



**SOCIETA' ITALIANA DI FARMACIA OSPEDALIERA
E DEI SERVIZI FARMACEUTICI DELLE AZIENDE SANITARIE**

fondata nel 1952

**Corso residenziale di aggiornamento a cura
della regione Calabria**

**IL VALORE DELL'INNOVAZIONE: DALLA VALUTAZIONE ALLA GESTIONE DELLE
CRITICITA'**

Immunoterapia e biomarcatori: indicatori di appropriatezza diagnostico-terapeutica.



**Anna Maria Lavecchia
SOC Anatomia Patologica
Azienda Ospedaliera Pugliese
Ciaccio - Catanzaro**

**20 Giugno 2017
Università degli Studi
Magna Graecia di
Catanzaro**

La medicina di precisione

Farmaci intelligenti che colpiscono selettivamente le cellule neoplastiche.



- Massima efficacia
- Minori effetti collaterali
- Uso per via orale
- Elevati costi
 - Delle indagini diagnostiche
 - Delle terapie mirate

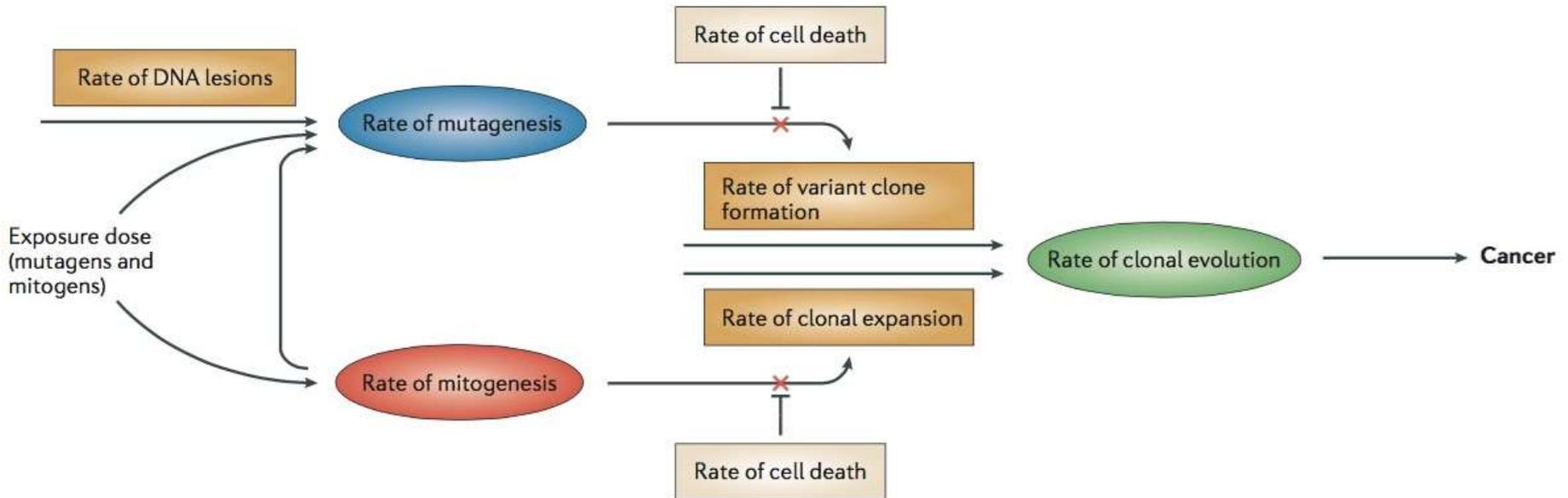
Medicina di precisione: challenges

- Complessità degli eventi biologici
- Incompleta conoscenza della patogenesi
- Difficoltà traslazionale della ricerca nella pratica clinica.

