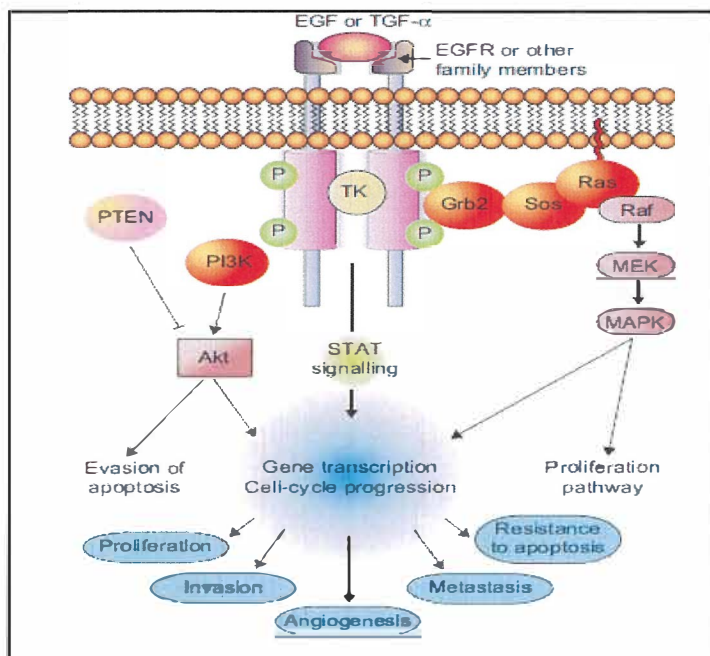


Določanje prediktivnih tumorskih markerjev
– klinični, biološki in metodološki aspekti

Zbornik predavanj



Organizacijski odbor

Snježana Frković-Grazio, Matej Bračko, Erika Matos, Srđan Novaković

7-8 maj 2010

Hotel Lek, Kranjska Gora

Program

Petek, 7 maj 2010

14.00-15.00: Prijava udeležencev

15.00-15.15: Uvod (Erika Matos, Srđan Novaković)

Moderatorja: Tanja Čufer, Izidor Kern

15.15-15.45: Pomen določanja hormonskih receptorjev pri raku dojke (Simona Borštnar)

15.45-16.30: Pomen določanja HER2 statusa pri raku dojke (Erika Matos)

16.30-17.00: Določanje statusa hormonskih receptorjev in HER2 – metodološki aspekti
(Snježana Frković Grazio)

17.00-17.30: Razprava

17.30-18.00: *Odmor*

18.00-18.20: GIST; pomen mutacij za izbor zdravljenja (Branko Zakotnik)

18.20-18.40: Patologija in imunohistokemija GIST-a (Matej Bračko)

18.40-19.00: Razprava

20.00 *Večerja*

Sobota, 8 maj 2010

Moderatorja: Branko Zakotnik, Matej Bračko

9.00-9.30: EGFR status in zdravljenje nedrobnoceličnega raka pljuč (Tanja Čufer)

9.30-10.00: Določanje EGFR statusa (Izidor Kern)

10.00-10.30: Razprava

10.30-11.00: *Odmor*

11.00-11.30: Pomen določanja KRAS pri raku kolona in danke ter pomen določanja statusa
HER2 statusa pri raku želodca (Janja Ocvirk)

11.30-12.00: Testiranje znanih mutacij v genu KRAS (Srdjan Novaković)

12.00-12.30: Razprava

12.30: *Zaključek* (Snježana Frković Grazio)

Pomen določanja hormonskih receptorjev pri raku dojk

Simona Borštnar
Sektor za internistično onkologijo
Onkološki inštitut Ljubljana

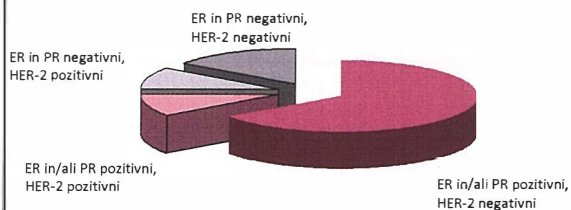


Pomen hormonskih receptorjev pri bolnicah z rakom dojk



- Hormonski receptorji so napovedni dejavniki:
 - poteka bolezni in
 - (predvsem) odgovora na hormonsko zdravljenje.

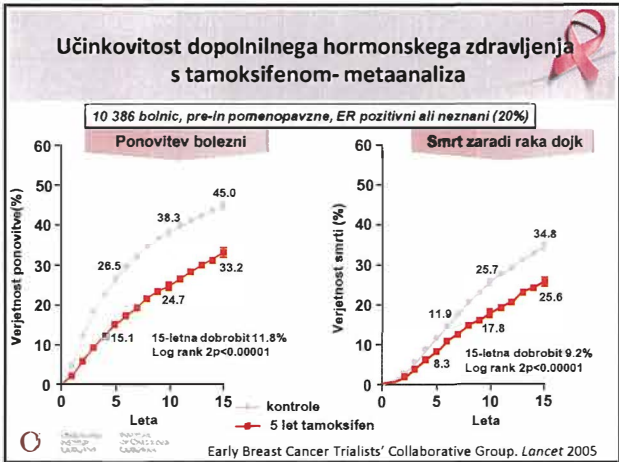
Delež hormonsko odvisnih rakov dojk



Skladnost molekularnih in klinično patoloških značilnosti raka dojg

Podskupina	ER	HER2	Profil proliferativnosti	Profil proliferativnosti
Basal-like DCIS	-	-	High	Low
Luminal & TN	-	-	Low	Low
Luminal & TN	+	-	Low	Low
HER2-enriched	+	+	High	High

Sotirou and Pusztai. N Engl J Med 2009; 360



Vloga določanja HR receptorjev in hormonskega zdravljenja pri DCIS (NSABP 24, N= 1804, srednje opazovanje 7 let)

DCIS
tumorektomija +RT

placebo 5 let	tamoksifen 5 let
16 % ponovitev, 7-letni DFS = 71.1 %	10 % ponovitev, 7-letni DFS = 83 %

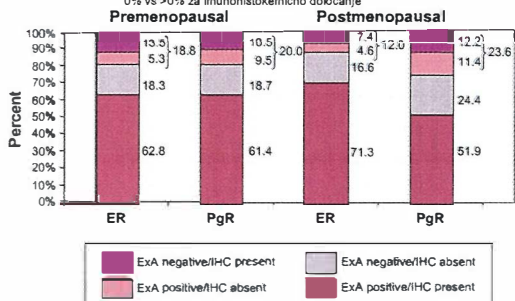
	ER+	ER-
zmanjšanje tveganja ponovitve bolezni (invazivni in neinvazivni raki)	39 %	20 %
p	0.0003	0.58

Fisher B, Lancet 1999
Allred DC, SABCs 2002

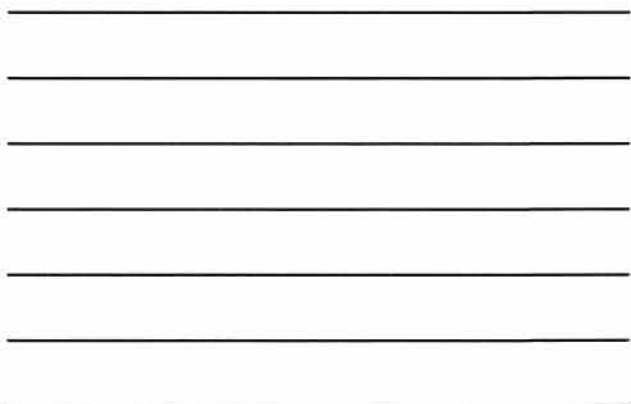


(Ne)ujemanje statusa hormonskih receptorjev določenih biokemično in imunohistokemično v okviru raziskav IBCSG VIII in IX

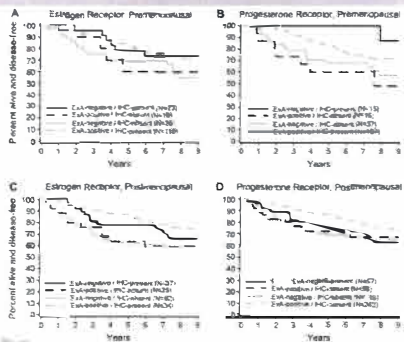
Razmejitvena vrednost < 10 vs ≥ 10 mmol/mg proteinov za biokemično določanje in 0% vs >0% za imunohistokemično določanje



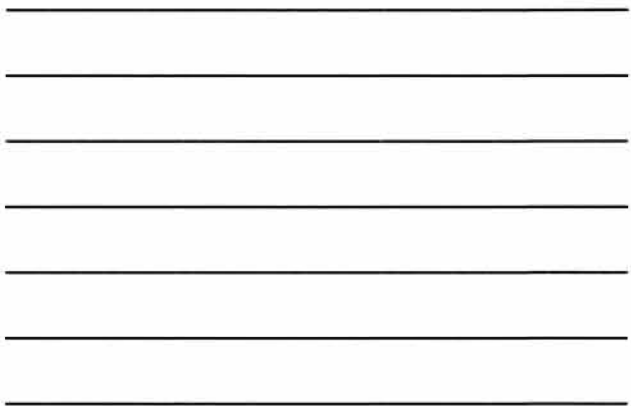
Regan MM et al for IBCSG. J Natl Cancer Inst 2006;98



Razlika v napovednem pomenu ER in PR določenih biokemično in imunohistokemično



Regan MM et al for IBCSG. J Natl Cancer Inst 2006;98



Napovedni pomen ER določenih z IHC metodo

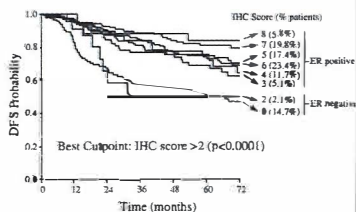
1982 bolnikov zdravljenih zaradi karcinoma dojke v letih 1973- 1993



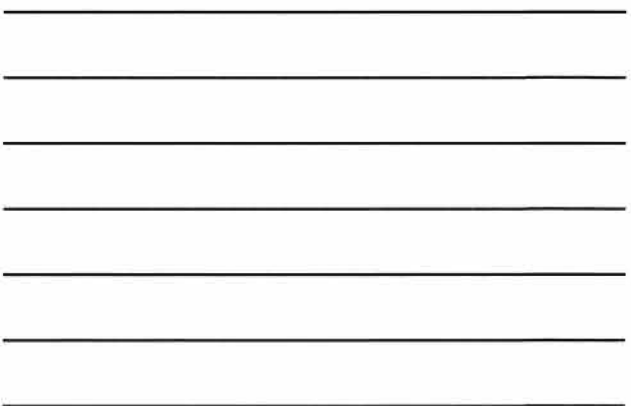
777 zdravljenih s hormonsko terapijo +/-KT



- IHC: 70.5 % ER+
- biokemično: 78.9 % ER+
- ujemanje 85.5%



Harvey J et al. J Clin Oncol 1999;17



(Ne)ujemanje izraženosti hormonskih receptorjev določenih v lokalnih laboratorijih in v centralnem laboratoriju v okviru raziskave BIG 1-98

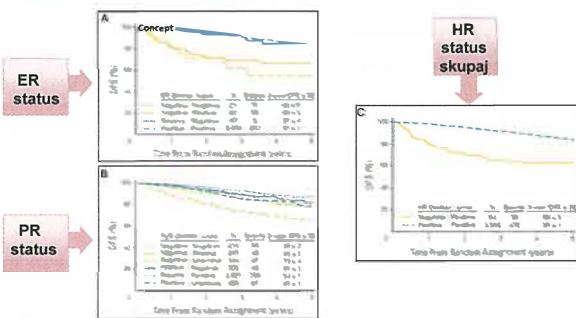
ER določeni lokalno	ER določeni centralno			Skupno
	0	1%-9%	≥10%	
negativni	24	8	73	105
pozitivni	66	54	5,980	6,100
skupno	90	62	6,053	6,205

pR določeni lokalno	PR določeni centralno			Skupno
	0	1%-9%	≥10%	
negativni	371	308	544	1223
pozitivni	183	247	3584	4014
skupno	554	555	4128	5237

ONCOLOGY
INSTITUTE
OF TRIESTE
LABORATORY

Viale G et al. J Clin Oncol 2007; 25

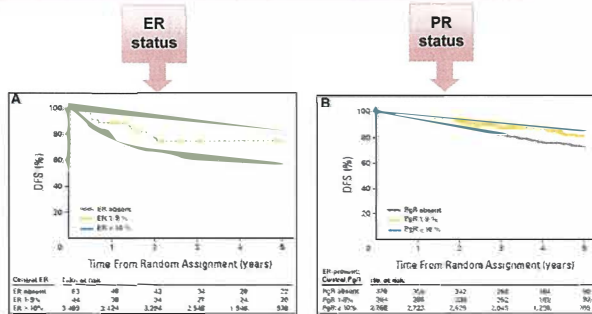
Preživetje brez znakov bolezni (DFS) glede na centralno in lokalno določanje hormonskih receptorjev



ONCOLOGY
INSTITUTE
OF TRIESTE
LABORATORY

Viale G et al. J Clin Oncol 2007; 25

Preživetje brez znakov bolezni (DFS) glede na izraženost ER in PR (odstotnost vs. 1-9% vs ≥ 10%) določenih v centralnem laboratoriju (raziskava BIG 1-98)



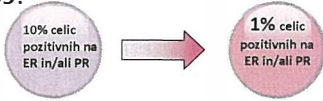
ONCOLOGY
INSTITUTE
OF TRIESTE
LABORATORY

Viale G et al. J Clin Oncol 2007; 25

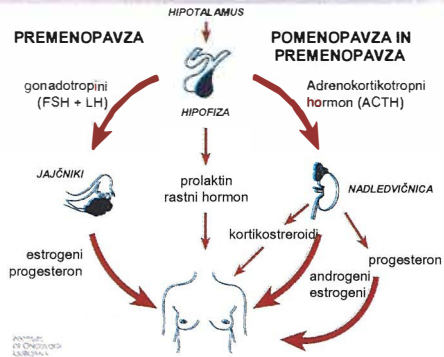
Kdaj je rak dojk hormonsko odvisen?



- Ko so prisotni estrogenski ali progesteronski receptorji v rakavi celici.
- Sprememba definicije v klinični praksi v letu 2009:



Proizvodnja estrogenov v premenopavzi in pomenopavzi

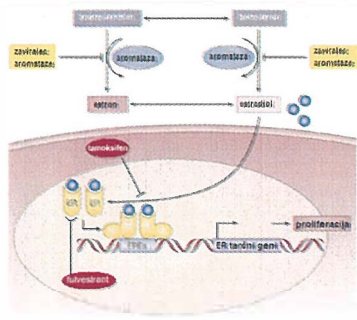


Vrste hormonskega zdravljenja

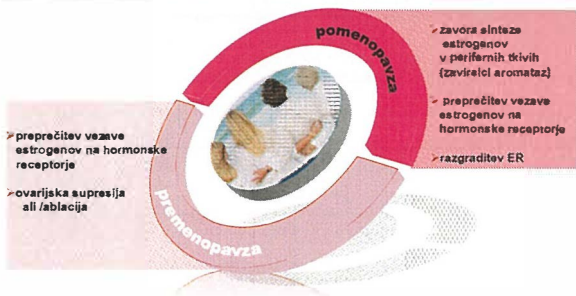


- **KASTRACIJA:**
 - odstranitev jajčnikov
 - zavora delovanja
- **ANTIESTROGENI**
 - selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERM): tamoksifen
 - čisti antiestrogen -razgrajevalec ER (SERD): fulvestrant
- **ZAVORA PRETVORBE STEROIDNIH PROHORMONOV V ESTROGENE**
 - zaviralci aromataz: anastrozol, letrozol, eksemestan
- **PROGESTINI**
 - megestrol acetat

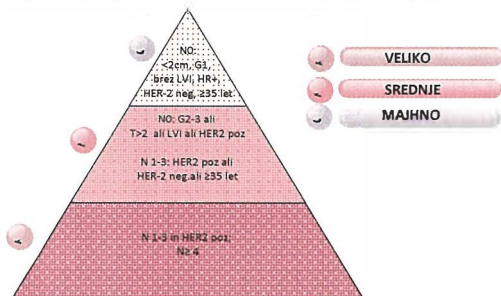
Mesta delovanja hormonske terapije



Izbir hormonske terapije glede na menopavzni status



Tveganje za ponovitev bolezni



Izbor dopolnilnega sistemskega zdravljenja

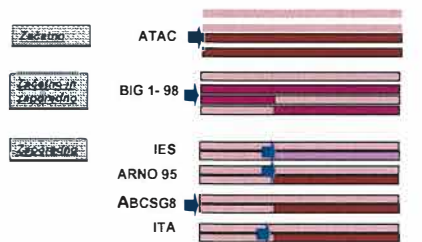


Status HER-2	HER-2 negativen						HER-2 pozitiven					
	visoka		srednje		neg.		visoka		srednje		neg.	
Hormonska odvisnost	poz	neg	poz	neg	poz/neg	poz	neg	poz	neg	poz/neg	poz	neg
Menopavzani status	HT	HT	HT	HT								
NIZKO TVEGANJE PONOVITVE												
SREDNJE TVEGANJE PONOVITVE	KT KT+HT	KT KT+HT	KT+HT HT	KT+HT HT	KT	KT+HT HT	KT+HT HT	KT+HT HT	KT+HT HT	KT+HT HT	KT+T	KT+T
VISOKO TVEGANJE PONOVITVE	KT+HT	KT+HT	KT+HT	KT+HT	KT	KT+HT HT	KT+HT HT	KT+HT HT	KT+HT HT	KT+HT HT	KT+T	KT+T

KT=kemoterapija
HT=hormonska terapija
T=trastuzumab (Herceptin)



Raziskave dopolnilnega 5-letnega zdravljenja pomenopavznih bolnic (primerjava učinkosti tamoksifena in AI)



Raziskave dopolnilnega 5-letnega zdravljenja pomenopavznih bolnic (primerjava učinkosti tamoksifena in AI)

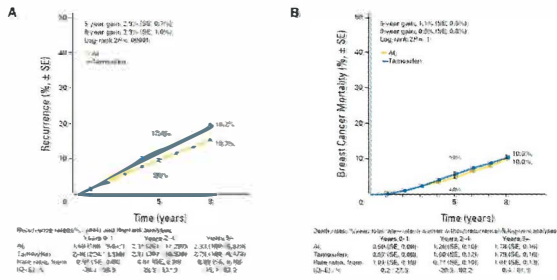


REZULTATI

Raziskava Referenca	Vrsta AI	Št. bol.	Srednji FU (mes)	Razmerje tveganj (95 % IZ)		
				za ponovitev	p	za smrt
ATAC Lancet Oncol 2008	ana vs. tam	6241	100	0,85 (0,76-0,94)	0,003	0,97 (0,86-1,11)
BIG-1-98 SABCS 2008	let vs. tam	8010	73	0,87 (0,76-0,99)	0,03	0,85 (0,72-1,0)
ITA Boccardo F Lancet 2007	tam → ana vs tam	448	64	0,56 (0,35-0,89)	0,01	0,56 (0,28-1,15)
ABCSG-8 ARNO 95 Jaksež R et al. Lancet 2005	tam → ana vs tam	3224	28	0,60 (0,44-0,81)	0,0009	0,76 (0,52-1,12)
IES Coombes RC et al. ECCO/ESMO 2009	tam → ekse vs tam	4742	91	0,81 (0,72-0,91)	<0,001	0,86 (0,75-0,99)
BIG-1-98 SABCS 2008	tam → let vs. let	3094	71	1,05 (0,84-1,32)	ns	1,13 (0,83-1,53)
	let → tam vs. letrozol	3085	71	0,96 (0,76-1,21)	ns	0,90 (0,65-1,24)

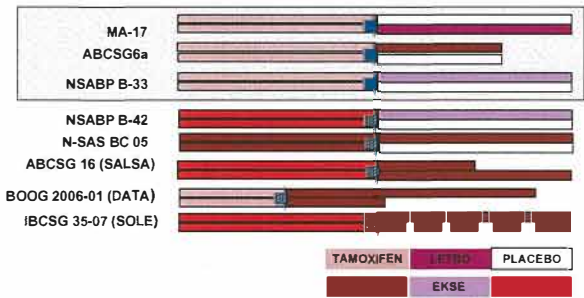


Primerjava učinkovitosti AI in tamoksifena pri pomenopavznih bolnicah s karcinomom dojke - metaanaliza



Dowsett, M. et al. J Clin Oncol; 28:509-518 2010

Raziskave podaljšanega hormonskega zdravljenja pomenopavznih bolnic z AI



Podaljšano zdravljenje z AI REZULTATI

Raziskava Referenca	Vrsta AI	Število bolnikov	Srednji FU (mes)	Razmerje tveganj (95% IZ)			
				za ponovitev bolezni	p	za smrt	p
CCTG MA 17 GossP et al JNCI 2005	letrozol	5187	30	0,58 (0,45-0,76)	< 0,001	0,82 (0,57-1,19)	0,3
NSABP B-33 Mamounos et al J Clin Oncol 2008	Eksarrestan	1998	30	0,68	0,07	1,2	0,63
ABCSG-6a Jakesz R et al JNCI 2007	Anastrozol	856	62,8	0,62 (0,40-0,96)	0,031	0,89 (0,59-1,34)	0,57

Neoadjuvantna hormonska terapija s tamoksifenom pri starejših



- med 1980-1990 je bilo narejenih več nerandomiziranih raziskav faze II, ki so preučevale učinkovitost tamoksifena pri bolnicah ≥ 70 let z lokalno napredovalim rakom dojke

- delež odgovorov 49%-68%;
- srednji čas do najboljšega odgovora 13.5 to 14 tednov
- srednji čas do napredovanja bolezni: 47/26/15.5 mesecev pri bolnicah, kjer je bil dosežen popoln/dejni odgovor/stagnacija
- preživetje primerljivo s historičnimi podatki

Hormonsko zdravljenje pre/perimenopavznih bolnic z metastatskim hormonsko odvisnim rakom dojke



	LH-RH	LH-RH + tamoksifen	Relativno tveganje	p
Delež odgovorov	30%	39%	0.67	0.03
Čas do progressa (mesece)	5.4	8.7	0.70	<0.001
Povprečno preživetje (leta)	2.6	2.9	0.76	0.002

Učinkovitost AI v primerjavi s tamoksifenom v neoadjuvantnem zdravljenju pomenopavznih bolnic



Raziskava, ref.	Število bolnic	Izbor bolnic	Zdravljenje: 3-4 mesece	Učinkovitost		Delež BCS (%)
				%cRR	%pCR	
LET 024 trial Eierman, Ann Oncol 2001	324	veliki operabilni ali lokalno napredovali	LET	55*	<1	45*
			TAM	36	<1	35
IMPACT trial Smiths JCO 2005	330	veliki operabilni ali lokalno napredovali	A	37	3	44
			TAM	36	4	31
			AT	39	3	24
PROACT Catalotti, Cancer 2006	314	veliki operabilni ali lokalno napredovali	A	39	NR	43*
			TAM	35	NR	30.8
Exemestane Study Semiglazov ASCO 2005	351	veliki operabilni ali lokalno napredovali	EXE	76*	2	37*
			TAM	40	2	20

*statistično značilna razlika

cRR = klinični odgovor, pCR = patološki popoln odgovor, BCS = konzervirajoča operacija

Prvi red zdravljenja pomenopavznih bolnic s hormonsko odvisnim metastatskim rakom dojk



Referenca	Randomizacija	Št.	Delež odgovorov (%)	Klinična dobitnost (%)	Srednji čas do progressa (mes)
Nabholz et al <i>J Clin Oncol 2000</i>	Anastrozole	171	21	59*	11.1*
	Tamoxifen	182	17	46	5.6
Bonnetere et al <i>J Clin Oncol 2000</i>	Anastrozole	340	33	56	8.2
	Tamoxifen	328	33	56	8.3
Mouridsen et al <i>J Clin Oncol 2003</i>	Letrozole	453	30*	49*	9.4*
	Tamoxifen	454	20	38	6.0
Pardiens et al <i>J Clin Oncol 2008</i>	Examestane	182	46*	66*	9.9*
	Tamoxifen	189	31	49	5.8

*statistično značilna razlika

Drugi red zdravljenja pomenopavznih bolnic s hormonsko odvisnim metastatskim rakom dojk (po predhodnem zdravljenju s tamoksifenom)



Referenca	Randomizacija	Št.	Delež odgovorov (%)	Klinična dobitnost (%)	Srednji čas do progressa (mes)	Srednje preživetje (mes)
Buzdar et al <i>Cancer 1998</i>	Anastrozol, 1mg	263	13	42	—	27*
	Megestrol acetat	253	12	40	—	23
Dombernowski et al <i>J Clin Oncol 1998</i>	Letrozol, 2.5 mg	174	24*	35	5.6*	25
	Megestrol acetat	189	16	32	5.5	22
Buzdar et al <i>J Clin Oncol 2001</i>	Letrozol, 2.5 mg	199	32	53	3	29
	Megestrol acetat	201	30	47	3	26
Kaufmann et al <i>J Clin Oncol 2000</i>	Exemestan, 25 mg	336	15	37	4.7*	Ni doseženo*
	Megestrol acetat	403	12	35	3.8	28

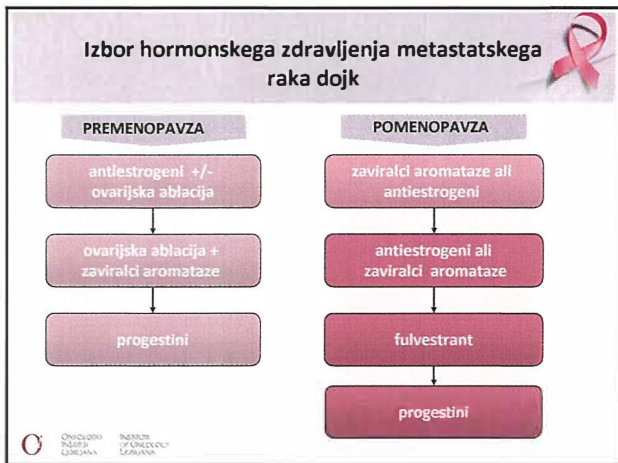
*statistično značilna razlika

Fulvestrant v zdravljenju pomenopavznih bolnic s hormonsko odvisnim metastatskim rakom dojk



Referenca	Predhodno zdravljenje	Randomizacija	Št.	Klinična dobitnost (%)	Delež odgovorov	Srednji čas do progressa (mes)
Howell et al <i>JCO 2004</i>	Brez oz tam adjuvantno Pred ≥ 12 mes.	Fulvestrant vs tamoksifen	587	54.3* 62.0	31.6 33.9	6.8 8.3
Robertson et al Raziskava FIRST <i>JCO 2009</i>	Brez oz tam adjuvantno Pred ≥ 12 mes.	Fulvestrant vs anastrozol	205	72.5 67	36 35.5	še ni dosežen* 14.2
Osborne et al <i>JCO 2002</i>	tam	Fulvestrant vs anastrozol	400	43.5 40.9	19.2 16.5	5.4 4.1
Chia et al. Raziskava EFFECT <i>The Breast 2008</i>	nesteroidni AI	Fulvestrant vs eksemestan	693	32.2 31.5	29.1 27.2	9.9 8.1
Beigh et al Raziskava FACT SABCS 2009	dopolnilno hormonsko zdravljenje	Anastrozol vs Fulvestrant + anastrozol	514	55.1 55.0	33.6 31.8	10.2 10.8

*statistično značilna razlika



Zaključki

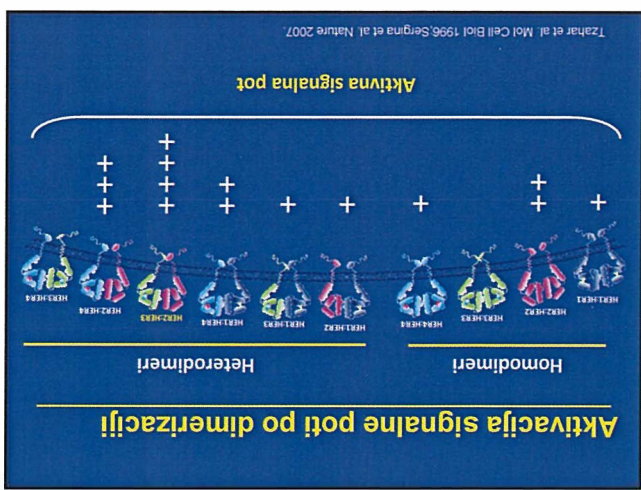
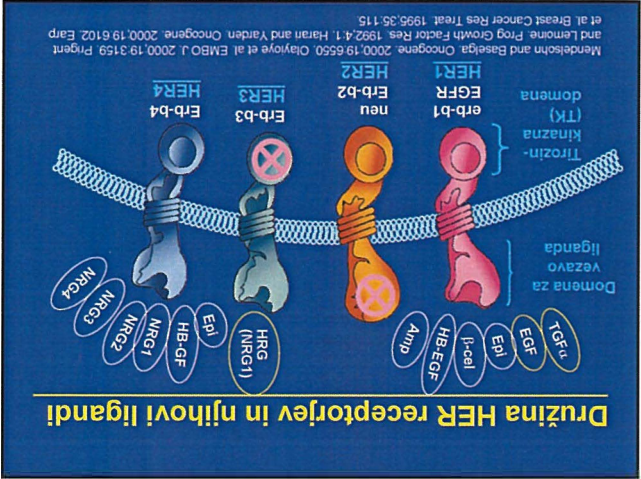
- Hormonsko odvisnost raka dojk definira prisotnost estrogenih in/ali progesteronskih receptorjev.
- Prisotnost hormonskih receptorjev napoveduje odgovor na hormonsko zdravljenje.
- Hormonsko zdravljenje je izbor za pre- in pomenopavzne bolnice s hormonsko odvisnim rakom dojk v dopolnilnem zdravljenju in zdravljenju razširjene bolezni.

ONKOLOGI
INŠTITUT
LJUBLJANA

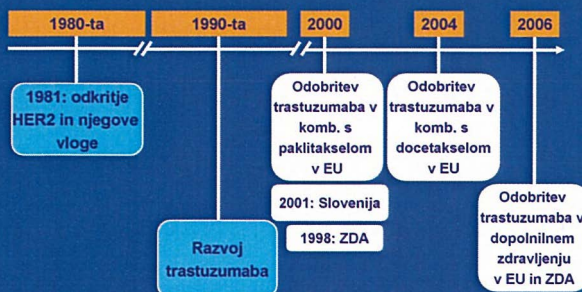
 INŠTITUT
ZA ONKOLOGIJO
LJUBLJANA

Pomen določanja HER2 statusa pri raku dojke

Asist.mag. Erika Matos, dr.med.



Od HER2 do tarčnega zdravlila

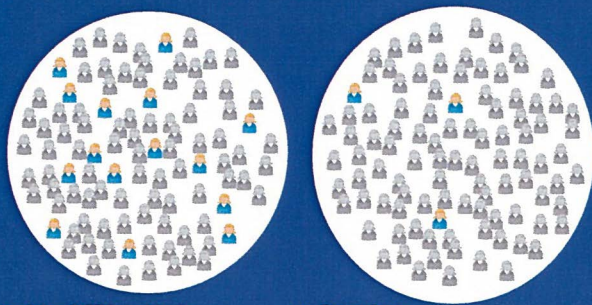


Prvi raziskavi s trastuzumabom, faza II

- Faza II¹, 46 bolnic, močno pretretirane
 - izbor IHC pozitivnih, če je bilo obarvanih vsaj 25% celic, nejasna merila
 - ORR 11,6% (1 CR, 4 PR)
- Faza II², 222 bolnic, 2. in 3. linija
 - izbor HER2 pozitivnih (2+ ali 3+) na osnovi sistema ocenjevanja 0, 1+, 2+, 3+, pri čemer je bil 3+ rezultat pri srednjem do močnem obarvanju membrane > 10% celic,
 - ORR 15% (8 CR, 11 PR) v ITT populaciji
 - ORR 18% pri IHC 3+ in ORR 6% pri IHC 2+³

1 Baselga J et al. J Clin Oncol 1996;14(3):737-744. 2 Cobleigh M et al. J Clin Oncol 1999, 17(9):2639-2648. 3 Smith IE. Anti-Cancer Drugs 2001;12(4):S3-S10.

