

# Biologia moleculară a CBP – informații practice pentru echipa multidisciplinară

Teodora Alexa-Stratulat, MD, PhD

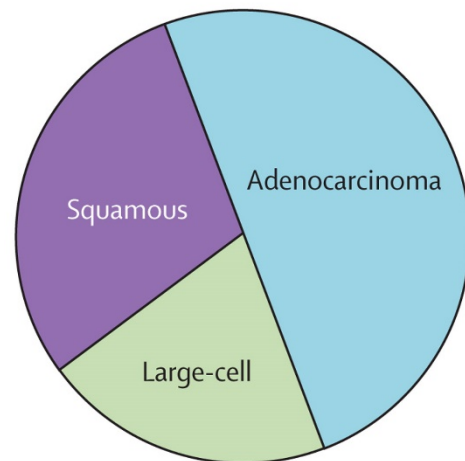
UMF Grigore T Popa, Iași

Institutul Regional de Oncologie Iași

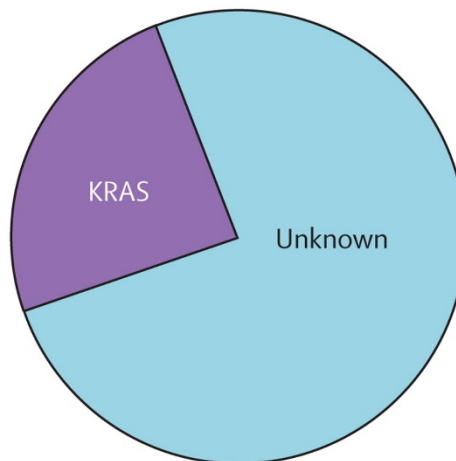
# Introducere

- apariția CBP – proces multistadial de transformare al unei celule normale în celulă tumorală rezultat în urma diferitelor evenimente moleculare ce determină câștig/pierdere de funcție
- consecutiv mutațiilor genetice, sunt alterate numeroase căi de semnalizare implicate în proliferare celulară, diferențiere, apoptoză, invazie, metastazare
- au fost identificate numeroase gene implicate în tumorigeneza CBP, iar fiecare subtip histologic poate prezenta setul propriu de anomalii genetice

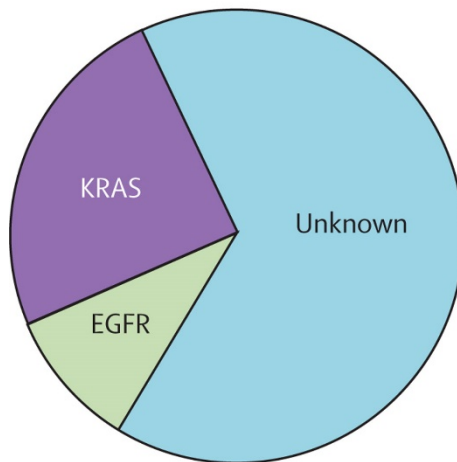
Traditional view



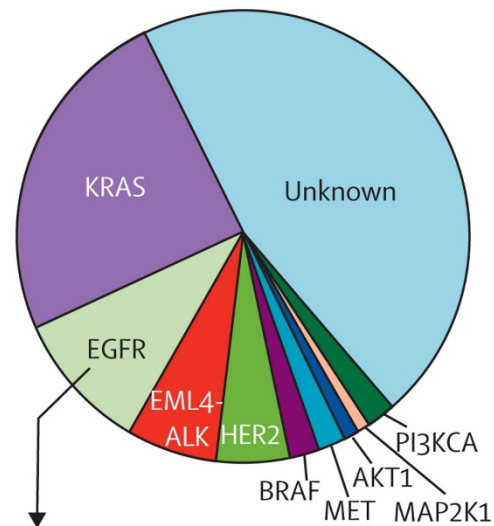
1987



2004

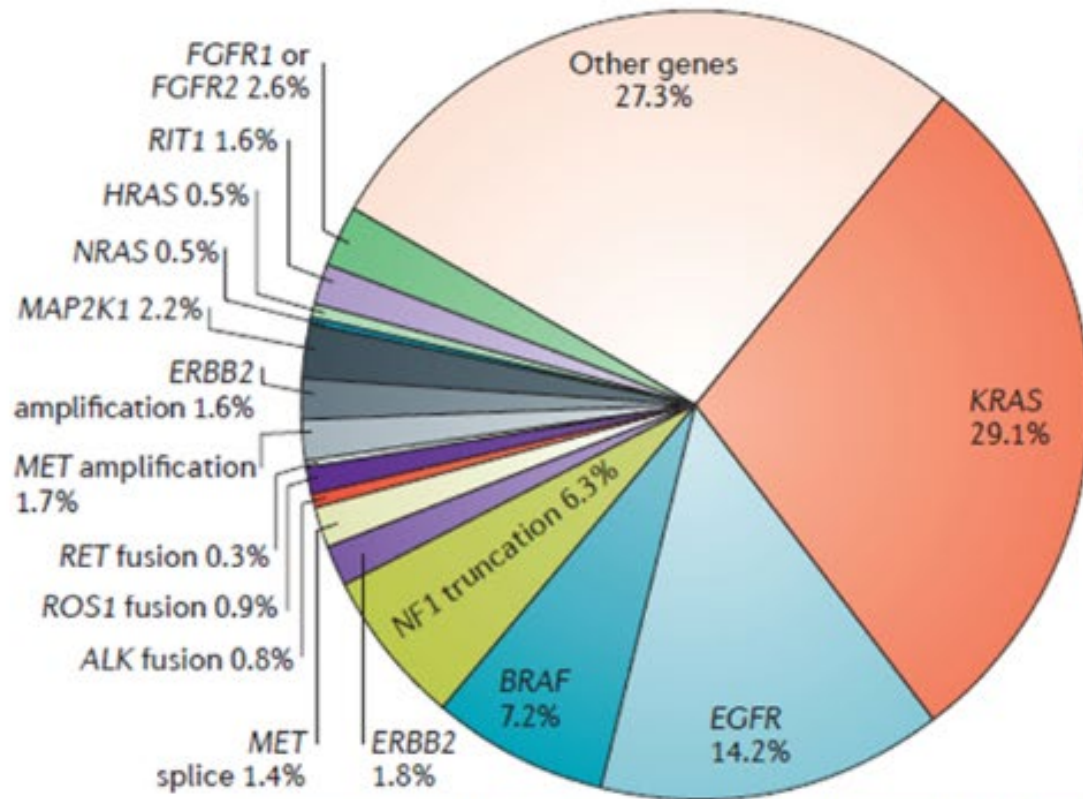


2009



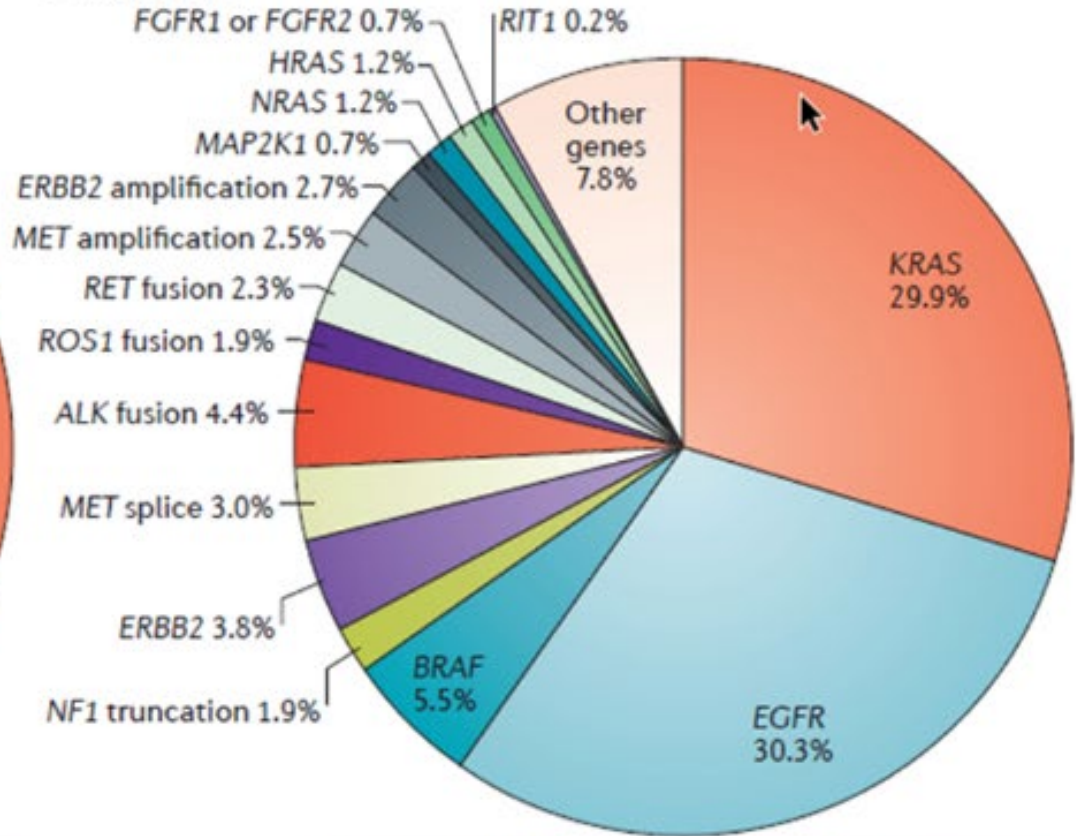
- **Mutations associated with drug sensitivity**  
EGFR Gly719X, exon 19 deletion, Leu858Arg, Leu861Gln
- **Mutations associated with primary drug resistance**  
EGFR exon 20 insertions
- **Mutations associated with acquired drug resistance**  
EGFR Thr790Met, Asp761Tyr, Leu747Ser, Thr854Ala

**a Early stage**



Data from TCGA (Sanchez-Vega et al.<sup>178</sup>, Ellrott et al.<sup>179</sup> and Hoadley et al.<sup>100</sup>), Imielinski et al.<sup>62</sup> and Kadara et al.<sup>133</sup> (n = 741)