Eterogeneità tumorale

Biomarcatori

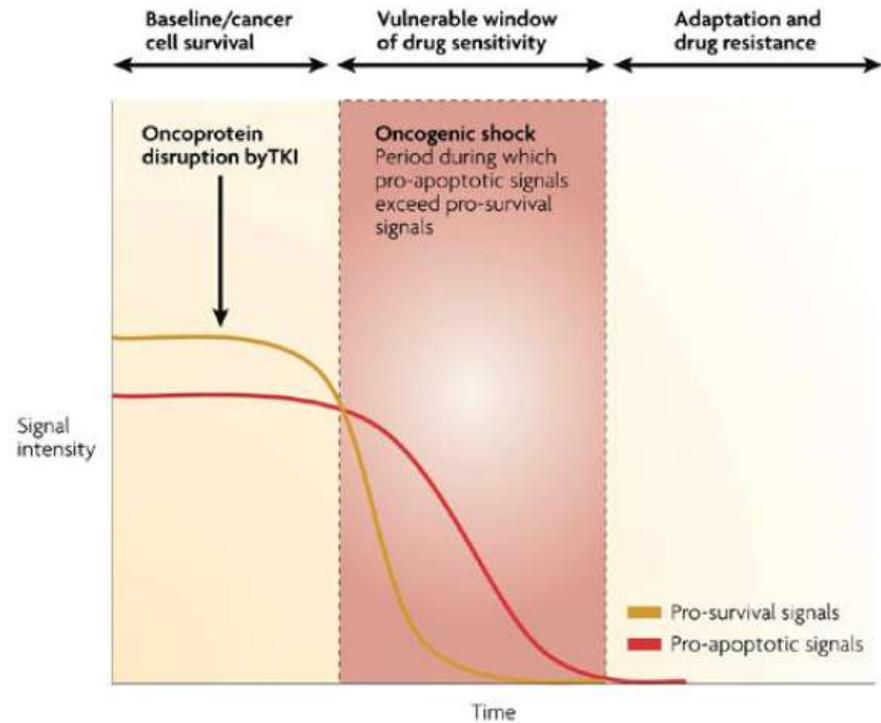
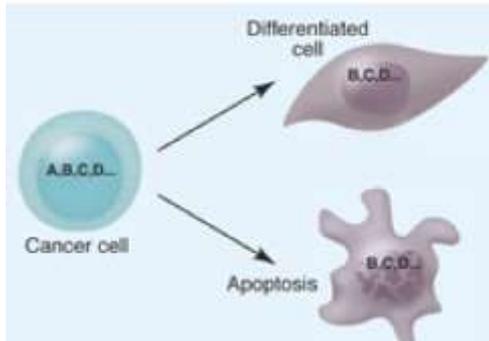
Biomarcatori tumorali



La crescita tumorale e la progressione neoplastica sono caratterizzate da **specifici biomarcatori** e seguono un processo evuzionistico clonale condizionata dal tasso di formazione dei cloni varianti, e dal tasso di espansione di tali cloni, a loro volta indotte dai mutageni esogeni e dai mitogeni, a cui si contrappone il tasso di morte cellulare.

Alla fine sopravviveranno cellule alterate capaci di sfuggire ai meccanismi di sorveglianza immunitaria e di sopravvivere nelle condizioni di stress dovute alla perdita delle normali funzioni cellulari.

Oncogene addiction



Le cellule neoplastiche si svincolano dai meccanismi che le hanno determinate per diventare dipendenti solo da alcuni di essi (*oncogene addiction*).

La terapia mirata silenzia la via di segnale che condiziona la crescita incontrollata e prevalgono i segnali che portano all'apoptosi (shock oncogenico). Un possibile meccanismo di resistenza alla terapia è dovuto allo sviluppo di meccanismi di adattamento e di superamento dello shock oncogenico.

La biologia del cancro crea biomarcatori



Tutti gli eventi molecolari che sottendono alla cancerogenesi sono potenziali fonti di biomarcatori bersaglio della strategia terapeutica.

Biomarcatori

- prognostici (es.HER2, CEA, CA125, PSA)
 - predittivi (es. HER2, EGFR, BRAF)
 - di rischio (BRCA1, BRCA2, APC, MLH1, MSH2)
-
- I biomarcatori predittivi riflettono specifici meccanismi di progressione tumorale correlano con l'outcome clinico e predicono la risposta alle terapie specifiche.
 - Molti di loro entrano a far parte dei cosiddetti **companion diagnostics**.

COMPANION DIAGNOSTICO

Presidio diagnostico in vitro essenziale per l'uso sicuro ed efficace di un corrispondente prodotto terapeutico.