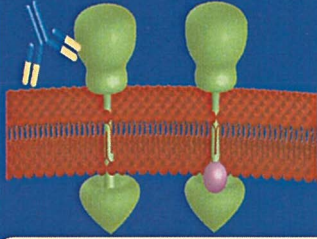
Izbor populacije je ključen za tarčna zdravlila



- Izbor HER2 pozitivnih
 - odgovor pri 15 od 100
- Brez izbora
 - odgovor pri 3 od 100

Nova tarčna zdravila: drugačen mehanizem delovanja

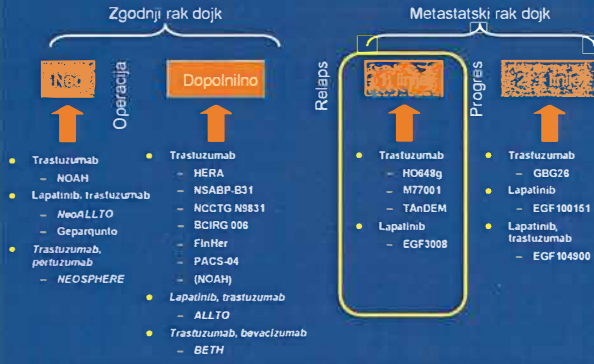
Monoklonalno Ab trastuzumab¹
Usmerjeno na EC domeno receptorja HER2



Mala molekula – lapatinib²⁻⁴
Usmerjeno na IC domeno HER1 in HER2

1. Gennari et al. Clin Cancer Res 2004;10:5650-5. 2. Rusnak. Mol Cancer Ther 2001;1:85-94. 3. Hegde et al. Mol Cancer Ther 2007;6(5):1629-40. 4. Xia et al. Oncogene 2002;21(41):6255-63

Zdravljenje HER2 pozitivnega raka dojk



Trastuzumab v kombinaciji s taksani

mediana spremljanja 30 mesecev	H0648g ¹		H0648g ²	
	IHC 2+ all IHC 3+		podskupina IHC 3+	
	paklitaksel + trastuzumab n=92	paklitaksel n=96	paklitaksel + trastuzumab n=68	paklitaksel n=77
ORR (%)	41,0	17,0	49,0	17,0
	p<0,001		p <0,05	
TTP (meseč)	6,9	3,0	7,1	3,0
	p<0,001		p <0,05	
OS (meseč)	22,1	18,4	24,8	17,9
	p=0,17		p <0,001	

• Skupina IHC 3+ je imela večjo dobrobit IHC 2+

1 Slamon DJ, et al. N Engl J Med 2001;344:783-92. 2 Smith IE. Anti-Cancer Drugs 2001;12(4):S3-S10.

Trastuzumab v kombinaciji s taksani

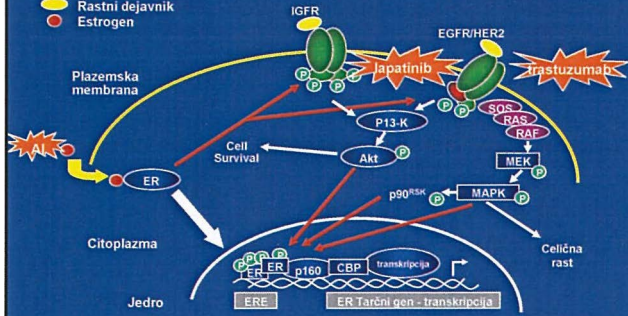
mediana spremljanja 40,9 in 35,9 mesecev v roki s kombinacijo in samo docetakselom	M77001 IHC 3+ in/ali FISH+	
	docetaksel + trastuzumab n=92	docetaksel n=94
ORR (%)	61	34
	p=0,0002	
TTP (mesece)	11,7	6,1
	p=0,0001	
OS (mesece)	31,2	22,7
	p=0,0325	

Marty M et al. J Clin Oncol 2005; 23(19): 4265-4273.

Kombinacija biološke in hormonske terapije

- "crosstalk" med signalno potjo HER2 receptorja in endokrino potjo

- Rastni dejavnik
- Estrogen



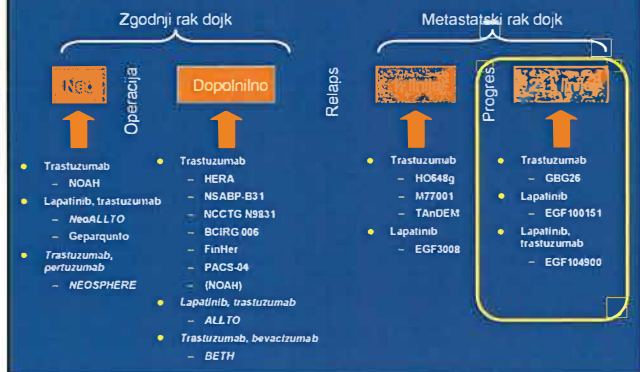
Prilagojeno po Johnston SRD. Clin Cancer Res. 2005;11:889s-899s.

Kombinacija biološke in hormonske terapije

* Centralno potrjen HR status (n=150)	TAnDEM ¹		EGF3008 ²	
	Centralno potrjen HER2 in delno tudi HR		Centralno potrjen HER2	
	anastrozol (n=104)	anastrozol + trastuzumab (n=103)	letrozol (n=108)	letrozol + lapatinib (n=111)
ORR (%)	6,8	20,3	15,0	28,0
	p=0,018		p=0,021	
PFS (mesece)	2,4 (3,8*)	4,8 (5,6*)	3,0	8,2
	p=0,0016 (p=0,62*)		p=0,019	
OS (mesece)	23,9 (28,6*)	28,5 (34,1)*	32,3	33,3
	p=0,325 (p=0,85*)		p=0,113	

¹ Kaufman B et al. J Clin Oncol 2009; 27(33): 5529-5537. ² Johnston S et al. J Clin Oncol 2009; 23(33): 5538-5546.

Zdravljenje HER2 pozitivnega raka dojk

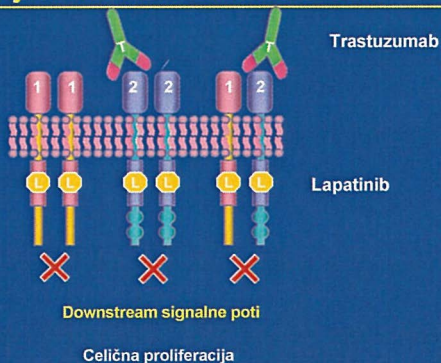


Zdravljenje po progresu s trastuzumabom

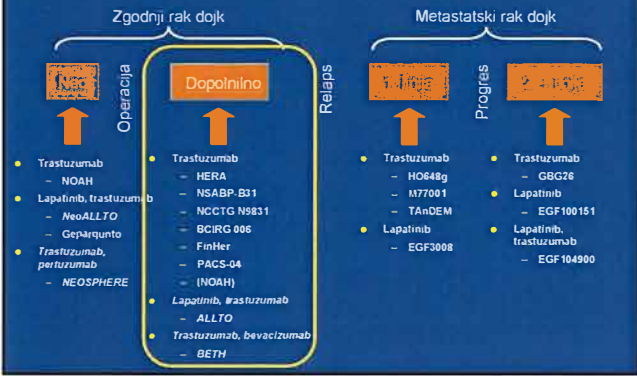
	EGF100151 ¹		GBC26 ²		EGF104900 ³	
	lapatinib (n=198)	lapatinib + trastuzumab (n=201)	lapatinib (n=71)	lapatinib + trastuzumab (n=78)	lapatinib (n=148)	lapatinib + trastuzumab (n=148)
ORR (%)	13,9	23,7	27,0	48,1	6,9	10,3
	p=0,017		p=0,0115		p=0,46	
TTP oz. PFS* (meseči)	4,3	6,2	5,6	8,2	8,1*	12,0*
	p=0,00013		p=0,0338		p=0,008	
OS (meseči)	15,3	15,6	20,4	25,5	9,5	14,0
	p=0,177		p=0,257		p=0,026	

1 Cameron D et al. Breast Cancer Res Treat 2008;112:533-543. 2 von Minckwitz et al. J Clin Oncol 2009. J Clin Oncol 2009;27(12):1999-2006. 3 Blackwell et al. SABCS 2009;ab 61.

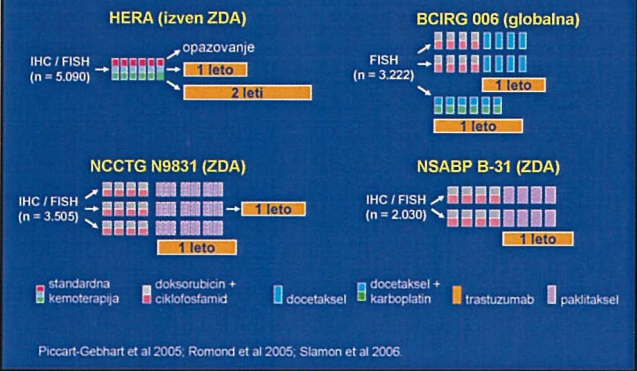
Kombinacija dveh bioloških učinkovin



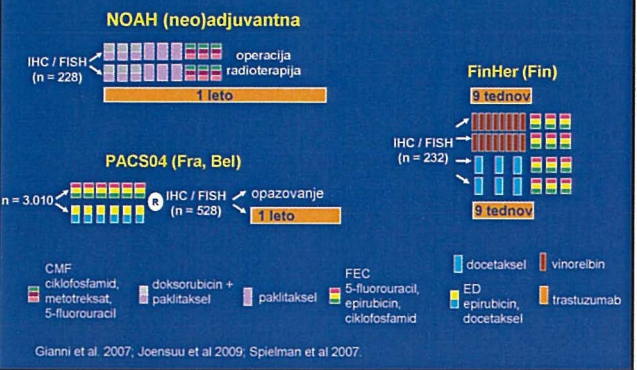
Zdravljenje HER2 pozitivnega raka dojke



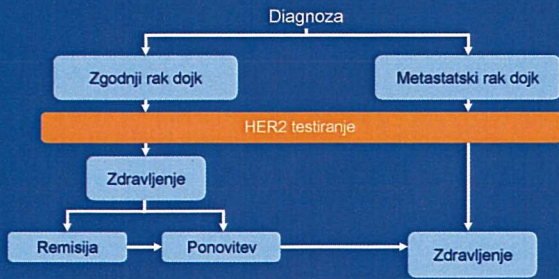
Ključne raziskave s trastuzumabom v dopolnilnem zdravljenju > 13.000 bolnic



Ključne raziskave s trastuzumabom v dopolnilnem zdravljenju > 13.000 bolnic



Pred sprejetjem odločitve o zdravljenju moramo poznati HER2 status



Goldhirsch et al 2006, Dowsett et al 2007, Wolff et al 2007

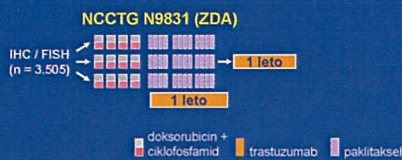
Priporočila za določanje HER2

- Leta 2007 je združenje ASCO/CAP (American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists) izdalo nova priporočila za opredelitev HER2 pozitivnega statusa
 - IHC pozitivno (3+): močno obarvane cele membrane v > 30% celic
 - FISH pozitivno (+): HER2/CEP17 razmerje > 2.2
- Kriterij HER2 pozitivnosti v dopolnilnih raziskavah s trastuzumabom
 - IHC pozitivno (3+): močno obarvane cele membrane v > 10% celic
 - FISH pozitivno (+): HER2/CEP17 razmerje > 2.0

Wolff AC et al J Clin Oncol 2007;25(1):118-145; Perez E et al. SABCS 2009 abstr 701

Vpliv ASCO/CAP 2007 priporočil na rezultate N9831

- Vnovično odčitavanje IHC in FISH glede na priporočila ASCO/CAP 2007
- Pri retrospektivnem pregledu vzorcev majhen odstotek bolnic iz N9831 ni zadostil novim ASCO/CAP 2007 priporočilom za HER2 pozitivni rezultat
 - IHC: 3.7%
 - FISH: 1.4%
 - oboje: 1.7%



Perez E et al. SABCS 2009 abstr 701.

DFS (preživetje brez bolezni) glede na nov odčitek IHC

Podskupina	roh.a	N	št. dogodkov	HR A vs. B	CI 95%	p	DFS 5 let
3+ IHC (> 30%)	A	847	231	0.59	0.47-0.73	<0.0001	74.0
	C	738	124				84.2
IHC 0, 1, 2+	A	146	37	0.63	0.38-105	0.07	76.0
	C	155	28				86.0
> 30% 3+	A	847	231	0.59	0.47-0.73	<0.0001	74.0
	C	738	124				84.2
> 10-30% 3+	A	36	8	0.40	0.09-1.75	0.18	77.2
	C	31	3				96.8
≤ 10%	A	110	29	0.61	0.35-1.08	0.09	75.7
	C	124	25				83.4
PRIOR 3+ IHC (> 10%)	A	883	239	0.58	0.47-0.72	<0.0001	74.2
	C	769	127				84.7
PRIOR IHC 0,1,2+	A	110	29	0.61	0.35-1.08	0.09	75.7
	C	124	25				83.4

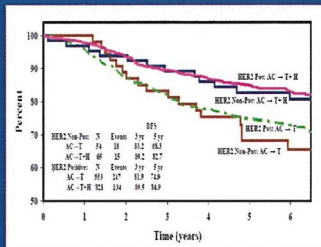
Perez E et al. SABCS 2009 abstr. 701

N=1.886

DFS (preživetje brez bolezni) glede na nova priporočila

ASCO/CAP 2007

- HER2 Non-positive oz. mejna populacija (IHC ≤ 30 and FISH razmerje ≤ 2.2)
- HER2+ (IHC >30 ali FISH razmerje > 2.2)



Perez E et al. SABCS 2009 abstr. 701

Odporna vprašanja

- Učinek trastuzumaba se zdi primerljiv ne glede na stara ali nova priporočila
 - HER2 pozitiven rezultat glede na prejšnja priporočila glede HER2 pozitivnega rezultata je lahko kriterij za dopolnilno zdravljenje
 - potrebni so podatki iz novih raziskav
- V raziskavi trastuzumaba in lapatiniba (MCCR RC0639) so centralno retestirali 118 bolnic za HER2 status²
 - podobno ali boljše ujemanje med lokalnimi in centralnimi laboratoriji kot v N9831
 - 4,2% bolnic ni bilo pozitivnih po novih priporočilih ASCO/CAP 2007 za HER2 status

1 Perez E et al. SABCS 2009 abstr. 701. 2 McCullough A et al. ASCO 2009 abstr. e11527

Številne učinkovine v razvoju na področju HER2 signalne poti

Inhibitor dimerizacije HER2	pertuzumab monoklonsko protiteleso, ki inhibira dimerizacijo HER2
Konjugat Ab-kemoterapevtik	T-DM1 trastuzumab z vezano citotoksično učinkovino
Inhibitorji PI3K	npr. GDC0941 molekula, ki se selektivno veže na PI3K izotomo, ki inhibira PI3K / Akt signalno pot
Inhibitorji tirozin kinaze	npr. neratinib ireverzibilni inhibitor EGFR, HER2 in HER4 tirozin kinaze
Inhibitorji mTOR	Npr. everolimus majhna molekula, ki inhibira signalno prevajanje preko mTOR
Inhibitorji HSP 90	npr. tanespimicin inhibira "heat-shock protein" HSP 90
Inhibicija VEGF	bevacizumab monoklonsko protiteleso proti VEGF

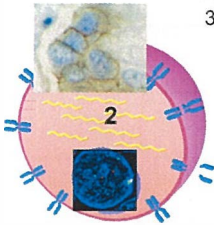
ADC, antibody-drug conjugate; T-DM1, trastuzumab DM1; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; EGFR, epidermal growth factor receptor; mTOR, mammalian target of rapamycin; HSP, heat-shock protein; VEGF, vascular endothelial growth factor

Določanje statusa hormonskih receptorjev in HER2 - metodološki aspekti

S. Frkovič Grazio
Onkološki Inštitut, Oddelek za patologijo

Določanje statusa HER2 pri karcinomu dojke

- 1 - DNA: FISH, CISH, RT-PCR, Southern blot
- 2 - mRNA: RT-PCR, Western blot
- 3 - protein: IHC, Northern blot

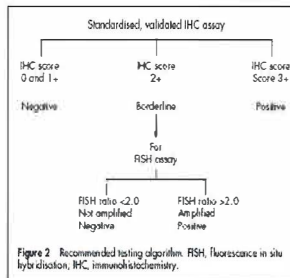
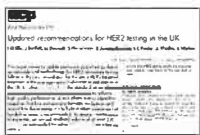


IHK in FISH:
- primerni za arhivsko tkivo
- ohranjena morfologija tkiva
- priporočeni za diagnostično določevanje

Appropriate laboratory assay methods
IHC and FISH[™] are the techniques recommended for determining HER2 status. Currently, the
Ellis et al. J Clin Path 2004; 233-237

Stara priporočila za določanje HER2 Velika Britanija NEQAS 2004

- algoritem določanja
- minimalni obseg preiskav (vsaj 250 na leto za IHC) (vsaj 100 na leto za FISH)
- invazivni karcinom
- uporaba notranjih kontrol
- način vrednotenja
- standardizirane metode



Priporočila ASCO in CAP
Priporočila za določanje HER2

ASCO & CAP
 2007



- Najprimernejši algoritem določevanja HER2
- Zagotavljanje optimalne kvalitete preiskav, kvalitete interpretacije in načina podajanja rezultatov

ASCO/CAP 2007

- 1. Ni 'zlatega standarda'; ni testa, ki bi v primerjavi z drugimi testi bolje prepoznal bolnice, pri katerih bo Herceptin uspešen
- 2. Ne glede na metodo (IHC ali FISH) je rezultat določanja lahko:
 Negativen HER2 (negative) HER2 test – IHC 0/1+, FISH r <1,8
 Dvomiljiv HER2 (equivocal) HER2 test – IHC 2+, FISH r 1,8-2,2
 Pozitiven HER2 (positive) HER2 test – IHC 3+, FISH r >2,2
- 3. Neskladje:
 v skupini negativnih in pozitivnih naj bo < 5%;
 v skupini dvomljivih ne velja

Določanje HER2 na OI

Skladnost IHC in FISH

Parni rezultati (IHC in FISH) za 5102 tumorjev 2005-2009

	0	1+	2+	3+	Total
FISH -	2614 (51,%)	1275 (25,0%)	414 (8,1%)	46 (0,9%)	4349 (85,2%)
FISH +	16 (0,3%)	37 (0,7%)	104 (2,0%)	596 (11,7%)	735 (14,8%)
Total	2630 (51,5%)	1312 (25,7%)	518 (10,2%)	642 (12,6%)	5102

1,9% neskladnih med vsemi (99/5102)
 2,2% neskladnih med + in - (99/4584)

Določanje HER2 na OI

Skladnost IHK in FISH

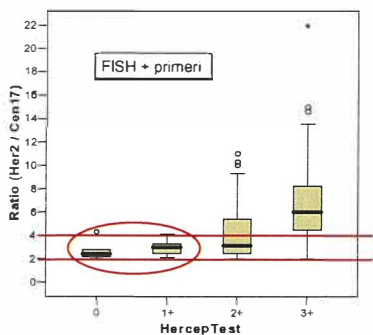
Parni rezultati (IHK in FISH) za 5102 tumorjev 2005-2009

	0 (N=2630)	1+ (N=1312)	2+ (N=518)	3+ (N=642)	Total (N=5102)
FISH -	2614 (99,4%)	1275 (97,2%)	414 (79,9%)	46 (7,2%)	4349 (85,2%)
FISH +	16 (0,6%)	37 (2,8%)	104 (20,1%)	596 (92,8%)	735 (14,8%)

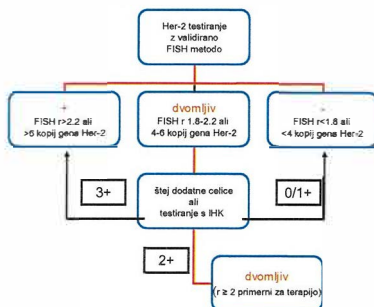
V literaturi: 2-8% IHC 0/1+ je FISH+
5-22% IHC 3+ je FISH -

Določanje HER2 na OI

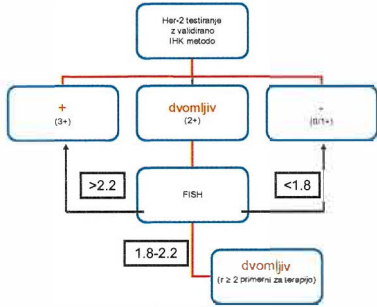
Stopnja pomnožitve gena HER2 glede na rezultat HercepTesta



Algoritem za FISH

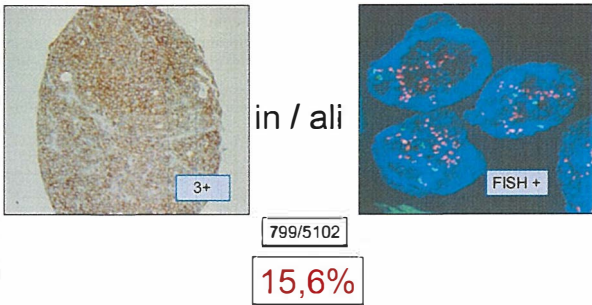


Algotem za IHK



Določanje HER2 na OI

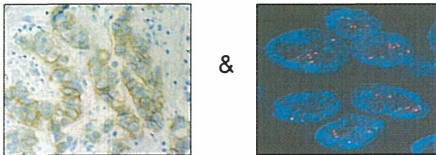
Delež HER2 pozitivnih IC



Določanje HER2 na OI

2 x 'dvomljivo'

- IHK 'dvomljivo' & FISH 'dvomljivo'
- HecepTest poz (2+) & FISH količnik 1,8 – 2,2



7 / 2071 (0,3%)

Herceptin data sheet

INDICATIONS AND USAGE

Herceptin (trastuzumab), as part of a treatment regimen containing doxorubicin, cyclophosphamide, and paclitaxel, is indicated for the adjuvant treatment of patients with HER2-overexpressing, node-positive breast cancer. (See CLINICAL STUDIES and DOSAGE AND ADMINISTRATION.)

Herceptin as a single agent is indicated for the treatment of patients with metastatic breast cancer whose tumors overexpress the HER2 protein and who have received one or more chemotherapy regimens.

Herceptin
cancer
metastatic

HER2 Detection

(See PRECAUTIONS: HER2 Testing)

Detection of HER2 protein overexpression, either directly through IHC or indirectly through gene amplification, is necessary for selection of patients appropriate for Herceptin therapy. (see INDICATIONS AND USAGE). Assessment for HER2 expression or gene amplification should be performed by laboratories with demonstrated proficiency in the specific technology being utilized. Several FDA-approved commercial assays are available to aid in the selection of patients for Herceptin therapy; see HER2 Protein Overexpression Detection Methods and HER2 Gene Amplification Detection Methods. These include Herceptin[®] and Ventana's approved assay (IHC assays) and PathVision[®] and Dako's approved assay (FISH assays). Users should refer to the package inserts of specific assay kits for information on the validation and performance of each assay.

Limitations in assay precision (particularly for the IHC method) and in the direct linkage between assay result and overexpression of the Herceptin target for the FISH method make it inadvisable to rely on overexpression and potential benefit from Herceptin (see Tables 2 and 4).

Herceptin data sheet

Herceptin[®]
(Trastuzumab)

Manufactured by:
Genentech, Inc.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4980

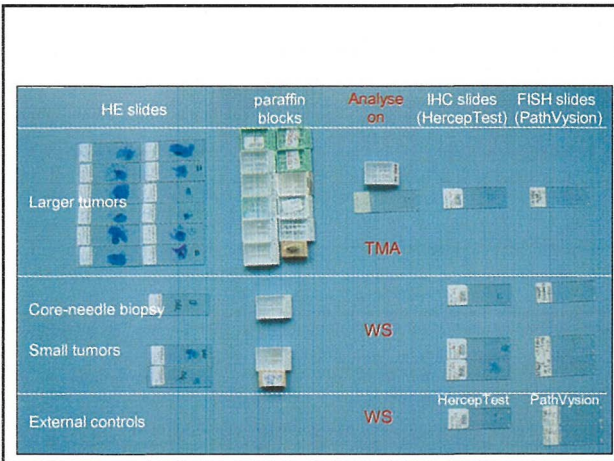
4829800
Initial US Approval: September 1998
Revision Date: November 2003
© 2003 Genentech, Inc.
L10726 7/17/03

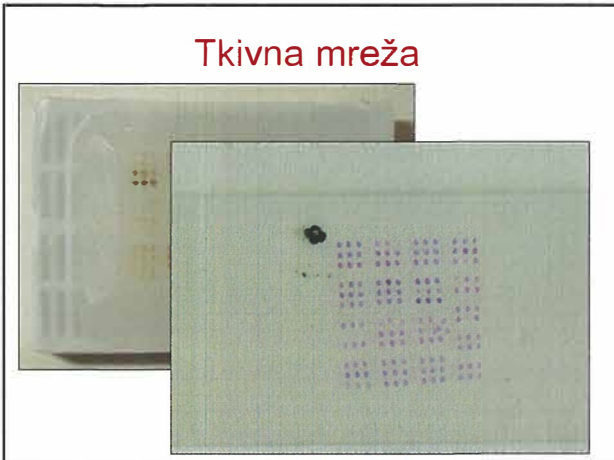
There are limitations in the direct linkage between gene amplification and overexpression of the Herceptin target which make it inadvisable to rely on a single method to rule out potential benefit from Herceptin. There is insufficient information to conclude whether patients without 3+ protein overexpression by IHC but with gene amplification by FISH may benefit from Herceptin therapy in the adjuvant breast cancer setting. There is insufficient information to determine whether FISH testing can distinguish a subpopulation of **HER2 2+** patients with metastatic breast cancer who would benefit from Herceptin therapy.

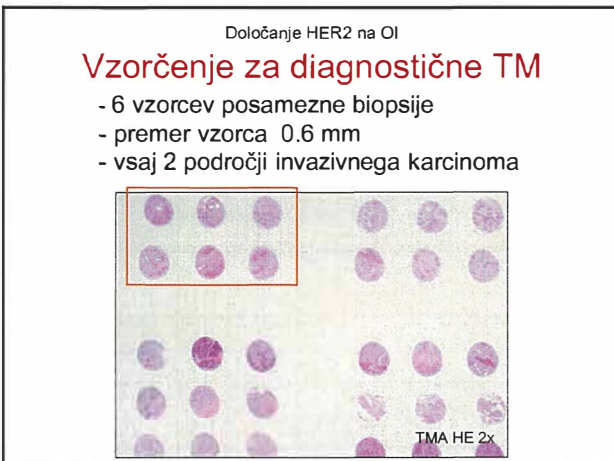
Priporočila ASCO in CAP

IHC 3+ / FISH- in
IHC 0 ali 1+ / FISH+

Discordant results (IHC 3+ / FISH-negative or IHC < 3+ / FISH-positive) have also been described, and were observed in approximately 4% among 1,503 patients screened centrally (LabCorp, Burlington, NC) with both methods for eligibility for a clinical trial with trastuzumab.⁵⁹ However, clinical outcome data for these two groups are not yet available. We anticipate and recommend that such analyses will be forthcoming as correlative studies of the large prospective randomized clinical trials of trastuzumab.

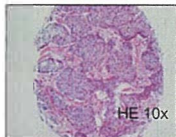




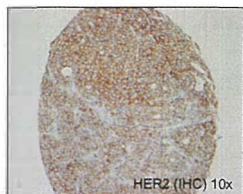


Določanje HER2 na OI
TM pri določanju HER2

1. Ocena primernosti vzorca
na preparatu HE



2. "Slepo" vrednotenje preparatov IHK in FISH-a



Določanje HER2 na OI
**Skladnost rezultatov FISH:
TM vs. cela rezina**

- 71/72 99% skladnih rezultatov
(kappa = 0.952)
- 25/25 100% (Skacel 2002)
- 28/29 98% (Gancberg 2002)
- 83/87 95% (Zhang 2003)
- 99/101 98% (Bhargava 2004)

Določanje HER2 na OI
**Skladnost rezultatov IHK:
TM vs. cela rezina**

- 94/97 97% skladnih rezultatov
(kappa: 0.901)
- 94/109 86% (Bhargava 2004)
- 51/54 93% (O'Grady 2003)

ASCO/CAP 2007

Optimalni postopki za zagotavljanje kakovosti

- Začetna validacija (pred diagnostično uporabo testa)
 - na vsaj 25 – 100 vzorcev
 - skladnost z validiranim testom > 95%
- Redna kontrola kvalitete
- Revalidacije 2x letno
- Vzdrževanje opreme
- Uporaba standardnih operativnih postopkov
- Redno izobraževanje in preverjanje usposobljenosti tehničnega osebja
- Redno izobraževanje in preverjanje usposobljenosti patologov
- Revalidacija ob vsaki spremembi postopkov

ASCO/CAP 2007

Ravnanje s tkivom

- Čim krajši čas od odvzema do fiksacije
- Debelina 5 do 10 mm
- Fiksacija v formalinu 6 do 48 ur
- Evidenca časa do fiksacije in trajanja fiksacije za vsak vzorec
- Rezone preiskane v največ 6 tednih

ASCO/CAP 2007

Priloga 2: Priporočene metode za diagnostično določanje HER2

Parameter	IHC (Herceptin)		FISH (HER2)		IHC (Herceptin)		FISH (HER2)	
	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO
Assay	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO
Methodology	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO
Reporting	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO
Notes	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO	ASCO

Optimalni način kontrole kakovosti

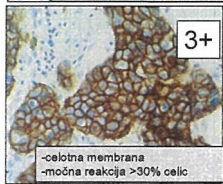
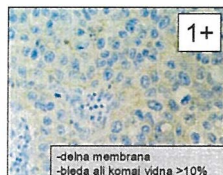
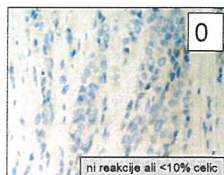
- interna kontrola kakovosti
 - pozitivne / negativne kontrole
 - ustrezne kontrole z različnim nivojem ekspresije antigena
- eksterni program kontrole kakovosti
 - vsaj 2 kroga letno
 - zadovoljiv rezultat je >90% ustreznih rezultatov
- presoja eksterne komisije vsake 2 leti
- letne interne presoje
- nezadovoljivi rezultati → suspenzija laboratorija

ASCO/CAP Guideline recommendations for HER2 testing

J Clin Oncol 2007; 25(1):118

brew assays" have not. Prospective substudies from two of the adjuvant randomized trials of trastuzumab versus nil have demonstrated that approximately 20% of HER2 assays performed in the field (at the primary treatment site's pathology department) were incorrect when the same specimen was re-evaluated in a high volume central laboratory.^{20,42} Such disorganized practice and high rate of inaccuracy, for such an important test that dictates a critically effective yet potentially life-threatening and expensive treatment, is not acceptable.

Vrednotenje IHK reakcije



Spremembe pri vrednotenju IHK

Do 2007

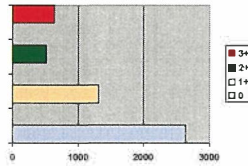
- **Negativno (0 in1+):** neobarvane ali delno obarvane membrane v < 10% celic
- **Pozitivno (2+):** šibko ali zmerno obarvane cele membrane v > 10%
- **Pozitivno (3+):** močno obarvane cele membrane v > 10% celic

ASCO/CAP 2007

- **Negativno (0 in1+):** neobarvane membrane ali delno obarvane membrane v < 10% celic
- **Dvomljivo (2+):** šibko ali zmerno obarvane cele membrane v > 10%; močno obarvane <30%
- **Pozitivno (3+):** močno obarvane cele membrane v > 30% celic

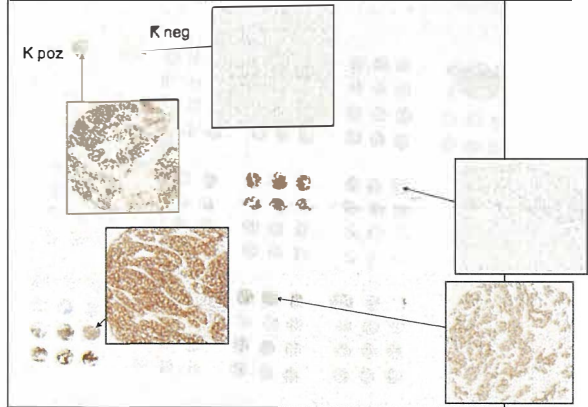
IHK rezultati OI

- poz (3+) 12,6% (842 / 5102)
- dvomljivo (2+) 10,2% (518 / 5102)
- neg (1+) 25,7% (1312 / 5102)
- neg (0) 51,5% (2630 / 5102)



- *Mayo Clinic*, 1575 cases
13% IHC score 3+
- *Saitama Cancer Center*, 1482 cases
13% IHC score 3+
- *MSKCC New York*, 3655 cases
11% IHC score 3+
- *UH Leuven*, 1362 cases
11% IHC score 3+

IHK določevanje HER2 na tkivnih mrežah

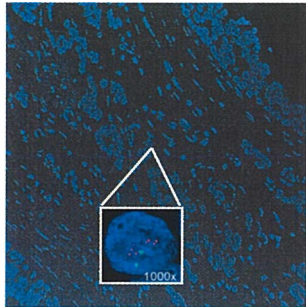


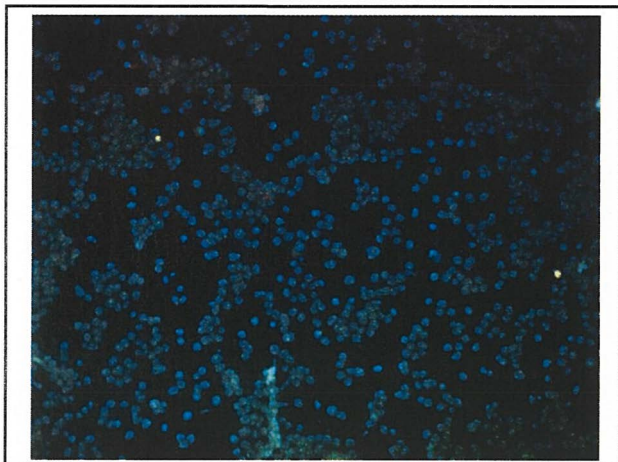
FISH za določanje HER2

Nukleinskih kislin ne ekstrahiramo iz vzorca (in situ)!!