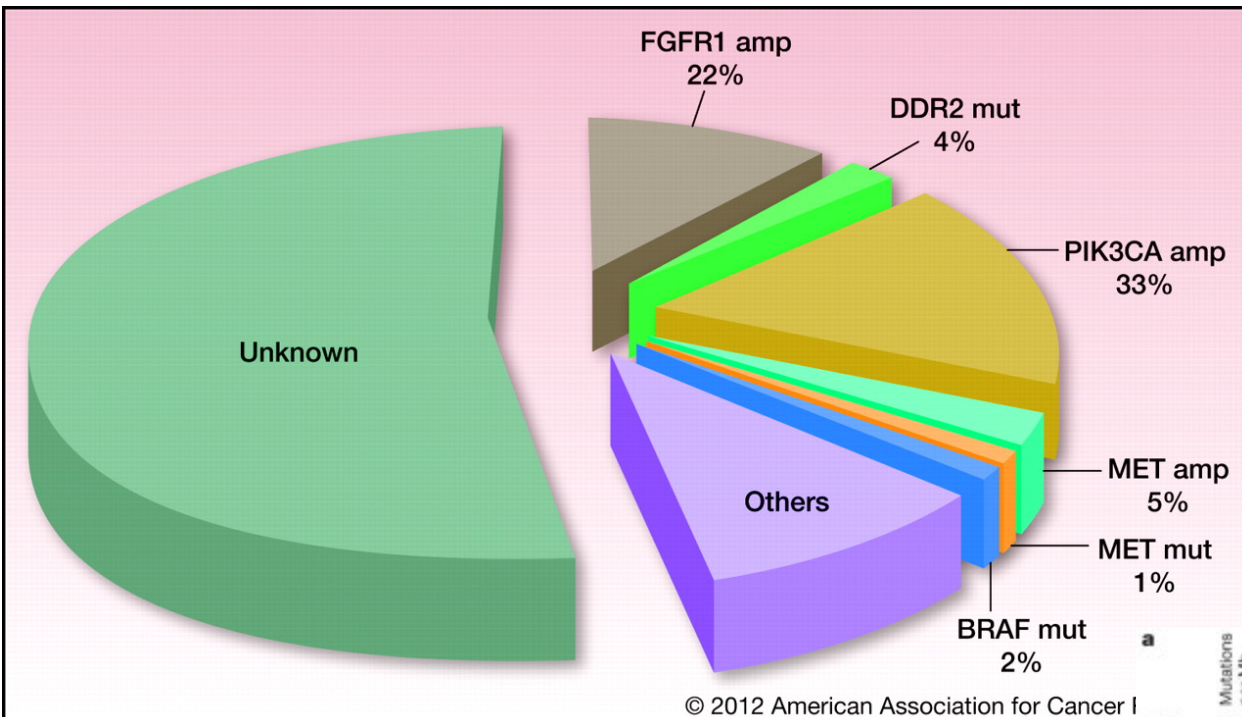
**b Metastatic**



Data from MSK-IMPACT (Jordan et al.<sup>59</sup>) and FoundationOne (Frampton et al.<sup>15</sup>) panels (n = 5262)