Therapy	Cancer	Biomarker	Abnormality
Anti-HER2 (trastuzumab, lapatinib, pertuzumab)	Breast	<i>ERBB2</i>	Gene amplification or overexpression
Anti-EGFR (cetuximab, panitumumab)	Colorectal	<i>KRAS</i>	Mutation
Anti-EGFR (gefitinib, erlotinib)	NSCLC	<i>EGFR</i>	Mutation
Anti-BRAF (vemurafenib, dabrafenib)	Melanoma	<i>BRAF</i>	Mutation
Anti-ALK (crizotinib)	NSCLC	<i>EML4-ALK</i>	Translocation
Anti-HER2 (trastuzumab)	Gastric	<i>ERBB2</i>	Gene amplification or overexpression
Imatinib	GIST	<i>KIT</i> ^a	Mutation
PARP inhibitors ^c (olaparib)	Breast/ovarian	<i>BRCA1/2</i>	Mutation

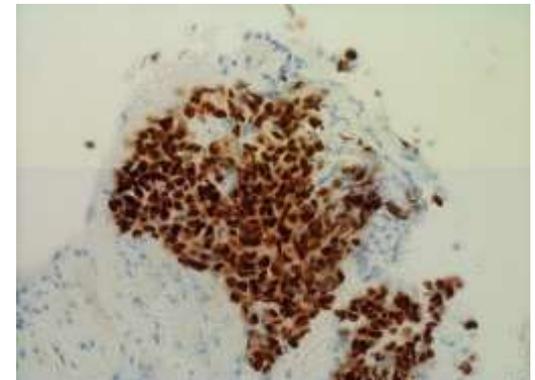
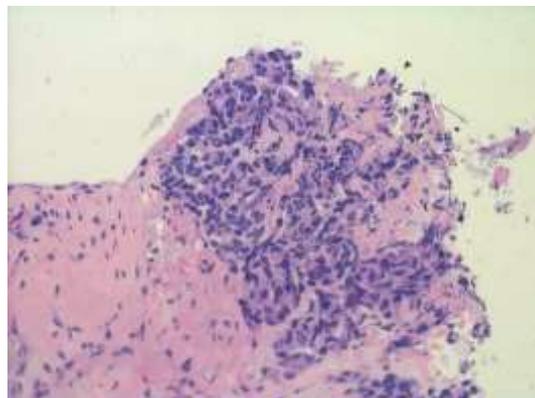
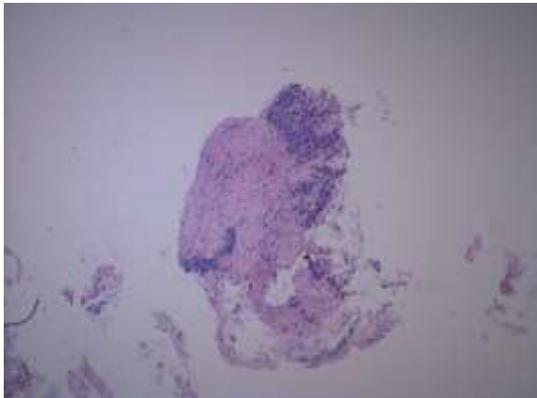
Metodi di indagine

- IHC
 - Individua le proteine
- FISH
 - Individua l'amplificazione e la traslocazione genica
- Sequenziamento, qPCR.
 - Individua mutazioni puntiformi.



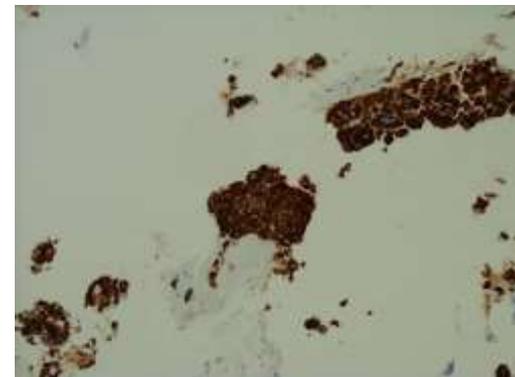
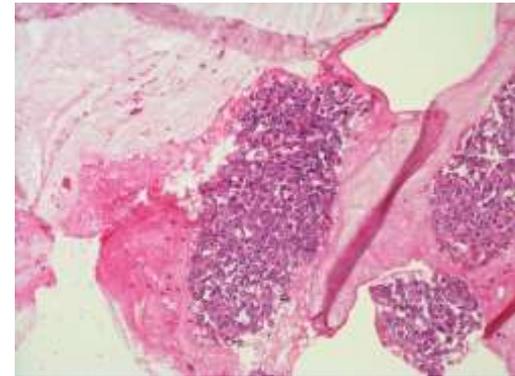
Fonti utilizzabili per la diagnosi morfologica e molecolare di carcinomi polmonari avanzati