Ohranjena morfoloģija tkiva

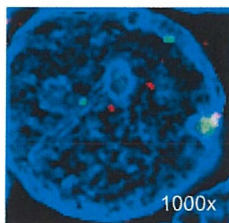
1. Razločevanje
 - karcinomskih in nekarcinomskih
 - tumorskih ali netumorskih celic
2. Razločevanje in situ in invazivne kopomente tumorja





Sonde za FISH

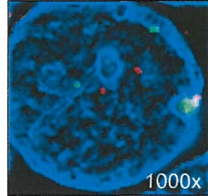
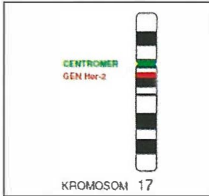
- Sonde so praviloma v parih!!
- Ena je označena s fluorokromom, ki sveti zeleno in druga s fluorokromom, ki sveti rdeče
- Jedrna DNK je kontrastirana z barvilom DAPI, ki sveti modro



Vrednotenje preparata temelji na oceni števila ali medsebojnega položaja sond

FISH za določanje pomnožitve HER-2

- V nespremenjeni celici sta 2 kromosoma 17 in na vsakem 1 gen HER
- Večje število kopij Her-2 je lahko posledica aneuploidije kromosoma 17 in ne pomnožitve gena
- Priporočena uporaba sonde za gen HER-2 in centromer kromosoma 17 (*PathVysion HER2 Probe Kit*)



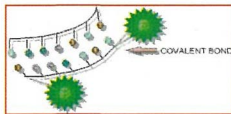
Načini označevanja sonde

Tipi detekcijskih molekul:

1. Radioaktivni označevalci
2. Molekule, ki jih dokažemo s protitelesi (CISH, SISH)
3. Fluorokromi (FISH)

Način vezave detekcijske molekule:

1. Indirektno - zahteven postopek detekcije
2. **Direktno** – postopki detekcije niso potrebni



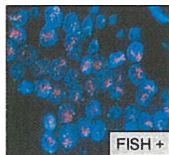
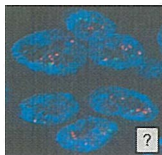
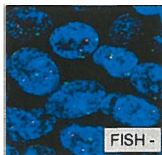
Vrednotenje FISH-a

Do 2007

- Signale HER2 in CEP 17 preštejemo v vsaj 20 jedrih IC in izračunamo količnik ($r = \text{ratio}$)
- Negativno: $r < 2$
- Pozitivno: $r \geq 2$

ASCO/CAP 2007

- Signale HER2 in CEP 17 preštejemo v vsaj 20 jedrih IC in izračunamo količnik ($r = \text{ratio}$)
- Negativno: $r < 1,8$
- Dvomljivo: $r = 1,8 - 2,2$
- Pozitivno: $r > 2,2$



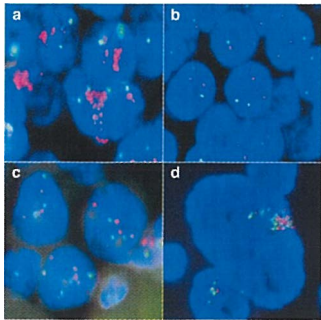
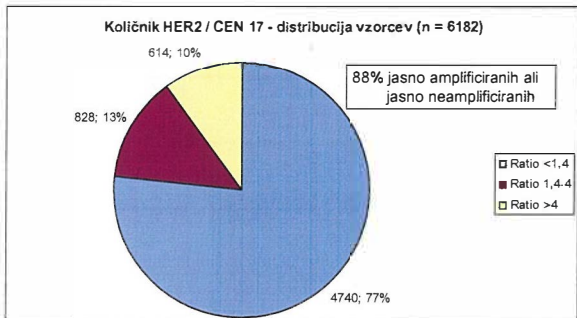


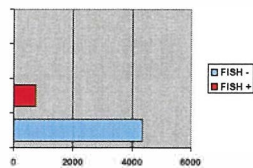
Fig 3. Patterns of human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) gene copy alterations
 (A) Classical amplification with clusters of red *HER2* signals.
 (B) Normal *HER2/CEP17* copy numbers.
 (C) Low-level increase of *HER2* relative to *CEP17*.
 (D) Coamplification of *HER2* and *CEP17*.

More than 95% of breast cancers correspond to categories A and B, either clearly *HER2* amplified or clearly not amplified



FISH rezultati OI

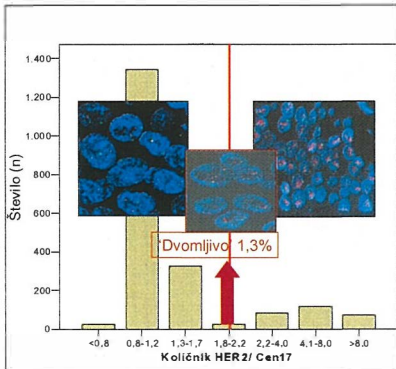
- FISH+ 14,8% (753/5102)
- FISH - 85,2% (4349/5102)



- MSKCC New York, 3655 cases*: 14.7% FISH+

*Am J Clin Pathol 2005; 123:541

Določanje HER2 na OI
Količnik HER2 / Cen17



FISH

Slabosti:

- Draga oprema
- Dražje kemikalije
- Dolg postopek
- Mikroskopski pregled z oceno dolgotrajnejši kot pri IHC

Prednosti:

- Kvantitativni rezultati
- Objektiven sistem vrednotenja
- Dobra ponovljivost med laboratoriji in ocenjevalci (kapa večinoma >0.95)
- Boljša korelacija s prognozo (?)
- Boljša napoved odgovora na trastuzumab (??)



- Pregled literature in kritični pristop k priporočilom iz leta 2007
- FISH priporočen kot primarni test

Guidelines for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing: Biologic and Methodologic Considerations

J Clin Oncol 2009; 27:1323-33

Guido Sauter, James Lee, John M.S. Bartlett, Dennis J. Slamon, and Michael F. Press

- Her2 gene amplification is directly correlated with Her-2 overexpression
- full range of Her-2 expression is not continuous
 - in amplified specimens receptors per tumor cells ranges from 500 000 to 2 000 000
 - in non-amplified ranges from 25 000 to 185 000
- Her-2 protein levels are not reliably analyzed by IHC on formalin-fixed tissues (fixation, especially ethanol exposure and antigen retrieval methods, nonspecific binding in crush artefacts area, tissue border, cutery artefacts)
- FISH analysis is both relatively independent of tissue fixation and highly reproducible between laboratories
- interlaboratory inconsistencies and external quality assurance schemes
- **FISH is more accurate for the assessment of her-2 status than IHC in FFPE breast cancers**

Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study

Modern Pathology (2007) 20, 584-591

Mitch Dowsett, Wedad M Hanna, Mark Kockx, Frederique Penault-Llorca, Josef Ruschoff, Thorsten Gütjahr, Kai Habben and Marc J van de Vijver

Academic Dept. of Biochem., Royal Marsden Hospital, London, UK;
 Department of Anat. Pathol, University of Toronto, Canada;
 Histogenex, Antwerp, Belgium;
 De part. de Pathol, Centre Jean-Perrin, Clermont-Ferrand, France;
 Institute für Pathol, Klinikum Kassel, Germany;
 F Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland;
 Roche Diagnostics GmbH, Germany
 Depart. of Pathol., Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands

!! higher proportion of equivocal cases than would be expected in the general population - 32% (32/100 IHC results) compared with about 15% in routine practice

Specimen	Immunohistochemistry					Consensus
	Center R	Center C	Center D	Center E	Center F	
A1	E	E	N	E	N	60
A2	N	N	N	N	N	100
A3	P	E	E	E	E	80
A4	P	P	P	P	P	100
A5	E	E	E	P	E	80
A6	N	E	N	E	N	60
A7	P	P	P	P	P	100
A8	N	E	N	E	E	60
A9	P	P	P	P	P	100
A10	N	N	N	N	N	100
A11	E	E	E	E	N	80
A12	E	E	N	E	N	60
A13	N	N	N	N	N	100
A14	E	E	N	E	E	80
A15	P	P	E	P	P	80
A16	P	P	P	P	P	100
A17	N	E	N	N	N	80
A18	P	P	P	P	P	100
A19	N	E	E	E	N	60
A20	N	N	N	N	N	100

Analysis of immunohistochemistry concordance: categorization of specimens and consensus among testing centers Specimen Center

N: negative (0 or 1+);
 E: equivocal (2+);
 P: positive (3+).

Each testing center, including the sending center, analyzed the HER2 status of set A specimens by immunohistochemistry using the HercepTest kit (DAKO), according to the manufacturer's instructions

FISH

- rezanje parafinskih rezin / sušenje
- deparafiniranje in hidriranje
- predobdelava
- proteoliza
- fiksacija in dehidracija
- denaturacija / hibridizacija
- pohibridizacijsko spiranje
- kontrastiranje, pokrivanje in označevanje preparatov

Hibridizacija



Kriteriji za interpretacijo FISH-a

- fiksacija 6 do 48 ur
- invazivni karcinom (ne DCIS !)
- vsaj 20 jeder v dveh ločenih področjih tumorja

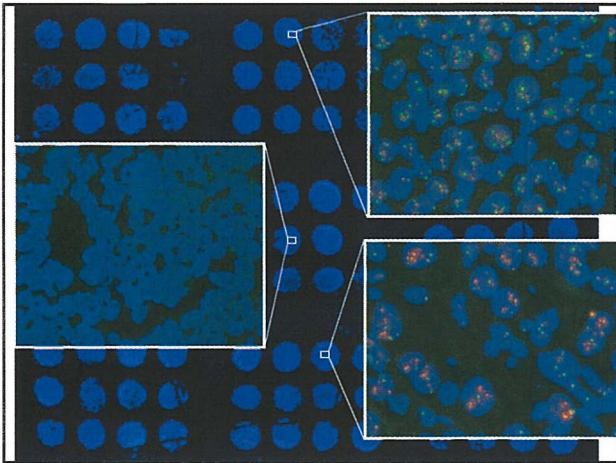
Preiskava zavrnjena / ponovljena

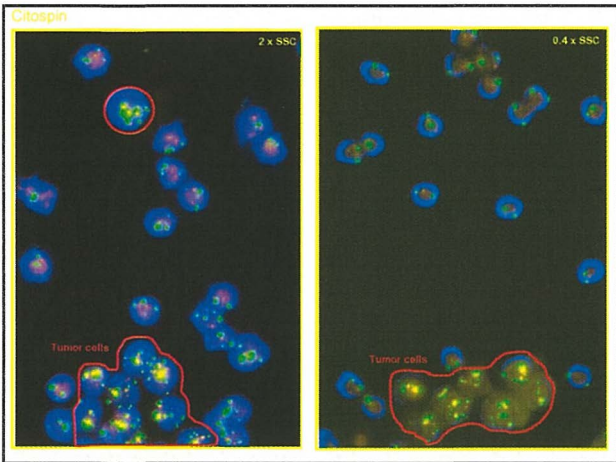
- >25% signalov prešibkih za vrednotenje
- neustrezen rezultat v kontroli
- >10% signalov v citopazmi
- močna avtofluorescenca
- slaba resolucija jeder

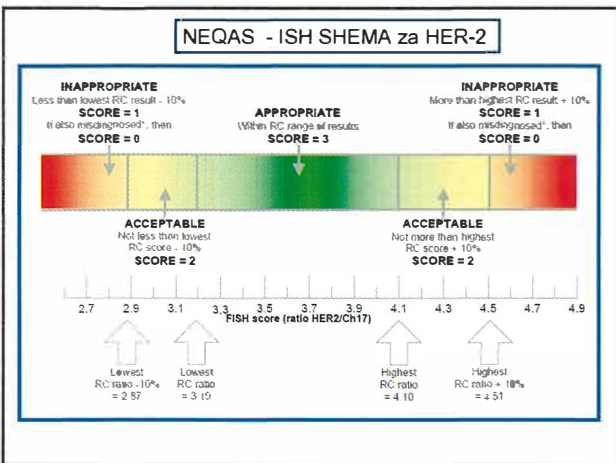
Dvomljiv rezultat:

- dodatne celice
- ponovitev
- IHK

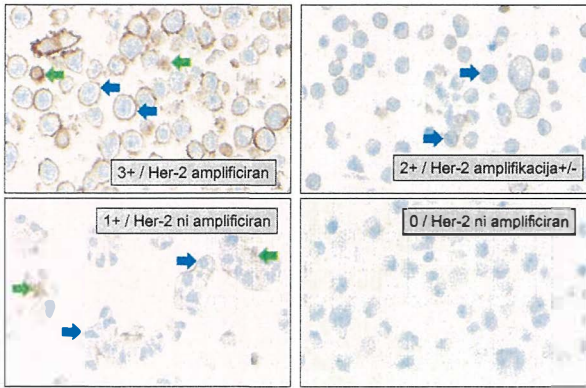
Table 8 FISH Interpretation Criteria
Review counterstaining technique and assess whether FISH cells to localize the analysis (e.g., carcinoma in situ) should not be scored.
Review controls. If not as expected, test should be repeated.
Count at least 20 nonoverlapping cells in two separate areas of interest (e.g.,
Prostate: 1000 nuclei; 25A)
Report if aneuploidy is high or rare resolution probe.
Percent of cells (mean ± SD) with signal (e.g., 30% with 2:2 ratio).
If HER2/CEP17 ratio between 1.8 and 2.2, have a duplicate portin report.
If fluorescence detection, have additional person report.
Counting can be done by a trained technician. The pathologist must confirm that cells are scored and that nuclei are correctly identified.
Note: Tumor heterogeneity, aneuploidy or polyploidy of chromosomes 17 and gene deletion may influence the interpretation of the signal ratio. Also, colocalization: DCIS, Aggressive in situ hybridization, FISH, immunofluorescence, HER2, human epidermal growth factor receptor 2.

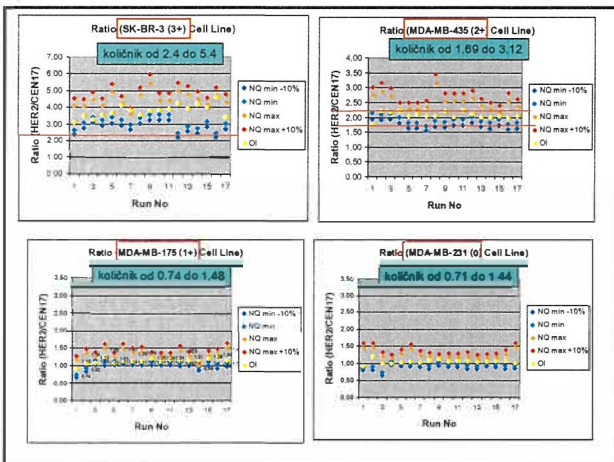


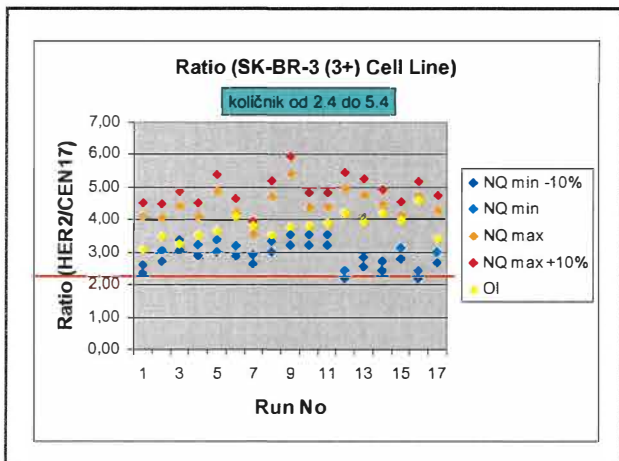


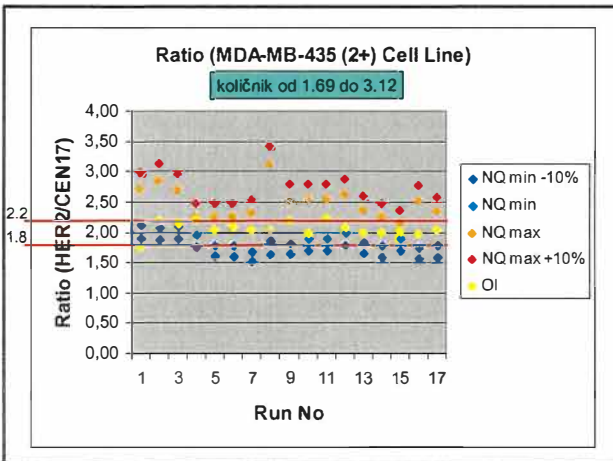


NEQAS celične linije







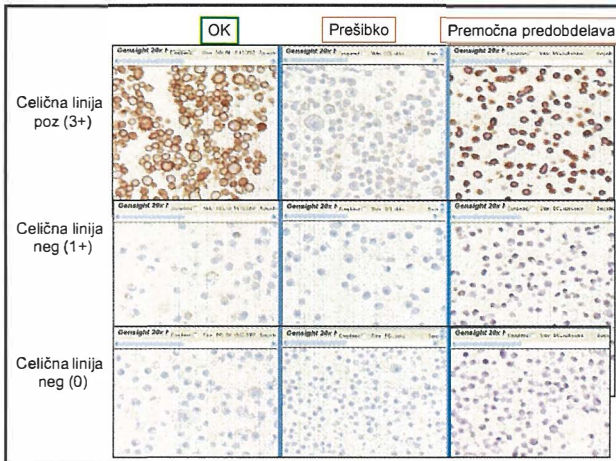


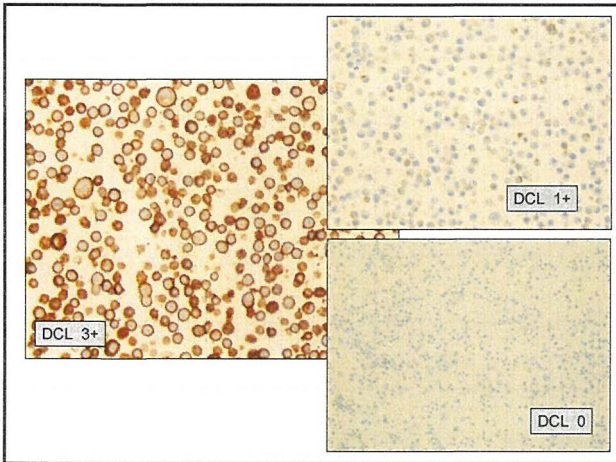
Imunohistokemija

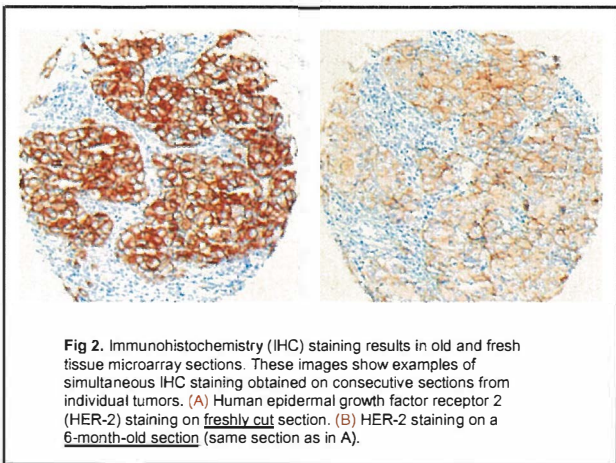
- rezanje parafinskih rezin / sušenje
- deparafiniranje in hidriranje
- predobdelava za razkrivanje in obnovo antigena (različni načini !)
- imunohistokemijsko barvanje (različni protokoli !)
- kontrastiranje
- dehidriranje, bistrenje, pokrivanje in označevanje preparatov

Imunohistokemija

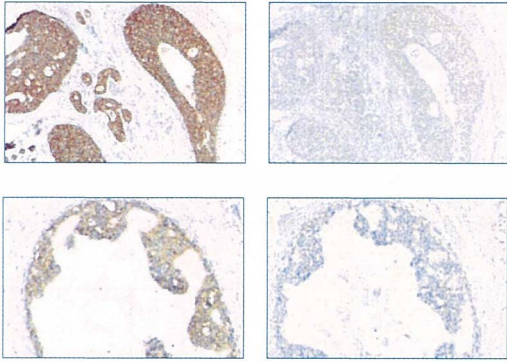
<p>Prednosti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dostopna in izvedljiva v večini laboratorijev • Zmerna cena • Hitrost 	<p>Slabosti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Težavna standardizacija • Občutljiva za nepravilno ravnanje s tkivom • Ponovljivost med ocenjevalci in laboratoriji ni optimalna (kapa 0.67 do 0.74) • Subjektivno vrednotenje rezultata IHK reakcije
--	--

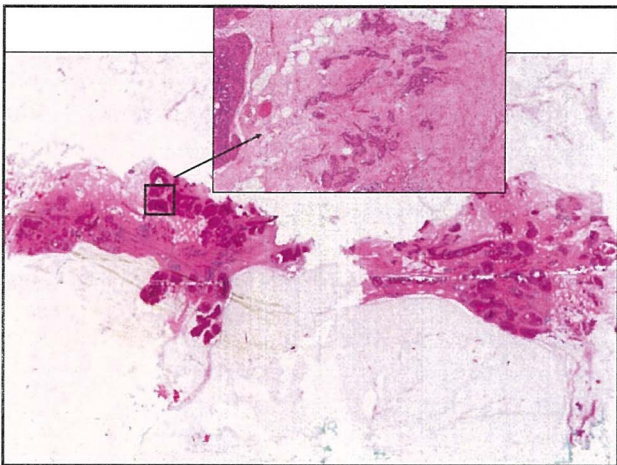


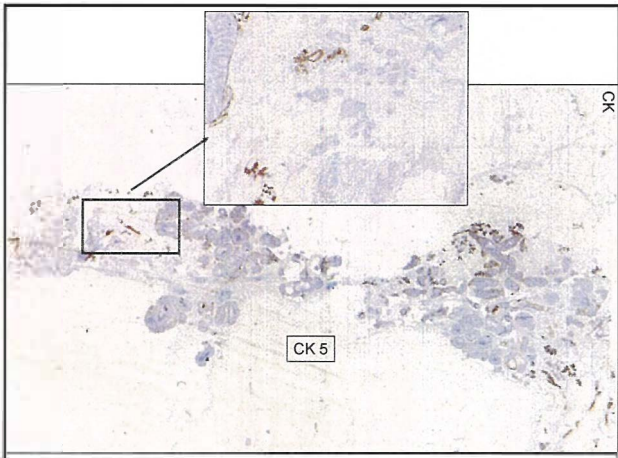


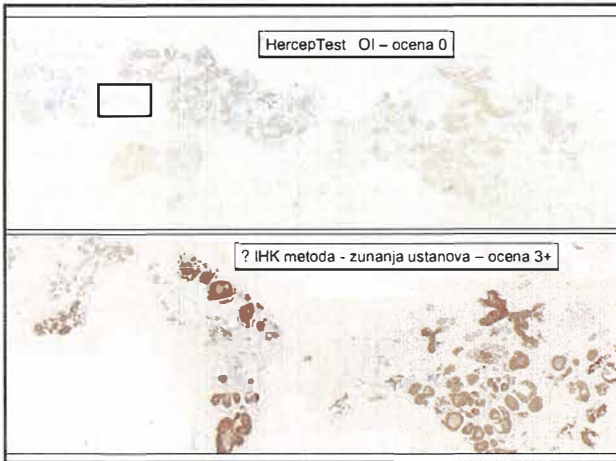


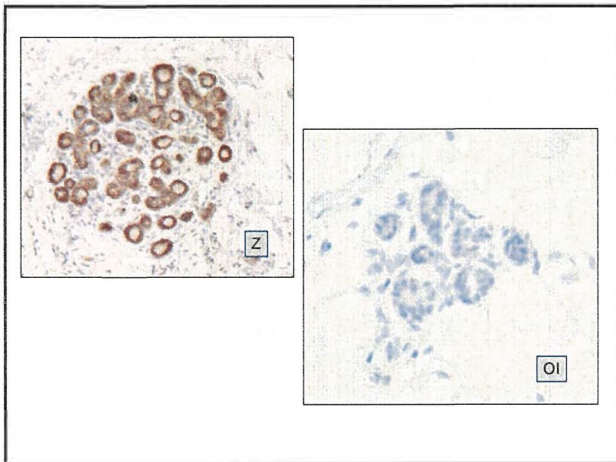
Učinek izsušitve rezine po HIER – lažno negativna reakcija

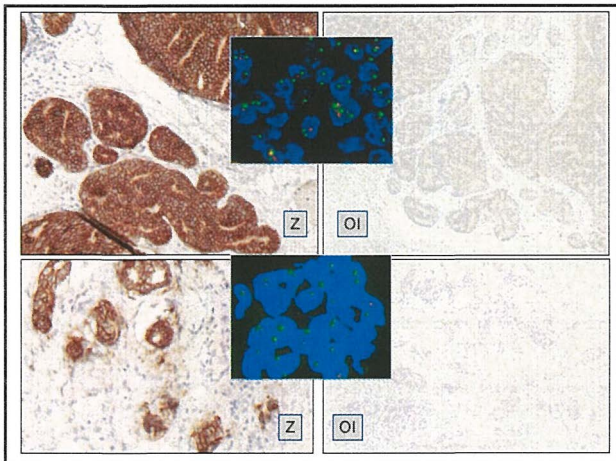


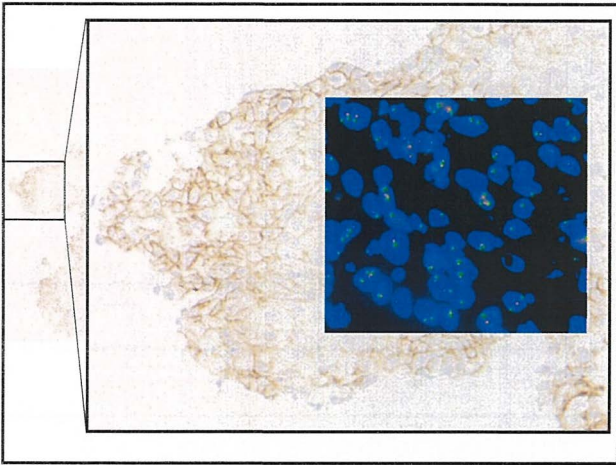


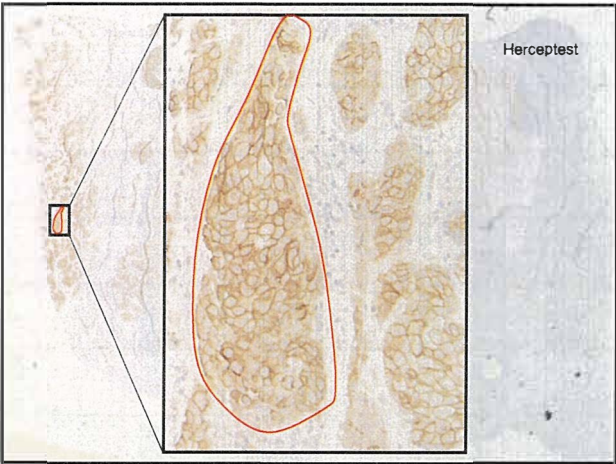


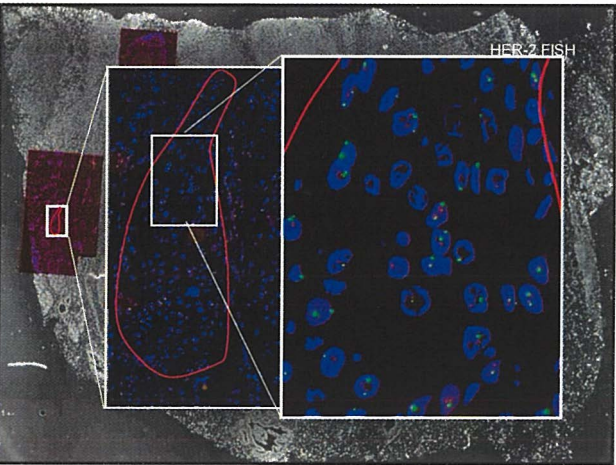


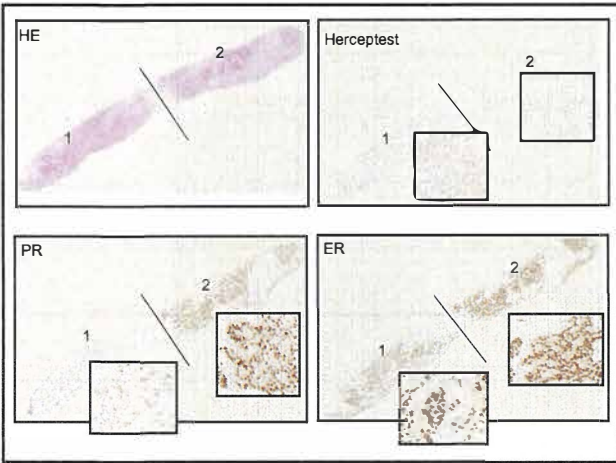


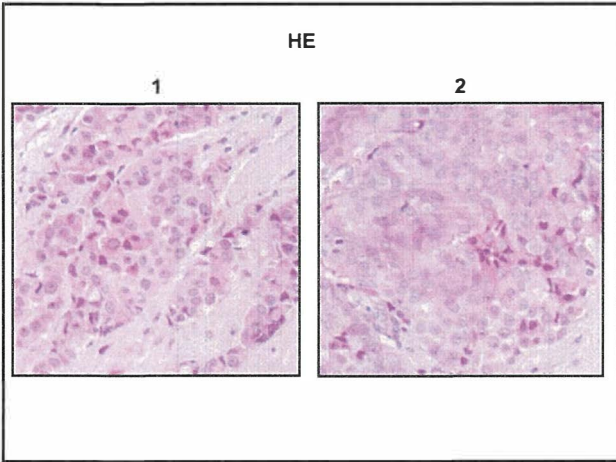


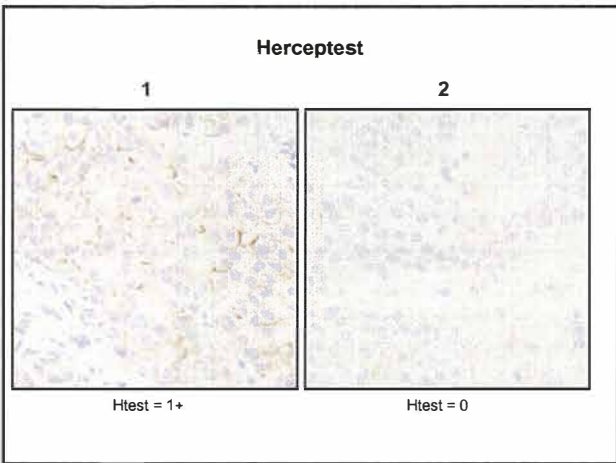






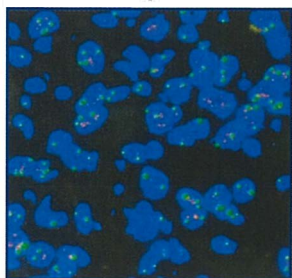






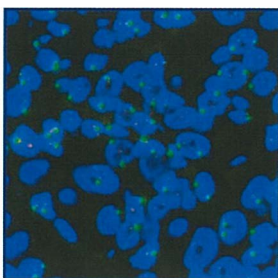
HER-2 FISH

1



Količnik = 2.1

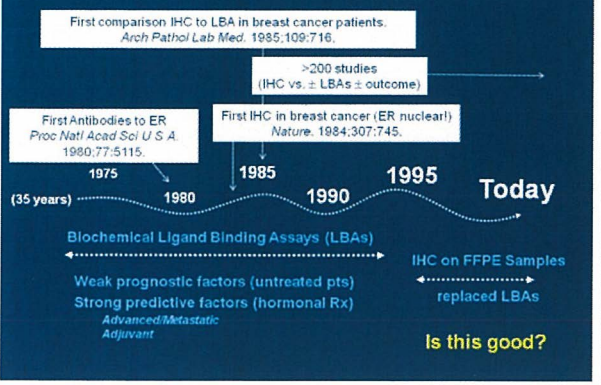
2



Količnik = 1.0

Določanje statusa ER in PR pri karcinomu dojke

ER α and PgR Testing in Breast Cancer



Določitev HR

Biokemija

- Velik vzorec
- Svež/ zmrznjen vzorec
- Radioaktivnost
- Tehnično zahtevna metoda
- Draga
- Homogenizat vseh celic in ne samo tumorskih

IHK:

- Velikost ni omejitev
- Fiksiran / v parafin vklopljen
- Ni radioaktivnosti
- Cenejša
- Ocena HR v tumorskih celicah
- ~~Enostavna~~

IHK je danes priporočena metoda določanja statusa HR (priporočila NHS UK, ASCO/CAP, NCCN.....)

Problemi z IHK določanjem statusa HR

- Kaj je problem ?
 - Nezanosljivi rezultati, zlasti visok delež lažno negativnih
- Obsežnost problema ?
 - ne poznamo natančno !
 - rezultate poznamo le za laboratorije, ki skrbijo za kakovost (rezultati različnih shem kakovosti), vodijo evidence napak, sodelujejo v kliničnih študijah (s centralnim določitvam statusa markerjev)
 - poznamo tudi nekaj "javnih škandalov" – 40% lažno negativnih ER (400/1000 bolnic) v področju Newfoundlanda in Labradorja – 200 bolnic toži !

Priporočila ASCO in CAP

Priporočila za določanje ER in PR

ASCO & CAP
2010



Priporočila, ki naj bi prispevala k izboljšanju stopnje zanesljivosti:

- kaj testirati?
- kako in s čim testirati?
- kako zmanjšati variabilnost rezultatov?
- kaj je pozitivno? kako poročati?
- kako izvajati kontrolo kakovosti?