- CBP non-microcelular, varianta adenocarcinom, 2019

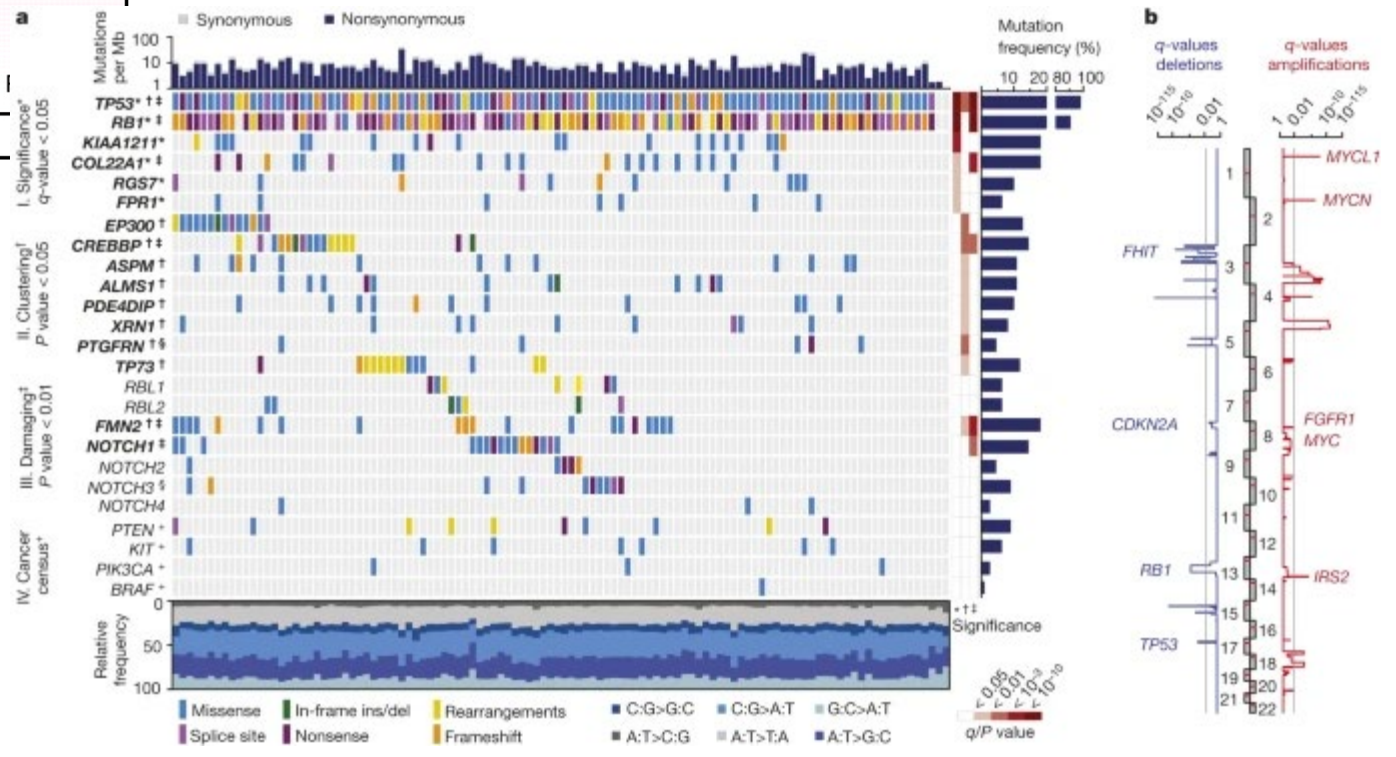




CCR Reviews

CBP non-microcellular, varianta carcinom scuamocelular

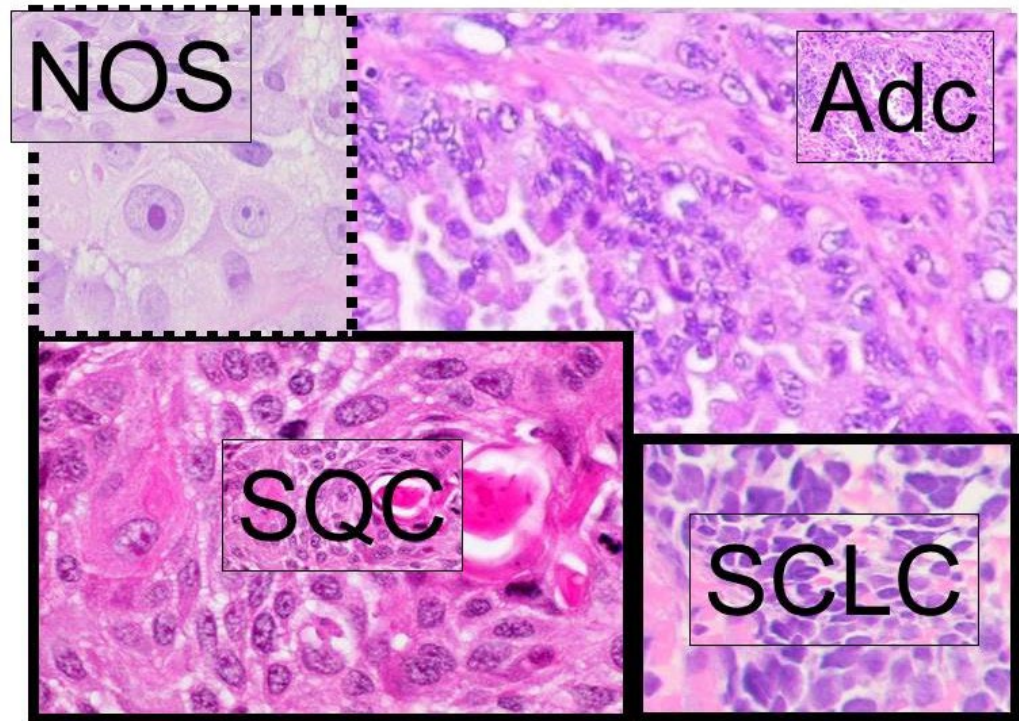
CBP microcellular



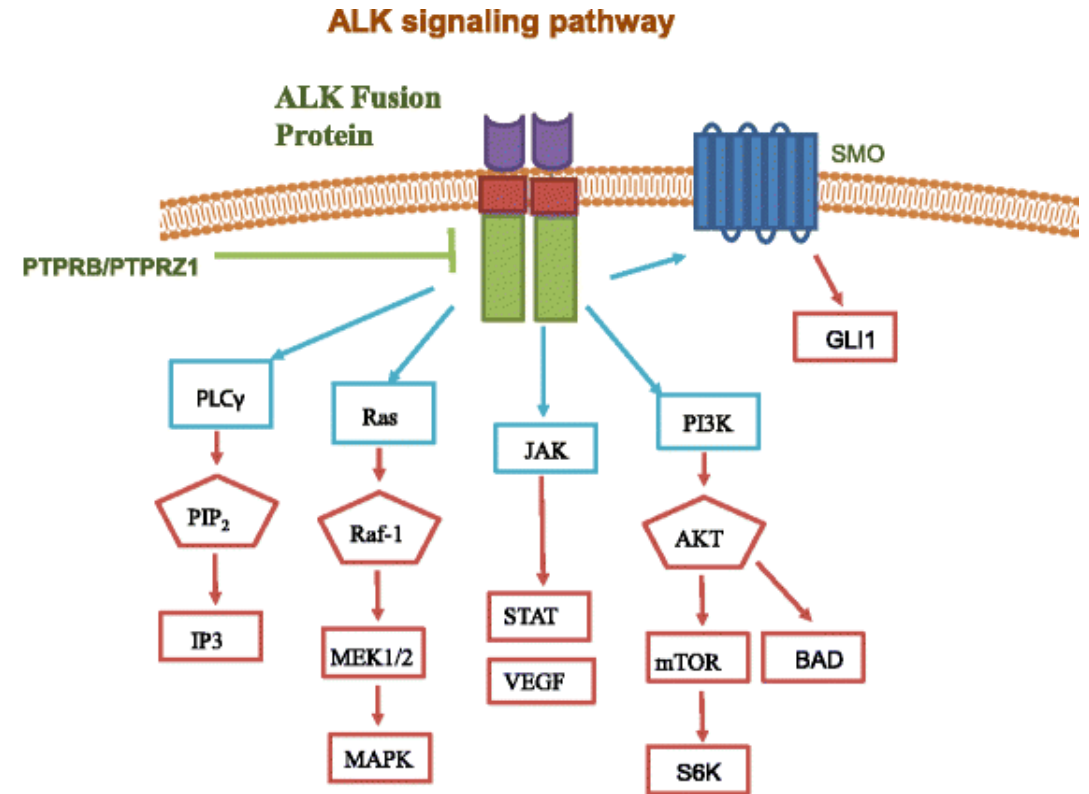
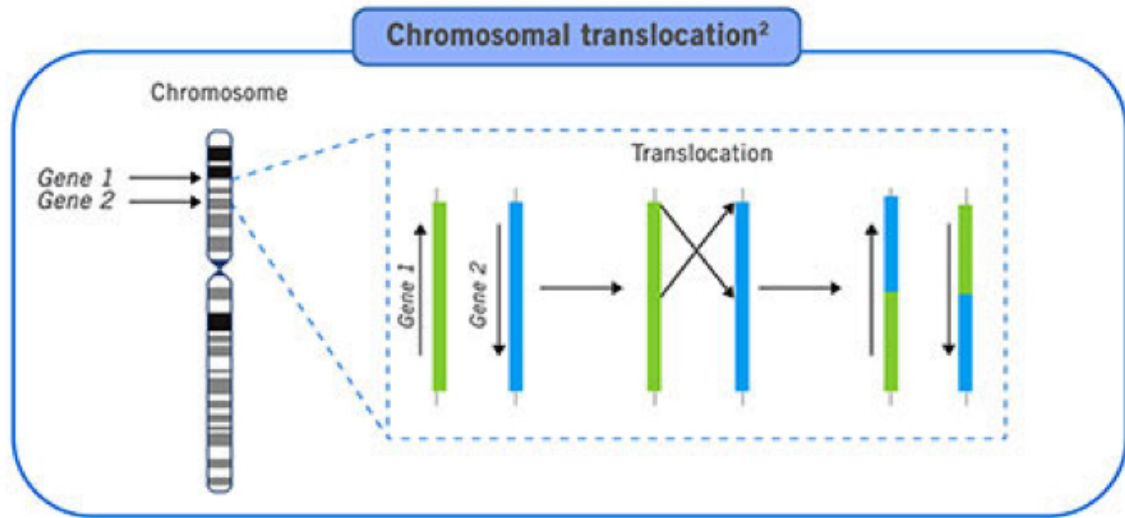
# Oct 2020...

- CBP cu mutație EGFR – 10-15% cazuri (30-60% asiatici)
- CBP cu translocatie ALK – 3-5% cazuri
- CBP cu translocatie ROS1 – 1-2% cazuri
- CBP cu mutație BRAF – 1-2% cazuri
- CBP cu mutație RET – 1-2% cazuri
- **CBP PDL1 pozitiv**

- Prima etapă în analiza de biologie moleculară este reprezentată de evaluarea anatomo-patologică



# Translocația ALK



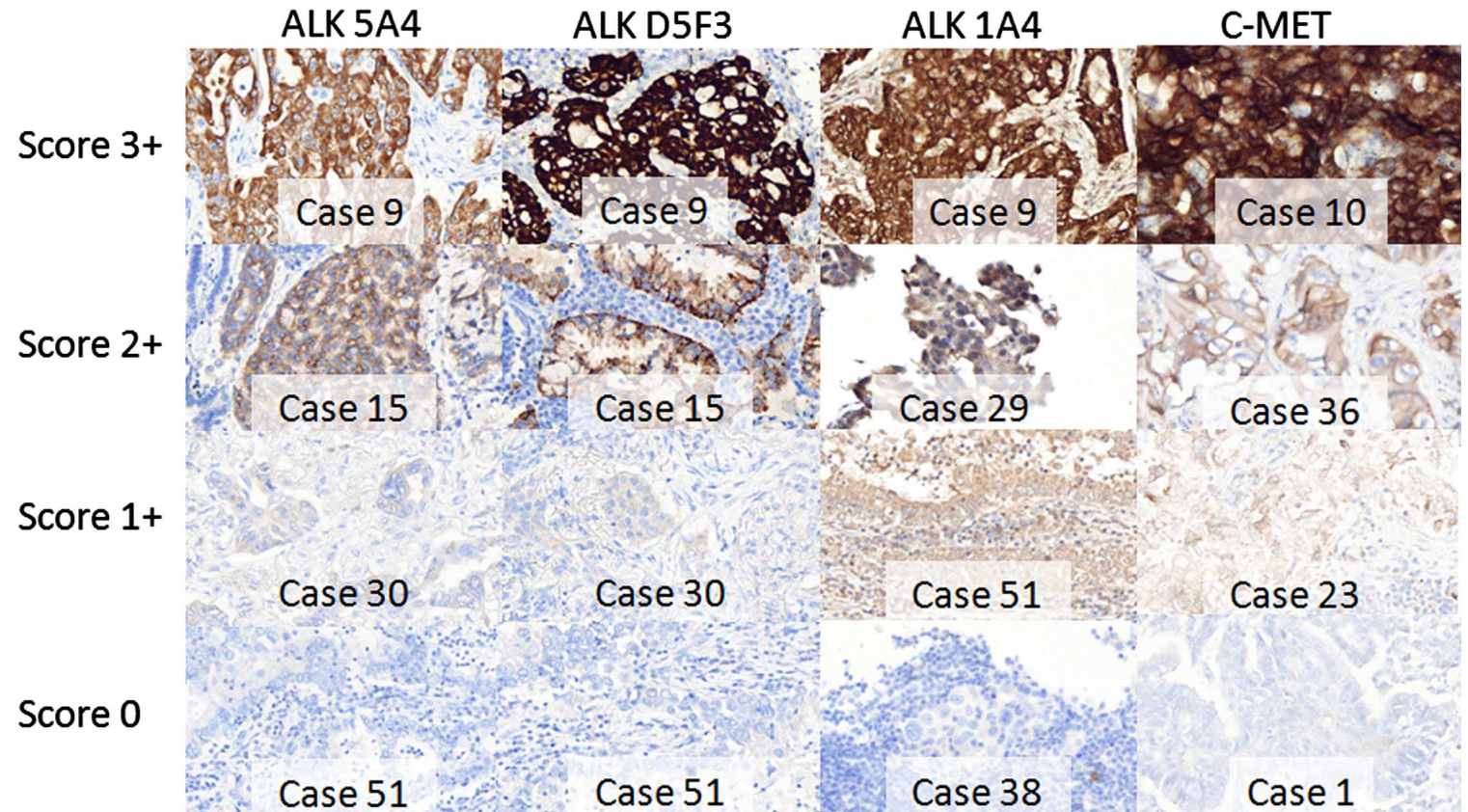
Cell proliferation, invasion, migration, inhibition of apoptosis, angiogenesis



# Metode de determinare

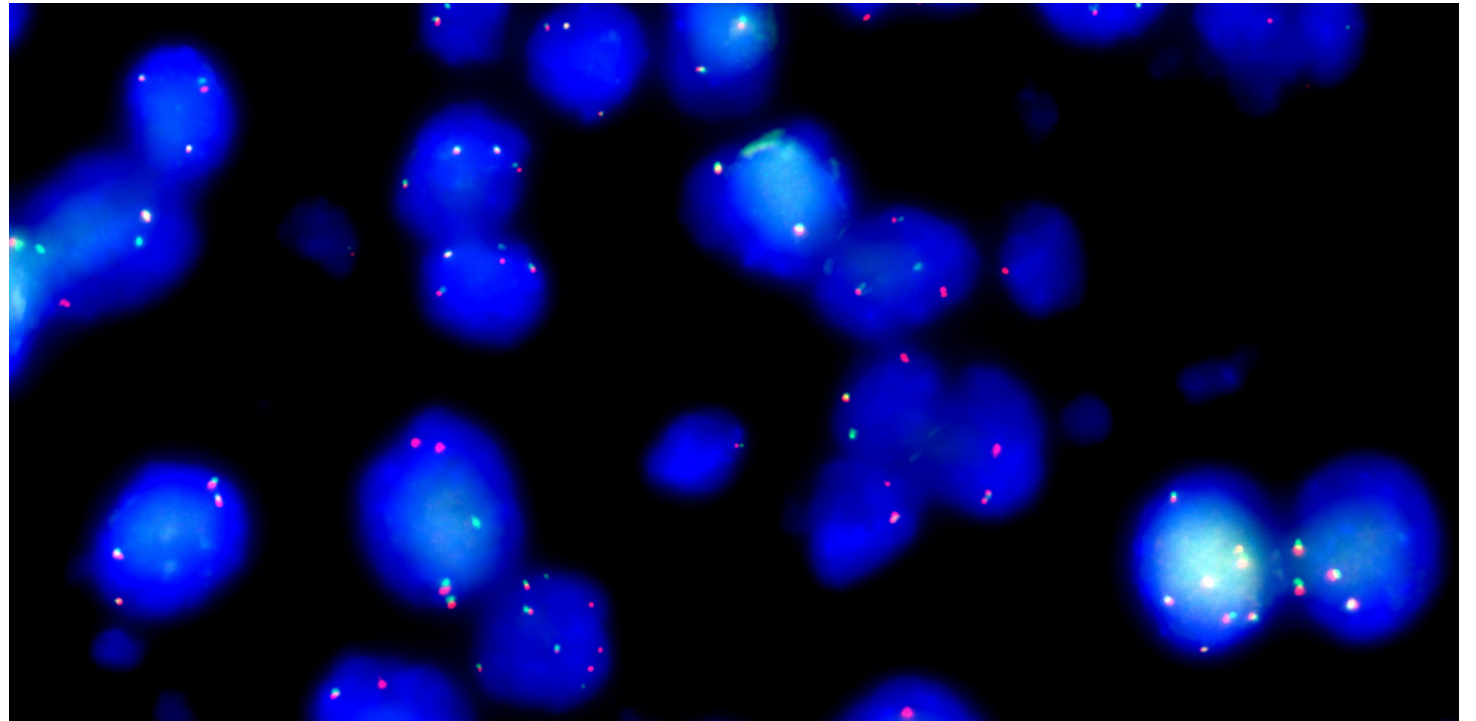
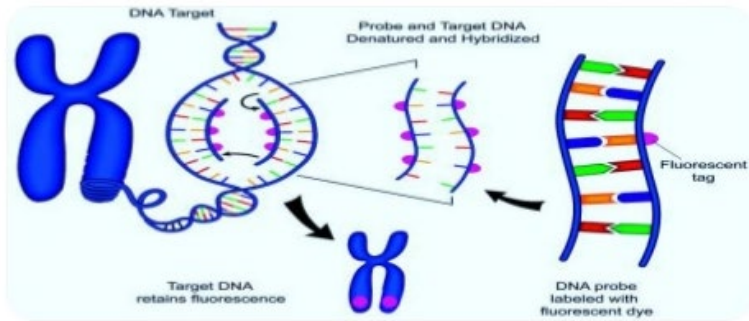
## IHC

