



## Mutace genu EGFR1 a translokace EML4-ALK u NSCLC pro indikaci inhibitorů EGFR1 a ALK

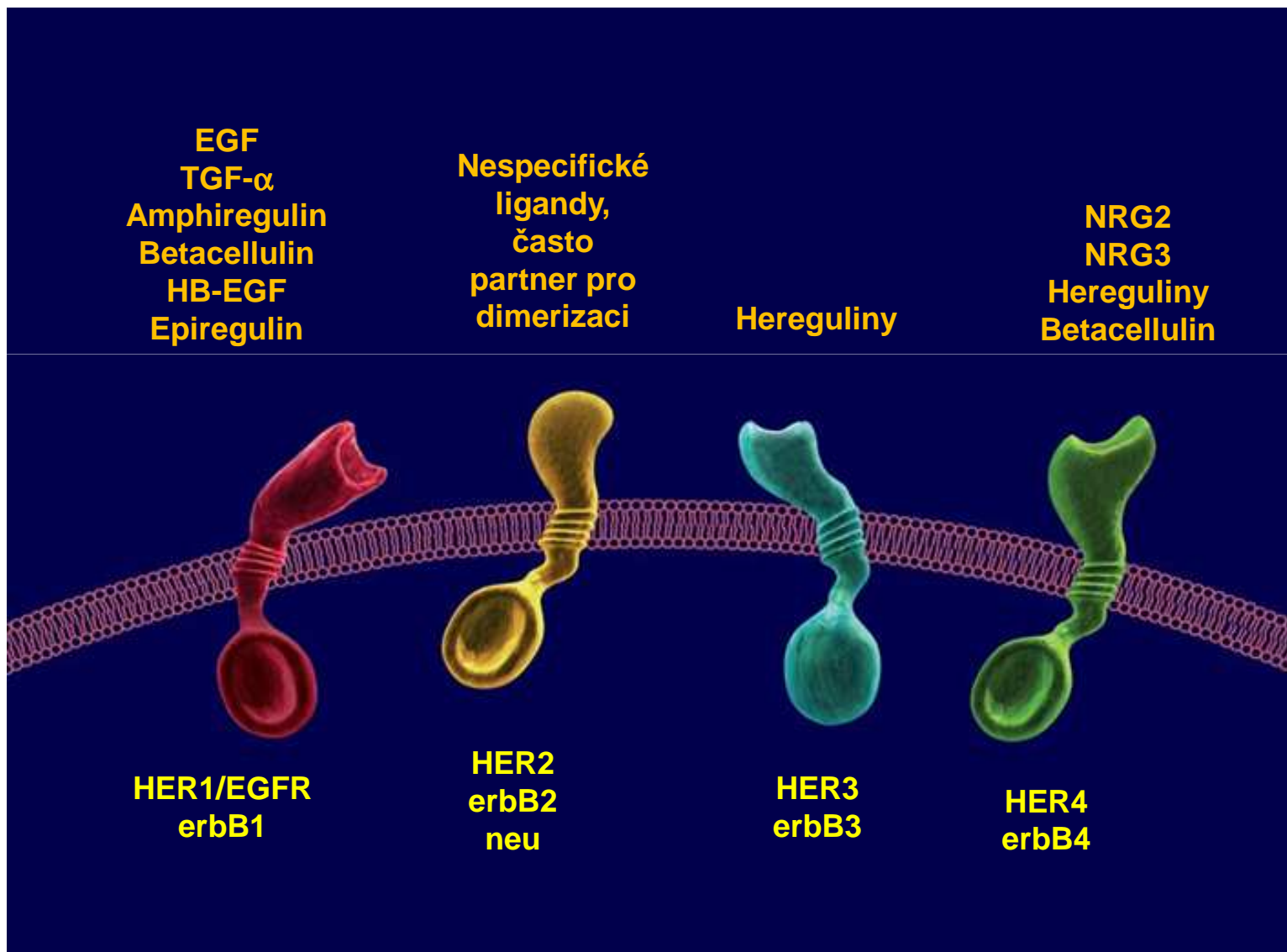
Marián Hajdúch, Jiří Drábek, Radek Trojanec, Jiří Ehrman,  
Zdeněk Kolář a kolektiv

Ústav molekulární a translační medicíny  
Ústav klinické a molekulární patologie  
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci  
Fakultní nemocnice Olomouc