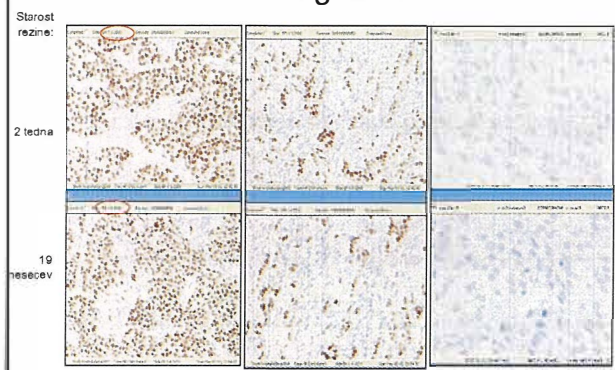
Kaj testirati?

- Obvezno vse invazivne karcinome
- Priporočljivo tudi DCIS
- Širokoigelnne biopsije (multipli stebrički), če se skladajo s tumorjem v resektatu (glede gradusa in tipa)

Optimalno ravnanje s tkivom

- čas med kirurško odstranitvijo in začetkom fiksacije manj od 1 ure
- fiksativ: 10% puferirani formalin
- razmerje volumnov fiksativa/vzorca - 10:1
- čas fiksacije: > 6 h in < 72 h
- rezine pobarvane znotraj 6 tednov
- podatki morajo biti dokumentirani!

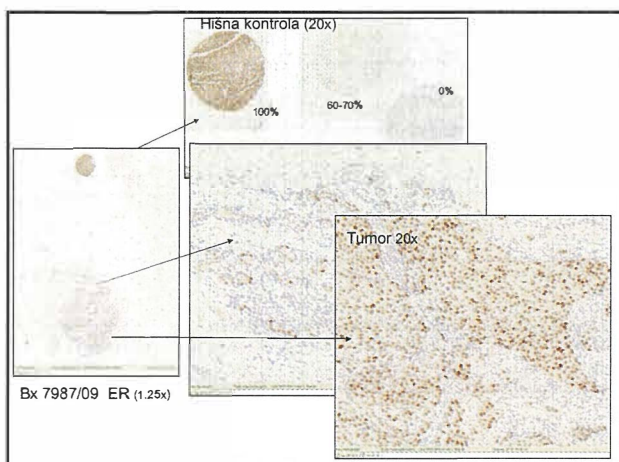
Vpliv starosti tkivne rezine na antigenost ER



Priporočila ASCO in CAP

Standardizacija IHK barvanja

- uporabljamo reagente in protitelesa, katerih specifičnost, senzitivnost ter klinična napovedna vrednost so dobro dokumentirane
- testiranje in validacija na lastnem materialu; revalidacija pri kakršnikoli spremembi postopka
- če uporabljamo drugačne reagente oz. protitelesa, morajo biti rezultati vsaj v 90% skladni s klinično validiranim testom pri ER/PR+, oz. v 95% pri ER/PR-
- uporaba pozitivnih in negativnih kontrol pri vsakem barvanju
- kontrolo naj sestavljajo tkiva z različnimi nivoji ekspresije antigena



Priporočila ASCO in CAP

- Vzdrževanje opreme
- Uporaba standardnih operativnih postopkov
- Redno izobraževanje in preverjanje usposobljenosti tehničnega osebja
- Redno izobraževanje in preverjanje usposobljenosti patologov

Kontrola kakovosti IHK barvanja

- interna kontrola kakovosti
 - pozitivne in negativne kontrole
- eksterna kontrola kakovosti
 - >90% ustreznih rezultatov
 - pri odstopanju: dokumentirana analiza / program ukrepov / analiza uspešnosti ukrepov
- periodične analize lastnih rezultatov

Ocena (ER in PR)

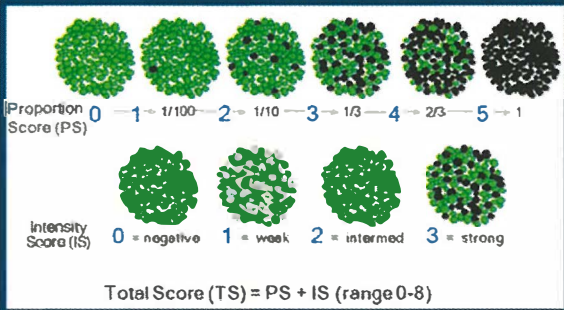
- **Pozitivno**
≥ 1% pozitivnih tumorskih jeder
- **Negativno**
< 1% pozitivnih tumorskih jeder
- **Neinterpretabilno**
 - ni pozitivnih jeder v tumorju, normalno tkivo dojke (v preiskovanem vzorcu) je povsem negativno ali pa je povsem negativna normalna zunanja kontrola na istem stekelcu
- **Določimo:**
 - delež pozitivnih (kvantitativno ali semikvantitativno)
 - intenziteto reakcije (povprečno)
- Odčitovalci vzdržujejo svojo kompetentnost in konzistentnost ter ju dokumentirajo

H-score

- vrednosti od 0 do 300
- % celic x 3 (močno pozitivno) + % celic x 2 (zmerno pozitivno) + % celic x 1 (šibko pozitivno)

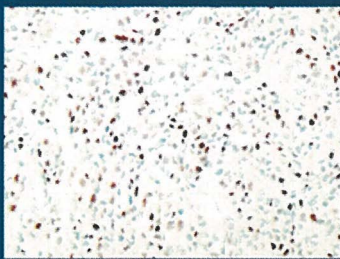
Allred quick score

Scoring Immunostained Slides



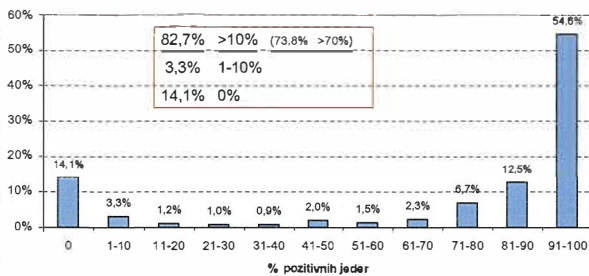
Allred DC, et al. Mod Pathol. 1998;11:155-168.

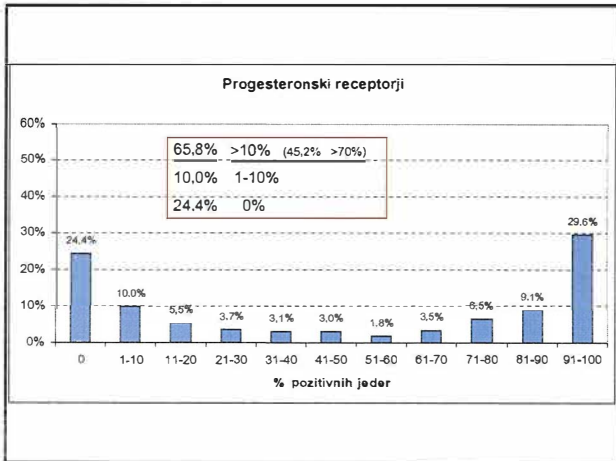
Example of Scoring



Proportion Score = 4 (1/3rd to 2/3rd positive cells)
 Intensity Score = 2 (average intensity "intermediate")
 Total Score = 6/8

Estrogenski receptorji



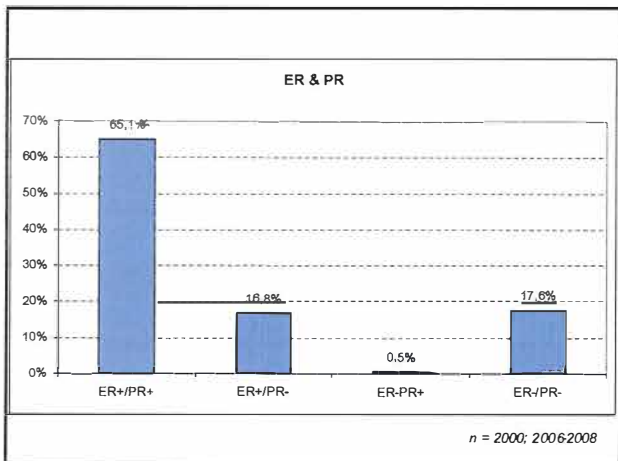


Rezultat testiranja zavrnemo, testiranje ponovimo, če:

- rezultat na zunanji kontroli ni ustrezen
- artefakti zajemajo celoten vzorec

Rezultat zavrnemo, testiranje ponovimo na drugem vzorcu, če:

- je bil vzorec dekalciniran z močno kislino
- v vzorcu ni normalnih epitelijskih elementov in/ali normalne kontrole na istem stekelcu
- je rezultat ER-/PR+
- dobimo negativen rezultat na tumorju nizkega gradusa oz. pri tubularnem, mucinoznem ali lobularnem karcinomu



"Algoritem" testiranja

- invazivni karcinom (obvezno)
- DCIS (priporočljivo)
- validirana metoda določitve (preanalitski pogoji standardizirani, protitelo, predobdelava, metoda, aparat), **zadostno število preiskav**, izkušeno osebje, interni in eksterni nadzor kakovosti in spremljanje rezultatov

HR negativni
(cca 20%)

Ponovitev / potrditev če je:
- nizek gradus
- lobularni karcinom
- tubularni / mucinozni karcinom

HR pozitivni
(cca 80%)

- kvantifikacija (delež, score ...)

ER NEQAS

<http://www.ukneqasicc.ucl.ac.uk/>

Immunocytochemistry Volume 5 Issue 3 (Run 76)

Breast Hormonal Receptor Module

DISTRIBUTION OF SCORES

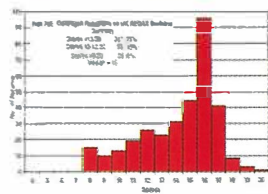


Figure 5. Run 75E: Oestrogen Receptors (UK NEQAS sections).

13-20 sprejemljivo
10-12 mejno
≤ 9 slabo

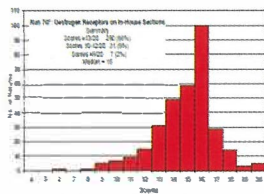


Figure 6. Run 76F: Oestrogen Receptors (In-House sections).

13-20 88%
10-12 9%
≤ 9 2%

PR NEQAS

<http://www.ukneqasicc.ucl.ac.uk/>

DISTRIBUTION OF SCORES

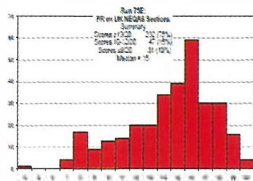


Figure 5. Run 75E: Progesterone Receptors (UK NEQAS ICC & TSH sections).

13-20 sprejemljivo
10-12 mejno
≤ 9 slabo

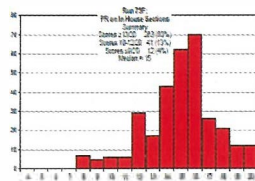


Figure 6. Run 75F: Progesterone Receptors (In-House sections).

13-20 83%
10-12 13%
≤ 9 4%

Table 7. Primary Antibody: Oestrogen receptors (ER)

Antibody details	N	%
BioGenex AB272.2M (clone 1D5)	1	0
Dako M7047 (clone 1D5)	55	58
Dako M105 RTU (clone 1D5)	2	50
MaxPath/Leica/Novolion RM 9101-5 rabbit monoclonal (clone SP1)	59	81
MaxPath/Leica/Microsystems/MCL-ER #F11 (clone EF11)	134	74
Axcel RM405 rabbit monoclonal (clone SP1)	1	100
Axcel VPE613 (clone EF11)	14	100
Axcel VPE614 (clone EF11)	15	100
Ventana 780.2132 (clone EF11)	8	88
Ventana 780.2596 (clone EF11)	20	70
Ventana 780.4324 rabbit monoclonal (clone SP1)	1	100
Zymed/Novogen 001145 (clone 1D5)	1	100
Data not supplied or incomplete	17	

Table 8. Pretreatments

Pretreatment	N	%
Biosare Medical Decalcifying Chamber	3	100
Dako Plascal	2	100
LabVision Pretreatment Module	7	71
Microwave oven	55	58
Pressure cooker	117	81
Pressure cooker in microwave oven	28	81
Ventana Medical Systems BondTrak	23	70
Ventana Medical Systems Benchmark XT	26	88
Leica Microsystems Epitope Retrieval Solution 1 (AR961)	14	64
Leica Microsystems Epitope Retrieval Solution 2 (AR962)	16	85
Axcel bath 65-98-C	22	41
Data not supplied or incomplete	14	

Table 11. Automation

Automation	N	%
BioGenex Genom MX 6000i	13	77
BioGenex Optimax	7	71
Dako Autostainer	68	73
Dako TechMate 500	17	82
Dako TechMate Horizon	3	100
LabVision Autostainer	30	73
None	66	67
Shandon Sequenza	4	75
Ventana Medical Systems Benchmark	20	70
Ventana Medical Systems BenchMark XT	28	89
Ventana Medical Systems NexES	20	75
Leica Microsystems Bond Max	32	81
Data not supplied or incomplete	16	

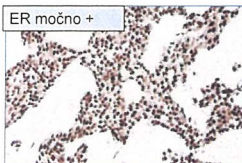


Plate 10. Good demonstration of ER in the high-expressor section (section A) from the UK NEQAS composite block



Plate 11. Expected level of ER staining from the UK NEQAS mid-expressor (section B) showing varying tumour nuclei intensity and positivity

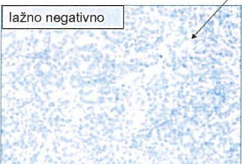


Plate 14. False-negative staining of the UK NEQAS mid-expressor (section A) due to poor nuclear counterstain. The nuclear counterstain is also too strong and the overall image is overexposed, which may also be a problem

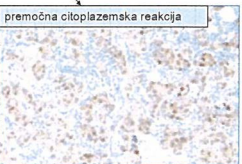
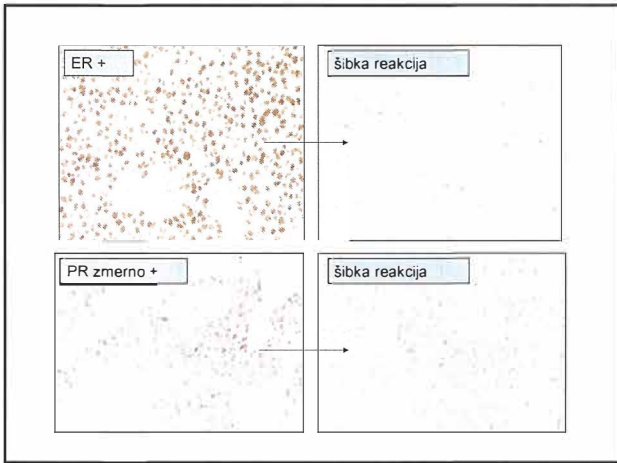
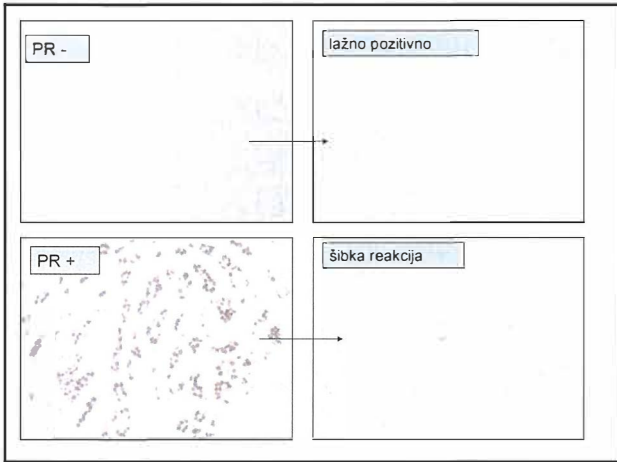
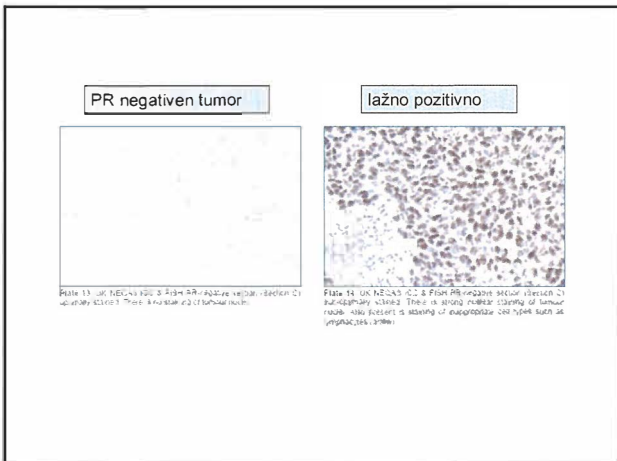


Plate 15. Excessive cytoplasmic staining of the UK NEQAS mid-expressor (section B) with Plate 11. This participant used a protein A-based detection system. An antibody blocking step or a labelled polymer-based detection system can overcome this problem, which is caused by the unmasked demonstration of endogenous IgG

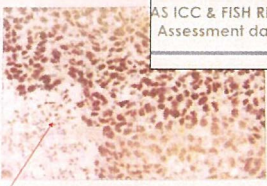






Immunocytochemistry

AS ICC & FISH REVIEWS OF RUN 75
Assessment date: Nov/Dec 2006



Breast cancer. Diagnostic, prognostic and predictive testing.

Advance notice of a joint meeting organised by UK NEQAS ICC & FISH and Maastricht. See page 4 for further details.

UK NEQAS ICC & FISH REVIEWS OF RUN 75
Assessment date: Nov/Dec 2006

NEQAS

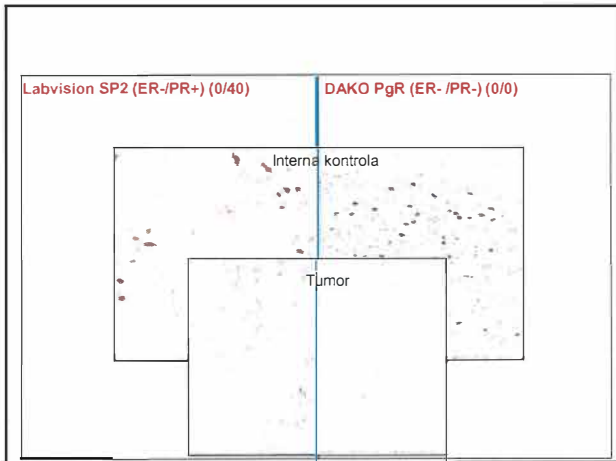
udeležencev s oceno sprejemljivo

Table 4. Primary Antibody Progesterone receptors (PR)

Antibody details	N	%
BioGenex MU-328-UC (clone PR 68)	4	25
Dako M3569 (clone PgR 636)	138	85
Dako K1804 (clone PgR 1294) pharmDx ER/PR kit	2	100
Novocastra/Leica Vision RM-390-G (clone 1A6)	1	0
Novocastra/Leica Vision RM-9102-S (clone SP2) rabbit monoclonal	30	20
Novocastra/Leica BioSystems NCL-PGR-AB (clone 16 - SANZT)	12	100
Novocastra/Leica BioSystems NCL-PGR-312 (clone 16)	44	86
Novocastra/Leica BioSystems NCL-PGR (clone 1A6)	8	55
Vector VP-P577 (clone 16 + SANZT)	1	100
Vector VP-P576 (clone 16)	19	79
Vector VP-P575 (clone 1A6)	2	50
Veribina 760-2616 (clone 16)	13	77
Veribina 760-2456 (clone 1E2) rabbit monoclonal	12	67
Zymed/Invitrogen (clone PR 2C5) 16-0172	1	0
Data not submitted or incomplete	33	

DOLOČITEV STATUSA HR NA ONKOLOŠKEM INŠTITUTU

Leto / kvartal	N	ER/PR- %	ER/PR+ %	ER+PR- %	ER+PR+ %	Prejeto
2004 1	126	22.4	68.0	9.6	0.0	0
2	171	17.0	67.8	14.8	0.6	1
3	173	20.2	68.2	11.0	0.6	1
4	167	19.2	75.1	7.8	9.0	16
2005 1	241	4.6	81.7	8.8	7.1	17
2	215	7.0	71.2	8.4	18.8	29
3	206	13.1	75.2	6.7	6.3	11
4	284	16.8	87.4	15.6	1.2	3
2006 1	200	17.8	82.2	16.1	3.6	2
2	138	8.7	70.3	21.0	0.0	0
3	162	18.7	80.9	16.1	3.7	1
Run 75 NEQAS	229	22.7	66.8	11.8	0.0	0
2007 1	166	26.5	84.8	13.6	1.0	2
2	282	20.2	80.9	18.3	1.1	3
3	232	18.1	66.8	18.9	0.4	1
4	268	24.2	82.2	12.6	3.0	0
2008 1	247	19.8	64.4	18.4	0.4	1
2	238	18.1	65.9	12.7	1.7	4
3	180	17.2	69.4	13.3	0.0	0
4	158	13.0	72.2	14.8	0.0	0



ONKOLOŠKI INŠTITUT – 829 določitev / 1 leto
 - ER-/PR+ skupno 72 (8,7%) → 6 na mesec
 * na patologa 1 na mesec (6/6)

Leto / kvartal	N	ER-/PR- %	ER+/PR+ %	ER+/PR- %	ER-PR+ %	ER- PR+ N
4	167	10,2	73,1	7,8	9,0	15
2005 1	241	4,6	81,7	6,6	7,1	17
2	215	7,0	71,2	8,4	13,5	29
3	206	13,1	75,2	6,3	5,3	11

X LABORATORIJ - 200 določitev / 1 leto
 -ER-/PR+ skupno 19 (8,7%) → 1,5 na mesec
 * na patologa 1 na 4 mesece

Leto / kvartal	N	ER-/PR- %	ER+/PR+ %	ER+/PR- %	ER-PR+ %	ER- PR+ N
4	50	10,2	73,1	7,8	9,0	5
2005 1	50	4,6	81,7	6,6	7,1	4
2	50	7,0	71,2	8,4	13,5	7
3	50	13,1	75,2	6,3	5,3	3

Prediktivni / prognostični marker

- Klinično validiran
- Koristen
- Tehnično validiran

Klinično validiran

- identificira skupino bolnikov s signifikantno razliko v: odgovoru na terapijo / ponovitev bolezni / preživetju
- pomen dokazan v multiplih randomiziranih študijah

Koristen

- marker se resnično uporablja v klinični praksi
 - pomemben za odločitev o načinu zdravljenja bolnika



Tehnično validiran

- Ustrezna:
 - specifičnosti
 - senziivnosti
 - reproducibilnosti
- Kalibriran glede na kliniko
- Standardiziran način ocene / poročanja
- Zagotovljen ustrezen način kontrole kakovosti



Pomen mutacij za sistemsko zdravljenje bolnikov z GastroIntestinalnimi Stromalnimi Tumorji

Branko Zakotnik
OIL

1

Vsebina

- Standardno sistemsko zdravljenje
- GIST: molekularna patogeneza
- Rezistenca
 - Primarna
 - Sekundarna
- Analiza mutacij: koncepti in strategije
- Mutacije c-KIT kot napovedni dejavnik
- Povzetek in zaključek

2

Zdravljenje

- Standardno začetno zdravljenje razsejanega ali neoperabilnega GIST-a je **imatinib mesilat** z začetno dozo **400 mg/dan**, ob progresu **800mg/dan**. Zdravljenje drugega reda: **sunitinib 50mg/d 4 tedne, 2 tedna 0 mg/dan** ali kontinuirano **37,5 mg/dan**.
- 12-14% bolnikov je primarno rezistentnih na imatinib^{1,2}, pri 40 % se razvije sekundarna rezistenca v 2 letih^{2,3}.
- Srednje preživetje brez progressa 19-23 mesecev in preživetje 49 mesecev⁴ kaže, da je nujna racionalna obravnava teh bolnikov z upoštevanjem vseh novih dognanj molekularnih mehanizmov rasti in rezistence z možnostjo uporabe novih tarčnih zdravil.
- To potrjuje tudi zadnja analiza podatkov ameriške raziskave kjer poročajo o skoraj 5 letnem srednjem preživetju⁵. Prav tako ugotavljamo, da je srednje preživetje pri bolnikih z razsejanim GIST, ki smo jih zdravili v Sloveniji od leta 2001 (n=51) 66 mesecev⁶.

3

¹Demetri GD et al. NEJM 2002. ²Van Glabbeke et al. JCO 2005. ³Verweij J et al. Lancet 2004. ⁴Van Glabbeke et al. ASCO 2007, Abstr10004. ⁵Blanke CD et al. JCO 2008. ⁶Repar A et al. Onkologija 2008

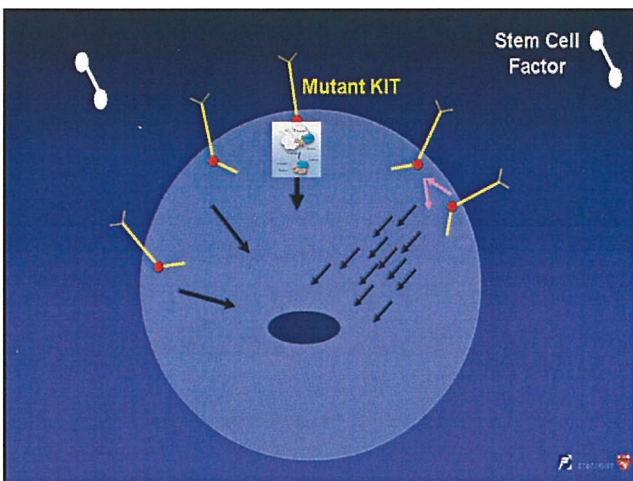
GIST: molekularna patogeneza

- Ključni dogodek pri maligni transformaciji je v večini primerov mutacija gena^{1,2}
 - *KIT*: 80%-85%¹
 - *PDGFRA*: 5%-7%²
 - Wild-type: 12%¹
- Rezultat teh mutacij je stalno aktivirana receptorska tirozin kinaza in kot posledica³:
 - Od liganda neodvisna mitogena aktivnost in stimulacija signalnih poti znotraj celice
 - Rast tumorja, metastaziranje

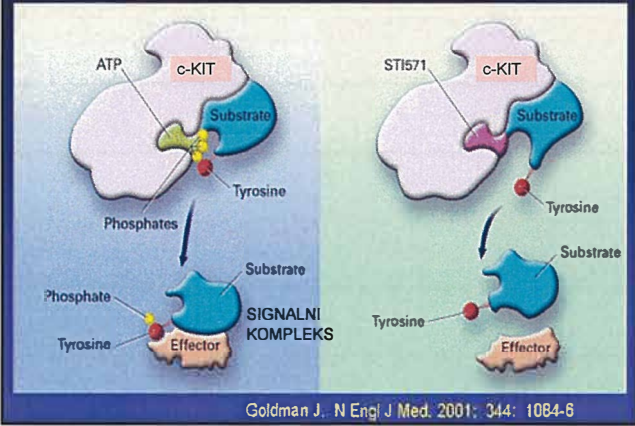
1. Cortless CL et al. *J Clin Oncol* 2004;22:3813-3825
2. Heinrich MC et al. *Science* 2003;299:708-710
3. Trent JC et al. *Curr Opin Oncol* 2006;18:388-395

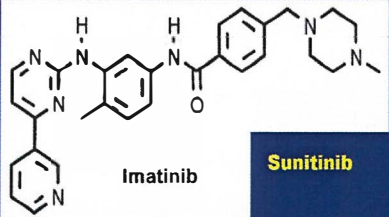
Strukturne variante TK tarč pri GIST-u






Mehanizem delovanja TKI



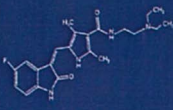
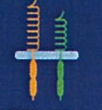


Imatinib

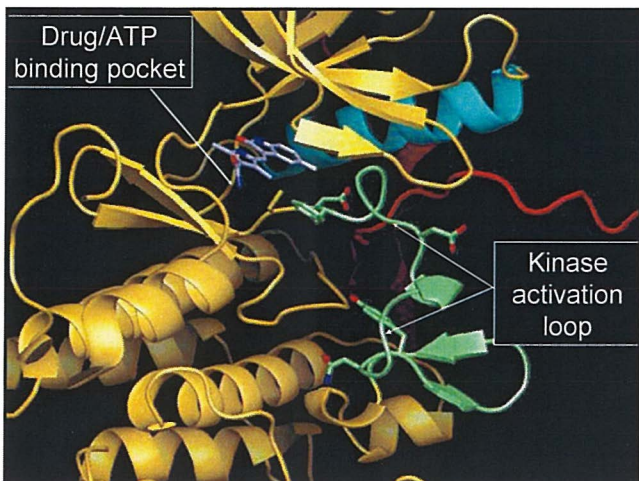


- sorafenib, nilotinib, dasatinib, vatalinib, masatinib, AMG706, PKC412, AZD2171,

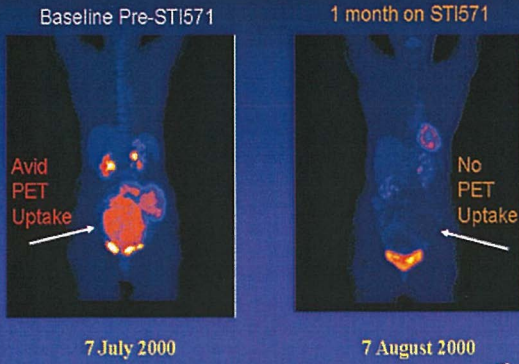
Sunitinib

VEGFR-1 KIT
VEGFR-2 PDGFR- β
VEGFR-3 FGFR-3
FLT-3
RET



Patient 1: R.A. - Recurrent GIST before / after STI571



Primarna in sekundarna rezistenca: Definicija

Primarna rezistenca ^{1,2}	Sekundarna (pridobljena) rezistenca ^{1,2}
<ul style="list-style-type: none"> ■ Ni odgovora na zdravljenje ■ Zgodnji progres – V 6 mesecih 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Odgovor na zdravljenje ■ Progres po 6 mesecih zdravljenja

1. von Mehren M et al. *Hematol Oncol Clin North Am* 2006;19:547-564.
 2. Blay JY et al. *Ann Oncol* 2005;16:566-576.

Možni mehanizmi rezistence na TKI

- Primarna rezistenca
 - mutacije na *KIT* exon 9 (odvisna od doze) in 17, *PDGFRA* exon 18; D842V⁶, WT
- Sekundarna rezistenca
 - Mutacije *KIT* ali *PDGFRA* kinaze¹⁻⁵. Najpogostejša oblika pridobljene rezistence (exoni 9, 11, 13, 14, 17)
 - Prekomerna ekspresija ali amplifikacija *KIT* or *PDGFRA* gena¹⁻³
 - Aktivacija intracelularnih signalnih poti neodvisnih od *KIT*¹⁻³

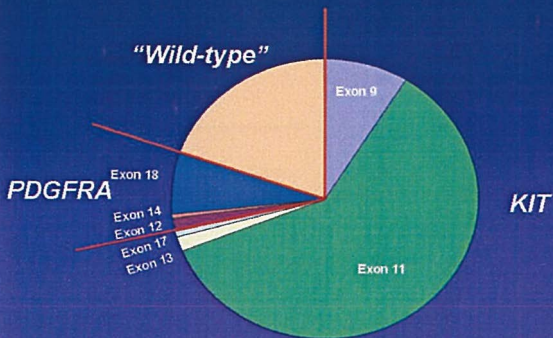
1. Chen LL et al. *Curr Oncol Rep* 2005;7:293-299
 2. Fletcher JA et al. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22:815-827
 3. Wardelmann E et al. *Clin Can Res* 2005;12:1743-1749
 4. Anonescu CR et al. *Clin Can Res* 2005;11:4182-4190
 5. Ditsch-Richter M et al. *Gastroenterology* 2005;129:2719-2723
 6. Heinrich MC et al. *J Clin Oncol* 2006;24:4764-4774.

