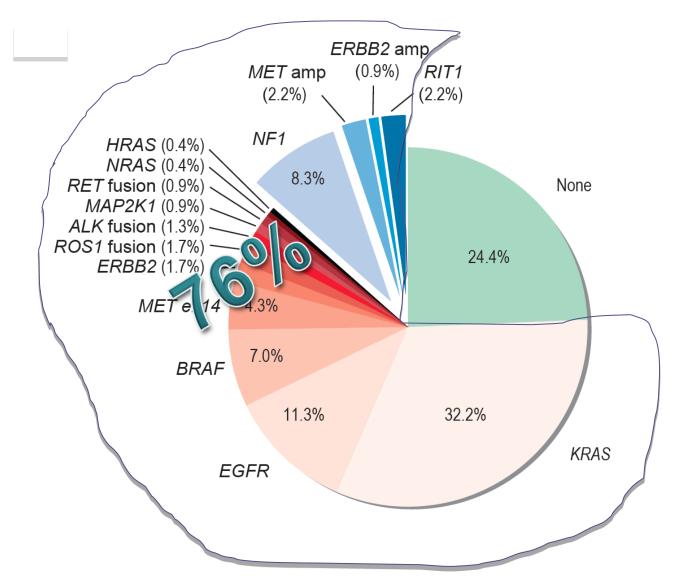
- The vast majority were accepting of pharmacogenomic testing and were willing to accept and delays in treatment to avail of testing (turnaround time 16 days, range 0-90).
- Ninety-two percent of patients were agreeable to an additional blood draw to facilitate testing, whereas just over half (55%) were agreeable to biopsy.
- One-fifth of patients indicated that they did not fully understand genetic testing and were worried about its implications.



- La multisciplinarietà alla diagnosi
- L'ottimizzazione del materiale diagnostico
- La necessità di stare al passo con i tempi
- Nuovi farmaci, differente gestione del pz
- La consapevolezza del risultato "a termine"
- La comunicazione al pz: test e suoi risultati
- I biomarkers sempre più...numerosi

Molecular Profiling of Lung Adenocarcinoma



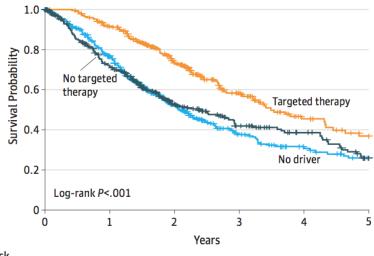


TCGA Research Network Nature 2014; 511:543



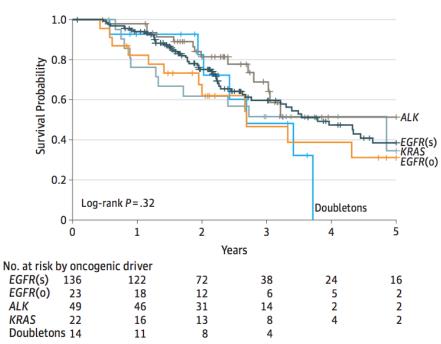
....not only "science"

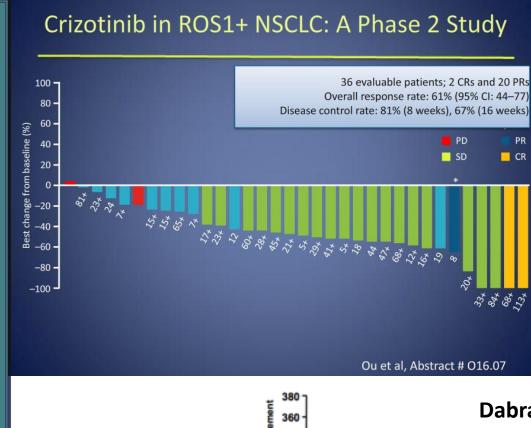
A Patients with an oncogenic driver mutation who did and did not receive targeted therapy, and patients without an ocogenic driver