- **Campioni tissutali bioptici**
 - Biopsia endobronchiale o trans-bronchiale
 - Agobiopsia percutanea trans-toracica
 - Biopsia pleurica
 - Biopsia linfonodale (linfonodi mediastinici o cervicali)
 - Biopsia di siti metastatici accessibili (fegato, ossa, surreni, cute)



Fonti utilizzabili per la diagnosi morfologica e molecolare di carcinomi polmonari avanzati

- **Campioni citologici** → **Cell Block**
 - Brushing e washing bronchiale
 - Agoaspirato con ago sottile trans-toracico percutaneo
 - Agoaspirato con ago sottile endobronchiale eco-guidato (EBUS) del tumore o dei linfonodi peri-tumorali
 - Agoaspirato con ago sottile trans-esofageo eco-guidato dei linfonodi mediastinici bassi
 - Versamento pleurico
 - Agoaspirato con ago sottile linfonodale
 - Agoaspirato con ago sottile di siti metastatici accessibili

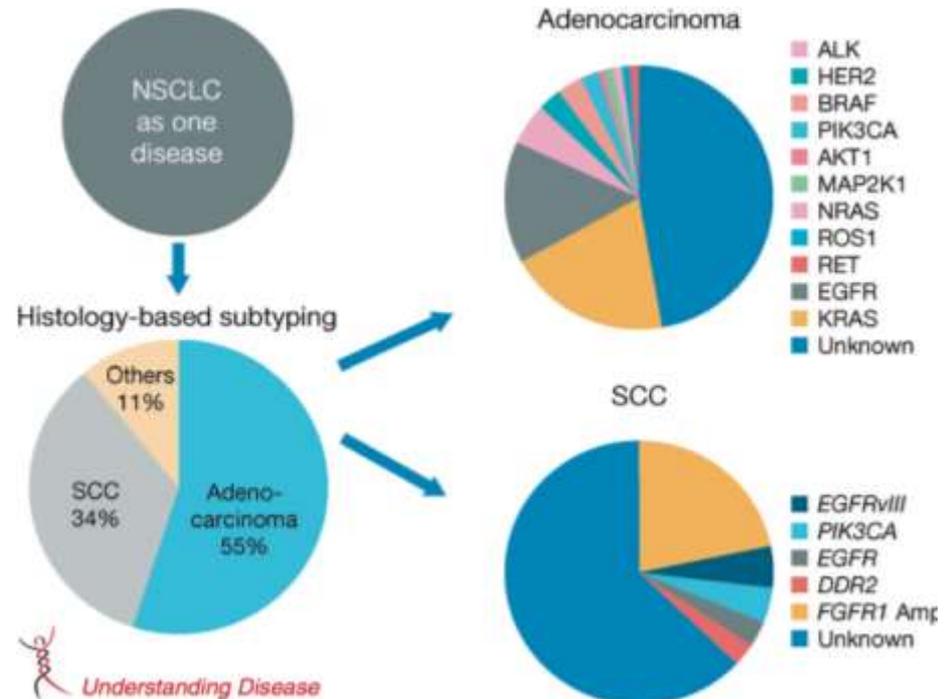


Drivers oncogenici nel NSCLC

- Mutazione in EGFR, KRAS, BRAF, HER2, TP53, RB
- Amplificazione in EGFR, HER2, MET, MYC
- Riarrangiamento genico in ALK, RET, ROS, NTRK1, NRG1

Terapie mirate per adenocarcinomi con:

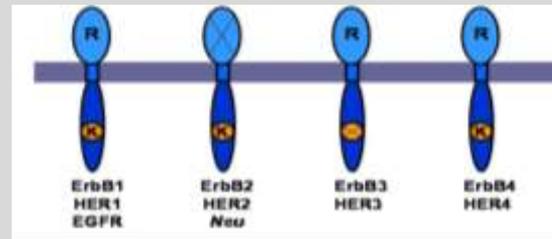
- Mutazioni di EGFR (Gefitinib, Erlotinib)
- Traslocazione di ALK (Crizotinib)