Analiza mutacij: koncepti in strategije

- Pomen primarnih c-KIT in PDGFRA mutacij za:
 - napoved odgovora
 - napoved prognoze
- WT, c-KIT in PGFRA negativen GIST
 - IGF1R
- Pomen sekundarnih mutacij za sekundarno rezistenco na TKI

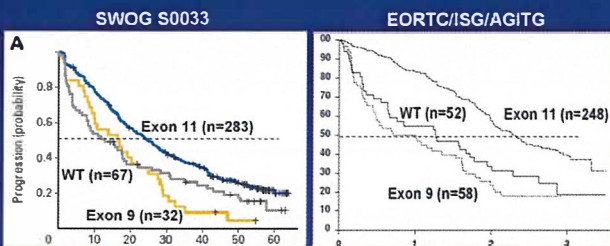
13

Mutacije kinaz pri GISTih



Heinrich et al. *J Clin Oncol* 21:4342-4349, 2003
 Agaram et al. *Genes, Chromosomes & Cancer* 47:853-859, 2008
 Agaimy et al. *J Clin Pathol* 2009;62:613-616, 2009

Phase III Trials Genotype vs Progression-Free Survival (All Doses)



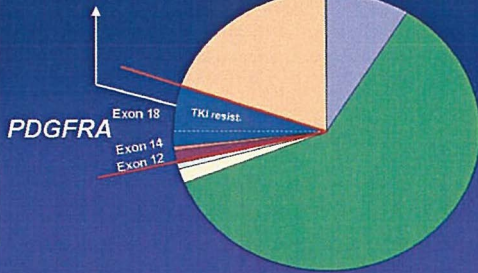
Heinrich et al. *J Clin Onc* 2008, 26(33):5360-7

Debiec-Rychter et al. *Eur J Cancer* 2006, 42(8):1093-103

PDGFRA mutacije pri GIST-u

PDGFRA D842V

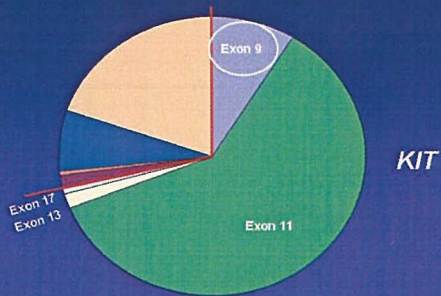
- 5% of GISTs
- Imatinib and sunitinib resistant



Heinrich et al. *J Clin Oncol* 21:4342-4349, 2003
 Dewaele B et al *Clin Cancer Res*. 2008 Sep 15; 14(18):5749-58

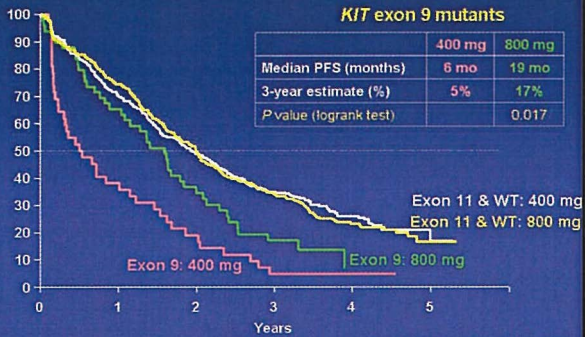
C-KIT mutacije pri GIST-u

Exon 9



Heinrich et al. *J Clin Oncol* 21:4342-4349, 2003

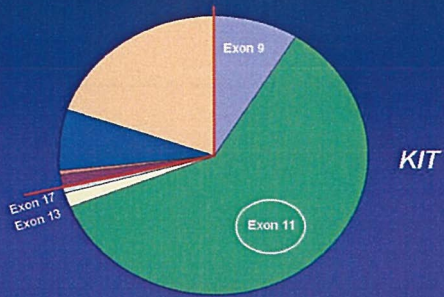
Meta-Analysis Progression-Free Survival vs. Dose



Van Glabbeke et al., *J Clin Onc*. 25:548S (abstract 10004), 2007

C-KIT mutacije pri GIST-u

Exon 11



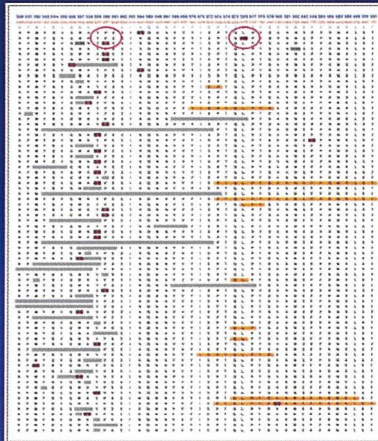
Heinrich et al. *J Clin Oncol* 21:4342-4349, 2003

KIT Exon 11 Mutations

Point mutations

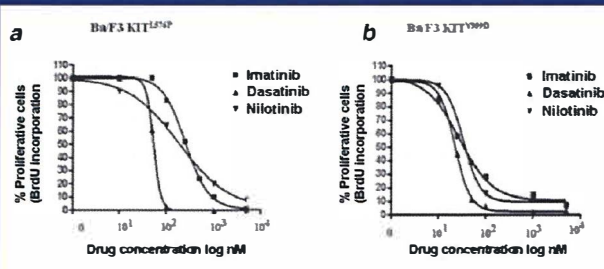
Deletions
Deletion/substitutions

Insertions
Insertion/substitutions



Martin et al. *JCO* 2005; 23:6190-8

In vitro Cell Line Data Suggests Reduced Sensitivity to Imatinib for KIT Exon 11 L576P Mutation



Antonescu et al. *Int. J. Cancer*: 121, 257-264 (2007)

GIST želodca: retrospektivna analiza

	# Cases	% Progressive Disease
<i>KIT</i> Exon 11 deletion	72	15.3%
<i>KIT</i> Exon 11 point mutation	36	0%

Metinen et al. Am J Surg Pathol 29:52-68, 2005

Povzetek: Pomen različnih genotipov TK

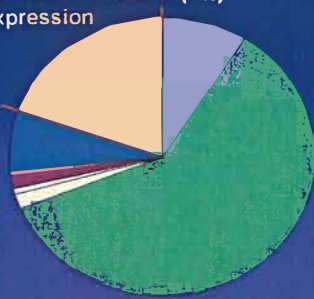
- Napoved odgovora na imatinib
 - *KIT* exon 11 napoveduje najboljši odgovor
 - Podatki na celičnih linijah in retrospektivna analiza kažejo na manjšo občutljivost L576P (delecija)
 - *KIT* exon 9 boljši odgovor in daljši čas do progressa z dozo imatiniba 800mg/dan
 - *PDGFR* D842L mutacija je rezistentna na imatinib in sunitinib

23

Wild-type GIST

“Wild-type”

- Rare *BRAF* and *RAS* mutations (1%)
- High *IGF1R* expression



Agaram et al. Genes, Chromosomes & Cancer 47:853-859, 2008
Agaimy et al. J Clin Pathol 2009;62:613-616, 2009

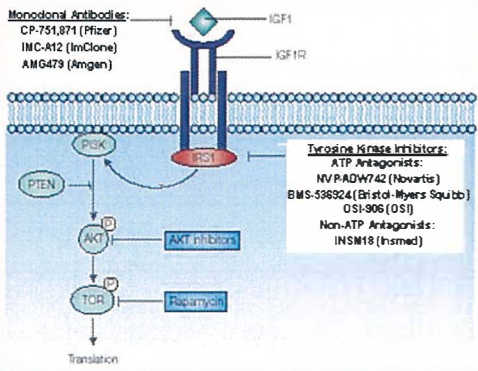
IGF1R pri WT GIST

- IGF1R ekspresija je povečana za faktor 10 pri otroških GIST-ih v primerjavi z odraslimi¹
- IGF1R je izražen in aktiviran pri večini WT GIST odraslih²
- V posameznih primerih amplifikacija IGF1R
- Ni IGF1R mutacij²
- In vitro raziskave kažejo, da je lahko IGF1R terapevtska tarča pri GIST-u²

1. Agaram et al., Clin Cancer Research 2008
2. Tam et al., PNAS 2009

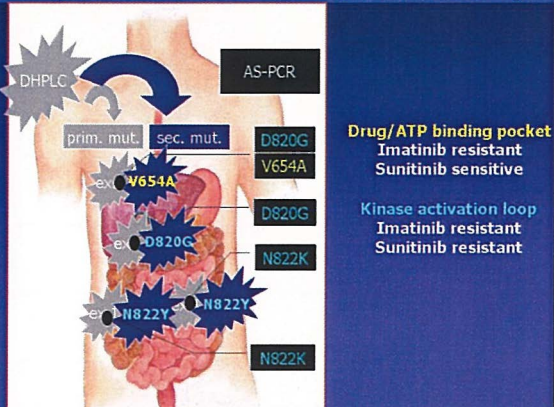
25

Strategije blokade IGF1R



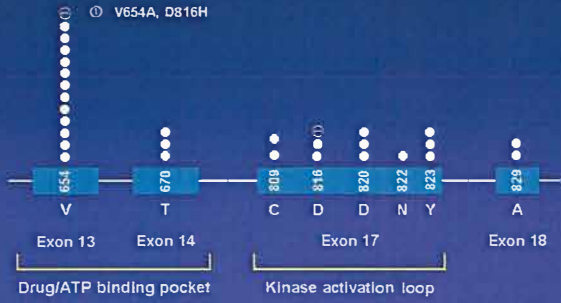
Adapted from Pollak, Schernhammer, & Hankinson - Nat Rev Cancer - 2004
Hofmann & Garcia-Echaverria - Drug Discovery Today - 2005

Heterogenost sekundarnih TKI mutacij



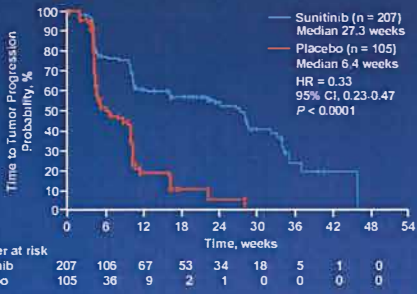
Liegl et al. J Pathol. 2008 Sep;216(1):64-74

Spectrum and Frequency of Secondary *KIT* Mutations in GIST (n = 29)



Heinrich et al. J Clin Oncol. 2006;24:4764-4774.

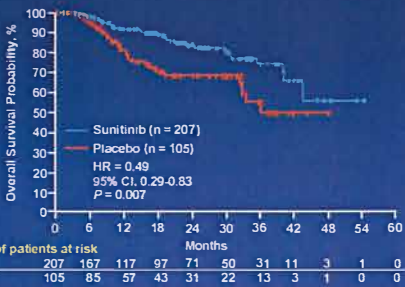
Second-Line Tyrosine Kinase Inhibitor Sunitinib Versus Placebo: TTP



Demetri GD et al. *Lancet*. 2006;368:1329-1338.

29

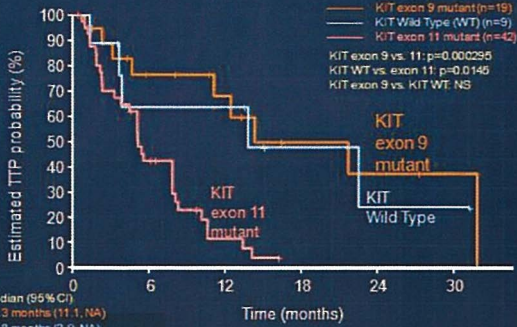
Second-Line Tyrosine Kinase Inhibitor Sunitinib Versus Placebo: Overall Survival



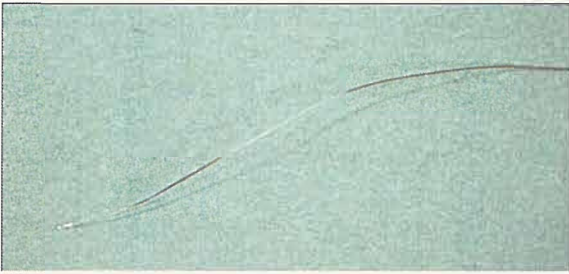
Demetri GD et al. *Lancet*. 2006;368:1329-1338.

30

Time to tumor progression on Sunitinib by Original Kinase Genotype

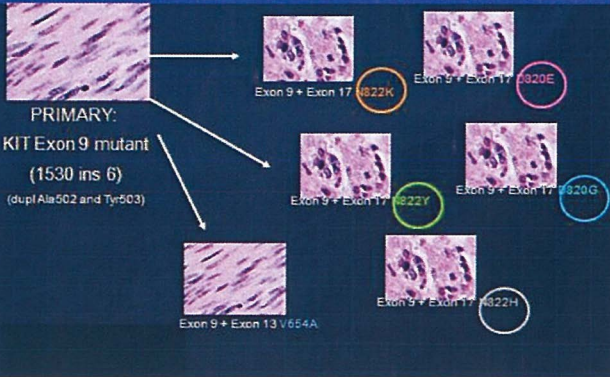


Sunitinib 4 on / 2 Off Schedule



Robert C et al., Lancet Oncol 2005;6:491

Heterogenost sekundarnih TKI rezistentnih mutacij pri bolniku s progresom na imatinib in nato na sunitinib



Povzetek: Problem rezistence

- Sekundarna mutacija c-KIT 11 exona je pogost vzrok rezistence na imatinib
- Mutacije ATP vezavnega mesta (ATP/drug binding domain) so senzitivne na TKI drugega reda, ki so na razpolago
- Vendar imajo taki tumorji lahko poleg te še mutacijo v aktivacijski zanki (activation loop domain)
- Zaradi heterogenosti rezistence bo potrebno uporabiti nove terapevtske strategije^{1,2,3}
 - Kombinacija TKI
 - Inhibitorji KIT/PDGFRA oncoproteinske ekspresije (hsp90)
 - Inhibitorji intracelularnih (downstream) poti

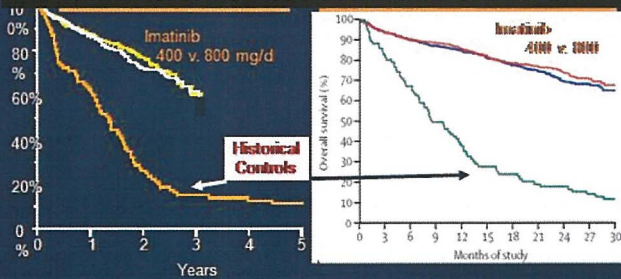
1. Blay JY et al. ASCO 2008

3. Wagner AJ J Clin Oncol 25, 2008 (May 20 suppl; abstr 10503)

2. Dumez H. Et al. ASCO 2008

34

PREŽIVETJE BOLNIKOV Z RAZSEJANIM GISTom NA ZDRAVLJENJU Z IMATINIBOM V PRIMERJAVI S HISTORIČNIMI SERIJAMI



Gastrointestinalni stromalni tumor (GIST) - patologija in imunohistokemija

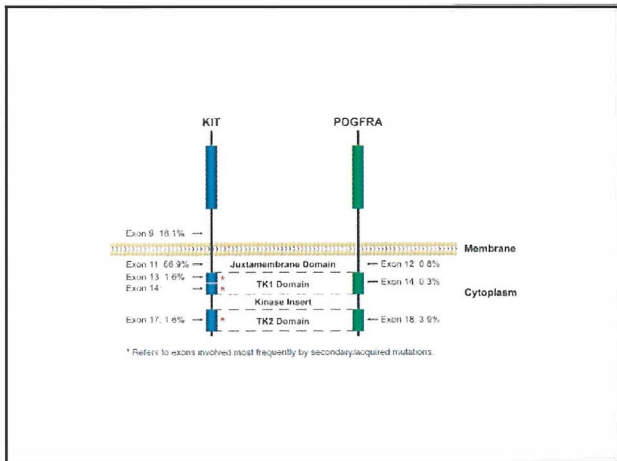
Matej Bračko,
Oddelek za patologijo
Onkološki inštitut Ljubljana

GIST

- Najpogostejši mezenhimski tumor GITa
- Incidenca: 10 – 20 / 1.000,000
- želodec 60-70%
tanko črevo 20-30%
redko v ezofagusu, kolonu ali rektumu
- redko na drugih mestih (omentum, mesenterij, peritonej, retroperitonej)

GIST: biologija

- Mutacija gena *KIT* (redkeje gena *PDGFRA*) je zgodnji, najverjetneje onkogenetski dogodek pri večini GISTov
- Mutacije povzročijo konformacijske spremembe KIT proteina, ki vodijo v konstitutivno, od liganda neodvisno aktivacijo tirozin-kinaze
- Fiziološke funkcije, povezane z aktivacijo KIT so preživetje celice, proliferacija, migracija, diferenciacija in apoptoza



GIST: obnašanje

- del GISTov (~30%) se obnaša agresivno
- ta delež je višji pri tumorjih tankega črevesa
- daleč najpogostejši lokalizaciji metastaz: peritonej in jetra
- kasni recidivi niso redki

GIST: napoved obnašanja

Verejtnost agresivnega poteka	Velikost (cm)	Število mitoz (na 50 PVP)
zelo majhna	≤ 2	≤ 5
majhna	> 2 ≤ 5	≤ 5
srednja	≤ 5	6-10
	> 5 ≤ 10	≤ 5
velika	> 5	> 5
	> 10 katerakoli	katerakoli > 10

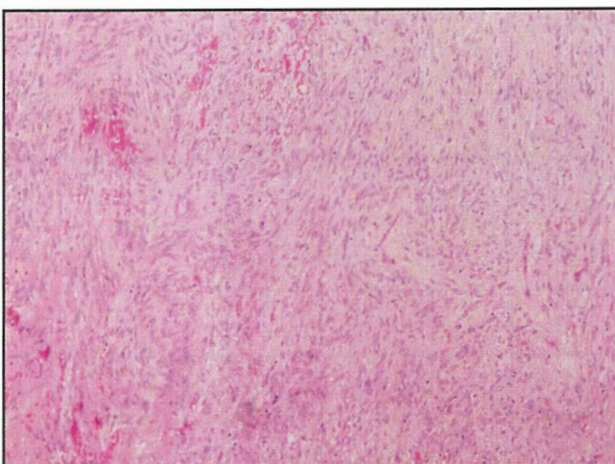
Fletcher et al. Hum Pathol 2002; 33:459-65

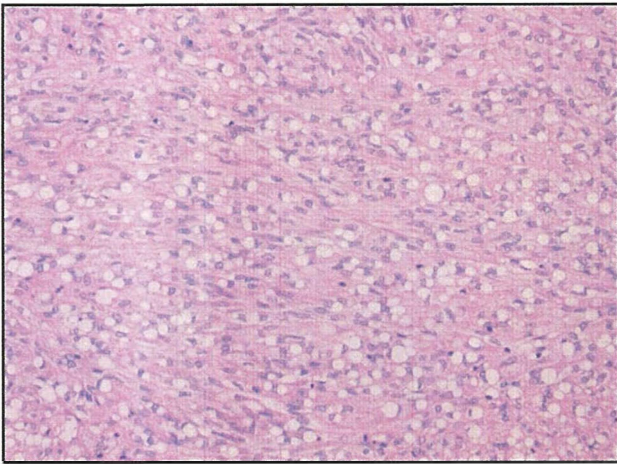
Risk stratification of primary GIST					
Tumor parameter		Risk of progressive disease ^a			
Mitotic index	Size	Gastric	Duodenum	Jejunum/ileum	Rectum
≤5/50 HPE	<2 cm	None	None	None	None
≤5/50 HPE	≥2<5 cm	Very low (1.9%)	Low (8.3%)	Low (4.3%)	Low (8.5%)
≤5/80 HPE	>5<10 cm	Low (3.6%)	– ^b	Moderate (24%)	– ^c
≤5/50 HPE	>10 cm	Moderate (10%)	High (3.4%)	High (52%)	High (57%)
≤5/50 HPE	<2 cm	None ^b	– ^b	High ^b	High (54%)
≤5/50 HPE	≥2<5 cm	Moderate (16%)	High (50%)	High (73%)	High (52%)
≤5/50 HPE	>5<10 cm	High (55%)	– ^b	High (85%)	– ^c
≤5/50 HPE	>10 cm	High (86%)	High (86%)	High (90%)	High (71%)

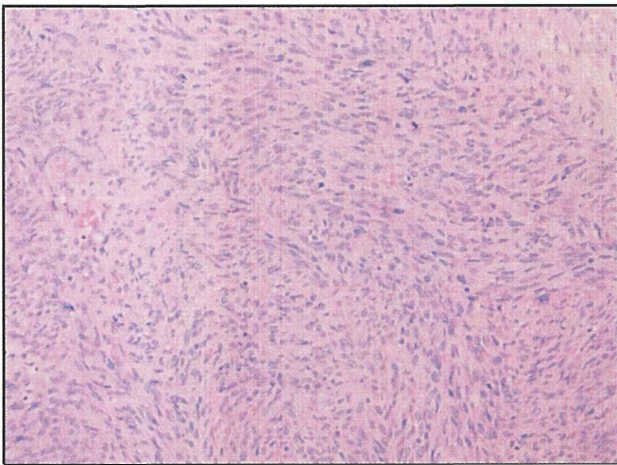
^a Defined as metastases or tumor-related death
^b Limited number of cases
^c Insufficient data

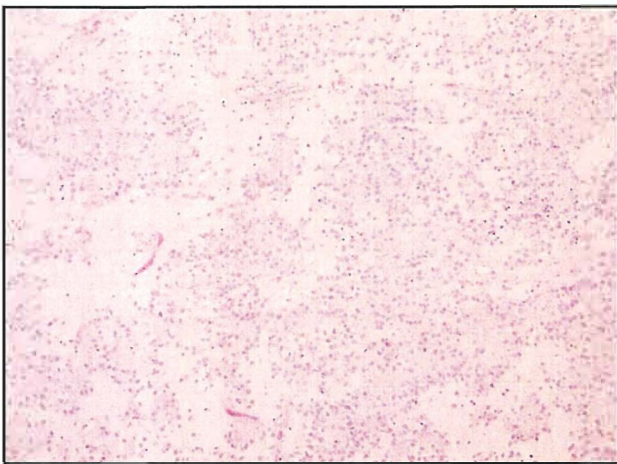
The table is based on Ahnstrom et al. *Semin Diagn Pathol*, 2006 [12]. Data based on long-term follow-up of 1,095 gastric, 629 small intestinal, 184 duodenal, and 111 rectal GISTs [3,5,6].

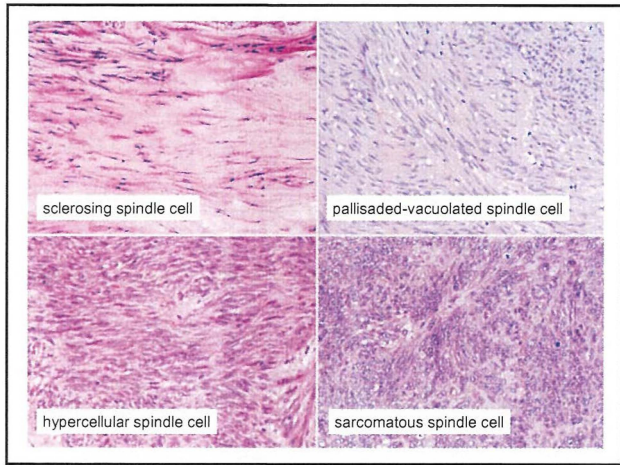
- ### GIST: patologija
- vretenastocelični tip 70%
 - epiteloidni tip 20%
 - mešani tip 10%

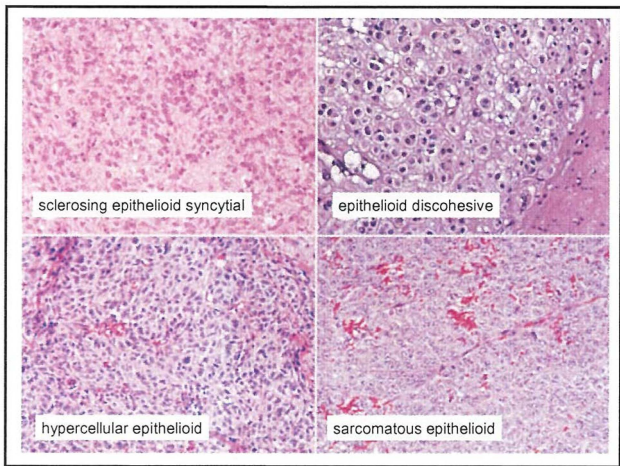


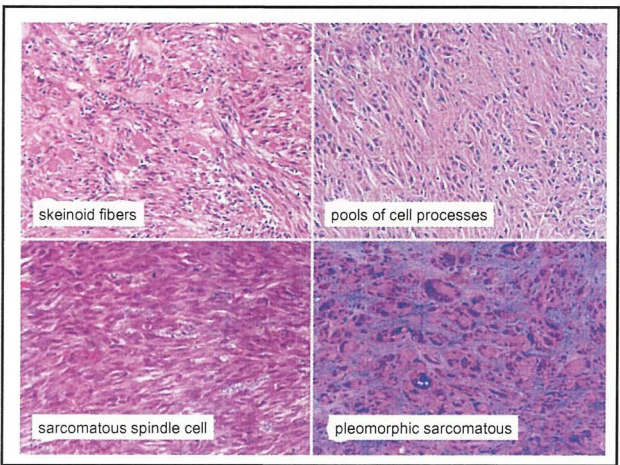






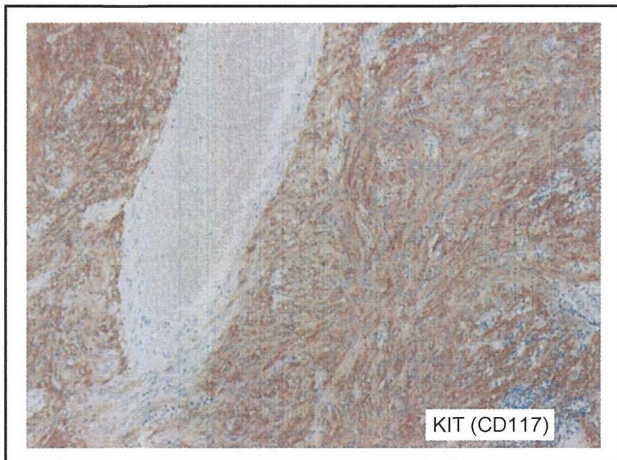


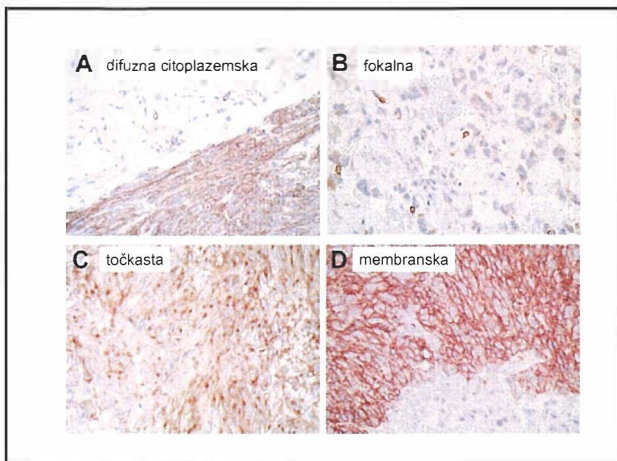




GIST: imunohistokemija

- KIT (CD117) 95%
- CD34 60-70%
- α SMA 30-40%
- S-100 protein 5% (običajno fokalno)
- Desmin 5% (običajno fokalno, največkrat v KIT-negativnih epitelioidnih GISTih želodca)
- Keratin 1-2% (šibko, fokalno)





GIST: imunohistokemija

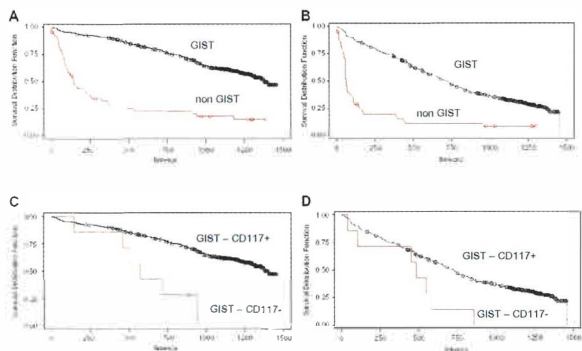
- obseg in vzorec IHK reakcije na KIT ne korelirata z vrsto mutacije in uspešnostjo zdravljenja s TKI
 - izjema: GISTi s šibko/fokalno ali negativno reakcijo na KIT so pogosteje *KIT* "wild type" ali pa imajo mutacijo *PDGFRA*

GIST: zdravljenje

- kirurgija
- radioterapija in kemoterapija neuspešni
- inhibitorji TK (imatinib, sunitinib) pri napredovali bolezni (inoperabilni tumorji, metastaze)

GIST: zdravljenje

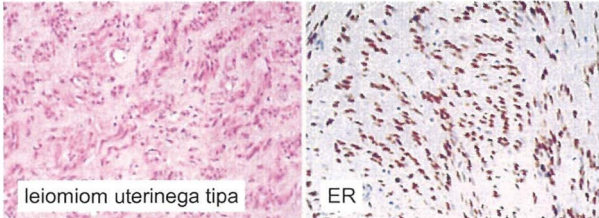
- Ali bo zdravljenje s TKI učinkovito?
- odvisno od vrste mutacije, odgovor lahko da le molekularnogenetska analiza



GIST: diferencialna diagnoza

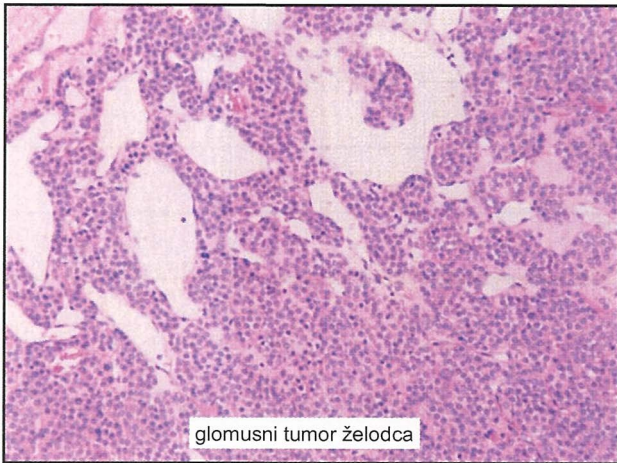
- “pravi” gladkomišični tumorji
 - leiomiom
 - muskularis mukoze (kolorektum)
 - intramuralni (ezofagus > kolon)
 - uterinega tipa (pri ženskah)
 - glomusni tumor (želodec)
 - leiomiosarkom (t. in d. črevo, izjemno redek v želodcu)

razmerje GIST : gladkomišični tumorji GIT-a > 20 : 1 !



leiomiom uterinega tipa

ER

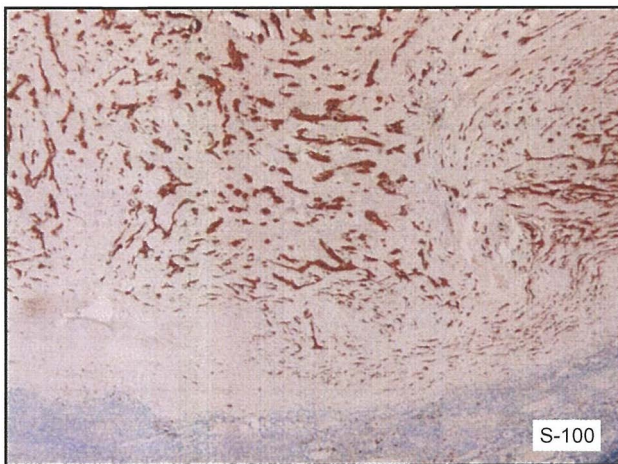




GIST: diferencialna diagnoza

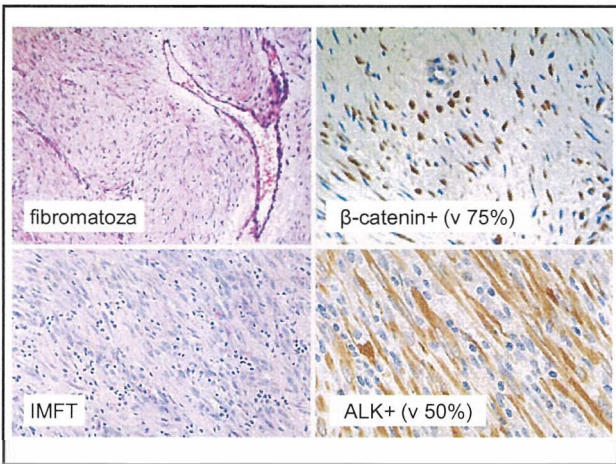
- tumorji živčnih ovojnic in melanocitov
 - GI schwannom
 - metastatski melanom
 - primarni GI svetlocelični sarkom

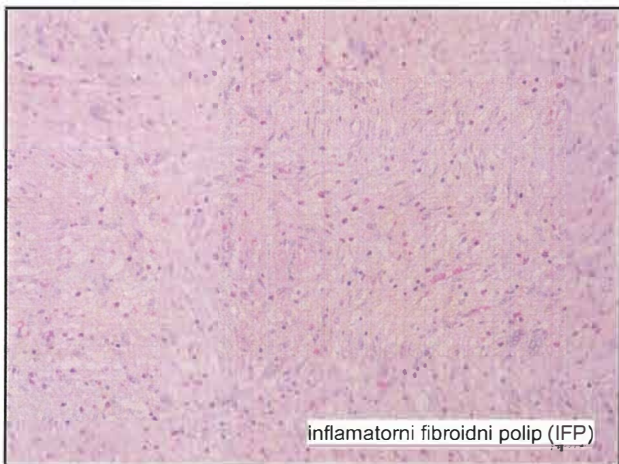




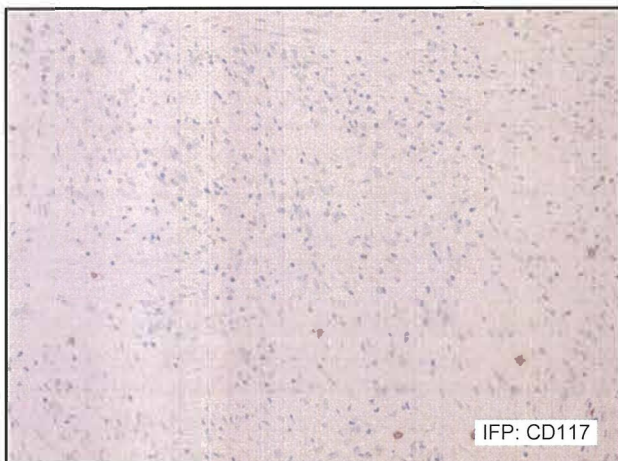
GIST: diferencialna diagnoza

- (mio)fibroblastni tumorji
 - intraabdominalna fibromatoza (dezmoid)
 - inflamatorni miofibroblastni tumor
 - inflamatorni fibroidni polip (Vanekov tumor)









KIT-pozitivni tumorji

- | | | |
|--|---|--|
| mastocitom/mastocitoza | } | z aktivacijo /
mutacijo <i>KIT</i> |
| seminom | | |
| pljučni mikrocelularni karcinom | | |
| granulocitni sarkom | | |
| melanom, svetlocelični sarkom (30-50%) | } | brez aktivacije /
mutacije <i>KIT</i> |
| ES/PNET (50%) | | |
| nevroblastom (30%) | | |
| angiosarkom (30%) | | |
| nekateri karcinomi | | |

pozitivna IHK reakcija na KIT ni absolutni pogoj za diagnozo GISTa

IHK KIT negativni GIST ni sinonim za GIST brez *KIT* mutacije ("wild type" GIST)

večina "wild type" GISTov je IHK pozitivnih na KIT

večina IHK KIT negativnih GISTov ima mutacijo *PDGFR*

med IHK KIT negativnimi GISTi je določen delež tumorjev z mutacijami *PDGFRA* ali *KIT*, ki so odzivni na zdravljenje s TKI

negativna reakcija na CD117 pri GISTu ne pomeni, da bo zdravljenje s TKI neučinkovito

pozitivna IHK reakcija na KIT ne pomeni, da gre za GIST

resnična ekspresija v nekaterih tipih tumorjev – v večini teh tumorjev ne gre za aktivacijo ali mutacijo *KIT*, zdravljenje s TKI ni uspešno
lažno pozitivna reakcija (pogosta pri nizkih dilucijah protitelesa in prekomernem razkrivanju antigena - HIER)

najpogostejša napaka, odkrita v konzultacijski praksi MSKCC*:

5% mezenhimskih tumorjev GIT na osnovi napačno interpretirane (lažno pozitivne) IHK reakcije na KIT prvotno napačno diagnosticiranih kot GIST (dejansko pa je šlo za fibromatozo, leiomiome, leiomiosarkome, neklasificirane sarkome...)