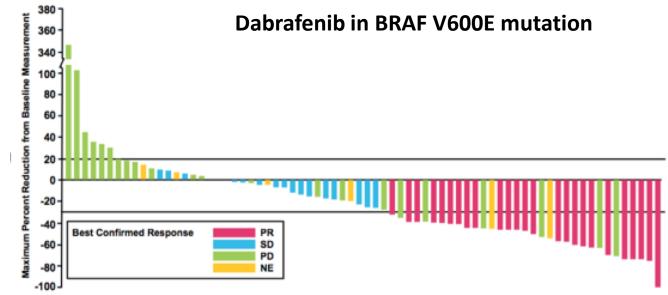
| | • | - | _ | • | | _ |
|---------------------|---------------|------|-------|----|----|----|
| | | | Years | | | |
| No. at risk | | | | | | |
| Patients with | oncogenic dri | iver | | | | |
| No targeted therapy | 318 | 205 | 110 | 64 | 43 | 20 |
| Targeted therapy | 260 | 225 | 143 | 72 | 36 | 23 |
| Patients with | 360 | 250 | 122 | 59 | 36 | 23 |

B Patients with the 5 most frequent oncogenic driver mutations who received targeted therapy











- La multisciplinarietà alla diagnosi
- L'ottimizzazione del materiale diagnostico
- La necessità di stare al passo con i tempi
- Nuovi farmaci, differente gestione del pz
- La consapevolezza del risultato "a termine"
- La comunicazione al pz: test e suoi risultati
- I biomarkers sempre più...numerosi
- Biomarker oggi, NON significa farmaco domani

Results

296 pts discussed 274 pt with Mol Ab

70 Pts with stage I/II 3 dead before MMTB



Mol Ab in 201 stage III/IV NSCLC pts

Treatment adapted on molecular profile? Yes 148 pts (74%)

Missing 5 (3%) **4**-----

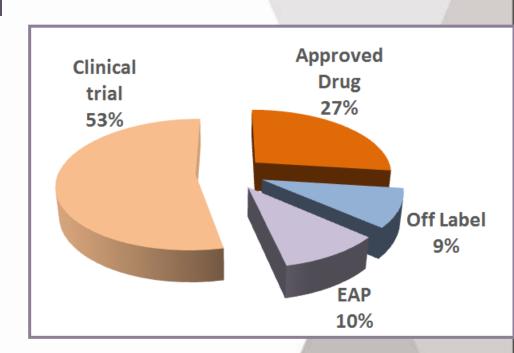


No treatment 59 pt (40%)



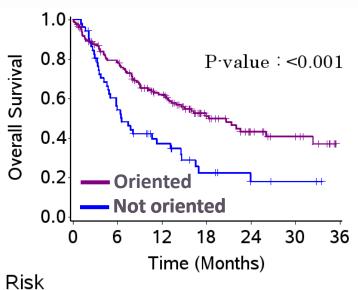
Pending 15 pts (10%)

Treatment done 69 pts (47%)



Overall survival

All patients (n=198)



Patients at Risk

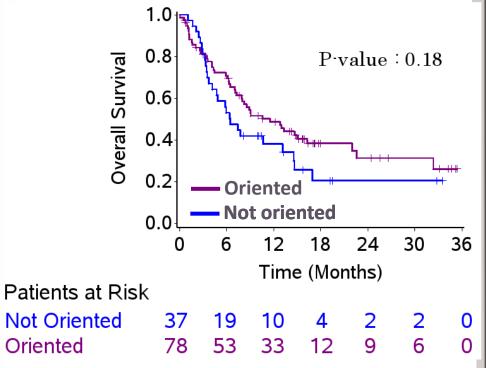
 Not Oriented
 52
 27
 15
 7
 3
 2
 0

 Oriented
 146
 108
 75
 38
 21
 13
 0

Median follow-up 18 months (range: 0.07-35)

| | MEDIAN OS (Months) |
|--------------|--------------------|
| Not Oriented | 7 |
| Oriented | 18 |

Without EGFR*m/ALK** (n=115)



Median follow-up 17 months (range: 0.07-35)

| | MEDIAN OS (Months) |
|--------------|--------------------|
| Not Oriented | 6 |
| Oriented | 12 |

Come co

Home Chi siamo » Per il paziente » Agenda » Link » Attività Walce »

Database Studi Clinici

Data Base degli Studi Clinici aperti in Italia: effettua la tua ricerca qui sotto.