EGFR

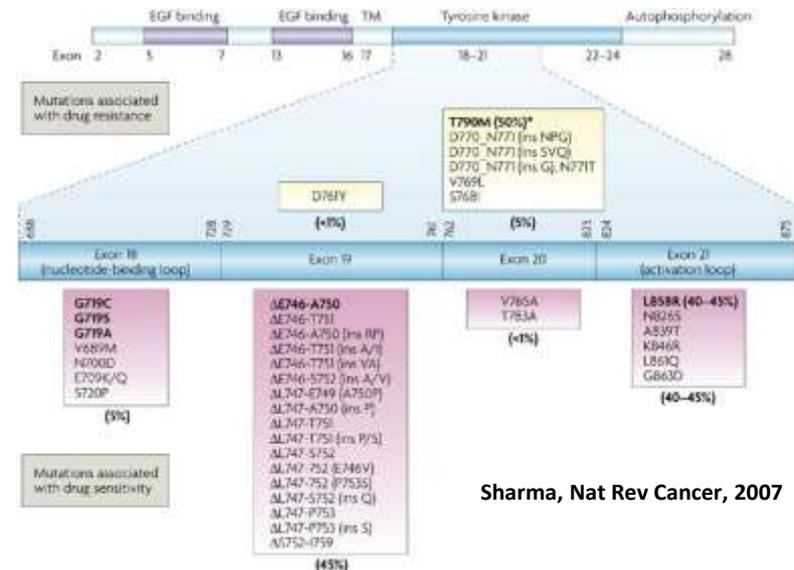
- Sede: cromosoma 7p11.2
- Codifica per un recettore di superficie tirosinchinasico.
- Le mutazioni puntiformi producono:
 - Attivazione costituzionale del recettore
 - Crescita incontrollata
 - Pathways di PI3K, AKT, RAS, RAF, MAPKI
 - Nei NSCLC:
 - D es.19
 - L858R es.21
- Espresso in diversi tumori solidi: testa-collo, ovaio, vescica, encefalo, mammella e polmone.

4 types of erbB receptors



11 ligands each with a common EGF like structure

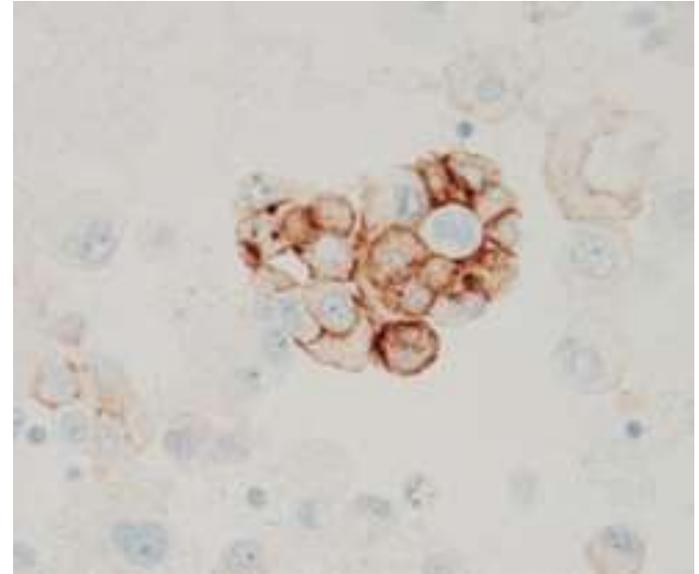
EGF
 TGF- α
 Amphiregulin
 Betacellulin
 Epiregulin
 HB-EGF
 Epigen
 Neuregulin 1 (NRG1)
 Neuregulin 2 (NRG2)
 Neuregulin 3 (NRG3)
 Neuregulin 4 (NRG4)



Sharma, Nat Rev Cancer, 2007

EGFR: metodi di indagine

- IHC:
 - Ab vs. L858R e E746-A750del (Cell Signal Technology)
 - Bassa sensibilità (ca.80%)
 - Specificità (99%)
- FISH:
 - Analisi del numero di copie geniche
- Sequencing, qPCR