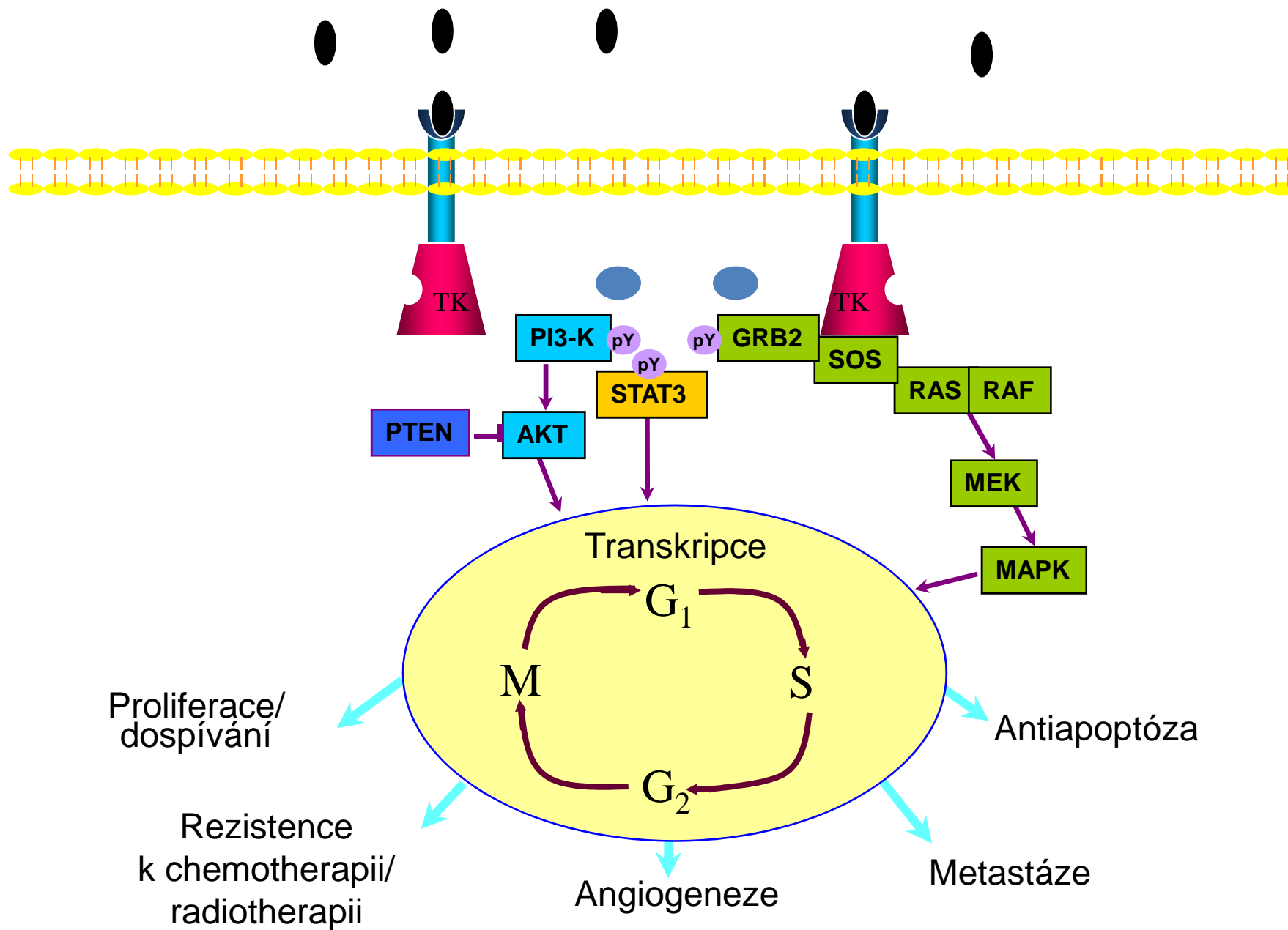




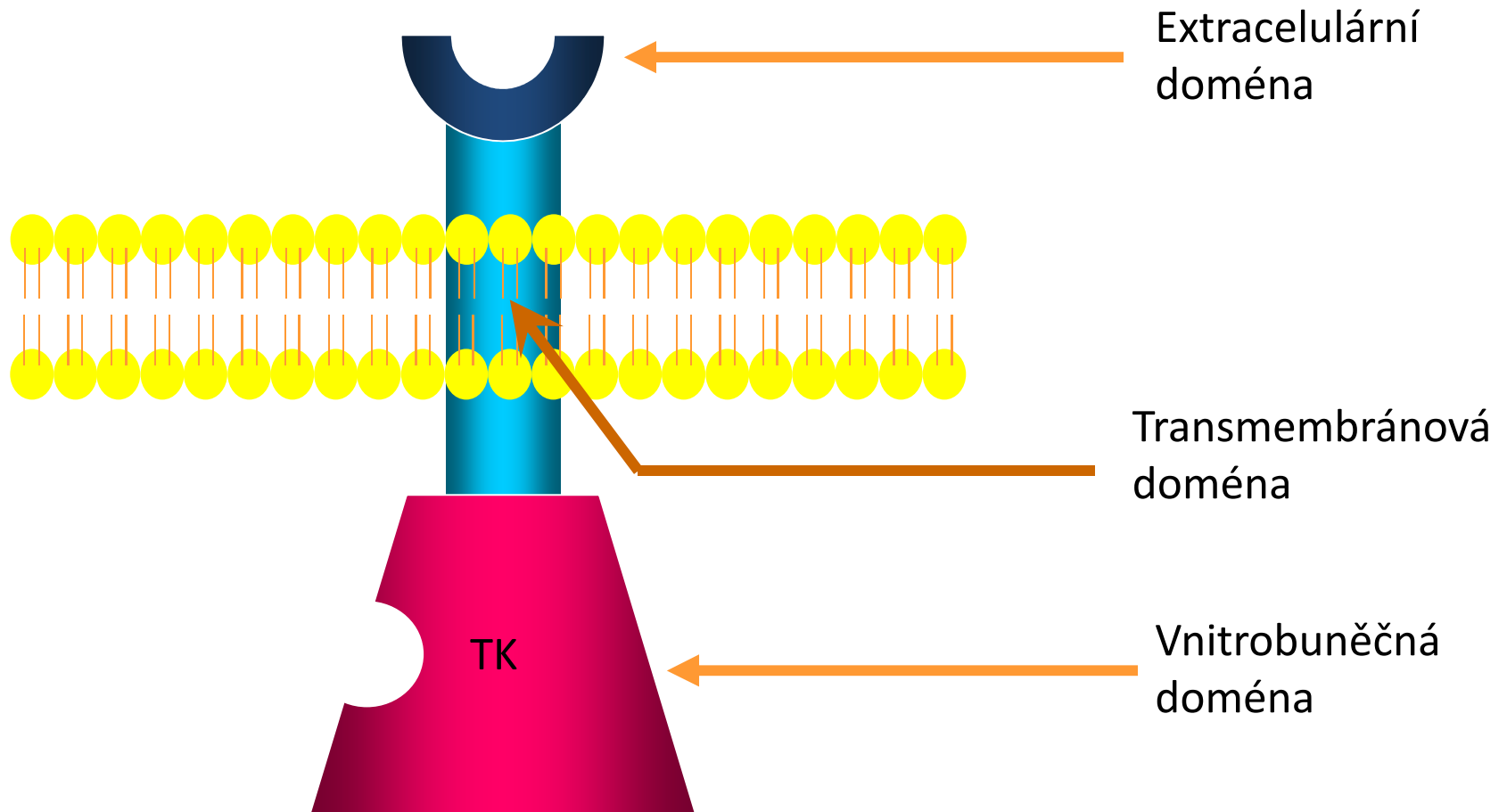
# HER rodina receptorů



# EGFR funkce v nádorové buňce

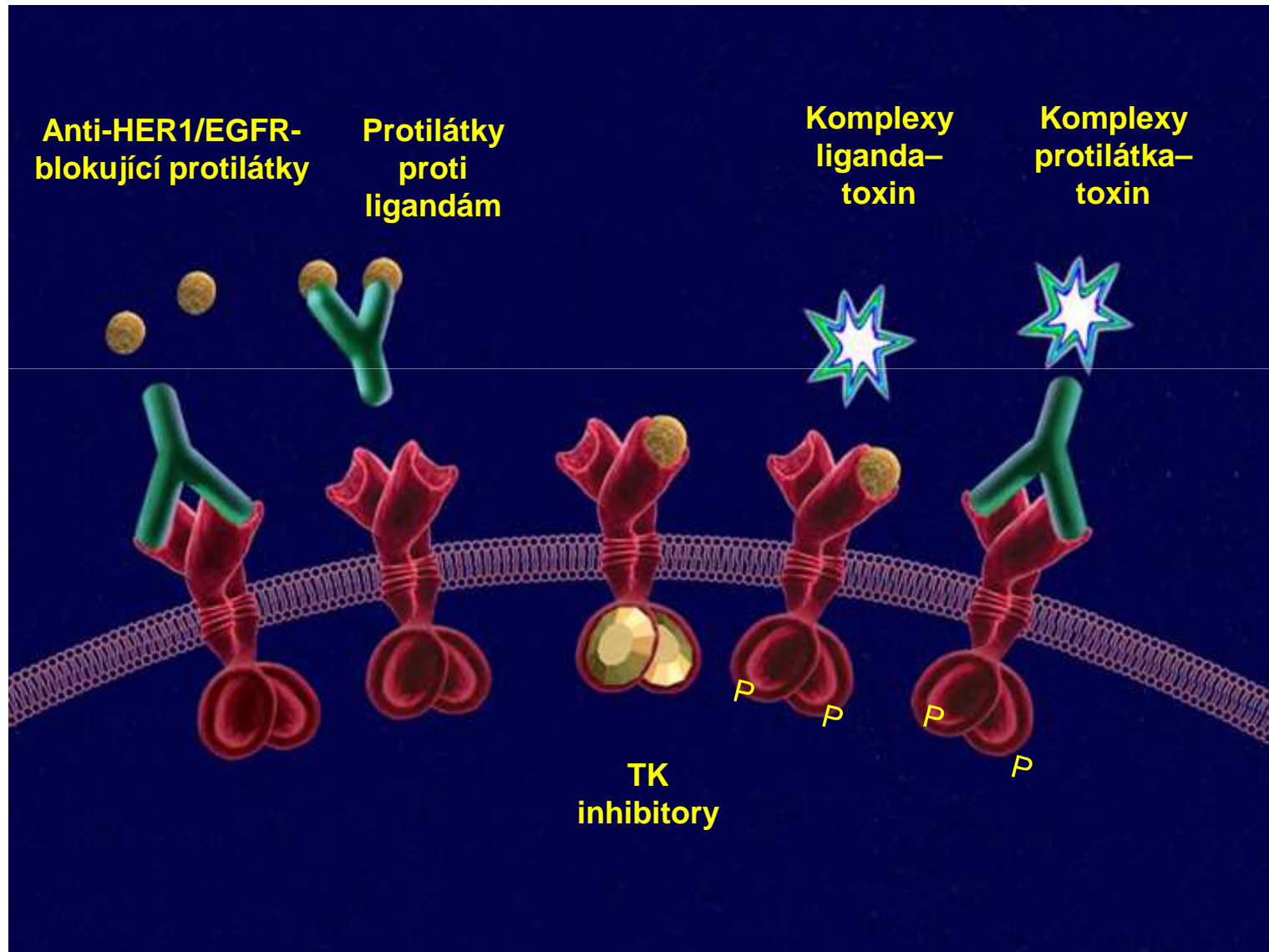


# Struktura EGFR



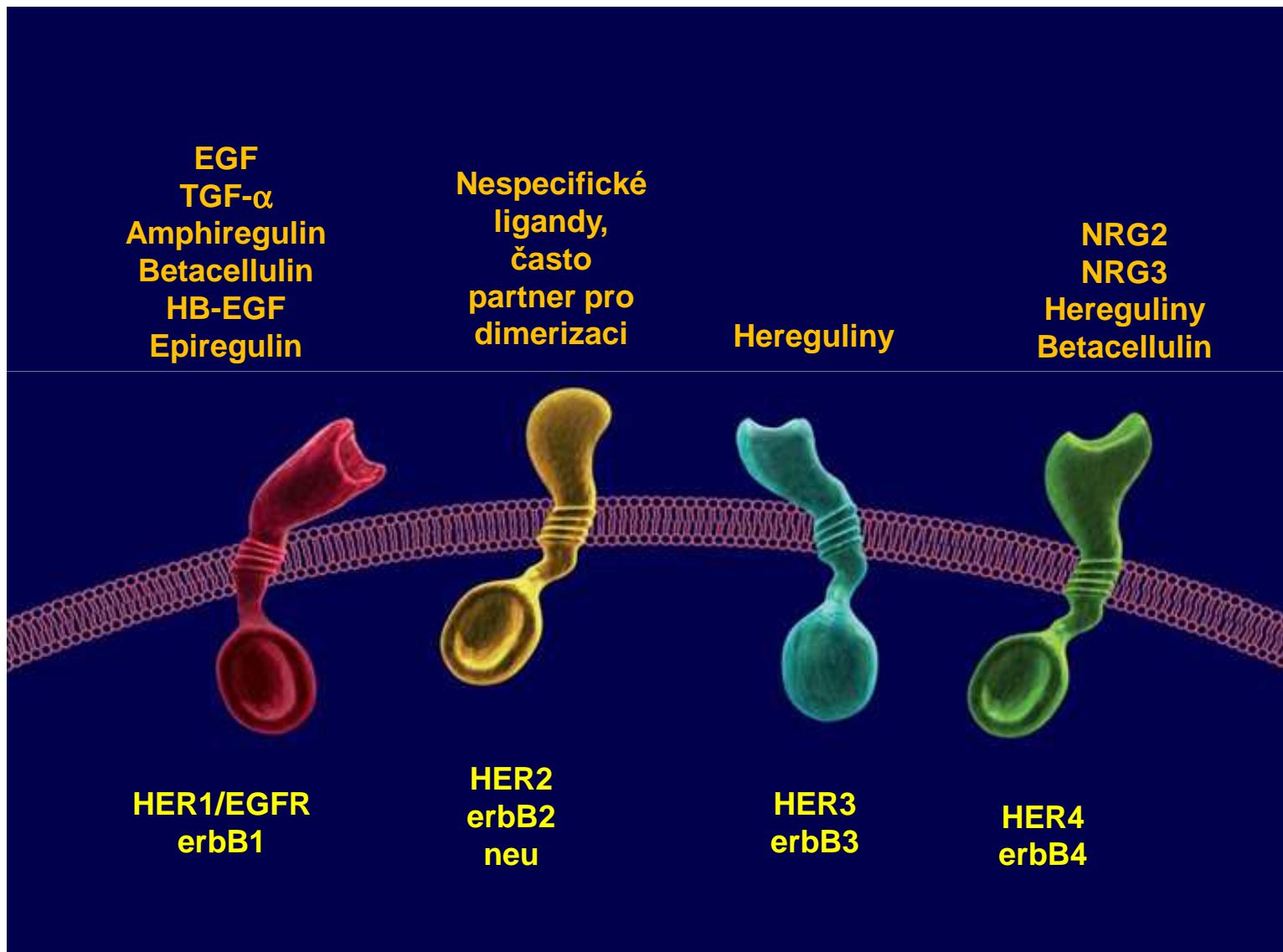


# Možnosti terapeutického zásahu HER1/EGFR





# HER rodina receptorů





# Prediktory účinnosti TK- inhibitorů EGFR

- Klinické:
  - nekuřáci (<5 krabiček za život, nebo nekuřák po >25 let)
  - ženy
  - Asiaté
  - adenokarcinomy včetně BAL
  - pacienti s kožní toxicitou
- Molekulární:
  - *EGFR* mutace v exonech 19-21
  - *EGFR* amplifikace
  - *EGFR* overexprese?
  - *KRAS* mutace – negativní prediktor
  - *CYP2D6* metabolizátor



# Somatické mutace v tyrozinkinázové doméně EGFR

**EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy.**

**Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, et al.**

**SCIENCE April 29, 2004**

**Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non –Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib**

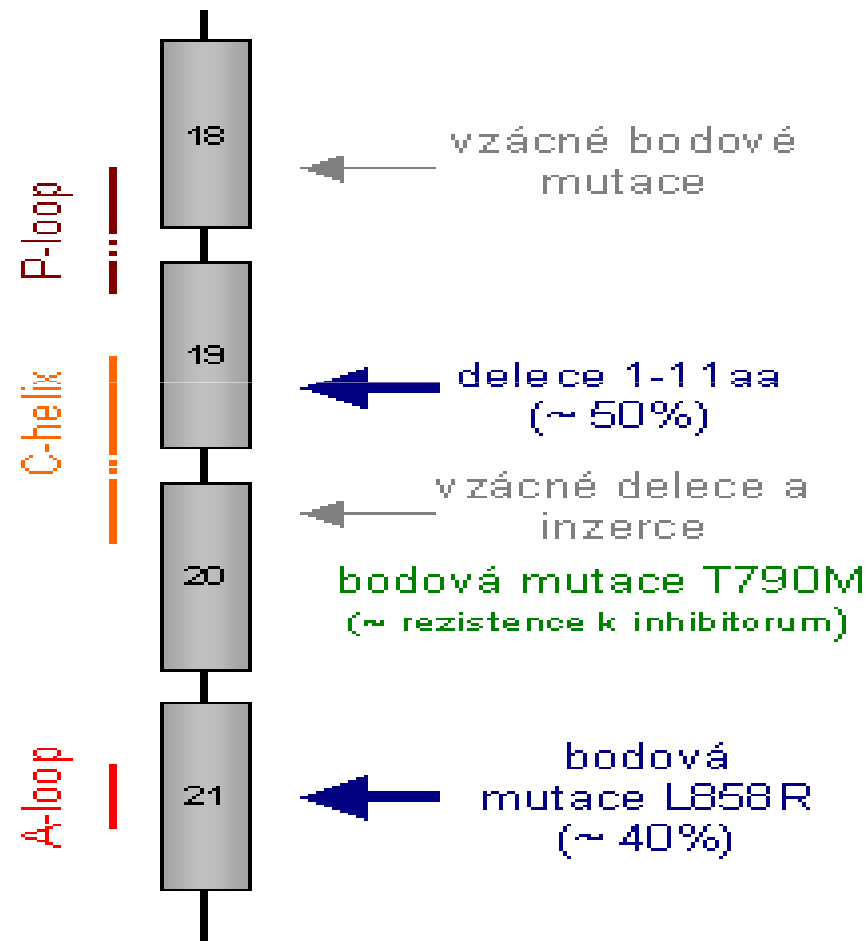
**Lynch, TJ, Bell DW, Sordella R et al.**

**NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, MAY 20, 2004**



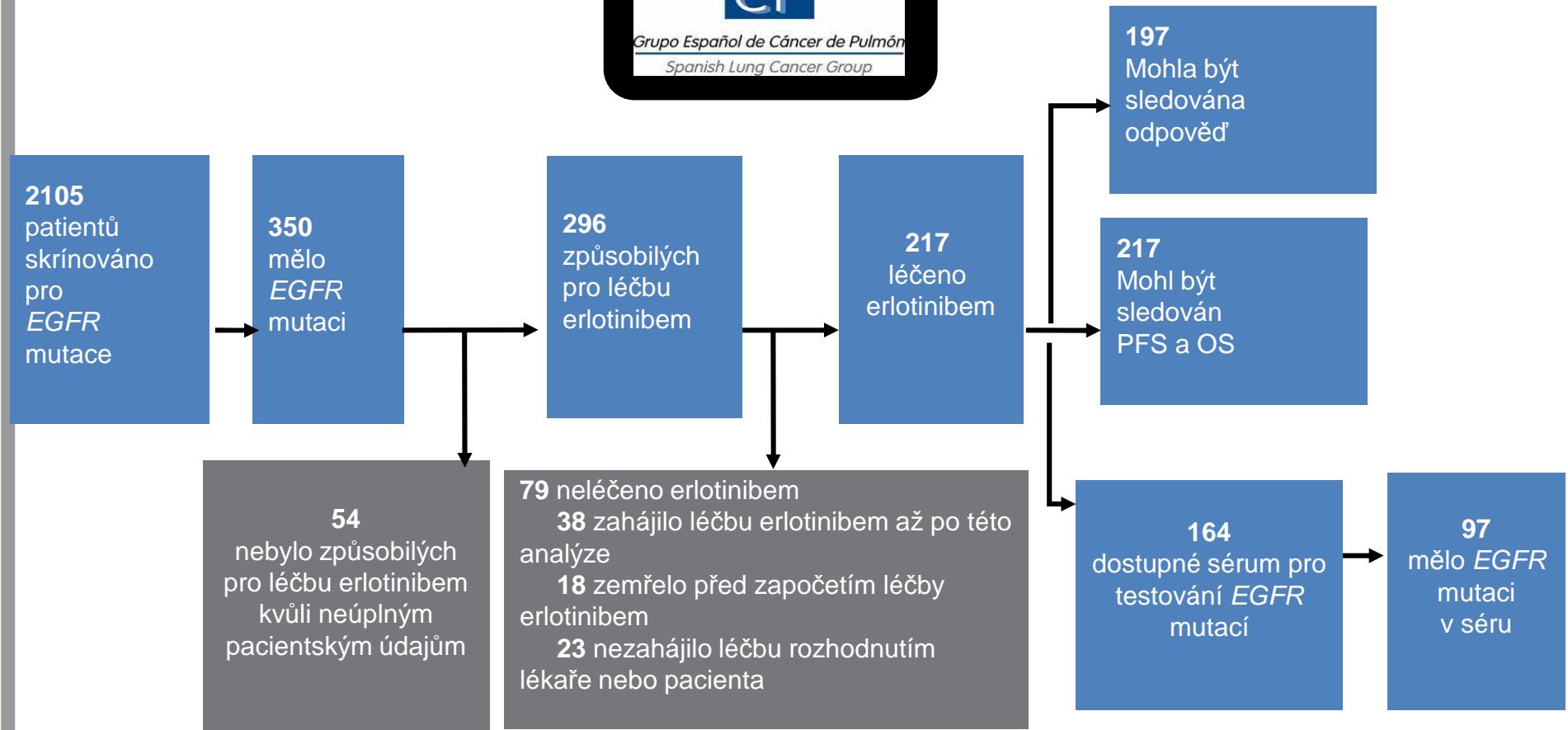


# Mutace genů *EGFR* u pacientů s NSCLC léčených TK inhibitory



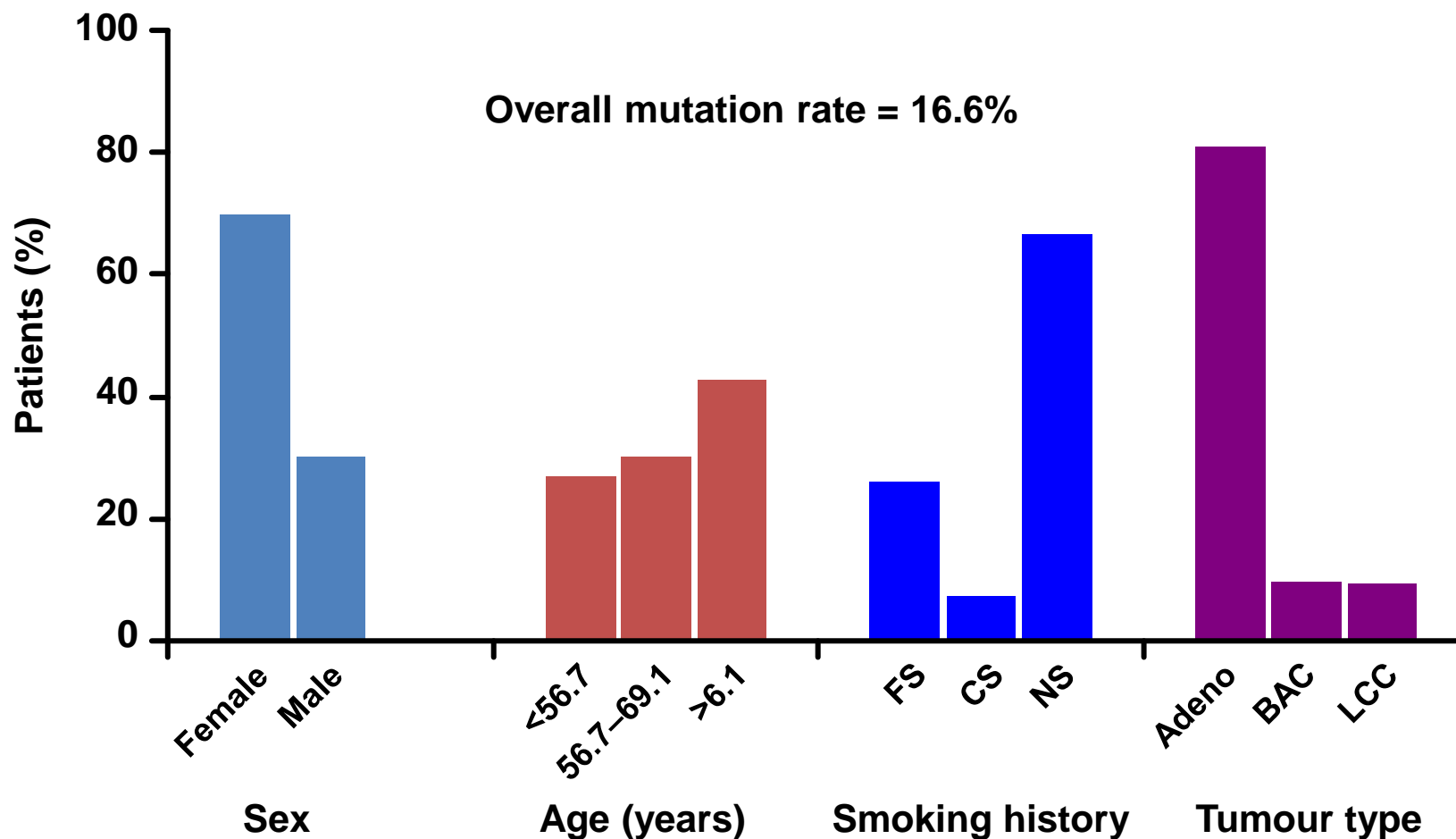
Struktura tyrozinkinazové domény genu *egfr1* a znázornění popsaných aberací

# Skríning EGFR mutací





## Velká část pacientů s EGFR mutací nespadá do prediktivních klinických skupin



n=350

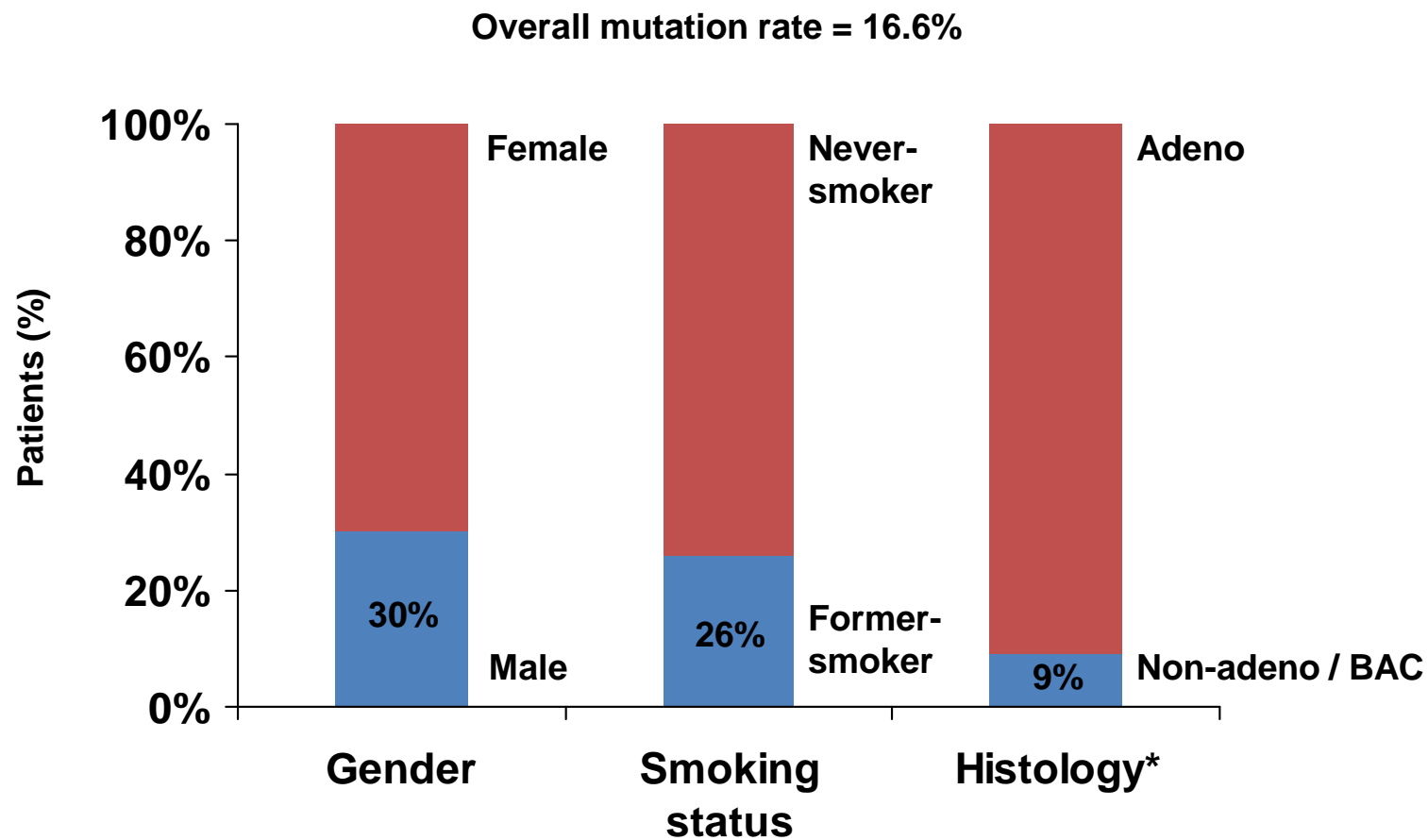
FS = former-smoker; CS = current-smoker; NS = never-smoker;