- doi anticorpi validați – 5A4, D5F3, la fel de eficienți (de evitat anticorpii ALK pentru limfom)
- rapiditate în obținerea rezultatelor
- detectează majoritatea tumorilor ALK pozitive
- dacă există dubii, se poate realiza FISH



# Metode de determinare

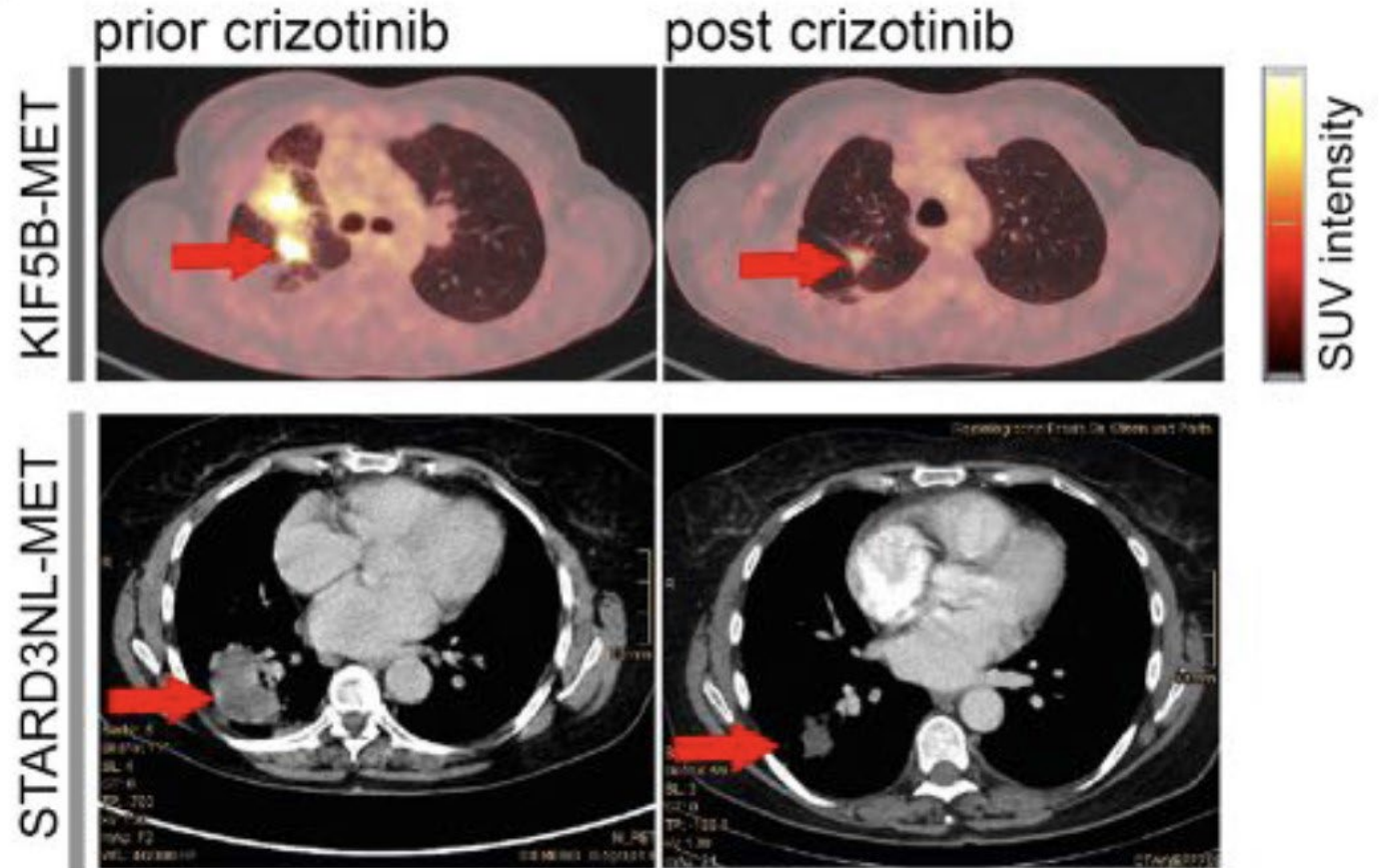
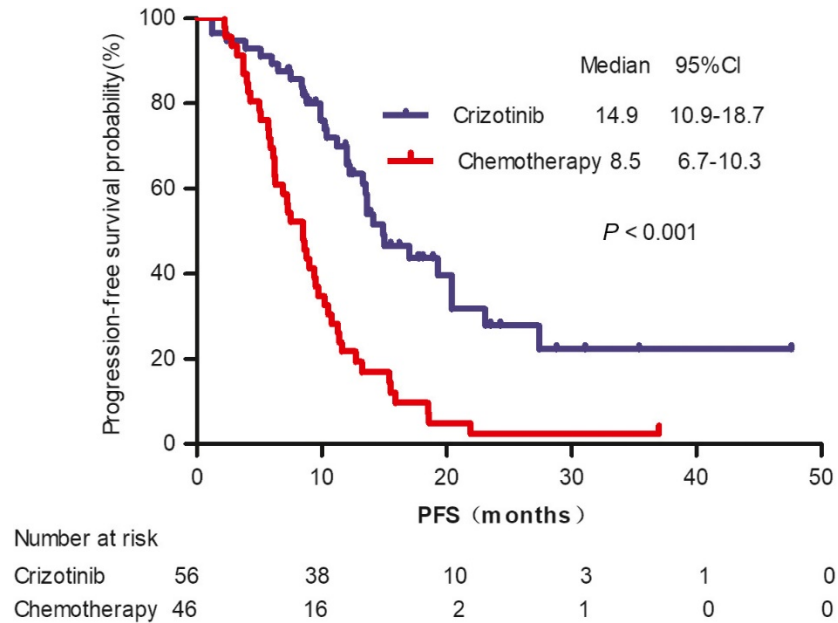
## FISH



Schematic representation of FISH technique. A DNA probe is tagged with a fluorescent marker. The probe and target DNA are denatured, and the probe is allowed to hybridize with the target. The fluorescent tag is then detected with a fluorescent microscope.



# De ce este important să identificăm pacienții ALK pozitivi?



# Terapii la pacienții ALK+

Tratamentul cu inhibitori ALK se asociază cu rate de supraviețuire de 41% la 18 luni

- **Alectinib**
- Brigatinib
- Ceritinib
- Crizotinib
- Lorlatinib

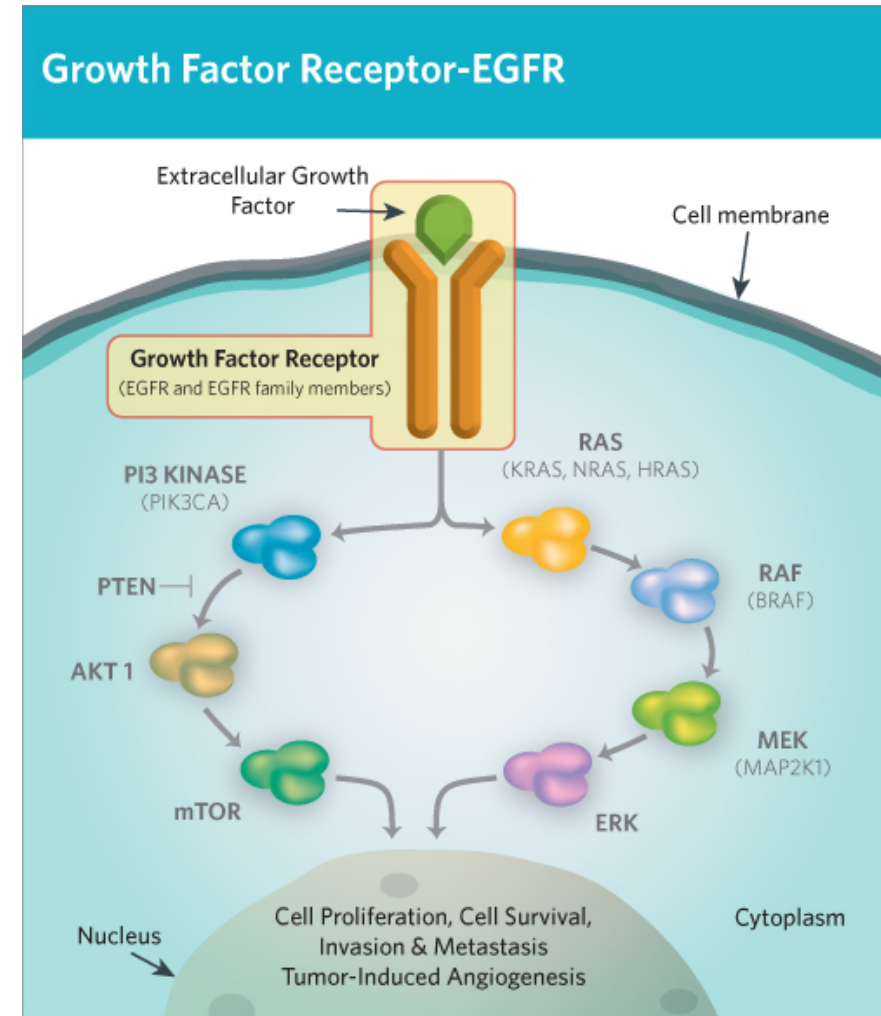
# Considerații practice

- Translocația ALK trebuie testată în toate cazurile de ADK pulmonar
- testarea se realizează gratuit cu sprijinul diferitelor firme de medicamente care pun la dispoziție vouchere
- rezultatele testării durează în medie 7-10 zile
- suspectați prezența translocației ALK în special la nefumători, tineri, boală avansată, MTS cerebrale
- terapia țintită anti-ALK prelungește semnificativ supraviețuirea pacientului și este mult mai bine tolerată decât chimioterapia