Per essere sicuro di compilare in modo corretto questa griglia, leggi con attenzione le informazioni fornite dal tuo medico in merito alla malattia. Questo ti permetterà di ottenere indicazioni più precise.





- La multisciplinarietà alla diagnosi
- L'ottimizzazione del materiale diagnostico
- La necessità di stare al passo con i tempi
- Nuovi farmaci, differente gestione del pz
- La consapevolezza del risultato "a termine"
- La comunicazione al pz: test e suoi risultati
- I biomarkers sempre più...numerosi
- Oggi biomarker NON significa farmaco
- Sarà personalizzata anche l'immunoterapia?

Key Study Findings

| | PD-L | 1+ | PD-L | 1- | | Odds Ratio | Odds Ratio |
|----------------------------|----------|----------|---------------|-------|--------|--------------------|------------------------------------|
| Study or Subgroup | Events | Total | Events | Total | Weight | M-H, Fixed, 95% CI | M-H, Fixed, 95% CI |
| Brahmer et al. 2015 * | 11 | 63 | 9 | 54 | 24.8% | 1.06 [0.40, 2.78] | - |
| Garon et al. 2015** | 37 | 134 | 2 | 22 | 7.7% | 3.81 [0.85, 17.13] | • |
| Gulley et al. 2015 **** | 17 | 118 | 2 | 20 | 9.1% | 1.51 [0.32, 7.13] | - 1 |
| Paz-Ares et al. 2015* | 38 | 123 | 10 | 108 | 22.8% | 4.38 [2.06, 9.32] | |
| Rizvi et al. 2014 * | 8 | 26 | 5 | 26 | 10.7% | 1.87 [0.52, 6.73] | |
| Rizvi et al. 2015 * | 9 | 45 | 4 | 31 | 11.8% | 1.69 [0.47, 6.06] | |
| Spira et al. 2015 *** | 17 | 93 | 4 | 51 | 13.1% | 2.63 [0.83, 8.29] | |
| Total (95% CI) | | 602 | | 312 | 100.0% | 2.44 [1.61, 3.68] | • |
| Total events | 137 | | 36 | | | | • |
| Heterogeneity: Chi2 = 6 | .39, df= | 6 (P = 0 | 0.38); 2= | 6% | | | 1001 |
| Test for overall effect: Z | = 4.24 (| P < 0.0 | 001) | | | | 0.01 0.1 1 10 100 PD-L1- PD-L1+ |

^{*} Nivolumab; ** Pembrolizumab; ***Atezolizumab, ****Avelumab

PD-L1 is a predictive marker of ORR



"E secondo voi io dovrei escludere un paziente sotto un cut-off dell' 1% da un trattamento?" G Rossi, Firenze Settembre 2015

Methods

- -Studies reporting ORR to anti-PD1/PD-L1 MoAbs
- -Pre-treated NSCLC patients
- -Tumor PD-L1 expression, IHC cut-off: 1%
- -Searching: PubMed, Cochrane, ASCO, WCLC

Statistics

- -Outcome measure: ORR (WHO, RECIST criteria)
- -Odds Ratio (OR): correlation between ORR and PD-L1
- -Q-test (p:0.1): heterogeneity
- -Begg's and Egger's test (p:0.05): publication bias



PD-L1 as a predictive immune biomarker: assays, sample collection and analysis in NSCLC studies