Adeno = adenocarcinoma; AC = bronchioloalveolar adenocarcinoma;

LCC = large-cell carcinoma



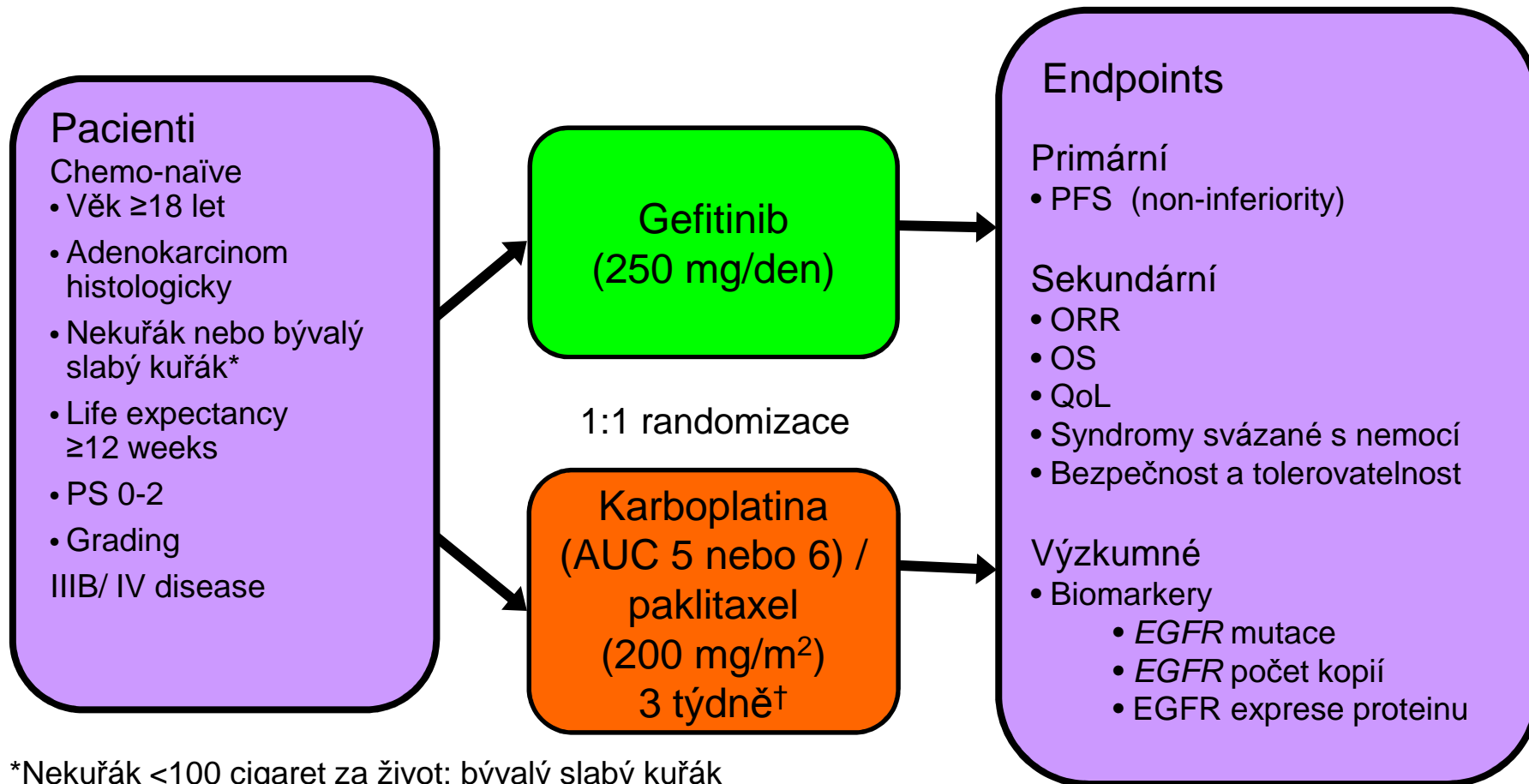
# Klinické skupiny nepředjímají EGFR status



\*Only patients with non-squamous NSCLC were included in the study



# IPASS: studie první linie léčby



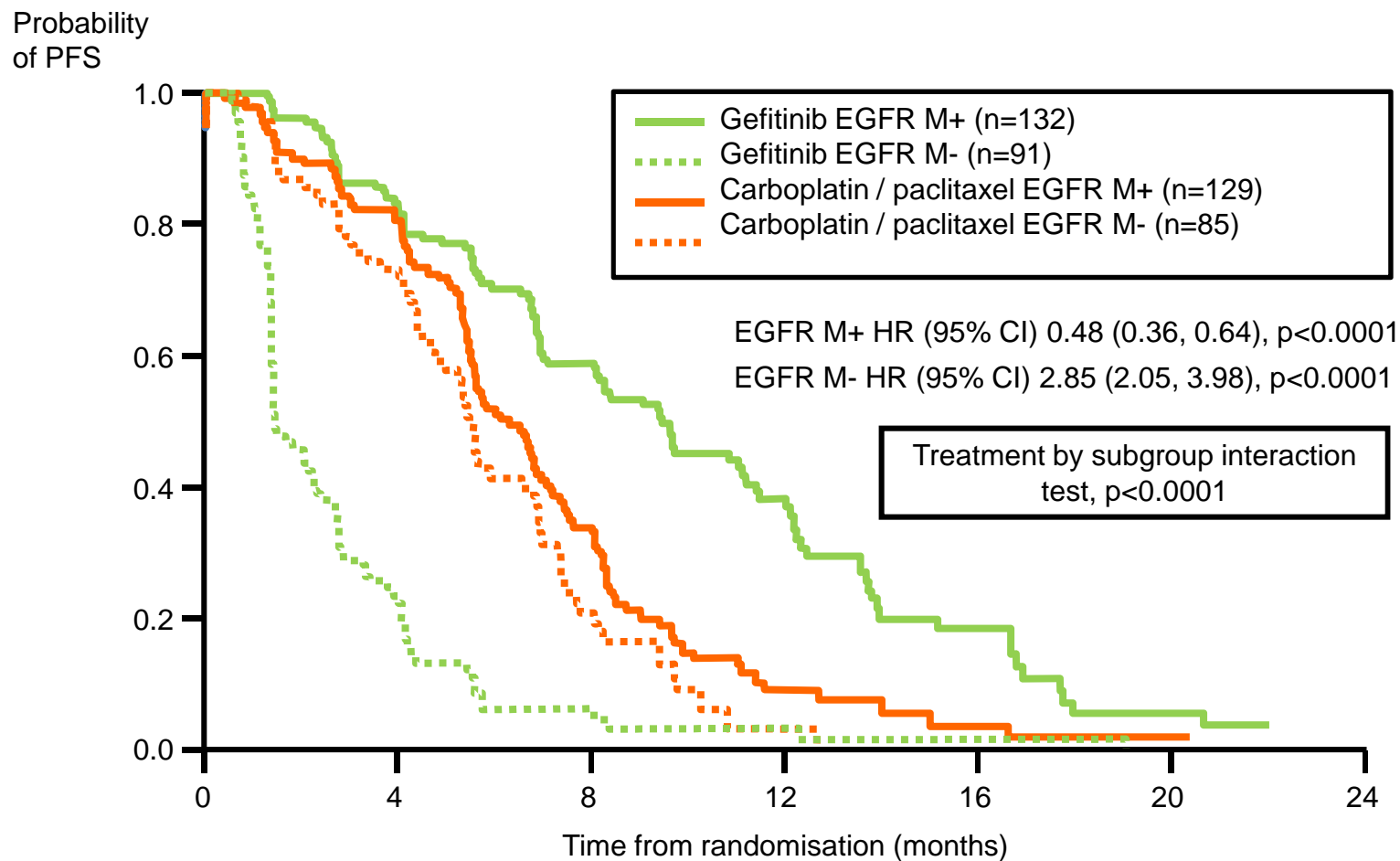
\*Nekuřák <100 cigaret za život; bývalý slabý kuřák přestal před ≥15 lety a kouřil celkem méně než ≤10 pack years; AUC, area under curve

<sup>†</sup>Maximum 6 cyklů

Karboplatina / paclitaxel byl nabídnut pacientům na gefitinibu při progresi;



# IPASS: analýza PFS dle mutačního statusu



Primary Cox analysis with covariates; ITT population;  
 HR <1 implies a lower risk of progression on gefitinib

## Jaký materiál testovat?

- Všechny techniky jsou vhodné (např. 21g-NA, TBB, brush, CT guided NA)

	21g-NA	TBB	Brush	CT-NA
Počet buněk	50-100	150-300	50-100	200-500
Množství DNA	50 pg	150 pg	100 pg	250 pg
Počet biopsií	8 (cytospin)	4-5	8	2-3

- Cytologické vzorky mohou být testovány.
- Existují otázky ohledně množství nádorové tkáně v cytologickém vzorku.
- Otázkou je také příprava cytologického vzorku – nelakovat!