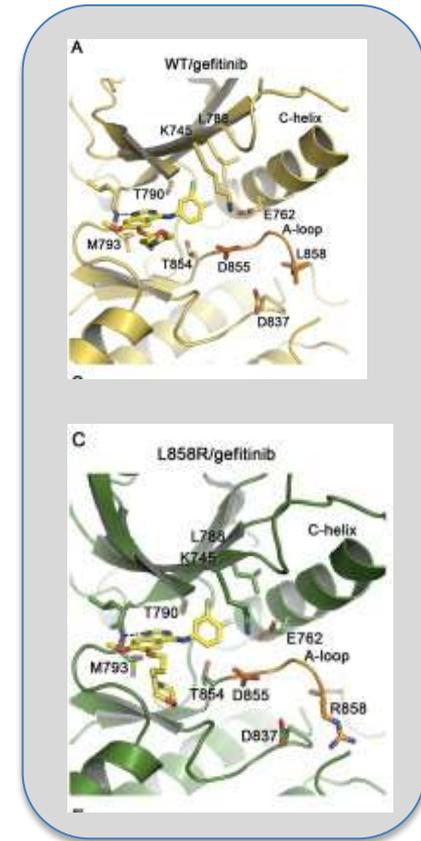


Diffusa positività di membrana per EGFR L858R su sezioni da cell blocks di liquido pleurico

EGFR: due strategie terapeutiche

- Ab monoclonali contro il dominio extracellulare, es: cetuximab, panituximab.
 - Ca colon retto
 - Ca squamoso testa-collo
- Piccole molecole contro il dominio chinasi intracellulare, es: gefitinib, afatinib.
 - NSCLC

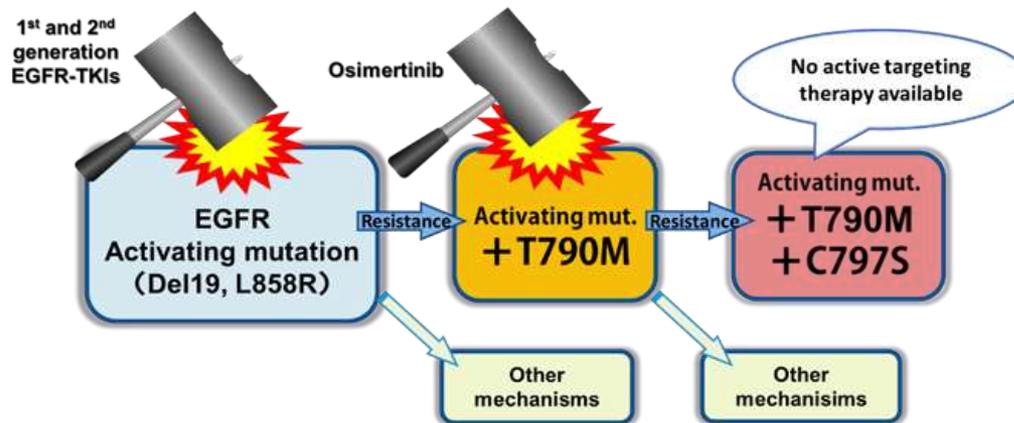
Drug Binding Modes in the Wild-Type and Mutant EGFR Kinase



Coinvolte interazioni di van der Waals favorevoli al legame del farmaco nel sito legante l' ATP della forma attiva che scompaiono in quella inattiva