*Antonescu CR. Mod Pathol 2008; 21: S31-S36

Novejša protitelesa

- PDGFRA: rezultati na parafinskih rezinah niso reproducibilni
- PKC-theta: izrazito ozadje, omejena specifičnost
- Nestin: potrebna nadaljna evalvacija
- CA II: obetavno, 95% senzitivnost, pozitivnih 50% KIT-negativnih GISTov
- **DOG1**: preizkušen, senzitivnost in specifičnost vsaj takšna kot pri KITu

DOG1

- komercialno dosegljiv (Novocastra, klon K9)
- preizkušen na seriji 1168 GISTov in 672 drugih tumorjev*
- 95% senzitivnost, neodvisno od vrste mutacije
- ~ polovica KIT-negativnih GISTov je DOG1+
- polovica DOG1-negativnih GISTov je KIT+
- negativen pri drugih tumorjih, ki so praviloma ali pogosto KIT+ (melanom, seminom, Ewingov sarkom, granulocitni sarkom)
- pozitiven pri >10% leiomiomov uterinega tipa

**Miettinen et al. AJSP 2009; 33:1401-8)*

Sklep

- prediktivna vrednost imunohistokemije pri GISTih je minimalna
- imunohistokemija – v povezavi z morfologijo – pa je ključnega pomena za pravilno diagnosticiranje GISTov in njihovo razlikovanje od drugih tumorjev prebavil

**Miettinen et al. AJSP 2009; 33:1401-8)*

EGFR status in zdravljenje nedrobnoceličnega raka pljuč

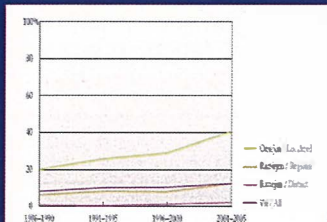
Prof.dr. Tanja Cufer, dr.med.
Kranjska Gora, 2010

Nedrobnocelični rak pljuč (NDRP) – Dejstva

- Rak pljuč je najpogostejši rak (okoli 1.200.000 v svetu in 1200 v RS / leto) in in najpogostejši vzrok smrti zaradi raka pri moških
- >80% nedrobnocelični rak
- 5-letna preživetja 10-12%, odvisno od stadija (večina bolnikov diagnosticiranih v napredovanih stadijih)
- Kemoterapija na bazi platine predstavlja standardno zdravljenje pri vseh bolnikih, razen v Stadiju I
- Kemoterapija podaljša preživetje pri napredovalem NDRP , in za okoli 6% izboljša 5-letno preživetje pri operabilnem NDRP
- Kemoterapija je dosegla svoj plato

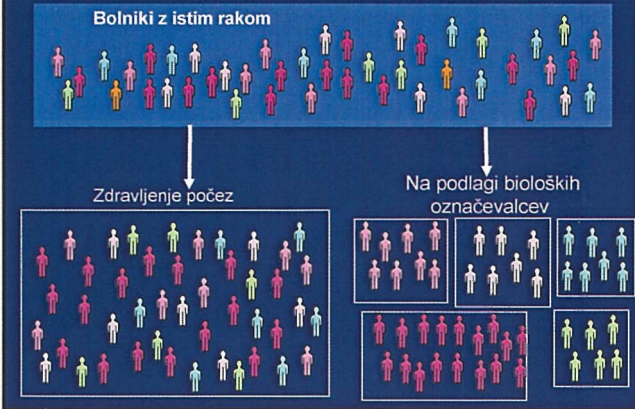
Bodočnost zdravljenja NDRP

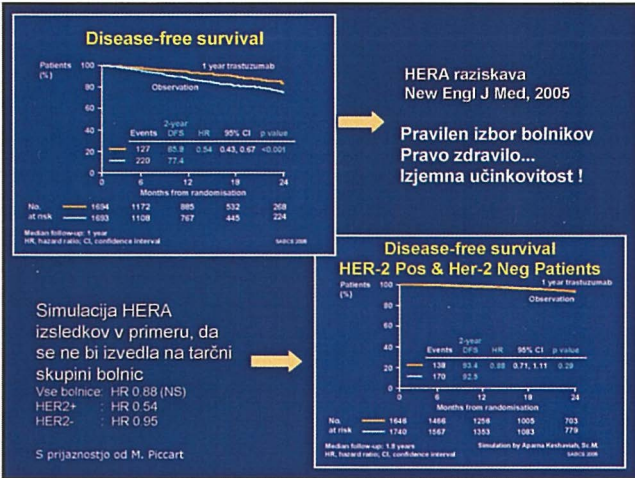
- Poznavanje biologije in molekularnih karakteristik
- Tarčno zdravljenje
- Personificirano zdravljenje



Slika 3. Podoben odstotek pacientov s pozitivno statusom za mutacije EGFR pri različnih časovnih obdobjih.
Vir: Register raka Slovenije

Personificirano zdravljenje raka

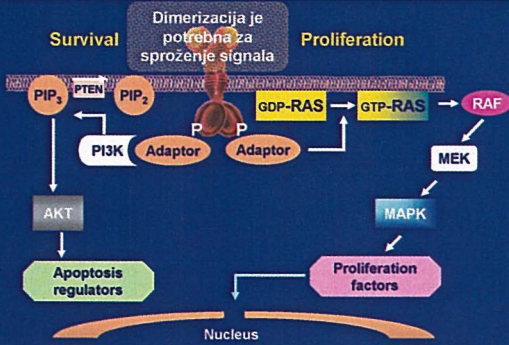




Preizkušena zdravila za tarčno zdravljenje NDRP

- Proti- EGFR zdravila
 - TKIs (gefitinib, erlotinib)
 - MAb (cetuximab)
- Anti-angiogena zdravila
 - Bevacizumab

EGFR signalna pot



EGFR in NDRP

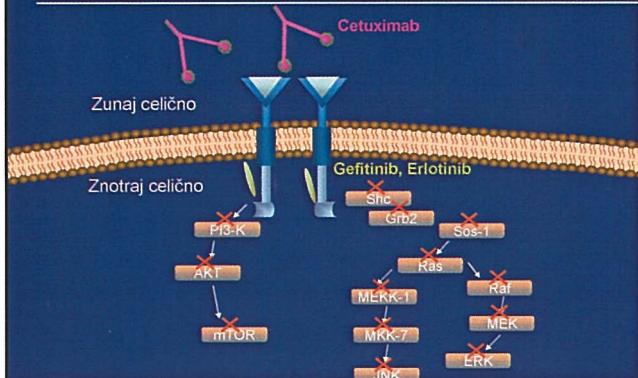
- EGFR je izražen pri več kot 80% bolnikov z NDRP NSCLC
- Izraženost EGFR pomeni slabo prognozo
- Prekomerna izraženost EGFR spremeni celico v odvisno od ligandov
- EGFR predstavlja tarčo za zdravljenje

Arteaga, Semin Oncol 2003

EGFR status

- EGFR izraženost proteina (IHC)
- EGFR pomnožitev gena (FISH, CISH)
- EGFR mutacije (PCR)

Mehanizem delovanja proti – EGFR usmerjenih zdravil: MAb, TKI



Cetuximab

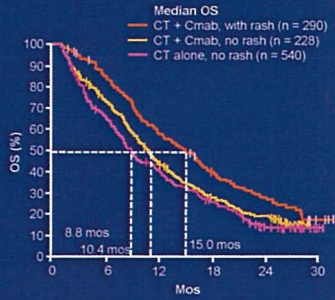
FLEX raziskava faze III Cetuximaba pri napredovalem EGFR pozitivnem NDRP

- Dodatek cetuximaba k standardni KT prvega reda (Cisplatin/vinorelbin), brez značilnega vpliva na PFS, značilno izboljša celokupno preživetje, ne glede na histologijo¹
 - Srednje OS: 11.3 vs 10.1 mes ($P = .04$)
 - 1-letno preživetje: 47% vs 42%
 - Brez značilne razlike v času do progressa
- FLEX biomarker raziskava ni pokazala nobenih razlik v učinkovitosti same KT z/brez cetuximaba glede na status *KRAS* mutacij in glede na *EGFR* amplifikacijo gena²
 - Brez značilnih razlik v PFS, RR, or OS

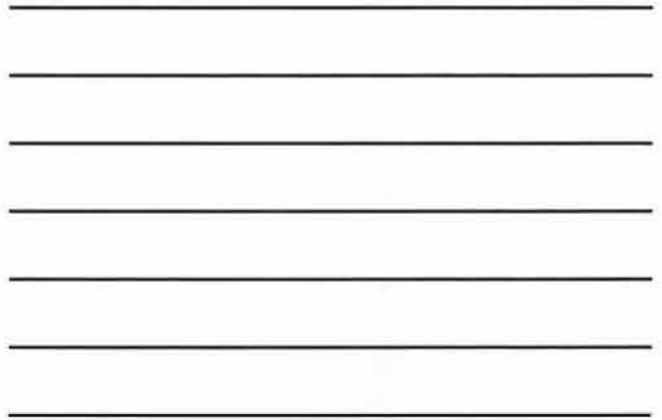
1. Pirker R, et al. Lancet. 2009;272:1525-1531. 2. Gatzemeier U, et al. J Thorac Oncol. 2009. Suppl 1 Abstract B2.3

FLEX biomarker analiza

- Izpuščaj po prvem ciklu je bil napovedni dejavnik boljšega preživetja
 - Katerakoli stopnja po CTC
 - HR: 0.631 (95% CI: 0.515-0.774; $P < .001$)



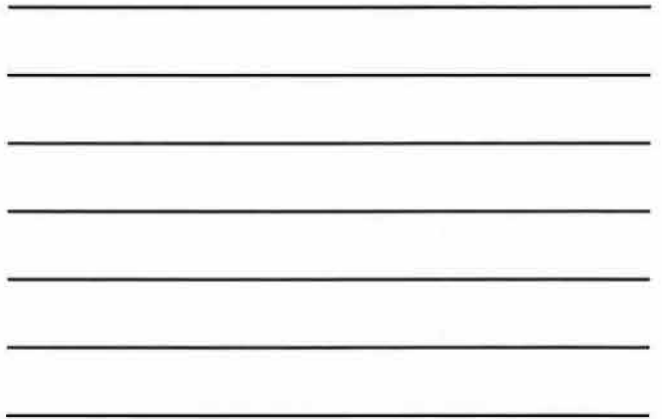
O'Byrne K, et al. ASCO 2009. Abstract 8007.



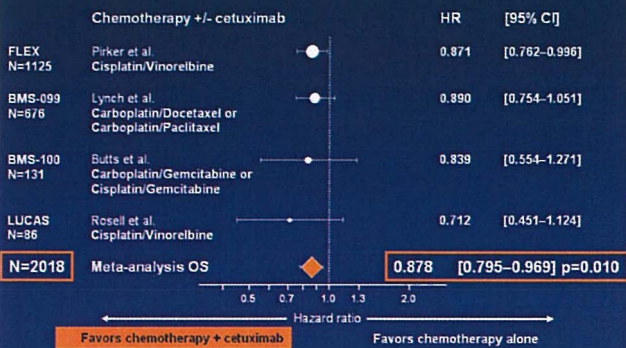
BMS099 raziskava faze III Cetuximaba pri napredovalem NDRP

- Dodatek cetuximaba k standardni KT prvega reda (Carbo/paclitaxel or doce) ni značilno vplival na preživetje¹⁾
 - Srednje OS: 9.69 vs 8.38 mes ($P = .169$)
 - Srednji PFS: 4.40 vs. 4.24 mos with Cht alone ($P = .236$)
- BMS 009 biomarker raziskava ni pokazala interakcij med preučevanimi molekularnimi označevalci in preživetjem niti odgovorom na zdravljenje²⁾
 - Biomarkers analyzed: KRAS mutacije, EGFR mutacije, EGFR izraženost proteina, EGFR pomnožitev gena

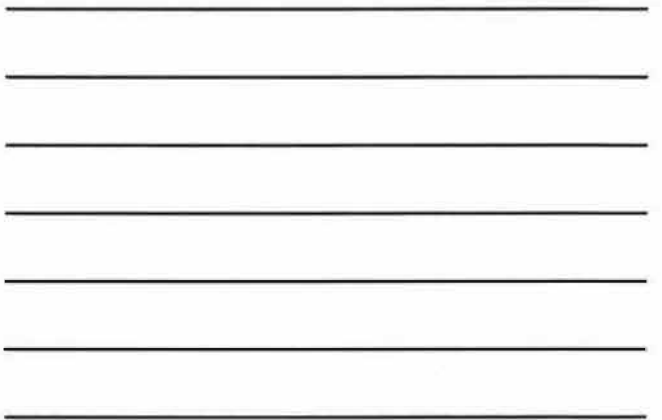
1 Lynch T.J, et al. JCO 2010;28:911-917. 2. Khambata-Ford S, et al. JCO 2010, 28:918-927.



Meta-analiza celokupnega preživetja



Fujii et al. EJC 2009, Suppl 7(2). Abstract 9009



Cetuximab

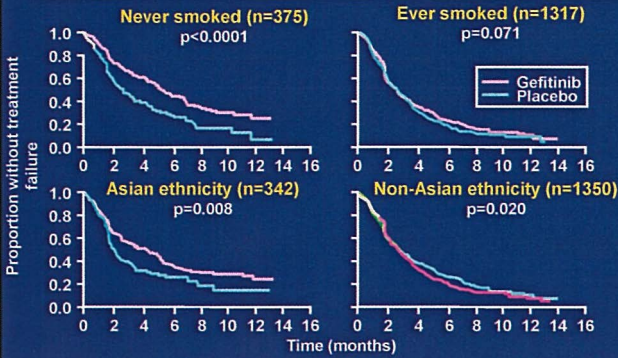
- Ena pozitivna in 1 negativna prospektivna randomizirana raziskava
- Še vedno ni molekularnega označevalca, ki bi omogočil izbor bolnikov in napovedoval odgovor na cetuximab
- Kožni izpuščaj naj bi napovedoval odgovor
- Potrebne so dodatne raziskave, zlasti translacijske

Gefitinib, Erlotinib

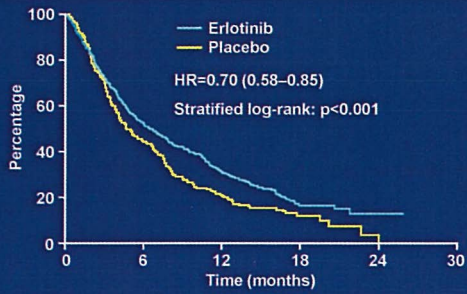
Gefitinib – faza II, III raziskave pri predhodno obsežno zdravljenih neselecioniranih bolnikih z NDRP

- **IDEAL1 and IDEAL2 faza II**, gefitinib 250 mg/dan je bil varen, odgovor na zdravljenje of 12-18% in zmanjšanje simptomov >40% simptomatskih bolnikov^{4,5}
 - Pospešena registracija FDA 2003
- **ISEL faza III**, gefitinib vs. placebo pri predhodno obsežno zdravljenih bolnikih, značilno višji delež odgovorov in čas trajanja odgovora, brez značilne razlike v celokupnem preživetju
 - Omejitev uporabe FDA 2005

ISEL : Čas trajanja odgovora glede na kadilski status in etnično pripadnost



BR.21 faza III raziskava: Erlotinib proti podporno zdravljenje pri predhodno zdravljenih bolnikih z napredovalim NDRP: celokupno preživetje



At risk	0	6	12	18	24	30
Erlotinib	488	255	145	23	4	0
Placebo	243	107	50	9	0	0

Shepherd F, et al. N Engl J Med 2005

Gefitinib vs. docetaxel v drugi liniji zdravljenja: metaanaliza

Four open-label, randomized trials:

- SIGN (Cufer et al 2006)
- INTEREST (Kim et al 2008)
- V-15-32 (Maruyama et al 2008),
- ISTANA (Lee et al 2008)

F. Shepherd, ASCO 2009

Gefitinib vs carbo/pacli v prvi liniji zdravljenja pri klinično selekcioniranih bolnikih z napredovalim NDRP v Aziji: IPASS faza III raziskava

Patients

- Chemonaive
- Age ≥18 years
- Adenocarcinoma histology
- Never or light ex-smokers*
- Life expectancy ≥12 weeks
- PS 0-2
- Measurable stage IIIB /IV disease

Gefitinib
(250 mg / day)

1:1 randomisation

Carboplatin
(AUC 5 or 6) /
paclitaxel
(200 mg / m²)
3 weekly[#]

Endpoints

Primary

- Progression-free survival (non-inferiority)

Secondary

- Objective response rate
- Overall survival
- Quality of life
- Disease-related symptoms
- Safety and tolerability

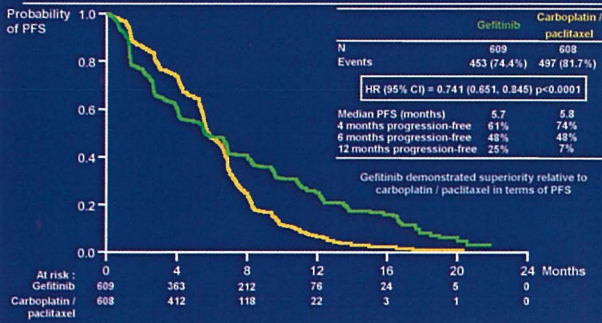
Exploratory

- Biomarkers
 - EGFR mutation
 - EGFR gene-copy number
 - EGFR protein expression

Carboplatin / paclitaxel was offered to gefitinib patients upon progression

Mok et al, Chicago 2008

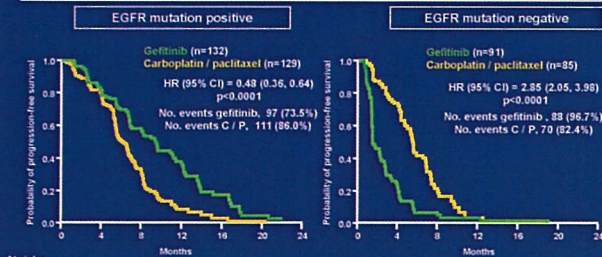
IPASS: Čas do napredovanja bolezni pri vseh bolnikih



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

Mok et al, Chicago 2008

IPASS: Čas do napredovanja bolezni glede na EGFR mutacije

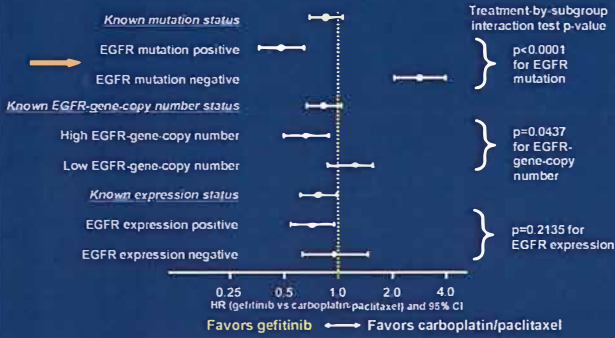


Treatment by subgroup interaction test, p<0.0001

ITT population
Cox analysis with covariates

Mok et al, NEJM 2009

IPASS: PFS biomarkerji



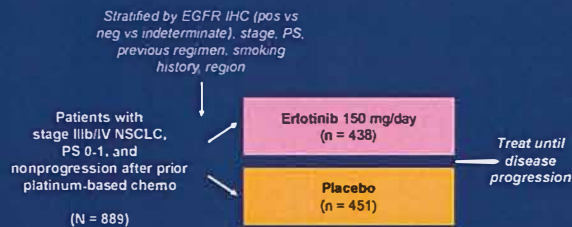
Fukuoka A1 et al., ASCO 2009

Potrditvene faza III raziskave k IPASS

- First-SIGNAL (gefitinib vs. GP) ¹
 - Azijska populacija, nekadilci
 - Značilno višji RR in daljši PFS z gefitinibom; brez značilne razlike v OS
- NEJ002 raziskava (gefitinib vs. CP) ²
 - Azijska populacija, EGFR mu+
 - Značilno višji RR in daljši PFS z gefitinibom; trend k boljšemu OS z gefitinibo (kljub 89% cross-over v roki z KT)
- WJTOG 3405 (gefitinib vs. Cis/Doce) ³
 - Azijska populacija, EGFR mu+
 - Značilno višji RR in daljši PFS z gefitinibom; OS še ni podatkov

1 Lee JS et al., J Thorac Oncol 2009, Abs PRS 4; 2 Inoue A et al., EJC 2009, Abs. 9LBA; 3 Mitsudomi T et al., Lancet Oncol 2009

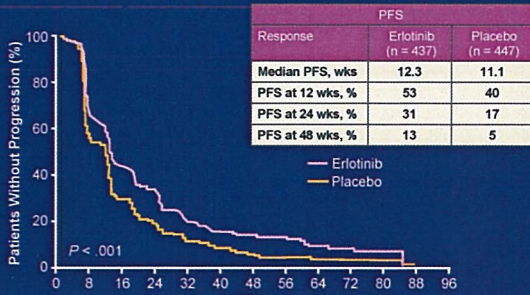
SATURN faza 3 raziskava: Erlotinib proti placebo v vzdrževalnem zdravljenju napredovalga NDRP



- Primary endpoint: PFS (all patients and in patients with EGFR IHC-positive tumors)
- Secondary endpoints: OS (all patients and in patients with EGFR IHC-positive tumors), safety, TTP, biomarker analyses, QoL

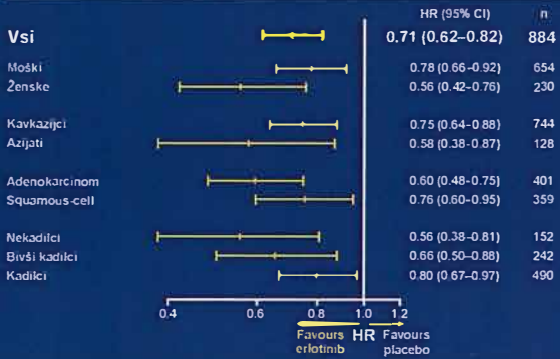
Cappuzzo F, et al., ASCO 2009

SATURN faza 3 raziskava: Čas do napredovanja bolezni

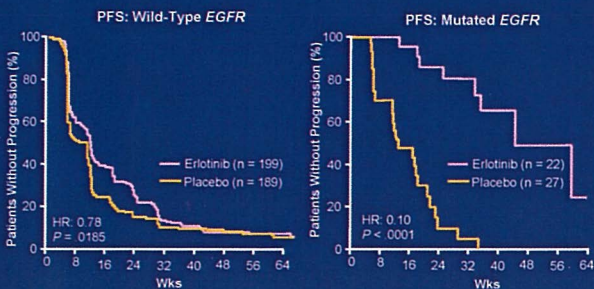


Cappuzzo F, et al. ASCO 2009

SATURN: PFS glede na klinične lastnosti

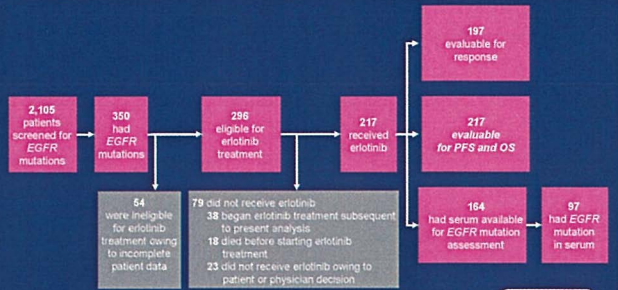


SATURN: Značilna dobitna zdrževalnega erlotiniba pri bolnikih z EGFR mutacijami



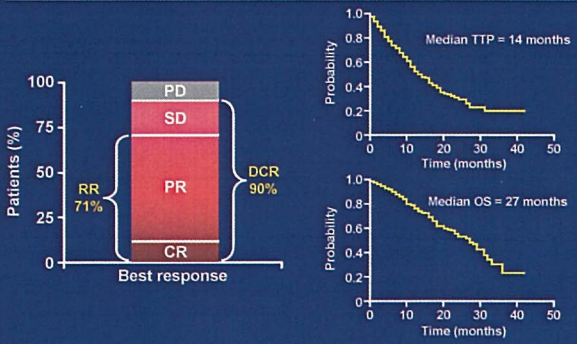
Cappuzzo F, et al. ASCO 2009. Abstract 8001. Brugger W, et al. ASCO 2009. Abstract 8020.

Skrining in EGFR mutacijam prilagojeno zdravljenje napredovalega NDRP (Spanish Lung Cancer Group)

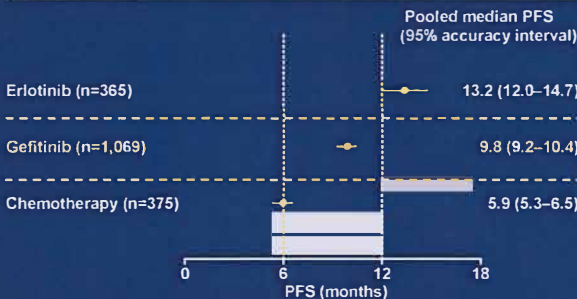


PFS = progression-free survival; OS = overall survival Rosell R, et al. N Eng J Med 2009;361:958-67

Erlotinib pri bolnikih z aktivirajočimi EGFR mutacijami



Skupna analiza bolnikov z EGFR mutacijami zdravljenih v rutinski klinični praksi z TKI ali kemoterapijo



*Any line of therapy; PFS = progression-free survival Paz-Ares, et al. JTO 2009;4 (Suppl. 1):S352 (Abs. B9.7)

ISEL : Delež bolnikov z EGFR mutacijami glede na klinične lastnosti



EGFR-TKI v kombinaciji z kemoterapijo pri NDRP

- Gefitinib ali erlotinib v kombinaciji z platino vsebujočimi shemami KT
 - gemcitabine / cisplatin (INTACT 1¹, TALENT²)
 - carboplatin / paclitaxel (INTACT 2³, TRIBUTE⁴)
- Brez značilnih razlik v preživetju v vseh faza III raziskavah, tako z gefitinibom (INTACT 1 and 2) kot erlotinibom (TALENT and TRIBUTE)

¹Giaccone et al 2004; ²Gatzemeier et al 2004; ³Herbst et al 2004; ⁴Herbst et al 2004

Resistanca na anti-EGFR zdravljenje

Znani vzroki

- KRAS mutacije (bolniki z KRAS mutacijami zelo redko odgovorijo na anti-EGFR zdravljenje)
- EGFR mutacije, ki napovedujejo rezistenco (T 790, exon 20)
- Amplifikacija MET

Mehanizmi premagovanja rezistence

- Intermitentno zdravljenje z EGFR inhibitorji
- Dvojna blokada PI3K in MAPK signalne poti
- Dvojna blokada EGFR in IGF-1R poti
- MET inhibicija

Gefitinib, Erlotinib

- Zdravljenje z anti-EGFR TKI, gefitinibom ali erlotinibom predstavlja učinkovito in varno zdravljenje prvega, drugega ali tretjega reda pri bolnikih z napredovalim NDRP
- Izbor bolnikov, ki imajo največjo dobrobit od zdravljenja z gefitinibom ali erlotinibom je delno možna na podlagi klasičnih klinično-patoloških podatkov (adenokarcinom, ženski spol, nekadilec) predvsem pa na podlagi določanja aktivirajočih mutacij.
- Vloga EGFR amplifikacije gena, KRAS mutacij in MET amplifikacije gena za izbor bolnikov se nakazuje a so potrebne še dodatne raziskave
- Raziskave učinkovitosti in varnosti anti-EGFR TKI v dopolnilnem zdravljenju raka pljuč so v teku
- Raziskave kombiniranega tarčnega zdravljenja z anti-EGFR TKI in drugimi tarčnimi zdravili so v teku

Neželeni učinki anti-EGFR zdravil

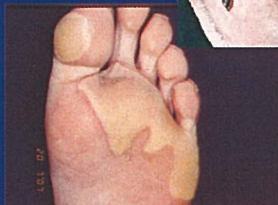
Cetuximab

- Preobčutljivostne reakcije
- Kožne spremembe

Gefitinib, erlotinib

- Kožne spremembe
- Driska
- Mukozitis
- Utrujenost
- Kardiotoksičnost

Kožni neželeni učinki TKI



Nega kože !

- Hladilno mazilo
- Mazilo z ureo
- Mazilo z ureo +vit.K
- Mazilo z GKK
- Lokalna aplikacija antibiotika

NDRP: Počasen a jasen napredek

Odbobje	Preživetja		
	Srednje preživetje, mes	1-letno, %	2-letno, %
1980	4-6	10	--
2000	8	30-35	10-15
2005	12	50	20
2010	Personificirano zdravljenje, bolniku in biologiji tumorja prilagojeno tarčno zdravljenje		

Prihodnost zdravljenja raka pljuč

Empirična onkologija

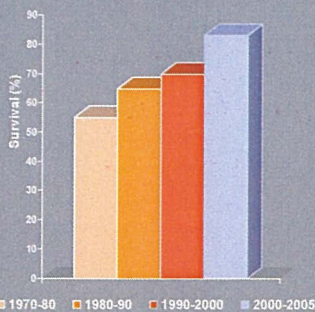
Vsem enako zdravljenje
Empiričen raziskave

Molekularna onkologija

Personificirano zdravljenje
Translacijske raziskave



5-letna preživetja raka dojk v Sloveniji

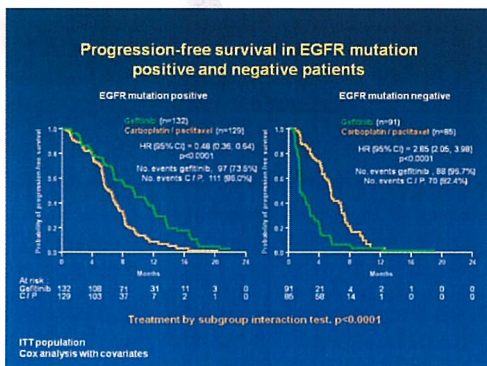


Hvala za pozornost!