| | Pembrolizumab Merck | Nivolumab Bristol-Myers Squibb | MPDL3280A Roche/Genentech | MEDI4736 AstraZeneca |
|---|--|---|--|--|
| PD-L1 Assay | Prototype or clinical trial IHC assay (22C3 Ab) ¹ | • Dako automated IHC assay (28-8 Ab) ^{3,4} | Ventana automated IHC assay | 1st generation or Ventana automated IHC (BenchMark ULTRA) assay (Ventana PD-L1 (SP263) clone)^{7,8} |
| Sample | Surface expression of PD- L1 on tumor specimen* | Surface expression of PD- L1 on tumor cells* | Surface expression of PD- L1 on TILs ⁵ | Surface expression of PD- L1 on TILs |
| Collection | Source and Collection Ph I: Fresh tissue Ph II/III: Archival or fresh tissue Archival⁴ or fresh tissue | • Archival ⁴ or fresh tissue | Archival or fresh tissue | PhI: Fresh tissue |
| Definition of Positivity [†] | IHC Staining: Strong vs weak expression² PD-L1 expression required for NSCLC for enrollment² Note that one arm of KEYNOTE 001 trial requires PD-L1⁻ tumors¹ Tumor PD-L1 expression:¹ ≥50% PD-L1⁺ cut-off: 32% (41/129) 1-49% PD-L1⁺ cut-off: 36% (46/129) | IHC Staining: Strong vs weak expression^{3,4} Patients not restricted in PD-L1 status in 2nd- & 3rd-line⁴ Ph III 1st-line trial in PD-L1+³ Tumor PD-L1 expression:⁴ 5% PD-L1+ cut-off: 49% (33/68)⁴ | IHC Staining intensity (0, 1, 2, 3): •IHC 3 (≥10% PD-L1+): Ph III trial ⁵ •IHC 2,3 (≥5% PD-L1+) ⁵ •IHC 1,2,3 (≥1% PD-L1+) ⁵ •IHC 1, 0, or unknown •PD-L1 expression required for NSCLC for enrollment TIL PD-L1 expression: ^{5,6} •IHC 3 (≥10% PD-L1+): 11% (6/53) •PD-L1 low (IHC 1, 0): 75% (40/53) | IHC Staining intensity: Not presented to date^{7,8,9} TIL PD-L1 expression: Not presented to date^{7,8,9} |

IASLC:PDL-1 PROJECT



- Comparison of different antibodies
- Application to different staining platforms
- Intra- and inter-observer reproducibility(interlaboratory reproducibility)
- Large specimens vs small specimens vs cytology from same tumors
- Prognostic association based on a well defined cohort
- Predictive association : PD1/PDL1 treated pts
- ATLAS



Phase 1: Review Manuscript

Investigators will conduct an extensive review of the literature methods and the role of PDL1 diagnostics in conjunction the treatment of lung cancer. Based on the literature revi manuscript will be written.

Phase 2: Standardization of PDL1 immunohistochemistry

Participating investigators/centers

20-24 investigators up to 11 countries worldwide (IASLC F

Research - Specimens

Set-1: Each investigator will contribute 2 resection cases formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks. Overall squamous cell carcinoma, and 10% large cell carcinoma, verification by IHC markers as needed. Send to central lab blocks of various ages, ranging from <1 year to up to 5 year

Set-2: 10 Core needle biopsy samples from freshly resected (2 cores separately in 2 blocks per case). 10 Cytology sam tumor prepared by 1-2 investigators (2 blocks per case).

Set-3: 300-1000 (or more) NSCLC cases from selected inve cohorts to assess prognostic value of PDL1 staining

PDL1 IHC Standardization and ATLAS



IHC Platforms

Investigators will use existing available autostainer at their institutions Ventana

Leica

Dako

Antibodies

SP142 Spring Bioscience/Ventana (commercially available)

E1L3N Cell Signaling (commercially available)

Others (non-commercial antibody to be provided by study sponsors)

Research Phase 2

Three laboratories with Dako, Leica and Ventana autostainers, respectively, will be tasked to develop the optimal staining protocol, using tonsil and placenta as positive controls. These protocols will then be distributed to investigators based on their autostainer availability and choice.

Slides from 20 set-1 unique specimens will be distributed to each investigator. Staining will be performed using the optimized protocol. All slides will be imaged using Aperio scanner. PDL-1 expression will be scored by participating investigator for % cells staining at each intensity level (0, 1, 2, 3) and an H-score derived. Staining patterns will be noted.

All scores and images will be collected and statistical analyses performed

Overall interclass correlation

Extent of variation across individual samples

Any variation based on platform used

Investigator meeting #1 will assess results of this multicenter study, compare the antibody performance with each autostainer, and identify labs that require further protocol optimization. If needed, the protocols can be further adjusted to become a the "IASLC recommended" protocols. For discussion purposes, slide images from selected laboratories will be shown during this meeting.

Validate the consensus protocols The remaining 20 unique specimens will be distributed to each investigator to be stained using the recommended protocols. Specimens will be scored for % cells staining at each intensity level (0, 1, 2, 3) and an H-score derived. The results will be analyzed for overall interclass correlation and 3 compared to the results from first round study.