## Jak testovat?

1. Histologicky verifikovaná tkáň NSCLC
2. Přímé sekvenování
3. Fragmentační analýza (delece v exonu 19)
4. PCR amplifikace v reálném čase se škorpión sondami (TheraScreen DxS) nebo s PNA Clamp (Pentagen)





## Kde testovat v rámci LPM?

	Testujete?	Vyšetření 2010/11	Metodiky	Materiál
Bioptická laboratoř, s.r.o. Plzeň	Zavedeno	Probíhá v Genomac, s.r.o.	Sekvenování, fragmentační analýza, PCR	Cytologie, Parafinové bloky
FN Hradec králové	Zavedeno	desítky	Kapilární denaturační ELFO	Cytologie, Parafinové bloky
FN Olomouc + CGB a.s.	ANO	187/70	Sekvenování, fragmentační analýza, qPCR (TheraScreen, Pentagen)	Cytologie, Parafinové bloky, pleurální výpotek
MOÚ	ANO	13/23	qPCR (TheraScreen, Pentagen)	Cytologie, Parafinové bloky
FN Motol + FTN	Plánují zavést	Retrospekt ivní vzorky	Sekvenování, PNA clamp-qPCR (Pentagen)	Parafinové bloky
VFN	ANO	52	qPCR	Cytologie, Parafinové bloky

# ALK (anaplastic lymphoma kinase)

-2 typy chromozomálních přestaveb:

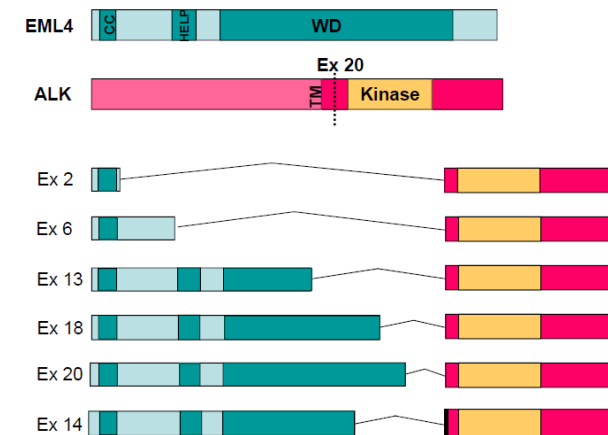
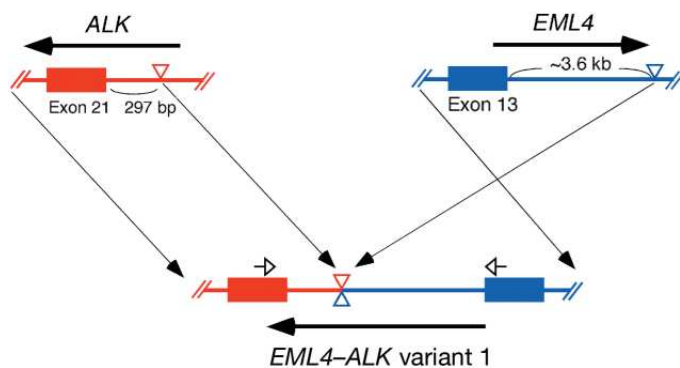
- ALK/NPM1 - t(2;5)(p23;q35) - anaplastický velkobuněčný lymfom
- ALK/EML4 - inv(2)(p21p23) – nemalobuněčný karcinom plic

## ALK/EML4

-cca 5 % pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic

-převážně u nekuřáků s wt-EGFR, adenokarcinomů

-Crizotinib (PF-02341066, Pfizer) – 3 fáze klinického testování

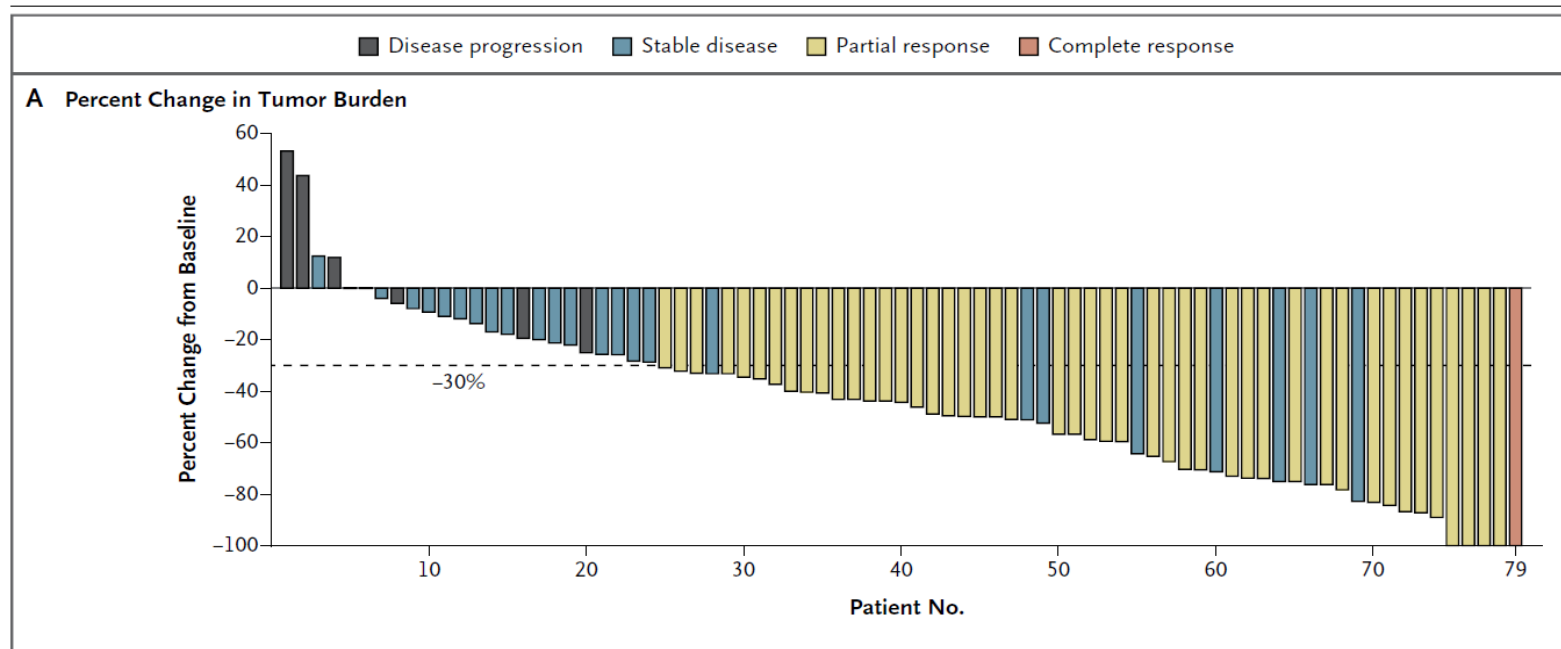


## ALK (2.fáze klinického testování)

Kwak et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2010 Oct 28;363(18):1693-703.

- zařazeno 82 pacientů s progresí na předchozí léčbě a s FISH prokázanou ALK přestavbou
  - převážně mladší, nekuřáci, adenokarcinomy, c-MET amplifikace neprokázána, wt-EGFR
- trvání léčby – medián 6,4 měsíců (2x denně 250 mg)
- overall response rate – 57 % (46 – partial response, 1 – complete response)
- stable disease - 33% (27/82)
- 77 % (63/82) pokračuje v užívání Crizotinibu (předpokládaný 6-ti měsíční PFS je 72 %)