DOLOČANJE EGFR STATUSA

Izidor Kern
Bolnišnica Golnik

zakaj določiti EGFR status



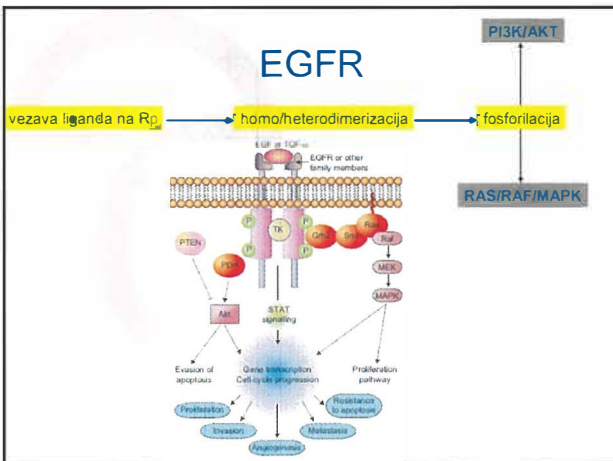
EGFR

= receptor za epidermalni rastni faktor (tudi $TNF\alpha$)

- transmembranski glikoprotein družina ErbB TK receptorjev
 - ekstracelularno receptorski del
 - intracelularno encimski del (tirozinska kinaza)
- dva načina inaktivacije
 - s protitelesi (cetuximab, panitumumab,...)
 - z malimi molekulami (TKI: gefitinib, erlotinib, lapatinib)
- prekomerna ekspresija v malignih tumorjih (80% NSCLC)
 - prediktivni faktor – aktivirajoče mutacije in amplifikacija gena napovedujejo dober odgovor na TKI
 - prognostični faktor – ekspresija pomeni slabšo prognozo, aktivirajoče mutacije pomenijo boljšo prognozo, amplifikacija gena pomeni slabšo prognozo

EGFR

- funkcija (intracelularna signalna kaskada)
 - celična proliferacija tumorska rast
 - diferenciacija celice
 - migracija metastaziranje
 - adhezija
 - zaščita pred apoptozo, podaljšano preživetje celice
 - pospešena genska transkripcija
- somatska mutacija v EGFR genu (kinazna domena) eksoni 18-21
 - posledica je stalna EGFR aktivacija
 - povezane s tumorjem in ne z zdravo celico
 - sekundarne mutacije (T790M) – rezistenca za TH



histogeneza pljučnega raka adenokarcinom

- periferni pljučni kompartment (Clara tip PII)
 - dve signalni poti, med seboj izključujoči na osnovi kadilskega statusa, ki se aktivirata z mutacijo



nekadilci
G1 adenokarcinom (BAC), papilarni
th - TKI

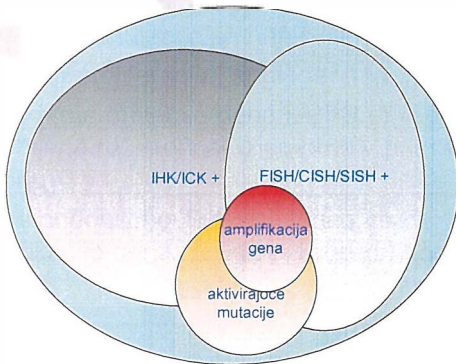
kadilci
mucinozni adenokarcinom
th - MEKI

- intermediarni pljučni kompartment
- centralni pljučni kompartment

EGFR

- vzhodnjaki, ♀, nekadilci, A
- zahodnjaki <18%
- aktivirajoče mutacije so najboljši prediktor TKI
- tumorska proliferacija, angiogeneza, zasevki
- sekundarne mutacije gena EGFR (T790M) → pridobljena rezistenca, izjemoma v primarnem tumorju
- 20% s pridobljeno TKI rezistenco ima amplifikacijo gena cMET – vzporedna pot

EGFR status



EGFR status v randomiziranih študijah

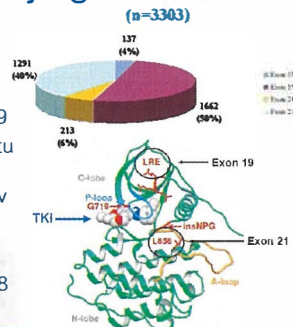
Genes	High expression, gene copy number, or presence of amplification		Low expression, gene copy number, or absence of amplification		HR	95% CI
	n	%	n	%		
EGFR protein as predictor						
HR 2.71**	Trastuzumab vs placebo	868 (0.85-0.95)	0.02	843 (0.82-1.08)	0.76	0.21
HR 0.925**	Carboplatin/paclitaxel vs carboplatin/paclitaxel	182	0.01	185	0.21	HR
HR 1.1**	Capecitabine vs placebo	677 (0.55-1.00)	0.18	672 (0.84-1.07)	0.84	0.02
EGFR copy number						
HR 1.1**	Trastuzumab vs placebo	648 (0.23-0.76)	0.04	639 (0.45-1.28)	0.75	0.42
HR 0.925**	Capecitabine vs placebo	143 (0.9)	0.08	144 (0.9)	0.57	HR
HR 1.01**	Trastuzumab vs placebo	641 (0.36-1.04)	0.01	639 (0.39-1.04)	0.42	0.03
HR 0.925**	Trastuzumab vs placebo	149 (0.28-1.51)	0.42	148	NR	0.52
HR 0.925**	Trastuzumab vs placebo	11 (0.15-1.65-2.6)	NR	0 (0.05-0.14)	NR	HR
HR 0.925**	Trastuzumab vs placebo	288 (0.11-6.8)	NR	0 (0.04-0.16-5.37)	NR	HR
HR 0.925**	Trastuzumab vs placebo	8 (0.075-0.12-0.79)	NR	0 (0.03-0.11-0.15)	NR	HR
HR 0.925**	Trastuzumab vs placebo	641 (0.5-0.7-1.12)	NR	152 (0.5-0.9-1.0)	NR	HR
EGFR mutation						
HR 1.1**	Trastuzumab vs placebo	833 (0.25-1.38)	0.11	828 (0.23-1.05)	0.89	0.42
HR 0.925**	Carboplatin/paclitaxel vs carboplatin/paclitaxel	182 (0.07)	0.08	181 (0.07)	0.61	HR
HR 0.925**	Trastuzumab vs placebo	848 (0.89-0.94)	<0.0001	247 (0.85-1.0)	<0.0001	<0.0001

določanje EGFR statusa

- PCR, sekveniranje — določitev mutacij gena za EGFR (v DNA)
- RT-PCR — določitev RNA za EGFR
- ISH — prikaz količine DNA — števila kopij gena za EGFR, prednost je sočasna ocena morfologije
 - FISH — fluorescenca dražja oprema, izurjenost za oceno, takojšen pregled
 - CISH — kromogena (srebrjenje, alkalna fosfataza) običajen mikroskop, enostavna ocena - protokol, trajen preparat
- imunocito/histokemija — prikaz ekspresije proteina za EGFR
 - različna protitelesa razširjena pozitivna reakcija – ne ločimo med normalno in prekomerno ekspresijo

aktivirajoče mutacije gena EGFR

- ~ 90%, značilne za adenokarcinom (še posebej BAC)
- 1. kratke delecije v eksonu 19
- 2. točkovna mutacija na mestu 2573 v eksonu 21 (CTG→CGG) s posledico v kodonu 858 (Leu→Arg)
- druge
 1. G719 mutacija v eksonu 18
 2. L861 mutacija v eksonu 21



obstajajo številne mutacije gena EGFR, katerih klinični pomen ni znan nekatere samo enkrat opisane ("tehnične" mutacije) možnost genskega polimorfizma

metode določevanja EGFR mutacij

Technique	Sensitivity (% of mutant DNA)	Mutations identified
Low sensitive		
Direct sequencing	20	Known and new
TaqMan PCR	10	Known only
Loop-hybrid mobility shift assay	10	Known only
Medium sensitive		
Pyrosequencing	5	Known and new
PCR-SSCP	5	Known and new
dHPLC	5	Known and new
Cyclic PCR	5	Known only
PCR-RFLP and length analysis	5	Known only
MALDI-TOF MS-based genotyping	5	Known only
Scorpions ARMS - Thera screen	1	Known only
PNA-LNA PCR clamp	1	Known only
High sensitive		
Single-molecule sequencing	0.1	Known and new
Mutant-enriched sequencing	0.1	Known only
SMAP	0.1	Known only

detekcija EGFR mutacij

1. presejalne metode

- sekveniranje
- vse EGFR mutacije
- dobro opremljen molekularni laboratorij
- nižja občutljivost, vsaj 25% tumorja v testiranem vzorcu
- usposobljeno, izkušeno osebje
- traja dlje časa

2. usmerjene, tarčne metode

- PCR, ARMS
- poznane mutacije
- hitra, zanesljiva, relativno enostavna
- boljša občutljivost
- višja cena zaradi reagentov?, trenutni monopol

pogoji za določitev EGFR mutacij

- celični ali tkivni vzorci – brez ustreznega vzorca ni nič
- v formalinu fiksirano tkivo, vklopljeno v parafin
- za PCR je potrebna določena najmanjša količina DNA tumorskih celic
– USTREZNA KAKOVOST IN KOLIČINA DNA
- celični vzorci – količinsko omejeni, shranjevanje ostankov primarnega vzorca (citoblok, zmrznjeno)

interpretacija rezultatov testa

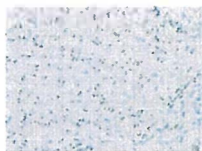
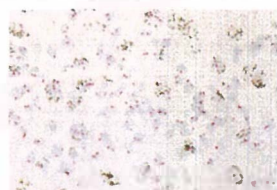
The diagram shows the EGFR gene structure with several mutation sites highlighted in yellow boxes: 'rezistenčne mutacije' (resistance mutations) and 'aktivirajoče mutacije' (activating mutations). Below the diagram are two pink boxes: 'LAŽNO NEGATIVNI' (false negative) with the note 'pre malo DNA občutljivost testa' (too little DNA, test sensitivity) and 'LAŽNO POZITIVNI' (false positive) with the note 'kontaminacija vpliv formalina preobčutljiv test?' (contamination, formalin effect, over-sensitive test?).

- POZITIVNO aktivirajoče mutacije (navedba)
- NEGATIVNO rezistenčne mutacije
- NEJASNO klinično nepomembne mutacije
- NEOPREDELJENO tehnični problem s testom (npr.: ni dovolj DNA)

prvih 100 primerov

	tip karcinoma		
	Adenokarcinom	Epidermoidni karcinom	NSCLC
mutacija +	15	1	0
mutacija -	35	31	18
skupaj	50	32	18

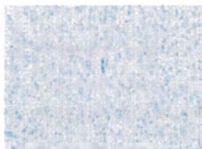
SISH



EGFR



DVOJNA ISH

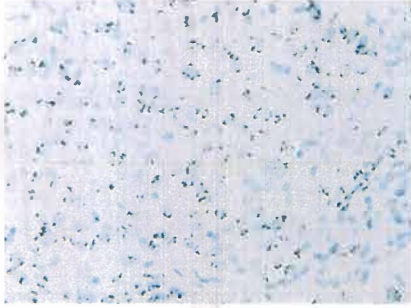


kromosom 7

amplifikacija gena za EGFR

- korelacija z aktivirajočimi mutacijami !?
(odvisna od študije, sistema ocenjevanja genske amplifikacije, tehnologije za odkrivanje mutacij, vzorčenja tumorja)
 1. med mutiranimi primeri ima 50% tudi povečano število kopij gena
 2. med primeri s povečanim številom kopij gena je 75% z mutacijo
- dodatna uporabna klinična informacija

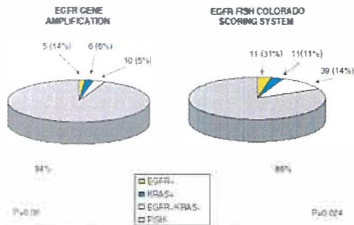
povečano število kopij gena EGFR



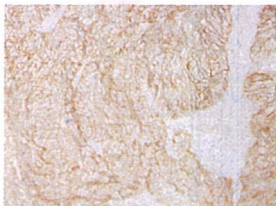
slabša prognoza

ocenjevanje

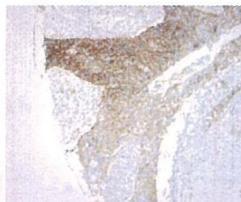
- amplifikacija gena
– glede na centromer kromosoma 7
EGFR/Chr7 ≥ 2
- polisomija gena (Colorado sistem)
– ≥ 4 kopije $\geq 40\%$ tumorskih celic
– ≥ 15 kopij $\geq 10\%$ tumorskih celic skupki



ICK/IHK



3C6



5B7

ekspresija gena EGFR

- ICK/IHK
- nima kliničnega pomena – ni korelacije z aktivirajočimi mutacijami in odgovorom na TKI
- številni kloni komercialnih protiteles
- iskanje IHK zanesljivega markerja EGFR statusa (razvoj kombiniranih metod: na enem stekelcu dokaz mutacije gena, amplifikacije gena in njegove ekspresija)



neustreznost vzorca za določitev EGFR mutacij

- hišni vzorci < 4%
- zunanji vzorci > 13%
- problemi
 - fiksacija
 - velikost vzorca
 - količina tumorja
 - viabilnost tumorja

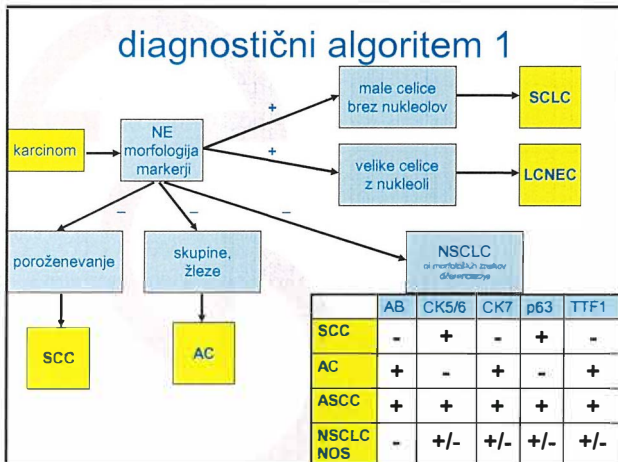
RESEKTAT 13%	IGELNA BIOPSIJA 8%
BB, TBB 8%	CITOLOGIJA 15%

odpornost na TKI

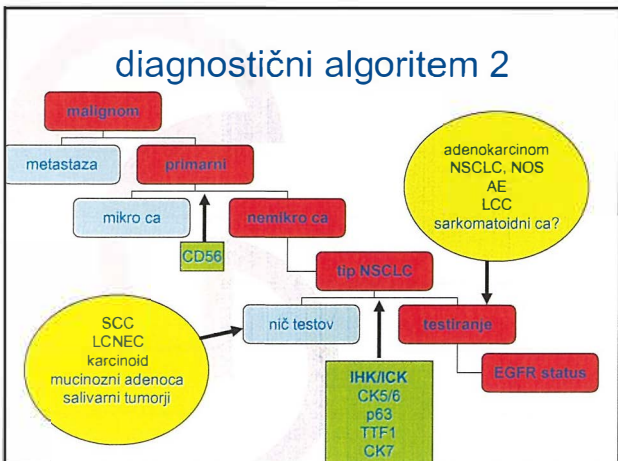
- antiEGFR zdravljenje s TKI podaljša prosti interval do progressa za do 10 mesecev
- sledi relaps bolezni
- določiti vzrok odpornosti v vzorcu tumorja

VZROK REZISTENCE	MOŽNOSTI
sekundarne EGFR mutacije (v 50% T790M)	ireverzibilni EGFR inhibitorji
aktivacija signalnih poti (v 20% cMET amplifikacija)	MET in EGFR inhibitorji
aktivacija signalnih poti (IGFR1 amplifikacija)	antiIGFR1

diagnostični algoritem 1



diagnostični algoritem 2



priporočila za določitev EGFR statusa

- trenutno ni smernic glede izbire vzorca, metode določevanja mutacij, kriterijev interpretacije
- IASLC/ETOP delovno srečanje Dunaj nov 2009

kdo indicira določitev EGFR statusa

- lečeči onkolog / pulmolog
- patolog
 - indikacija temelji na patološki dg!
 - zanesljivost dg NSCLC
 - natančnost tipizacije
- kdaj
 - ob postavitvi primarne dg pljučnega karcinoma
 - ob postavitvi indikacije za zdravljenje s TKI
 - razmisliti o rebiopsiji ob progresu, ponovitvi

koga testirati

- na začetku selekcioniran pristop
 - predvsem adenokarcinome,
 - izključen je mucinozni tip
 - neskvamozne karcinome
- kasneje verjetno vse nedrobnocelične primarne pljučne karcinome
- primarni ali sekundarni tumor ali recidiv ?
- heterogenost znotraj tumorja

kje in kako naj se izvaja test

KJE

- v povezavi patolog/klinik – TIMSKI PRISTOP
– tesno sodelovanje udeleženi v dg in th
- v isti ustanovi (diagnostika in zdravljenje)
- integriran model (HE in molekularna diagnostika na istem oddelku)

KAKO

- dve metodi za določitev mutacij (usmerjena in presejalna-potrditvena)
- FISH/SISH/CISH
- ocena občutljivosti in kliničnega pomena – vrednotenje testa

vzorčenje

vzorci

1. BB (2-3)
2. TBB (4-5)
3. igelne biopsije (2)
4. kirurški (MC, VATS, resekcija)
5. citološki (pleuralni izliv, FNAB)

najbolj dostopno mesto

histo>cito

metode bogatenja vzorca

1. laserska mikrodisekcija
2. mikro/makro disekcija

količina

>200-400 tumorskih celic, ↑ tumor/vzorec (>25-50%)

fiksacija

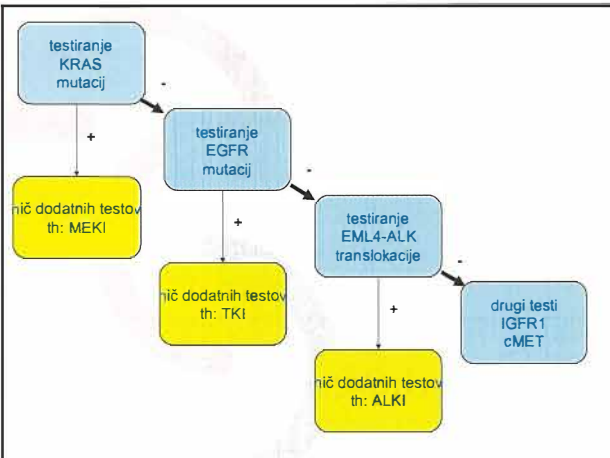
10% (4%) nevtralni pufirani formalin

vloga patologa

- izbor vzorca!!!! KAJ JE NA VOLJO?
 - cito (brisi, punkcije, izlivi), histo (biopsije, resekcije)
 - vzorec z najvišjim deležem tumorja (>50%), vsaj 200-400 tumorskih celic
- nadzor
 - fiksacija
 - standardizirani postopki
- sporočanje rezultatov – izvid (iz pato laboratorija)
 - del standardiziranega histo izvida
 - tip tumorja (WHO klasifikacija)
 - kakovost vzorca (velikost, ohranjenost, delež tumorja)
 - uporabljen test za določitev EGFR statusa
 - mutacije (prisotnost, vrsta mutacij, interpretacija – aktivirajoče, rezistenčne, neznane)
 - 5-7 dni
- ali testni vzorec ustrezno predstavlja bolnikov tumor
- tumorska banka

test mutacij gena EGFR

- izolacija DNA
 - količina DNA
 - kakovost DNA !
- izbor testa (certificirani testi, validacija)
 - sekveniranje
 - ARMS
 - dHPLC vedno morajo biti vključeni eksoni 19,20,21
 - drugo
- ponovi testiranje, če gre za dvom
- zunanja kontrola kakovosti, referenčni lab



Ali si lahko privoščimo molekularno tipiziranje v rutini?

- Glibermanov princip
"Hire the best coach that money can buy.
The second best is too expensive."
- **Čeprav so stroški z molekularnimi testi izjemno visoki, so dolgoročno gledano stroški tradicionalne rutine bistveno višji.**
- Česa smo se naučili pri karcinomu dojke?
ER/PR, HER2

Pomen določanja HER2 pri raku želodca

Janja Ocvirk

Stadiji in preživetje pri raku želodca¹

Rak	Stadij	TMN ¹	5-letno preživetje ²
Zgodnji	0	Tis, N0, M0	89%
	IA	T1, N0, M0	78%
	IB	T1, N1, M0 ali T2a/b, N0, M0	58%
Napreovali	II	T1, N2, M0 ali T2a/b, N1, M0 ali T3, N0, M0	34%
	IIIA	T2a/b, N2, M0 ali T3, N1, M0 ali T4, N0, M0	20%
	IIIB	T3, N2, M0	8%
IV	T1-3, N3, M0 ali T4, N1-3, M0 ali katerikoli T, katerikoli N, M1	7%	

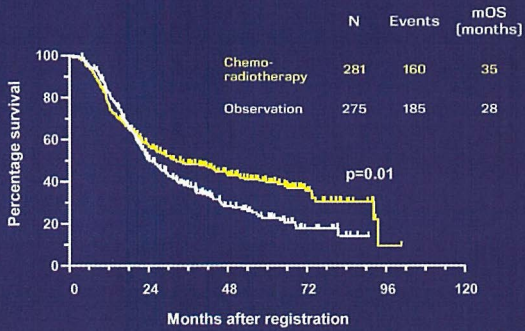
1. Greene FL, et al. AJCC Cancer Staging Manual, vol 7, 2009, New York: Springer
2. Hundahl SA, et al. Cancer 2000; 83: 912-932

Kurativne možnosti zdravljenja

namen ozdravitev

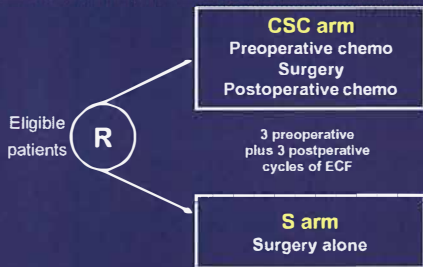
- Operacija je edina možnost ozdravitve pri raku želodca pod pogojem, da gre za R0 resekcijo
 - radikalna kirurgija + l.limfadenektomija vsaj D1, bolje D2
- Preoperativna ali neoadjuvantna kemoterapija
 - Z namenom povečanja možnosti popolne resekcije in s tem ozdravitve
 - Uporablja se shema ECF
- Pooperativna ali dopolnilna KT+RT
 - Izboljša preživetje bolnikov po radikalni resekciji v določenih stadijih in brez oddaljenih zasevkov.

SWOG 9008/INT 0116: celokupno preživetje



Macdonald J et al. *N Engl J Med* 345:725-730; updated ASCO GI 2004; Abstract 6

MAGIC trial: design



Cunningham et al. *ASCO* 2005; Abstract 4001

Rezultati

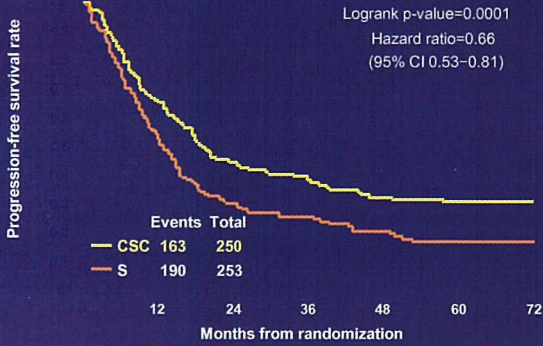
- Neželeni učinki ECF so bili podobni kot pri drugih uporabah ECF
- % pooperativnih komplikacij
 - 45% pri sami operaciji
 - 46% pri operaciji + KT
- Tumorji so bili pri skupini zdr. s KT značilno manjši.

MAGIC trial: pathology staging following surgery

	CSC	S	p-value
Maximum tumour diameter Median (IQR)	3 cm [2.0-5.0]	5 cm [3.5-7.5]	<0.001, Mann Whitney U test
Extent of tumour (gastric only) T1/T2 T3/T4	52% 48%	38% 62%	0.009, χ^2 test (trend)
Nodal status (gastric only) N0/N1 N2/N3	84% 16%	76% 29%	0.01, χ^2 test (trend)

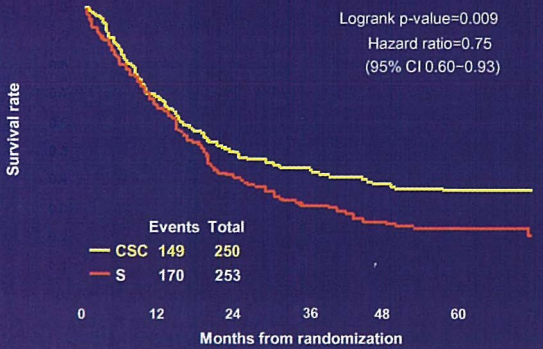
Cunningham *et al.* ASCO 2005;Abstract 4001

MAGIC trial: progression-free survival



Cunningham *et al.* ASCO 2005;Abstract 4001

MAGIC trial: overall survival



Cunningham *et al.* ASCO 2005;Abstract 4001

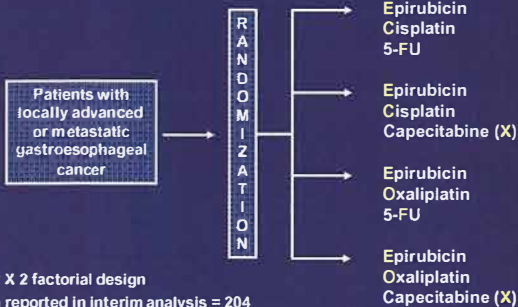
- Dodatek perioperativne KT z ECF učinkovito zmanjša tumor, poveča št. R0 resekcij, izboljša preživetje in preživetje brez bolezni pri bolnikih z potencialno operabilnim karcinomom želodca.

Cunningham - NEJM 2006

Napredovala bolezen

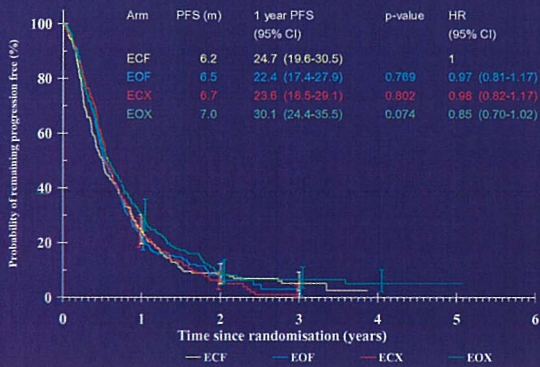
- Prognoza napredovale bolezni je slaba z <10% 5-letnim preživetjem
- Vloga kemoterapije je paliativna
- Nove kombinacije KT dajejo višje govore, malo CR, čas trajanja odgovor in OS sta še vedno kratka
- KT na osnovi Cisplatina je standard (CF, ECF, PELF...)
- Vloga novih citostatikov :oxaliplatin, docetaxel... in tarčnih zdravil

NCRI REAL-2 trial

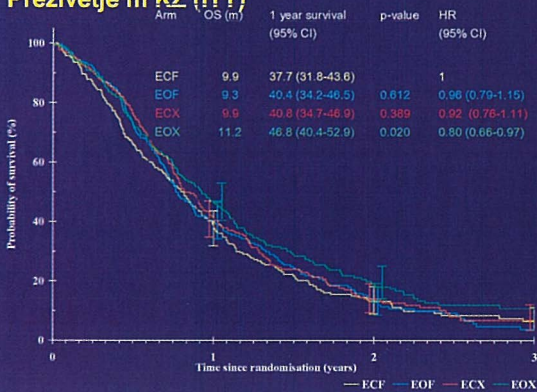


Sumpter K et al. Br J Can 2005, 92:1978-1983

Čas do napredovanja bolezni



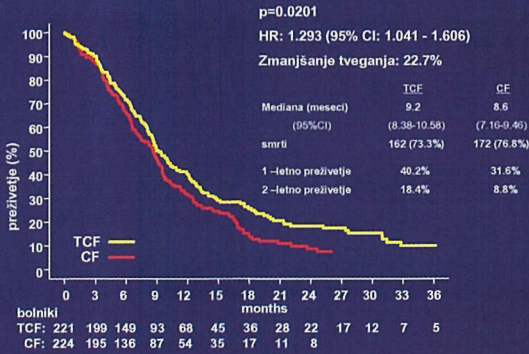
Preživetje m KŽ (ITT)



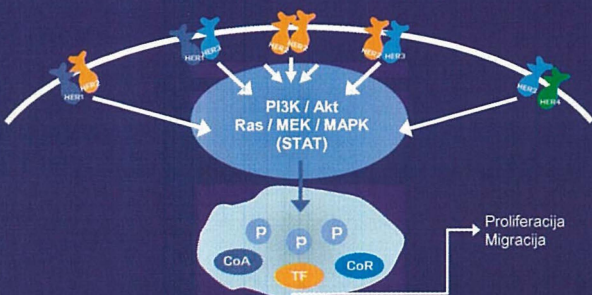
Rezultati REAL

- primarni:
 - Kapecitabine ni inferioren 5-FU
 - Oksaliplatin ni inferioren cisplatinu
- Tripleti
 - Kapecitabine lahko nadomesti PVI 5-FU
 - Oksaliplatin lahko nadomesti Cisplatin
- EOX izboljšša učinkovitost v primerjavi z ECF

Celokupno preživetje Tax 325

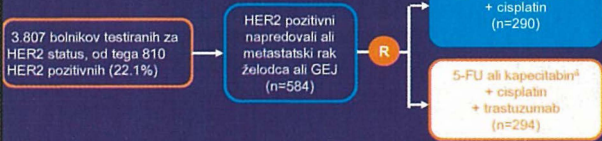


Čezmerno izražen HER2 poveča celično proliferacijo in migracijo



ToGA Zasnova raziskave¹

Odperta študija



Stratifikacija

- napredovali vs. metastatski
- rak želodca vs. GEJ
- merljiva vs. nemerljiva bolezen
- ECOG PS 0-1 vs 2
- capecitabin vs. 5-FU

Odmerki v shemah

- Xeloda 1000 mg/m² bid d1-14 q3w x 6
- 5-FU 800 mg/m²/dan v kontinuirani iv. infuziji d1-5 q3w x 6
- cisplatin 80 mg/m² q3w x 6
- Herceptin 8 mg/kg uvajalni, nato 6 mg/kg q3w do progressa

Algoritem testiranja

- Imunohistokemija kot prvi test in ISH tehnika pri IHC 2+ rezultatu¹

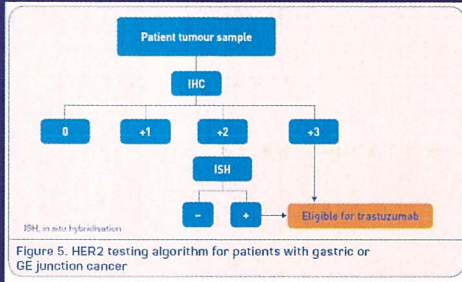


Figure 5. HER2 testing algorithm for patients with gastric or GE junction cancer

1. Chung et al. Poster 6511; ESMO-ESMO, 2009

HER2 screening results

	n
Patients consented to enter screening	3,883
Total patients screened (Aug 2005–Nov 2008)	3,807
Successful screenings FISH or IHC	3,667
Successful screenings FISH and IHC	3,280
HER2-negative by FISH and IHC	2,857
HER2-positive by FISH and/or IHC	810

HER2-positivity 22.1% according to protocol (based on 3,667 successful screenings)

Bing Y.J. et al. *J Clin Oncol* 2008; 27:Abstract 455S
Van Cutsem E. et al. *J Clin Oncol* 2008; 27:Abstract 455S

Izbor bolnikov

- Zožitve tarčne populacije z 22,1% na 16,6%¹

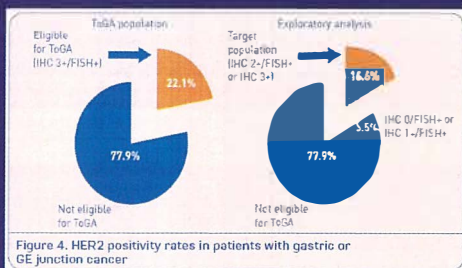
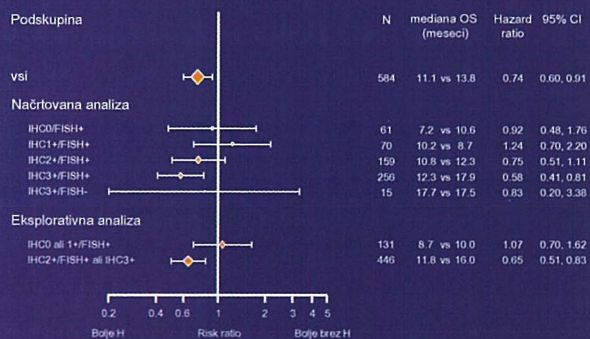


Figure 4. HER2 positivity rates in patients with gastric or GE junction cancer

1. Chung et al. Poster 6511; ESMO-ESMO, 2009

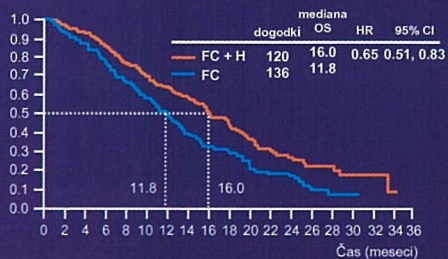
Učinkovitost glede na HER2 status¹



1. Bang et al. Abstract 4556, ASCO 2009

Celokupno preživetje pri IHC3+ ali IHC2+/FISH+

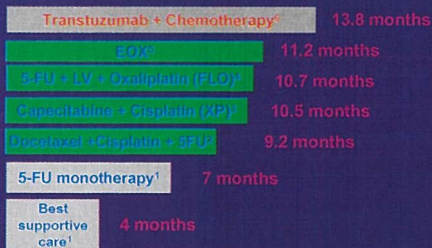
Eksplorativna analiza



No. at risk
 FC + H: 228, 218, 196, 170, 142, 122, 100, 84, 65, 51, 39, 28, 20, 12, 11, 5, 4, 1, 0
 FC: 218, 198, 170, 141, 112, 96, 75, 53, 39, 28, 20, 13, 11, 4, 3, 3, 0, 0, 0

1. Bang et al. Abstract 4556, ASCO 2009

Napredek v zdravljenju napredovalega karcinoma želodca



MEDIAN OVERALL SURVIVAL IN ADVANCED GASTRIC CANCER

1. Wagner A, et al. JCO 2003, 2. van Cutsem E, et al. JCO 2006, 3. Kang YK et al, Ann Oncol 2009, 4. Al Batran SE, et al. JCO 2009, 5. Cunningham D, et al. NEJM 2007, 6. van Cutsem E, et al. ASCO 2009.