# Mutația EGFR

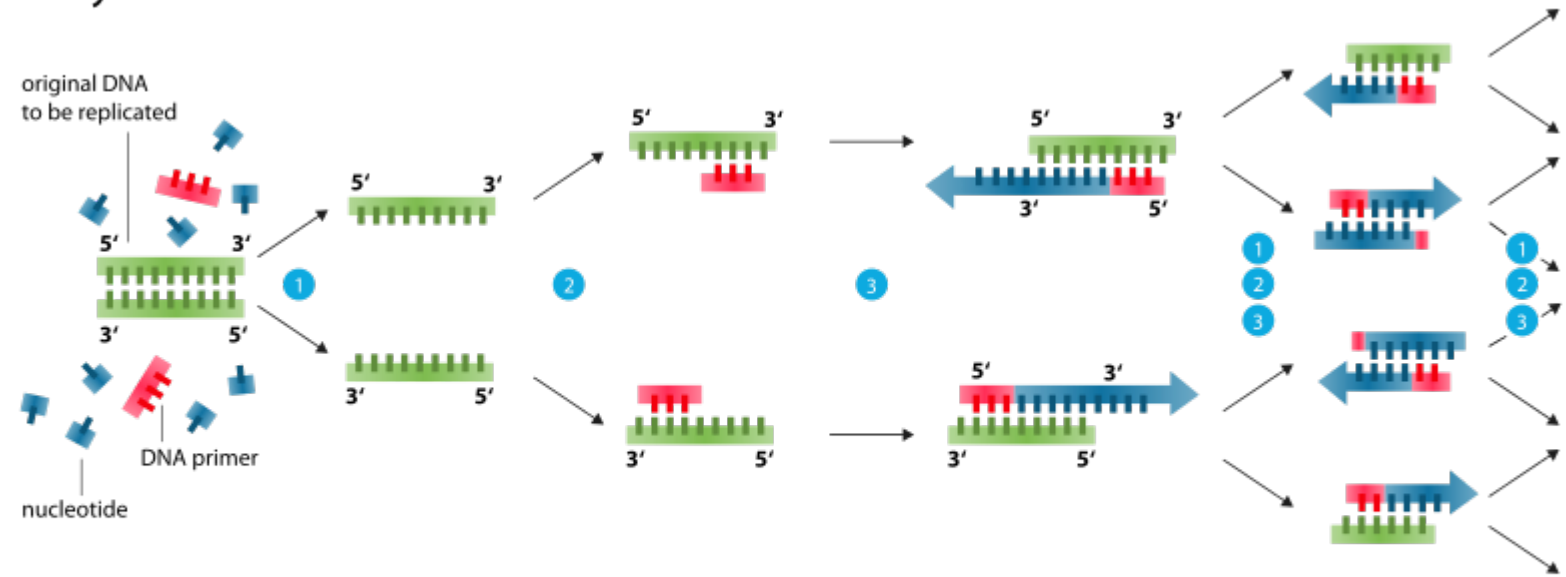
- EGFR reprezintă o cale de semnalizare frecvent afectată în ADK
- 10-15% pacienți prezintă mutații (deleții în exonul 19 sau mutații punctiforme în exonul 21) care se asociază cu activarea constitutivă a căii de transducție a semnalului



# Metode de determinare

- pirosecvențiere
- **PCR**
- NGS

## Polymerase chain reaction - PCR

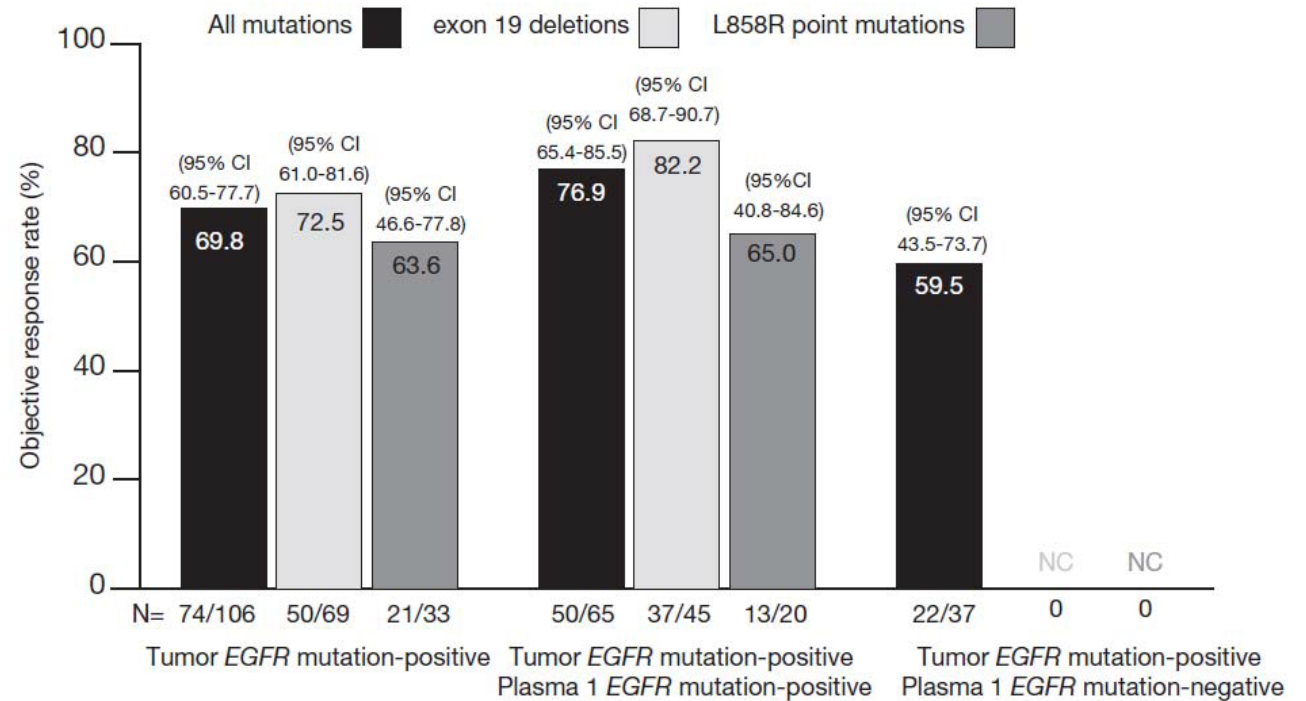
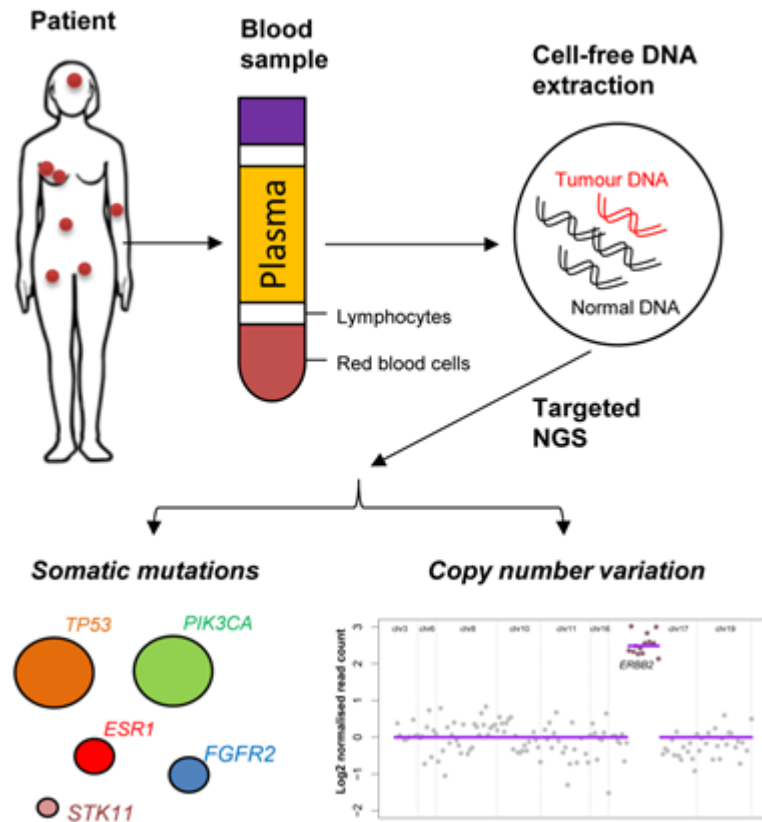


- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

# The issue is the Tissue

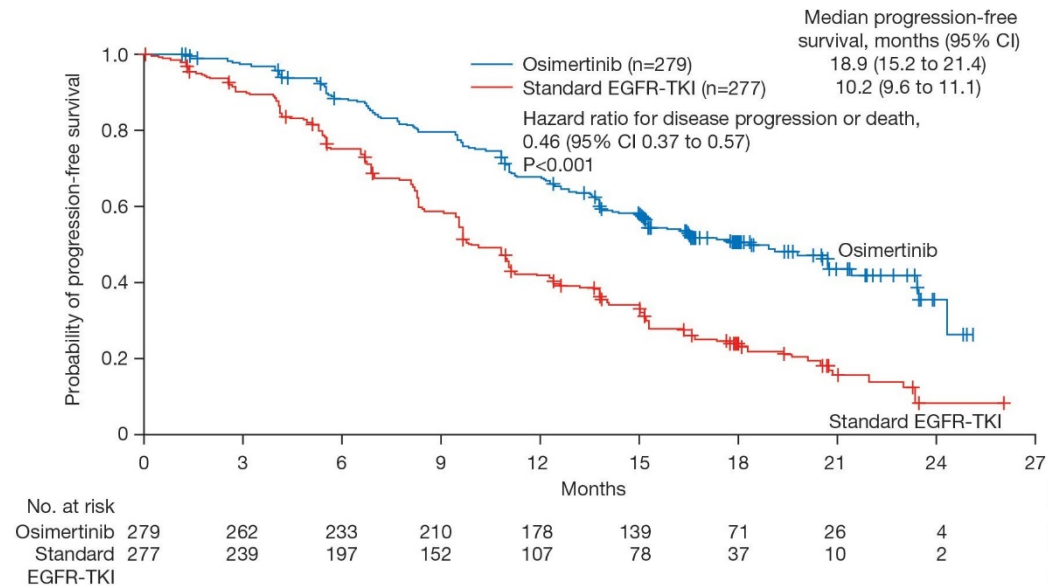
- Specimene chirurgicale de bună calitate – 25%
- Biopsii prin FBH/EBUS – 50% (cantitate mică de celule tumorale)
- Diagnostic citologic – 25%