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

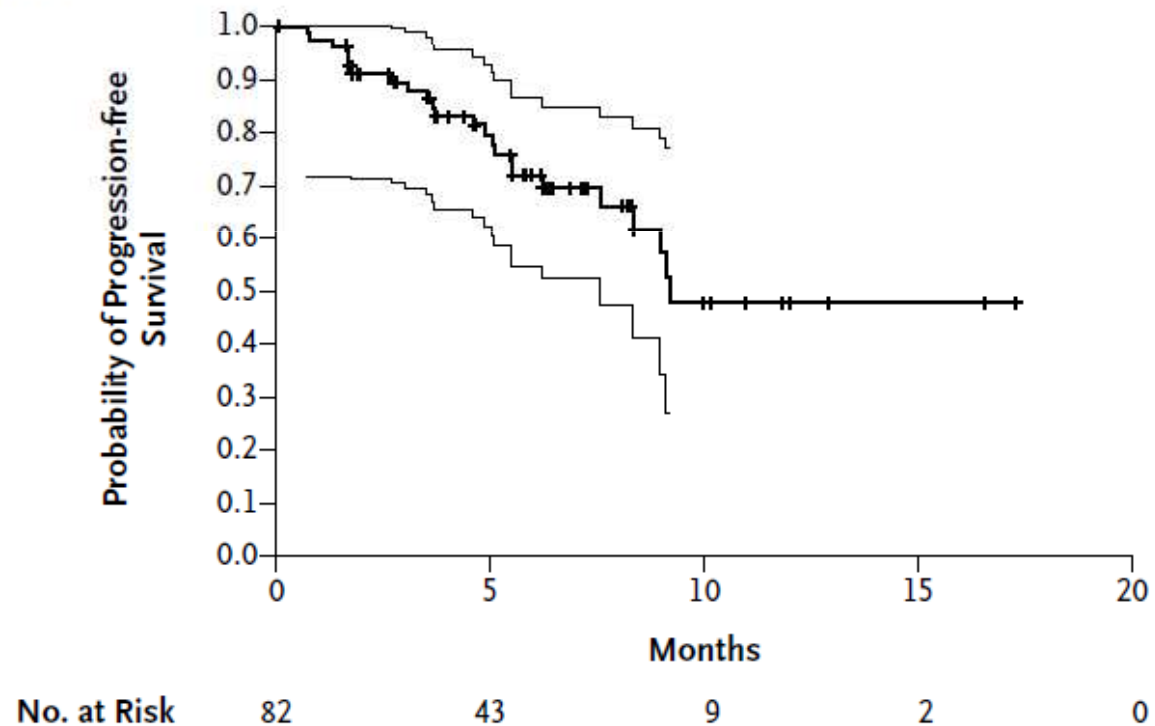


# ALK (2.fáze klinického testování)

Kwak et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2010 Oct 28;363(18):1693-703

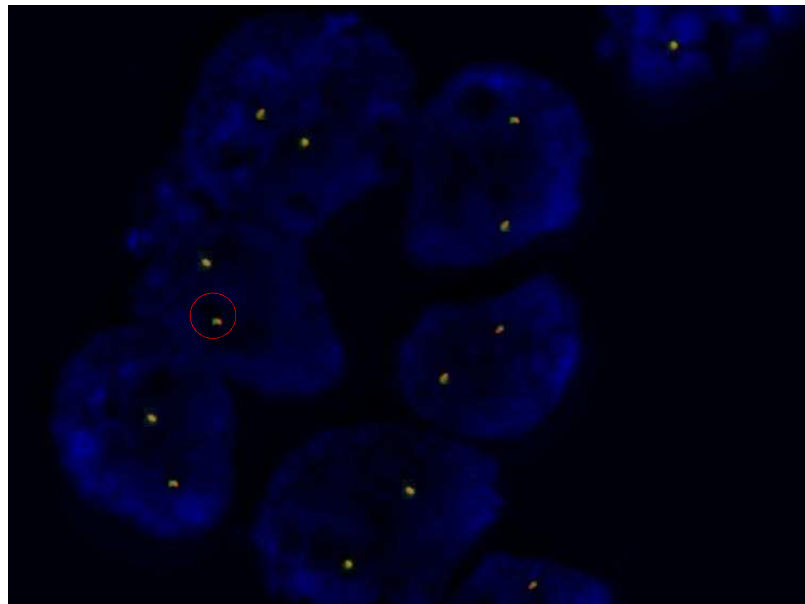
Progression-free Survival

Předpokládaný PFS

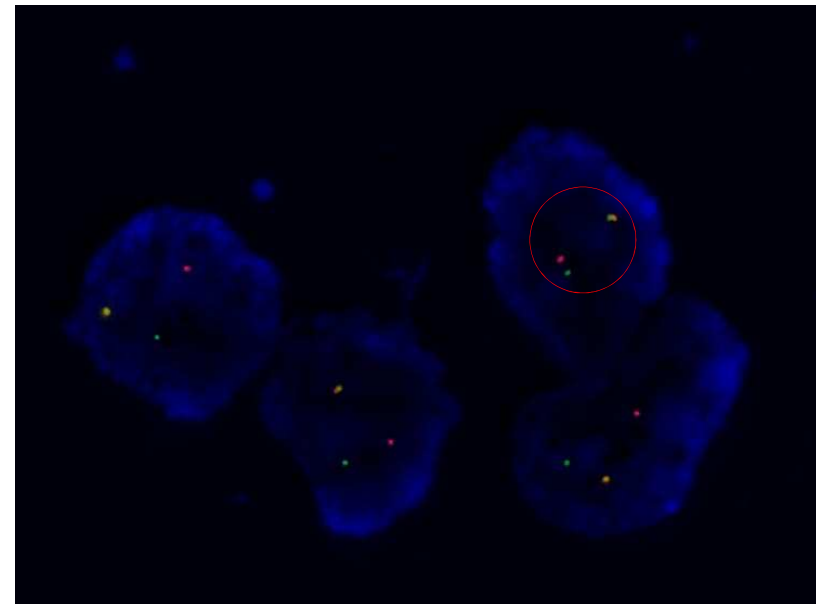


# ALK (anaplastic lymphoma kinase)

- v ÚMTM vyšetřeno 51 pacientů s NSCLC a 2 s histologicky neprokázaným typem ca plic
- u 3 pacientů (5,8 %) byla prokázána přestavba ALK (FISH, ALK Break apart probe)
  - 2 pacienti – adenokarcinom, 1 pacient NSCLC blíže nespecifikováno
  - u všech - wt-EGFR