Zaključki

- Trastuzumab je prvo tarčno zdravilo, ki ima dobrobit na preživetje bolnikov z napredovalim karcinomom želodca
- Trastuzumab v kombinaciji s KT je nova možnost zdravljenja za bolnike s HER2 pozitivnim karcinomom želodca

Določanje statusa Her-2 pri karcinomu želodca

No.	Referenca	n	%
1	Ooi et al. ²²	396	10.1
2	Dursun et al. ²³	62	17.7
3	Guel et al. ²⁴	95	10.9
4	Allgayer et al. ¹¹	189	11.6
5	Müller et al. ²⁵	413	11.6
6	Ougolkov et al. ²⁰	116	16.3
7	Sanz-Ortega et al. ¹¹	143	31.0
8	Aoyagi et al. ²¹	50	34.0
9	Koepfen et al. ¹	62	8.1
10	Pinto-de-Sousa et al. ¹⁹	157	19.3
11	Takehana et al. ¹	392	6.8
12	Lee et al. ²²	841	17.0
13	Ougolkov et al. ¹¹	96	26.8
14	Wang et al. ¹¹	100	32.0
15	Hsiao et al. ¹²	72	19.3
16	Yano et al. ¹⁹	200	17.0
Total		3264	Mean 17.6

Možni vzroki :

- različna metodologija
- subjektivnost ocene
- različni sistemi ocenjevanja

Table 6. HER2 positivity rate in gastric cancer: results from a literature survey of FISH/CISH studies

No.	Reference	Technique	n	FISH positivity, %
1	Isikawa et al. ¹⁶	FISH	105	18.1
2	Brien et al. ¹⁶	FISH	61	42.6
3	Brien et al. ¹⁸	FISH	63	19.0
4	Takehana et al. ²	FISH	352	7.1
5	Riso et al. ¹²	FISH	72	15.3
6	Wang et al. ¹⁷	FISH	97	9.3
7	Varis et al. ¹⁹	CISH	52	17.3
8	Yano et al. ¹⁹	FISH	199	27.1
9	Tanner et al. ⁸	CISH	231	17.3
			Total 1033	Mean 19.2

Možni vzroki variacij:

- različna metodologija
- subjektivnost ocene
- različni sistemi ocenjevanja
- heterogenost tumorja

Herceptin® 2016, 42, 747-751, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR.151204

Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study

M. Hoffmann,¹ O. Kos,² D. Sta³, R. Buttner,^{2,4} M. van de Vijver,⁵ W. Kim,⁶ A. Ochiai,⁷ I. Riisehoff,² & U. Hentschel⁸

¹Institute of Pathology, Erlangen University Hospital; ²IRBIO, Molecular Pathology GmbH, Erlangen, Germany; ³Cancer Hospital, Fudan University, Shanghai, China; ⁴Institute of Pathology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany; ⁵The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, the Netherlands; ⁶Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, South Korea; ⁷Pathology Division, National Cancer Center Research Institute East, Chiba, Japan

Histopathological parameter	Samples, n (%) (n = 168)
Grade ^a	
1	5 (3.0)
2	93 (55.4)
3	69 (41.1)
4	1 (0.5)
Tumour type (Lauren classification)	
Intestinal-type adenocarcinoma	120 (71.5)
Diffuse-type adenocarcinoma	39 (23.0)
Mixed-type adenocarcinoma	9 (5.5)

(Dako). Concordance between FISH and IHC was 93.5% in 168 evaluable samples. Eleven samples were scored as FISH+ but IHC- or equivocal.

Conclusions: IHC/FISH discrepancies were attributed to basolateral membranous immunoreactivity of glandular cells resulting in incomplete membranous reactivity and/or a higher rate of tumour heterogeneity in gastric cancer compared with breast cancer. With modifications to the IHC scoring system, the Hercep-TestTM is considered valid for the identification of HER2+ gastric tumours for this clinical trial. Correlation of HER2 scores with clinical outcomes will be needed to determine which patients might benefit from trastuzumab therapy.

Table 2. Comparison of FISH and IHC (breast cancer scoring) test results for HER2 status

	HercepTest TM score			
	IHC 3+	IHC 2+	IHC 1+	IHC 0
FISH+	18	5	2	4
FISH-	0 (100%)	9 (35.7%)	22 (8.3%)	108 (3.5%)
Total	18	14	24	112

FISH+ 29 (25.9%)
IHC 3+ 18 (14.9%)

Table 3. Analysis of IHC staining parameters for HER2 IHC and HER2 FISH results with 166 gastric cancer samples

Intenziteta reakcije →	Absent	Faint	Moderate	Strong
≥10% cells, complete	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
No samples	0	15	14	18
FISH+ cases	0	0	5	1/3
≥10% cells, incomplete	(0)	(1+)	(1+)	(1+)
No samples	0	2	7	0
FISH+ cases	0	0	2	1/3
~10% cells, complete	(0)	(0)	(0)	(0)
No samples	0	21	0	3
FISH+ cases	0	1	0	3
<10% cells, incomplete	(0)	(0)	(0)	(0)
No samples	55	33	0	0
FISH+ cases	0	0	0	0
Total no. samples	55	71	21	21
Total no. FISH+ cases	0	1	7	21

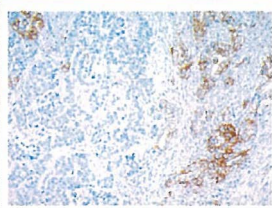


Figure 2. Tumour heterogeneity as a cause of false-negative in situ hybridisation immunohistochemistry test discrepancies.

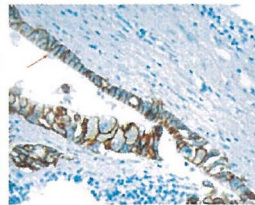


Figure 3. Incomplete membranous immunoreactivity in a false-negative in situ hybridisation-positive gastric cancer sample.

Heterogenost v 4.8% vzorcev (pri dojki cca 1-2%)

Table 4. Consensus panel recommendations on HER2 scoring for gastric cancer

Reactivity characteristics	Score/classification
No reactivity or membranous reactivity in <10% of cells	0/negative
Faint, barely perceptible membranous reactivity in >10% of cells; cells are reactive only in part of their membrane	1+/negative
Weak to moderate complete or basolateral membranous reactivity in >10% of tumour cells	2+/equivocal
Moderate to strong complete or basolateral membranous reactivity in >10% of tumour cells	3+ (positive)
Biopsy (not surgery) samples with cohesive either IHC 3+ and/or FISH+ clones are considered positive irrespective of size, i.e. <10%	

Skladnost IHK in FISH za Her-2 pri karcinomu želodca

v literaturi od 82 - 100%



Original contribution

Human
PATHOLOGY
www.elsevier.com/locate/bsc

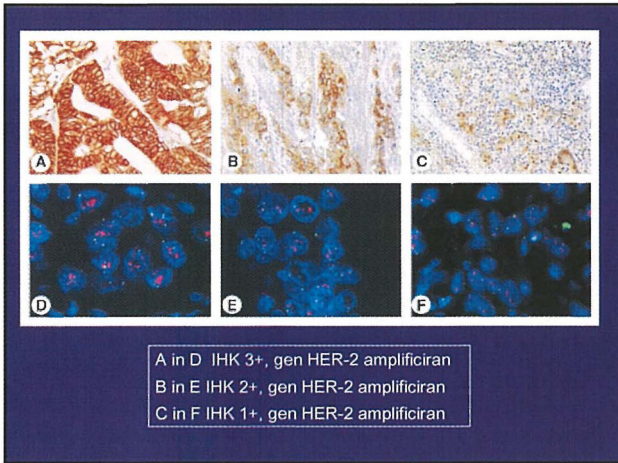
Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction^a

Min A Kim MD, PhD^a, Eun Ji Jung MS^b, Hye Seung Lee MD, PhD^c, Hee Eun Lee MD^d, Yoon Kyung Zeeo MD, PhD^e, Han-Kwang Tang MD, PhD^a, Woo Ho Kim MD, PhD^{a,h}

^aDepartment of Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul 151-747, Korea
^bSeoul Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul 151-747, Korea
^cDepartment of Pathology, Seoul National University Ansan Hospital, Gwangju 443-747, Korea
^dDepartment of Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul 151-747, Korea

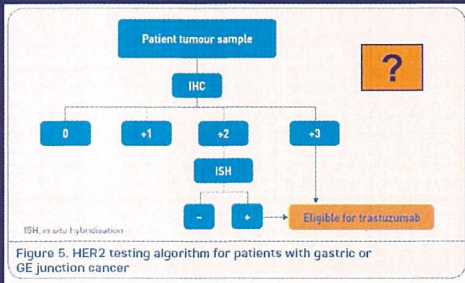
Table 3 Comparison of HER-2 status between IHC and FISH analysis

	Immunohistochemistry				Total
	0 (n = 91)	1+ (n = 101)	2+ (n = 46)	3+ (n = 10)	
FISH -	91 (100%)	97 (96%)	41 (89.1%)	6 (60%)	235
FISH +	0 (0%)	4 (4%)	5 (10.9%)	10 (100%)	19



Algoritem testiranja

- Imunohistokemija kot prvi test in ISH tehnika pri IHC 2+ rezultatu¹



¹ Chung et al. Poster 6511; ECCC-ESMO, 2009

Pomen določanja mutacij KRAS in BRAF pri RDČD

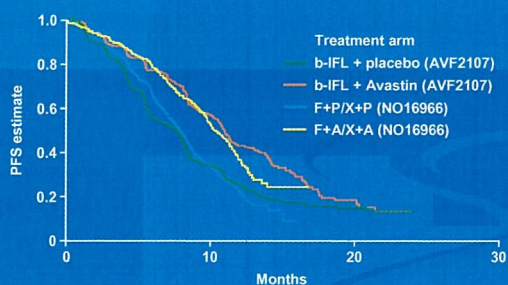
Doc.Dr. Janja Ocvirk, dr.med.
Onkološki inštitut Ljubljana

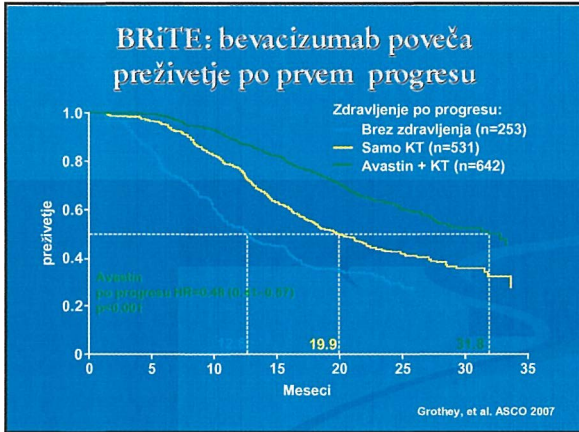
SISTEMSKO ZDRAVLJENJE

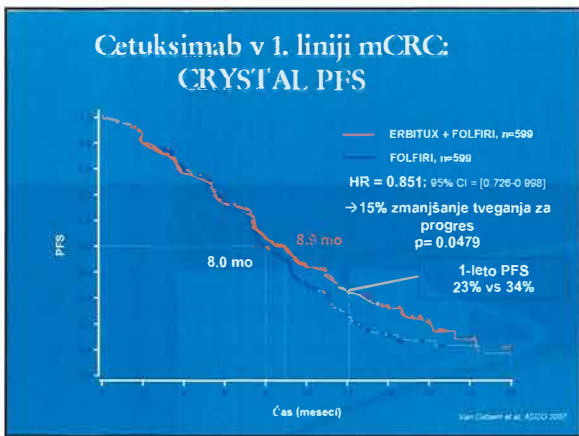
V zdravljenju razširjene bolezni uporabljamo več citostatikov in tarčnih zdravil v različnih kombinacijah:

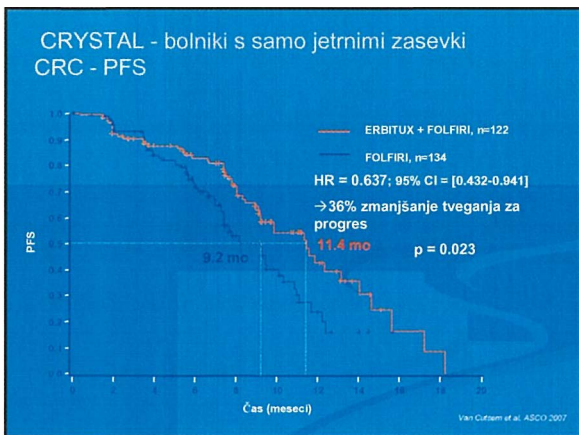
- 5-fluorouracil
- kapecitabin (Xeloda®)
- irinotekan (Campto®)
- oxaliplatin (Eloxatin®)
- cetuximab (Erbix®)
- bevacizumab (Avastin®)

Kombinacija PFS Kaplan-Meier pri AVF2107 vs NO16966 - PFS on treatment





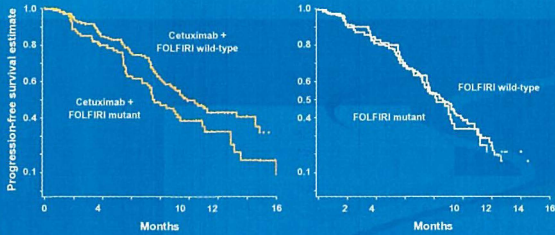




KRAS status in učinkovitost: PFS

Cetuximab + FOLFIRI HR=0.63; p=0.007
 mPFS wild-type (n=172): 9.9 months
 mPFS mutant (n=105): 7.6 months

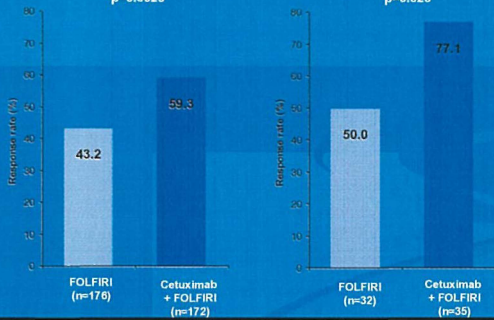
FOLFIRI HR=0.97; p=0.87
 mPFS wild-type (n=176): 8.7 months
 mPFS mutant (n=87): 8.1 months



KRAS status – Odgovor na zdravljenje

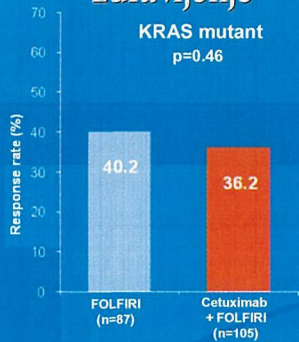
KRAS wild-type
 p=0.0025

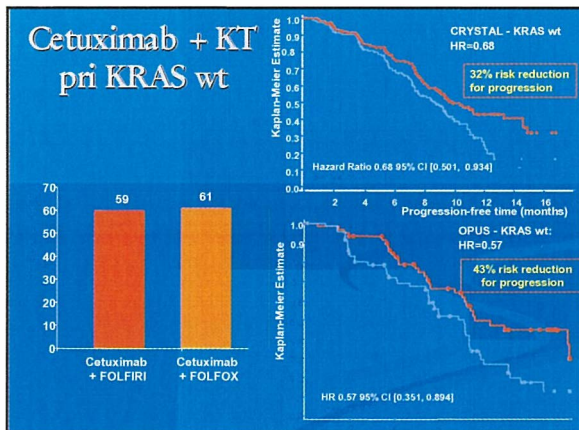
KRAS wild-type liver limited
 p=0.025



KRAS status – Odgovor na zdravljenje

KRAS mutant
 p=0.46





Prognostični vs napovedni markerji

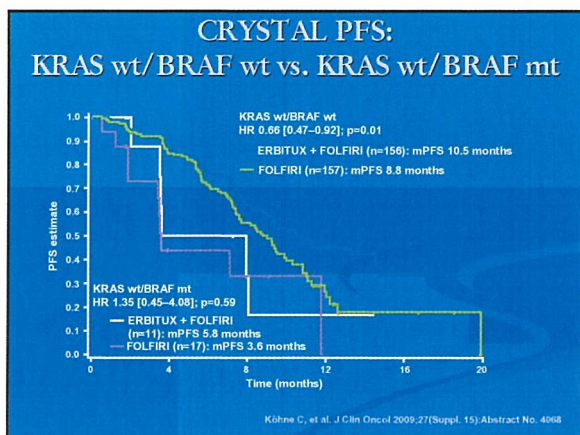
Prognostični

Dajejo informacijo o izidu neglede na vrsto zdravljenja

Napovedni

Dajejo informacijo o izidu glede na vrsto specifičnega zdravljenja

Nakateri markerji imajo lahko tako napovedno kot prognostično vrednost.



Prognostična vrednost BRAF in napovedna KRAS

- Raziskava PETACC.3
- 3278 bolnikov, stadij II in III CRC
- Določitev BRAF in KRAS mutacij

- KRAS mutacije 37%
 - BRAF mutacije 7.9%
- Brez razlik glede na stadij II ali III
- Multivariantna analiza: stadij, starost, spol, mesto tumorja, št. zajetih bezgavk, G, MSI
- KRAS m – G $p=0,0016$
 BRAF m – ženski spol $p=0,017$
 BRAFm – desna stran, stari, G in MSI $p<0,0004$

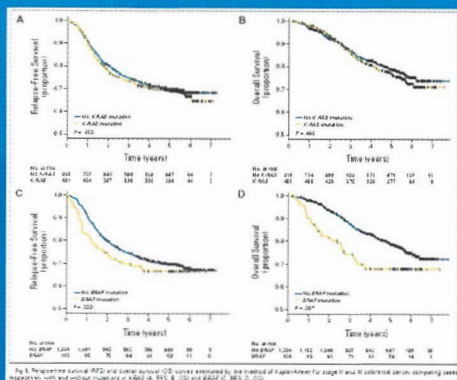


Fig 4. Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) (years) stratified by the results of Kaptan-Aker for stage II and III colorectal cancer comparing cases heterozygous with and without mutations in KRAS at 145, G, 132 and BRAF at 600, G, 123.

- KRAS nima prognostične vrednosti na PFS in OS pri bolnikih stadija II in III,
Ima napovedno vrednost za odgovor in preživetje mCRC zdravljenih s cetuximabom in panitumumabom
BRAF mutacija ima prognostično napovedno vrednost pri bolnikih st. II in III na OS

Zaključki

- Zdravljenje mCRC je čedalje bolj zapleteno, saj imamo na voljo več zdravil in njihovih kombinacij, z različno učinkovitostjo in neželenimi učinki, kar moramo upoštevati pri odločitvi o zdravljenju, ob PS in sočasnih boleznih bolnika. Vsekakor pa odločitev o zdravljenju brez dobrega patohistološkega izvida in informacije o KRAS ni več mogoča.
- Določitev mutacije BRAF kot prognostičen dejavnik pri bolnikih stadija II in III



Testiranje znanih mutacij v genu KRAS

Srdjan Novaković

Oddelek za molekularno diagnostiko
Onkološki inštitut Ljubljana

1



Status KRAS je napovedni dejavnik za uspešnost zdravljenja z EGFR inhibitorji¹

- EGFR je prekomerno izražen pri 50-80% bolnikov z rakom debelega črevesa, zato predstavlja primerno tarčo za zdravljenje.²
- Zdravljenje z EGFR inhibitorji je uspešno le pri bolnikih brez mutacij v genu KRAS (wild type).
- Prisotnost mutacij v genu KRAS korelira s slabšim odzivom na zdravljenje z EGFR inhibitorji.
- 30-40% bolnikov z metastatskim rakom debelega črevesa ima mutacijo v genu KRAS.³
- Identifikacija KRAS mutacij pomaga pri izbiri ustreznega zdravljenja.

1 Lohr A, et al. J Clin Oncol 2008; 26:374-379

2 Spiess JP, et al. Ann Oncol 2005; 16:102-108

3 Van Kesteren JHJM, et al. Virch Arch 2008; 453:431

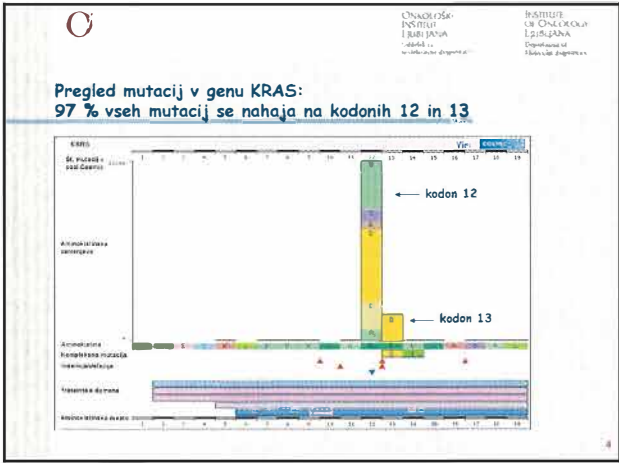
2



Molekularni mehanizmi in korelacija s slabšim odzivom na EGFR inhibitorje

- Produkt gena KRAS je GTP-aza, ki posreduje signal iz EGFR receptorja na znotrajcelične tarče.
- Produkt mutiranega gena KRAS na mestih 12 in 13 je G-protein s povečano afiniteto za vezavo GTP, ki je nenehno v aktivnem stanju.
- V primeru mutiranega gena KRAS signalizacija ni več odvisna od EGFR receptorja, zato se bolniki z mutacijami na kodonih 12 in 13 gena KRAS ne odzivajo na zdravljenje.

3



ONKOLOŠKI INŠTITUT LJUBLJANA
 Institute of Oncology Ljubljana
 Department of Molecular Diagnostics

Nabor mutacij v genu KRAS na kodonih 12 in 13

Mutacije	Odstotek
GGT -> GTT G12V	21,58%
GGT -> GAT G12D	35,07%
GGC -> GAC G13D	20,62%
GGT -> TGT G12C	9,63%
GGT -> GCT G12A	5,39%
GGT -> AGT G12E	5,59%
GGT -> CGT G12R	0,96%
GGC -> TGC G13C	0,39%
GGT -> GGA G12G	0,19%
GGC -> GCC G13A	0,19%
GGT -> GGG G12G	0,19%
GGC -> GTC G13V	0,19%

} 7 najpogostejših variant (98%)
 } Redke variante (manj kot 2%)

5

ONKOLOŠKI INŠTITUT LJUBLJANA
 Institute of Oncology Ljubljana
 Department of Molecular Diagnostics

Obstoječe tehnike, ki so na voljo za testiranje mutacij KRAS

- **PCR v realnem času (RT-PCR):**
 Visoko občutljiva za detekcijo specifičnih genetskih sprememb (manj kot 1%)
 Na voljo so komercialni kiti (KRAS Mutation Kit - TheraScreen DxS)
 Možnost postavitve lastne metode - potrebna je validacija
- **Sekveniranje**
 Omagača celotno prešejanje gena - uporabna za gene brez "vročih točk"
 Za uspešno detekcijo potrebujemo večji % mutirane DNA (min 20%)
 Tipi: metoda po Sangerju, Pyrosequencing
 Komercialni kit: MutectorII - TrimGen
- **Hibridizacijsko-kolorimetrične metode**
 PCR produkti, ki vsebujejo biotin se specifično vežejo na oligonuklotide, ki so vezani na nosilci (membrano, mikrofiltrerska plošča). Vezane produkte detektiramo s posebnimi encimi (konjugirano fosfatfaza) s fotodetekcijo
 Komercialni kiti: KRAS strip assay - ViennaLab, Mutector I - TrimGen

6

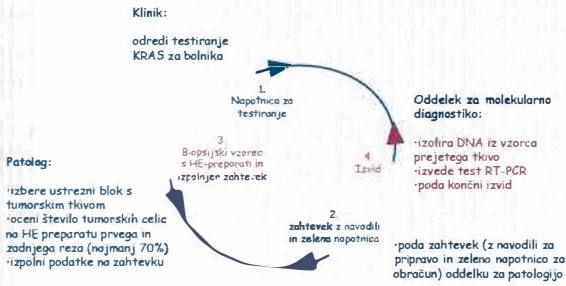


Metodologija testiranja statusa KRAS

- Material, primeren za testiranje:
 - Parafinski vzorec tkiva primarnega tumorja
 - Alternativa:
 - Zmrznjen vzorec tkiva primarnega tumorja
 - Parafinski vzorec metastatskega tkiva (95% ujemanje z vzorcem tkiva primarnega tumorja)
 - Endoskopska biopsija (pri bolnikih pri katerih ni bilo opravljeno resekcija)
- Delo v laboratoriju:
 - patološka in molekularno biološka analiza vzorca



Tok dokumentov, vzorcev in potek testiranja:





Zahtevek za pripravo rezin za testiranje genotipa KRAS

Kontaktne podatki

Izpolni oddelek za MD ob pošiljanju vzorca in zahtevek za patologijo. Zelo pomembno je, da patolog oceni prisotnost rakavih celic.

ODDELEK ZA POMOŠNIŠTVO PATOLOGA

Če ste se slišali

Pacijent:

Ime in priimek: _____

Številka bolniške kartice: _____

Ob prejemu vzorcev izpolni MD in pošlje obrazec po faksu na oddelek za patologijo.

ODDELEK ZA MOLEKULARNO DIAGNOSTIKO ONKOLOŠKEGA INŠTITUTA

Datum prejema vzorca: _____

Samoplačnik:

Številka bolniške kartice: _____

30-10-001 Številka HE diagnostični vzorca _____

3-HE zamrznjen vzorec _____

ONKOLOŠKI INŠTITUT LJUBLJANA
 Institute of Oncology Ljubljana
 Department of Molecular Diagnostics

Zelena napotnica za obračun stroškov priprave materiala za testiranje genotipa KRAS

Prosim za določitev reprezentativnega vzorca tumorja po navodilih, narez dodatnih rezin in pregled HE preparatov:

29002 -12X
10 rezin za izolacijo DNA in 2 rezini na stekelca

29020 -2x
dve HE-barvanji

29011 -2x
dva pregleda stekelc

10

ONKOLOŠKI INŠTITUT LJUBLJANA
 Institute of Oncology Ljubljana
 Department of Molecular Diagnostics

Navodila za pripravo rezin parafinsko vklopljenega tkiva za testiranje genotipa KRAS:

- Pri sprejemu in tehnični obdelavi tkiva upoštevajte standarde kakovosti v patologiji:
 - tkivo mora biti fiksirano čim prej
 - optimalno fiksirano v 10% nevtralnem formalinu
 - volumen fiksativa mora biti 5-10x večji od volumna tkiva
 - tehnična obdelava in vklop tkiva morata biti optimizirana

11

ONKOLOŠKI INŠTITUT LJUBLJANA
 Institute of Oncology Ljubljana
 Department of Molecular Diagnostics

Navodila za pripravo rezin parafinsko vklopljenega tkiva za testiranje genotipa KRAS:

- Pri pripravi rezin za molekularno biološko preiskavo:
 - za vsak vzorec uporabite novo rezilo
 - očistite vodno kopel med vzorci
 - med rezanjem si nadenite čiste rokavice
 - ne postavljajte odrezanih rezin na vroča mesta

12



Navodila za pripravo rezin parafinsko vklopljenega tkiva za testiranje genotipa KRAS:

- Za testiranje patolog določi primeren vzorec tumorja v katerem naj bo vsaj 70% tumorskega tkiva
- Pripravite prvi HE preparat (3-5 μm), preden naredite neobarvane rezine in ga označite s številko biopsije, oznako bloka in oznako HE - A
- Pripravite 10 neobarvanih rezin debeline 10 μm v epico (skupno 100 μm tkiva) in jo označite s številko biopsije in oznako bloka
- Pripravite zadnji HE preparat, potem ko ste naredili nepobarvane rezine in ga označite s številko biopsije, oznako bloka in oznako HE - B
- Oba HE preparata preveri specialist patolog in oceni delež tumorskega tkiva



Potek testiranja KRAS na Oddelku za molekularno diagnostiko

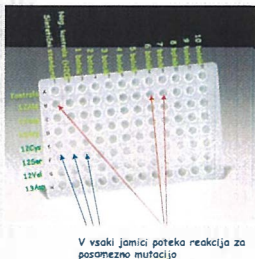
- Izolacija DNA iz tkivnega vzorca
- Merjenje količine DNA v vzorcu in umerjanje na ustrežno koncentracijo
- Izvedba testa z RT-PCR * (TheraScreen KRAS mutation kit)
- Analiza rezultatov
- Izdaja izvida

* Prednost RT-PCR pred sekvencizacijo: na voljo je malo tumorskega tkiva, v celicah pa je prisotno malo mutirane DNA. RT-PCR je v tem primeru bistveno bolj občutljiva metoda. Izvedba je enostavna, skrajša so čas testiranja in zahteva manj osebja.



Izvedba testa z RT-PCR (TheraScreen KRAS mutation kit)

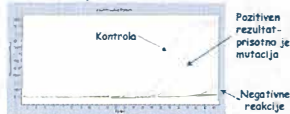
1. Izolirano DNA bolnika dodamo v reakcijsko mešanico na ploščo



2. Proces poteka na aparatu za RT-PCR



3. Pri analizi primerjamo količino pomožnega produkta v posamezni reakciji s količino pomožnega produkta v kontrolni reakciji





Ocena senzitivnosti metode

•Senzitivnost metode smo določali na vzorcih, ki so vsebovali različne % celic (tumorso linijo HT-29 brez KRAS mutacij, tumorsko linijo CCL247 z mutacijo p.Gly13Asp ter monokleamne celice)

•Posneli smo tumorske vzorce

•Razpon celic z mutacijo: 0,05%-30%

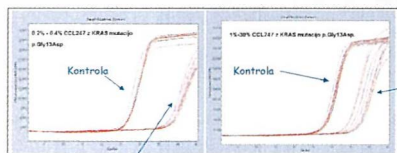
Št. HT-29	Št. CCL247	Št. monokleamnih celic	KRAS genotip
1000	0	0	wt
1000	0	1000	wt
1000	0	2000	wt
1000	0	3000	wt
1000	0	4000	wt
1000	0	5000	wt
1000	0	6000	wt
1000	0	7000	wt
1000	0	8000	wt
1000	0	9000	wt
1000	0	10000	wt
1000	1000	0	p.G13A
1000	2000	0	p.G13A
1000	3000	0	p.G13A
1000	4000	0	p.G13A
1000	5000	0	p.G13A
1000	6000	0	p.G13A
1000	7000	0	p.G13A
1000	8000	0	p.G13A
1000	9000	0	p.G13A
1000	10000	0	p.G13A



Ocena senzitivnosti metode

Senzitivnost:

Proizvajalec zagotavlja detekcijo 1% mutirane DNA v ozadju genomске DNA, pod pogojem, da je v vzorcu DNA ustrezne kvalitete. Naš laboratorijsko določen detekcijski limit znaša 2%.



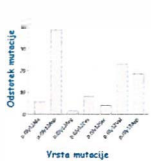
Pozitivne amplifikacijske krivulje smo opazili že pri 0,2% mutirane DNA

Ob naraščanju količine mutirane DNA v vzorcu se amplifikacijske krivulje pojavljajo prej in postanejo bolj strme



KRAS mutacije pri slovenskih bolnikih

- Pri preiskovanih slovenskih bolnikih smo zasledili 54,5% bolnikov brez mutacij v genu KRAS in 45,5% bolnikov z mutiranim genom za KRAS
- Distribucija mutacij v genu KRAS pri slovenskih bolnikih



Mutacija	Številski	Odstotek - Struktura
p.Gly12Asn	5,7	5,39
p.Gly12Asp	18,5	16,87
p.Gly12Arg	1,4	0,96
p.Gly12Cys	0,3	0,28
p.Gly12Ser	0,1	0,09
p.Gly12Val	23,0	21,38
p.Gly13Asp	18,5	17,07

distribucija KRAS mutacij pri slovenskih bolnikih se ujema z rezultati objavljeni v literaturi

- V 95,35% smo zasledili ujemanje v rezultatih genotipizacije med primarnim tumorjem in pripadajočim metastatskim tkivom.



Klinična korelacija z KRAS genotipom na skupini retrospektivnih vzorcev

Genotip	Število vzorcev	KRAS mutacije	Reakcija na zdravljenje
WT	77	0	85,7%
G117A	14	14	71,4%
G117V	8	8	75,0%
G117E	10	10	70,0%
G117R	10	10	70,0%
G117L	7	7	71,4%
G117M	10	10	70,0%
G117K	11	11	78,6%
G117N	11	11	78,6%
G117D	10	10	71,4%
G117C	10	10	71,4%
G117S	10	10	71,4%
G117H	10	10	71,4%
G117P	10	10	71,4%
G117Q	10	10	71,4%
G117T	10	10	71,4%
G117I	10	10	71,4%
G117F	10	10	71,4%
G117Y	10	10	71,4%
G117X	10	10	71,4%
G117Z	10	10	71,4%
G117A	10	10	71,4%
G117B	10	10	71,4%
G117C	10	10	71,4%
G117D	10	10	71,4%
G117E	10	10	71,4%
G117F	10	10	71,4%
G117G	10	10	71,4%
G117H	10	10	71,4%
G117I	10	10	71,4%
G117J	10	10	71,4%
G117K	10	10	71,4%
G117L	10	10	71,4%
G117M	10	10	71,4%
G117N	10	10	71,4%
G117O	10	10	71,4%
G117P	10	10	71,4%
G117Q	10	10	71,4%
G117R	10	10	71,4%
G117S	10	10	71,4%
G117T	10	10	71,4%
G117U	10	10	71,4%
G117V	10	10	71,4%
G117W	10	10	71,4%
G117X	10	10	71,4%
G117Y	10	10	71,4%
G117Z	10	10	71,4%

85,7% bolnikov brez mutacij v genu KRAS se je odzivalo na zdravljenje z anti-EGFR inhibitorji

71,4% bolnikov z mutacij v genu KRAS se na zdravljenje ni odzivalo



Študija: KRAS mutacije pri slovenskih bolnikih -zaključki:

- Diagnostična metoda, ki smo jo vpeljali za določanje genotipa KRAS je učinkovita in zanesljiva, izvedba pa je enostavna
- Delež bolnikov brez mutacije v genu KRAS, delež bolnikov z mutacij v genu KRAS in distribucija mutacij pri slovenskih bolnikih so primerljivi s podatki drugih publikacij.
- Izbira terapije za bolnika na osnovi statusa KRAS je primerna.



Testiranje KRAS -zaključek

- Kdaj? -Čim prej tem bolje.
- Za izvedbo zadostuje arhivski vzorec tumorja-ponovni invazivni postopki niso potrebni.
- Test KRAS omogoča kliniku odločitev glede nadaljnega zdravljenja - individualno za vsakega bolnika posebej.
- Izboljšanje učinkovitosti zdravljenja z EGFR inhibitorji.
- Manj nepotrebnih toksičnih stranskih učinkov.