# Biopsie lichidă – identificarea EGFR în sânge



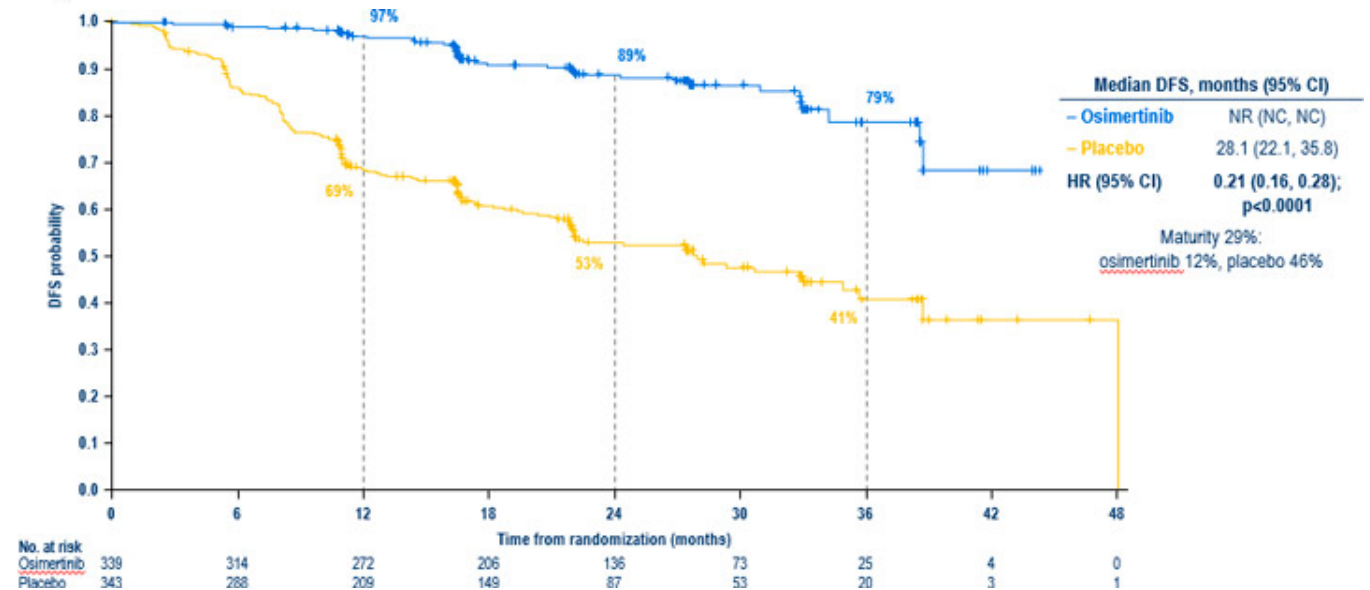
• Douillard JTO 2014

# De ce este important să identificăm pacienții EGFR pozitivi?



The New England Journal of Medicine ©2017

## • ASCO 2020 - ADAURA





# Terapii la pacienții EGFR +

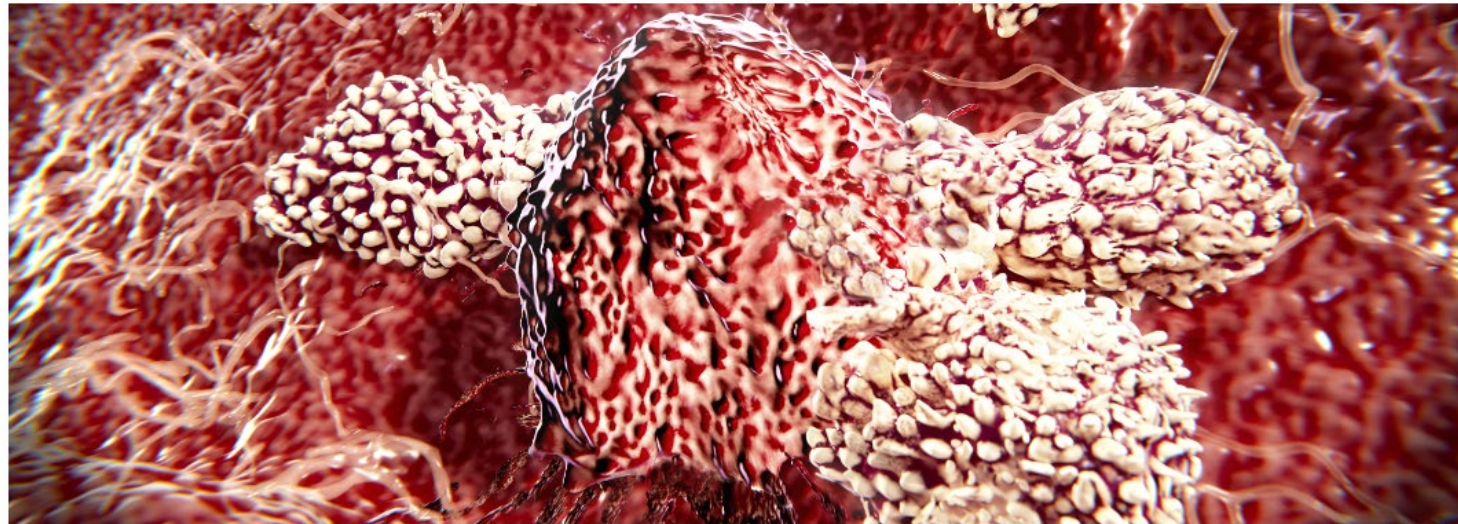
- Tratatamentul cu TKI se asociază cu rate de supraviețuire medie de peste 3 ani în stadiul metastatic
- Exemple:
  - Afatinib
  - Dacomitinib
  - Erlotinib
  - Gefitinib
  - **Osimertinib**
  - Erlotinib + ramucirumab
  - Erlotinib + bevacizumab

# Considerații practice

- Mutația EGFR trebuie testată în toate cazurile de ADK pulmonar (și în cc scuamocelular la nefumători)
- testarea se realizează gratuit cu sprijinul diferitelor firme de medicamente care pun la dispoziție vouchere
- rezultatele testării durează în medie 7-10 zile
- suspectați prezența mutației EGFR în special la nefumători, femei, boli avansate, status de performanță bun, asiatici
- terapia țintită anti-EGFR prelungeste semnificativ supraviețuirea pacientului și este mult mai bine tolerată decât chimioterapia

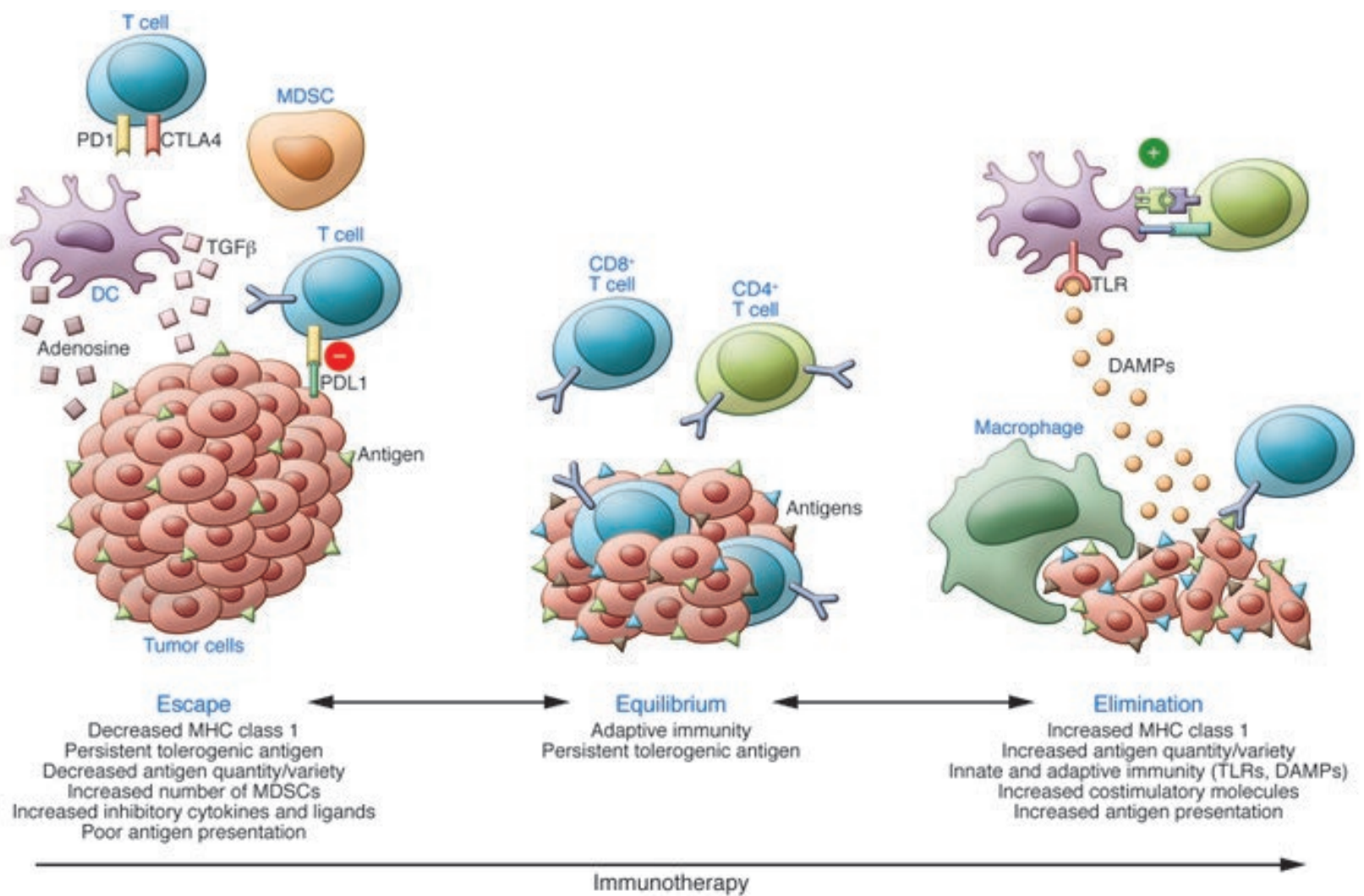
# Molecule imunomodulatorii

## Nobel Prize 2018: Cancer Immunotherapy Collection



The Nobel Prize for Medicine or Physiology 2018 was awarded this week to James P. Allison of the University of Texas MD Anderson Cancer Center and Tasuku Honjo of Kyoto University for their discovery of cancer therapy by inhibition of negative immune regulation.