Fyziologický stav genu ALK

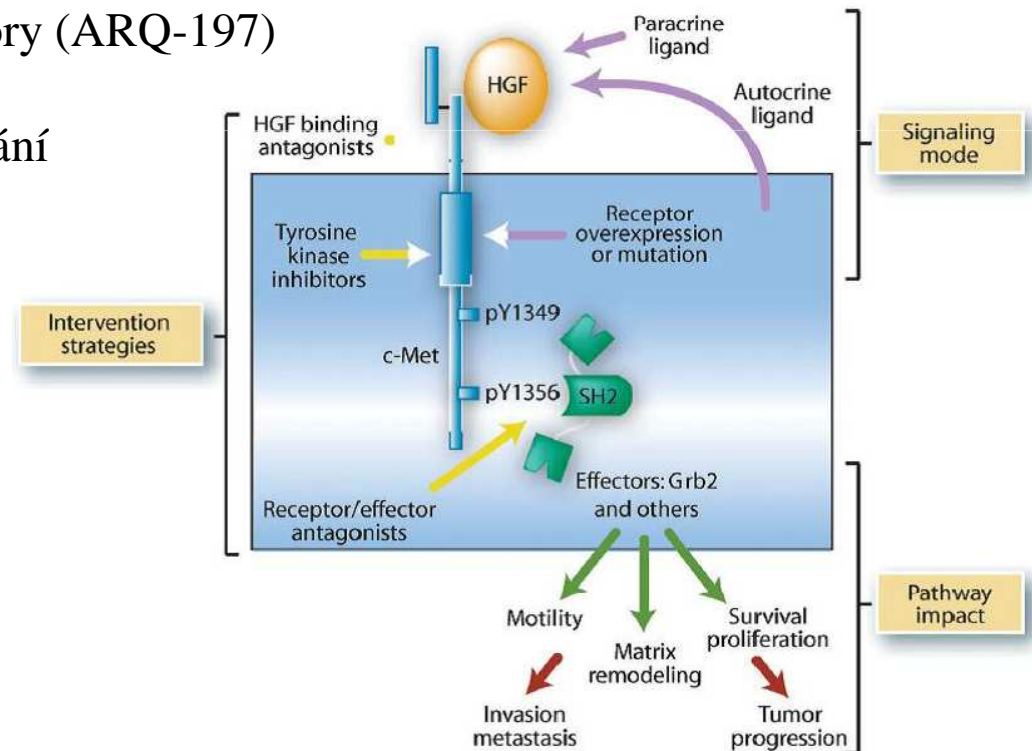


Translokace genu ALK

## c-MET

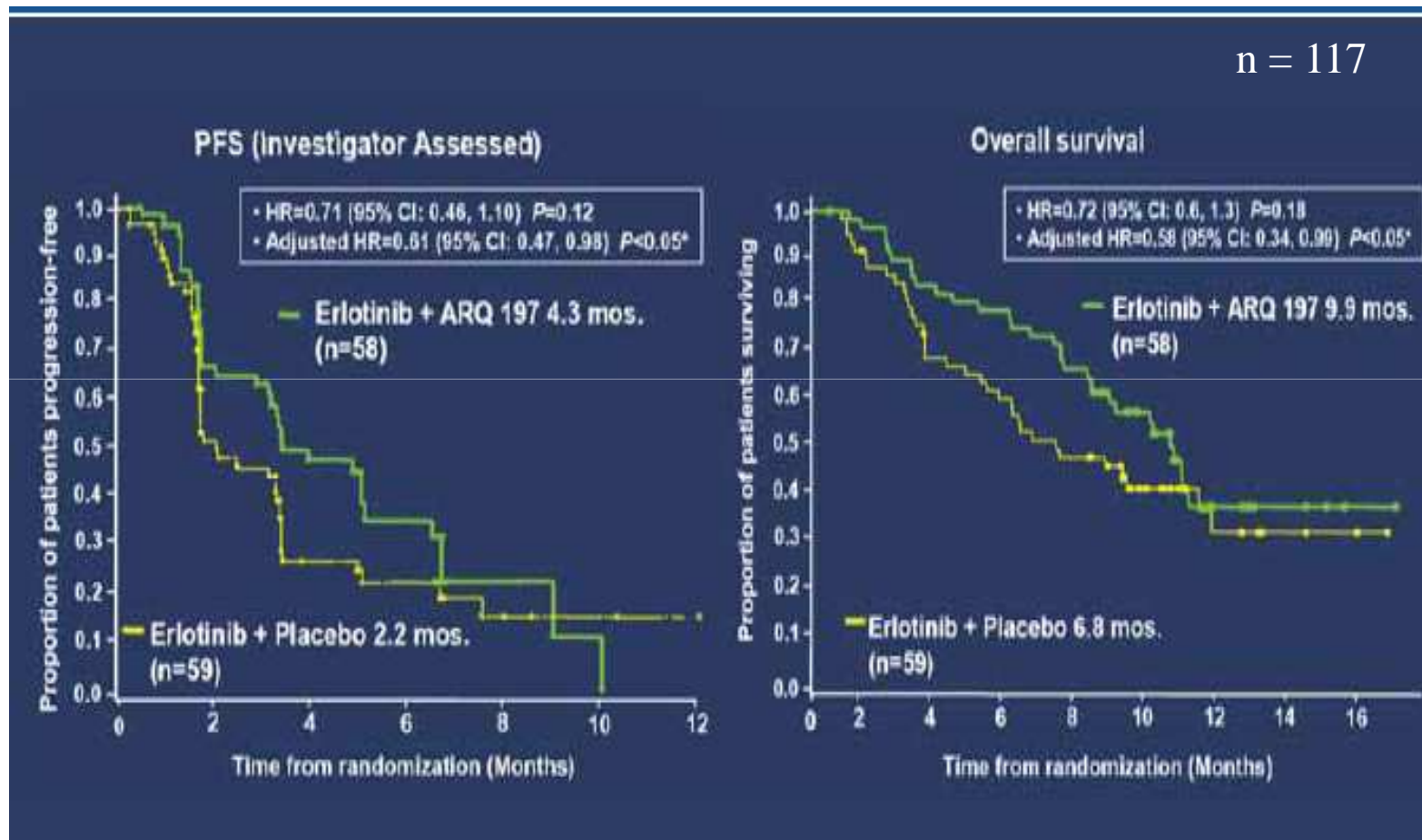
- Hepatocyte growth factor receptor (HGFR); 7q31
- amplifikace c-MET – rezistence na gefitinib, erlotinib
  - špatná prognóza
- blokace c-MET vede k obnovení senzitivity
  - nízkomolekulární inhibitory (ARQ-197)

ARQ-197 – 3. fáze klinického testování



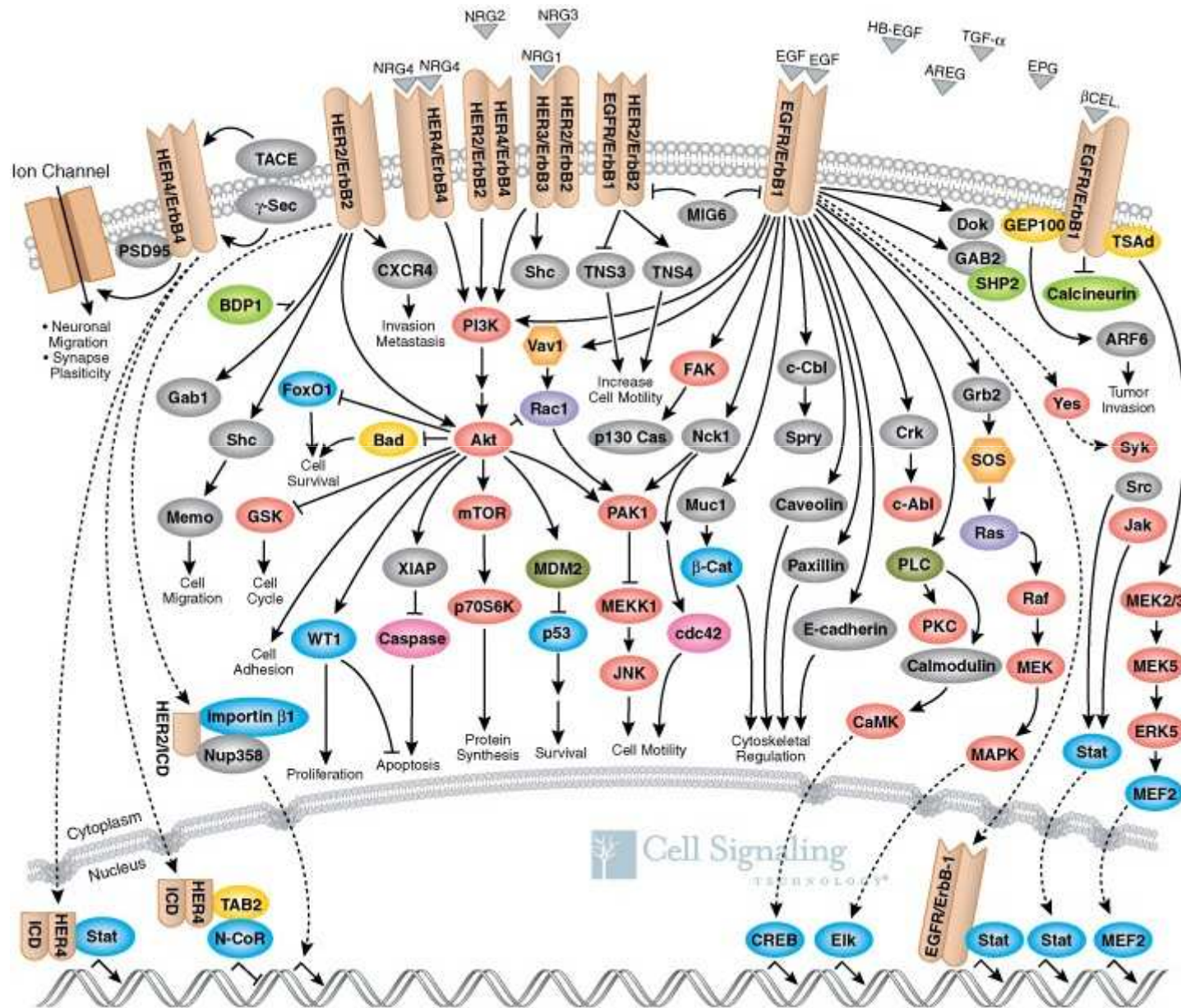


# ARQ-197 (2.fáze klinického testování)



Sequist et al. Final results from ARQ 197-209: a global randomized placebo-controlled phase II clinical trial of erlotinib plus ARQ 197 versus erlotinib plus placebo in previously treated EGFR inhibitor-naive patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). ESMO congress. Milan, Italy, 9 October 2010









# Závěry

- Žádnou jednotlivou metodu nelze považovat za zlatý standard, laboratoř musí mít zavedené alternativní metody
- Nutné dostatečné množství nádorových buněk ve vzorku, kontrola patologem nebo cytologem (dle konsensu z 25.6.2010)
- Materiál šetrně fixovat a barvit (pouze **neutrální** formaldehyd, alkohol nebo RNA-later)
- Nutnost provedení výtěžných (re)biopsií pro nasazení správné léčby
- Citlivost metod roste: Sekvenování-Pyrosekvenování-(HRM)-PNA Clamp (Pentagen)
- Metody jsou dostupné pro rutinní diagnostiku
- Nové prediktory (ALK, c-MET) vyžadující zvýšené nároky na tkáňový management (IHC, FISH, PCR)
- Problémy s úhradou prediktivních kódů – úhradové dodatky
- Nové metody – např. vysokokapacitní sekvenování pro vyšetření mutací BRCA1/2 u ca prsu a ovária pro indikaci PARP inhibitorů – diskuse s ČSLG ČLS JEP.