Allison has been recognised by the Nobel Prize Committee for his work on CTLA-4 a checkpoint protein which inhibits T cells from attacking cancer tumour cells. Honjo discovered the PD-1 protein family, which inhibit T cells from attacking by a different mechanism. Both scientists worked independently on inhibiting these checkpoints,



**Escape**  
 Decreased MHC class 1  
 Persistent tolerogenic antigen  
 Decreased antigen quantity/variety  
 Increased number of MDSCs  
 Increased inhibitory cytokines and ligands  
 Poor antigen presentation

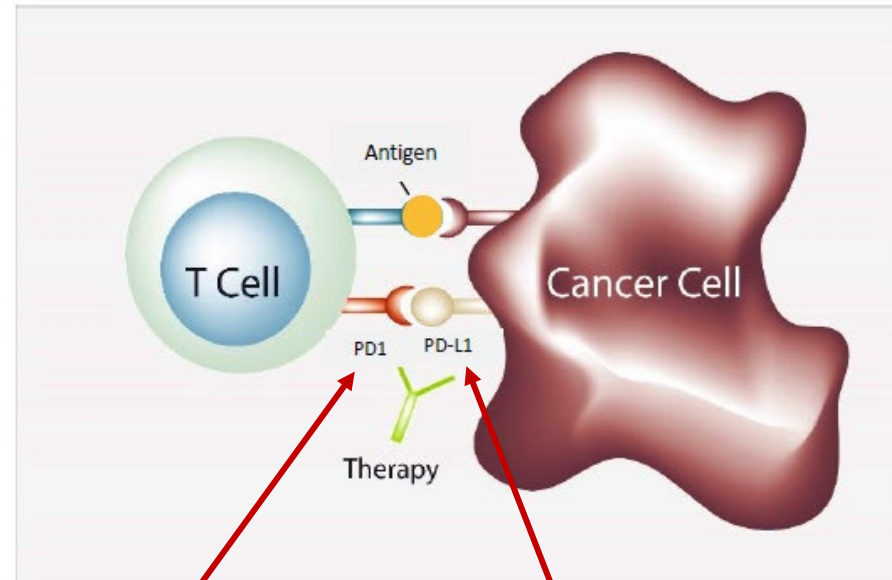
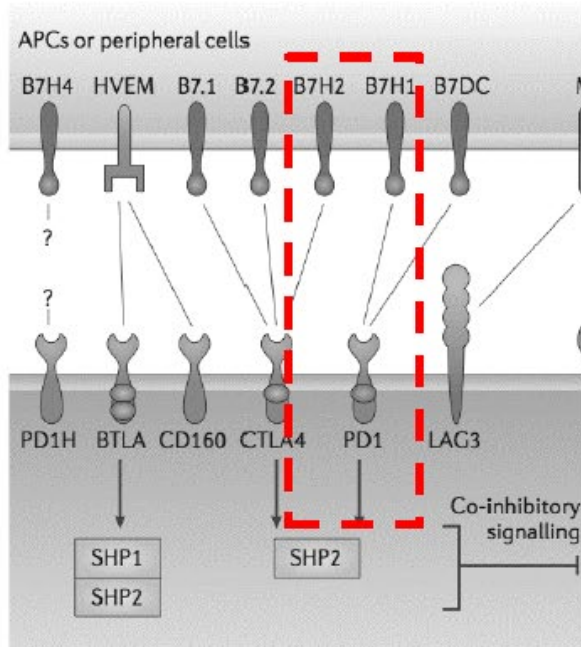
**Equilibrium**  
 Adaptive immunity  
 Persistent tolerogenic antigen

**Elimination**  
 Increased MHC class 1  
 Increased antigen quantity/variety  
 Innate and adaptive immunity (TLRs, DAMPs)  
 Increased costimulatory molecules  
 Increased antigen presentation

Immunotherapy



# PD/PD-L



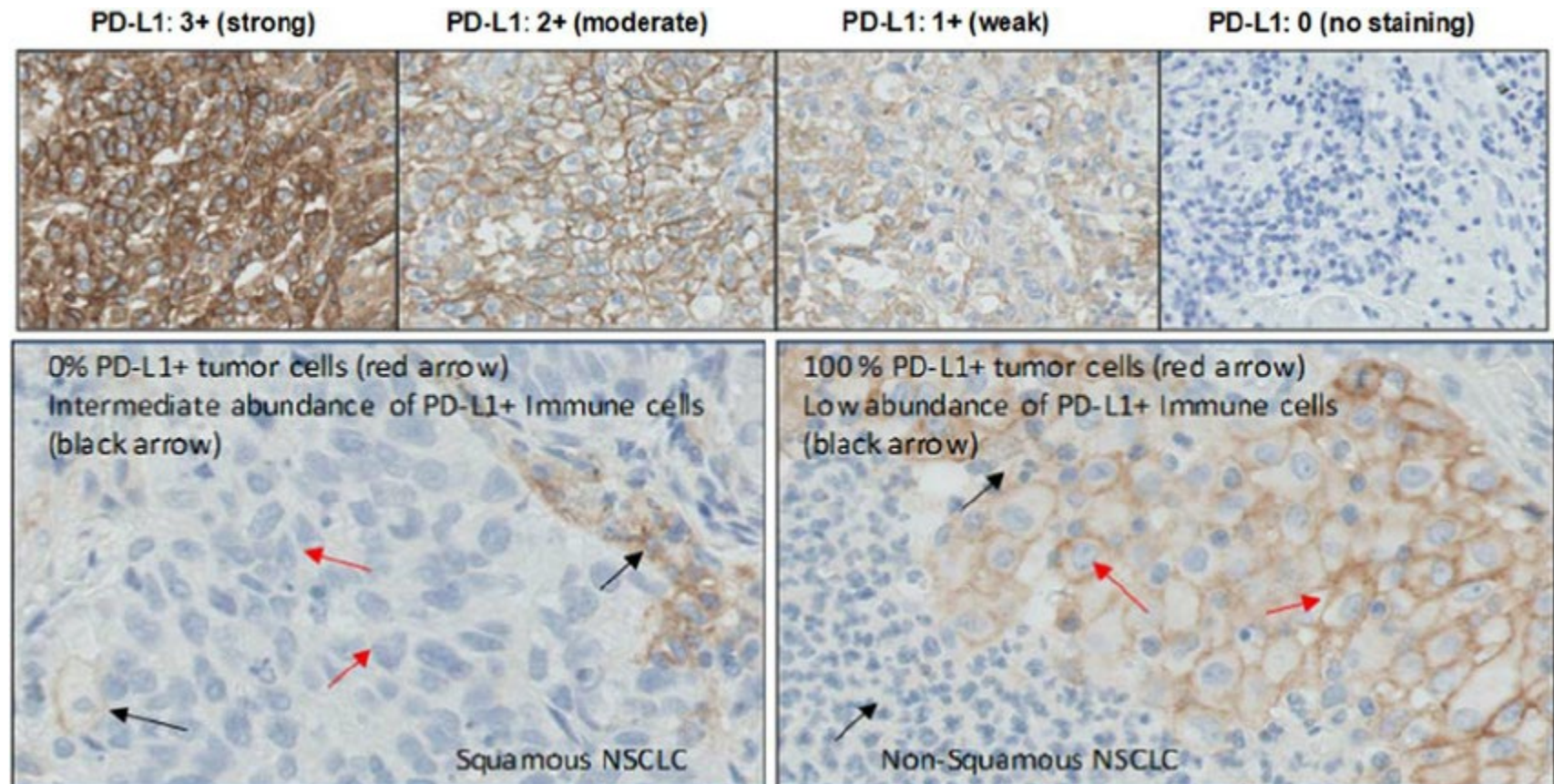
Nivolumab  
Pembrolizumab

Durvalumab  
Atezolizumab



# Metode de determinare

- IHC



# Provocări

- numeroase imunoterapice dezvoltate în același timp, fiecare cu platforma proprie de analiză

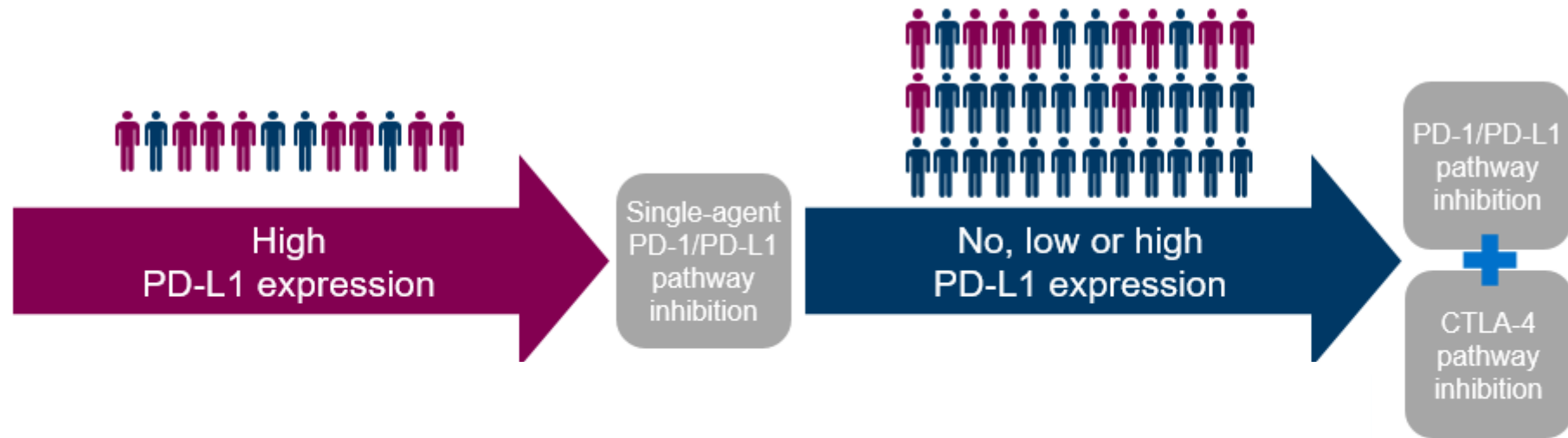
**Table 2.** Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Immunohistochemistry Assays According to Drugs and Diagnostic Tests

Drug	PD-L1 Diagnostic Antibody Clone	PD-L1 Binding Domain	Platform	Second- line Criteria for PD-L1 Positivity
Nivolumab (Bristol-Myers Squibb)	28-8 (rabbit)	Extracellular	Link 48 Autostainer	≥1% tumor cells
Pembrolizumab (Merck)	22C3 (mouse)	Extracellular	Link 48 Autostainer	≥50% tumor cells
Atezolizumab (Genentech/Roche)	SP142 (rabbit)	Cytoplasmic	BenchMark ULTRA	Tumor cells and/or tumor-infiltrating immune cells
Durvalumab (AstraZeneca/ MedImmune)	SP263 (rabbit)	Extracellular <sup>a</sup>	BenchMark	≥25% tumor cells
Avelumab (Pfizer/Merck Serono)	73-10	unknown	Dako assay	≥1% tumor cells

<sup>a</sup>Epitope of AA249-290 membrane and intracytoplasmic. Antibody clones 28-8, 22C3, and 73-10, and Link 48 Autostainer are products of Agilent Technologies/Dako. Antibody clones SP142 and SP263 and BenchMark and BenchMark ULTRA are products of Ventana.

IASLC ATLAS PD-L1 IMMUNOHISTOCHEMISTRY TESTING IN LUNG, 2017

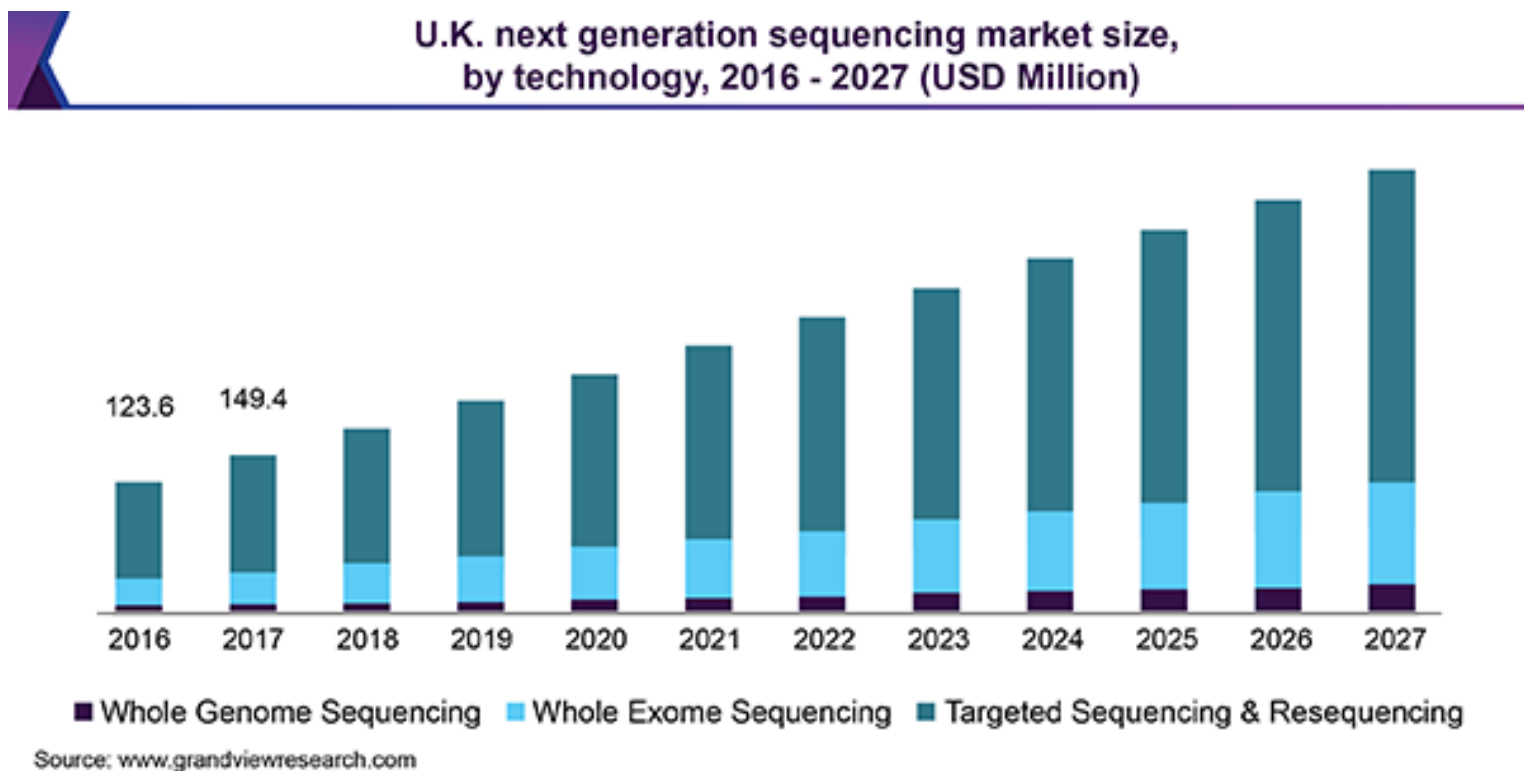
# De ce este important să determinăm statusul PDL1?



# Considerații practice

- Deși în prezent nu este obligatorie testarea PDL-1 în CBP, aceasta poate oferi informații prognostice și poate ghida tratamentul
- testarea se realizează gratuit cu sprijinul diferitelor firme de medicamente care pun la dispoziție vouchere
- rezultatele testării durează în medie 7-10 zile
- mono-imunoterapia și combinația chimio-imunoterapie prelungesc semnificativ supraviețuirea pacientului
- fiți foarte atenți la pacienții sub imunoterapie – efecte secundare noi, ușor de confundat/sub-diagnosticat în practică!

# Viitorul biologiei moleculare?

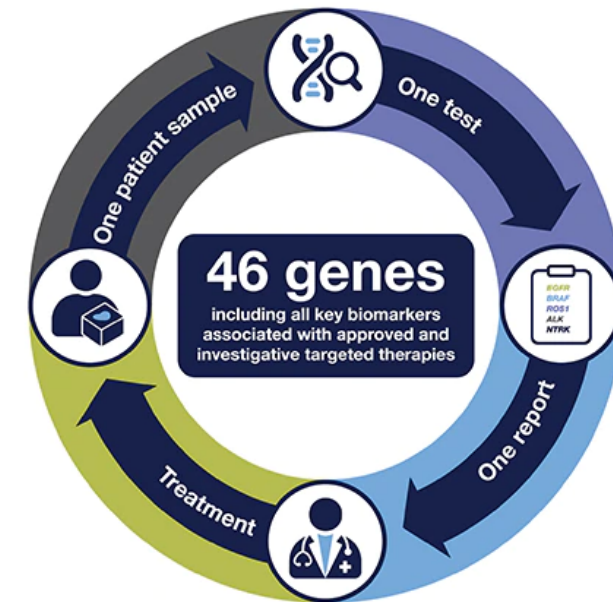




# NGS

- permite identificarea simultană a statusului mai multor gene cheie
- economie de țesut
- identificarea unor noi mutații cu potențial predictiv/prognostic
- pot fi extensive (FoundationOne CDx (F1CDx), MSK-IMPACT test) sau centrate pe CBP - Oncomine Dx Target Test
- preț încă ridicat, controverse legate de heterogenicitatea tumorală, aplicabilitate

<i>Teste de biologie moleculara pentru terapie si/sau diagnostic in oncologie</i>	
Detectia mutatiilor V600 E, K, R,D,M,G in gena BRAF	450
Detectia mutatiilor in exonii 18, 19, 20 si 21 ai genei EGFR in tesut	650 sau gratuit cu voucher
Detectia mutatiilor in exonii 18, 19, 20 si 21 ai genei EGFR in cancerere pulmonare din plasma	800 sau gratuit cu voucher
PCR pentru rearanjare clonala IgH si TCR (studiul pentru clonalitatea limfoproliferarilor B, respectiv T)	600
Detectia mutatiilor genei K-Ras exonii 2,3 si 4	750
<b>Detectia mutatiilor genei N-Ras, exonii 2,3 si 4 si BRAF</b>	750
Determinarea prin FISH a genei c-MYC pentru diagnosticul de certitudine in limfomul Burkitt	1000
Determinarea prin FISH a amplificarii genei Her2neu in carcinoamele gastrice	1000
Determinarea prin FISH a amplificarii genei MDM2 in diagnosticul diferential lipom versus liposarcom	1000
Determinarea prin FISH a translocatiilor genei EWSR1 pentru diagnosticul diferential al sarcomului Ewing de alte tipuri de tumori cu celule mici albastre*	1000
Determinarea prin FISH a aplicarii genei NMYC pentru prognosticul in neuroblastoame*	1000
Determinarea prin FISH pentru genele RREB1, MYB si CCND1 pentru diagnosticul de certitudine al melenomului malign.	1500
Rearanjarea prin FISH genei ROS 1 (6Q22) in adenocarcinoamele pulmonare in vederea terapiei tintite	1000
Rearanjarea prin FISH genei SS18 (18q11.2) pentru diagnosticul diferential al sarcomului sinovial vs alte tumori sarcomatoase	1000
* FISH EWSR1 si NMYC au 30% discount pentru pacientii minori.	700
FOCUS ONCOMINE - secventiere 52 de gene (NGS)	6000
BRCA ONCOMINE - secventierea 100% a exonilor genelor RRCA1 si BRCA2 (NGS)	2500



Oncomine DX target test



# Concluzii

- utilizarea tehnicilor de biologie moleculară a permis importante progrese terapeutice în CBP
- un procent semnificativ din pacienții cu CBP la care se identifică o mutație specifică beneficiază de terapii țintite
- determinarea PDL-1 își va pierde probabil importanța în timp, fiind înlocuită de markeri mai buni
- NGS reprezintă o strategie de viitor, însă în prezent costurile și limitările tehnologice o fac să fie recomandată doar în cazuri selectate
- pacienții cu CBP trebuie informați de necesitatea timpilor de așteptare pentru a beneficia de un tratament personalizat



**Vă mulțumesc pentru atenție!**