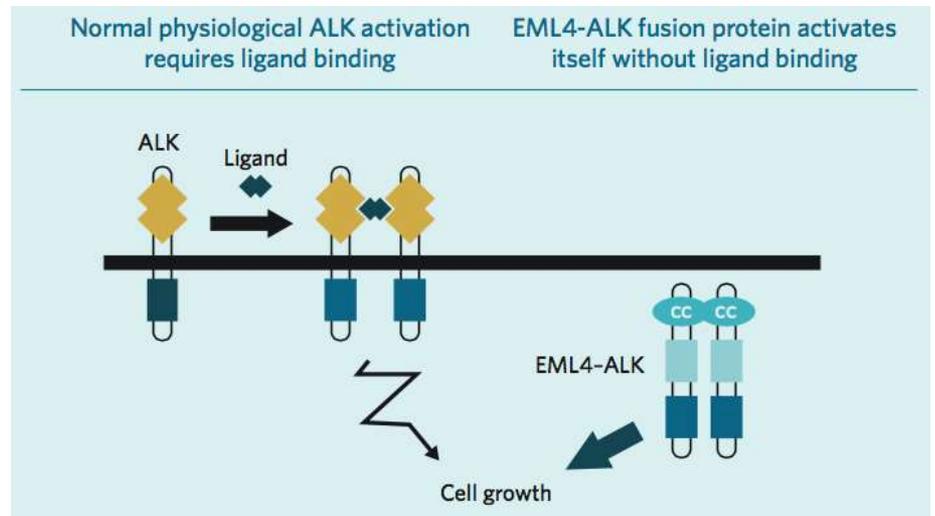
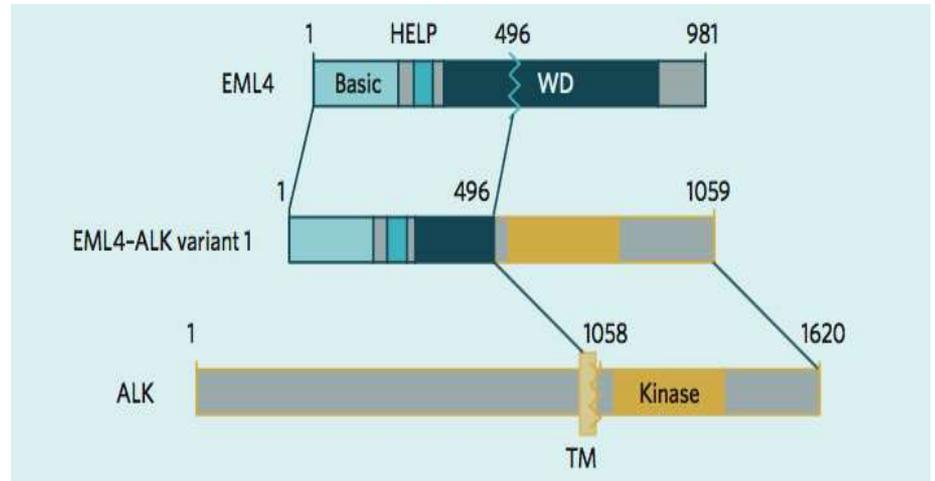
EGFR: resistenza acquisita

- Meccanismi di resistenza:
 - Seconda mutazione piu frequente nell'esone 20 (T790M)
 - Amplificazione di cMET
 - Cambio di istotipo
 - Mutazioni di altri geni della cascata intracellulare
- Inibitori di terza generazione
- In subset di pz. con T790M si sviluppa una terza mutazione nell'esone 20 C797S.



ALK

- Sede: cromosoma 2
- Codifica per un recettore di superficie tirosinchinasico appartenente alla famiglia RL.
- La traslocazione produce una proteina chimerica.
 - Attivazione costituzionale del recettore
 - Crescita incontrollata
- 3-7% degli adenocarcinomi
 - Soggetti più giovani
 - Più spesso non fumatori



Terapia mirata

Il crizotinib compete e spiazza la molecola di ATP

- Blocco della crescita tumorale
- Miglioramento delle condizioni generali
- Più lunga sopravvivenza

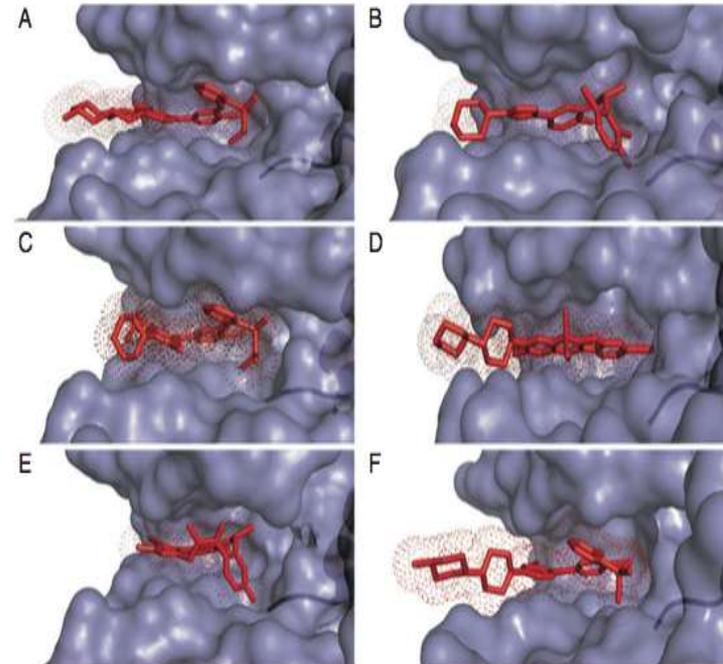
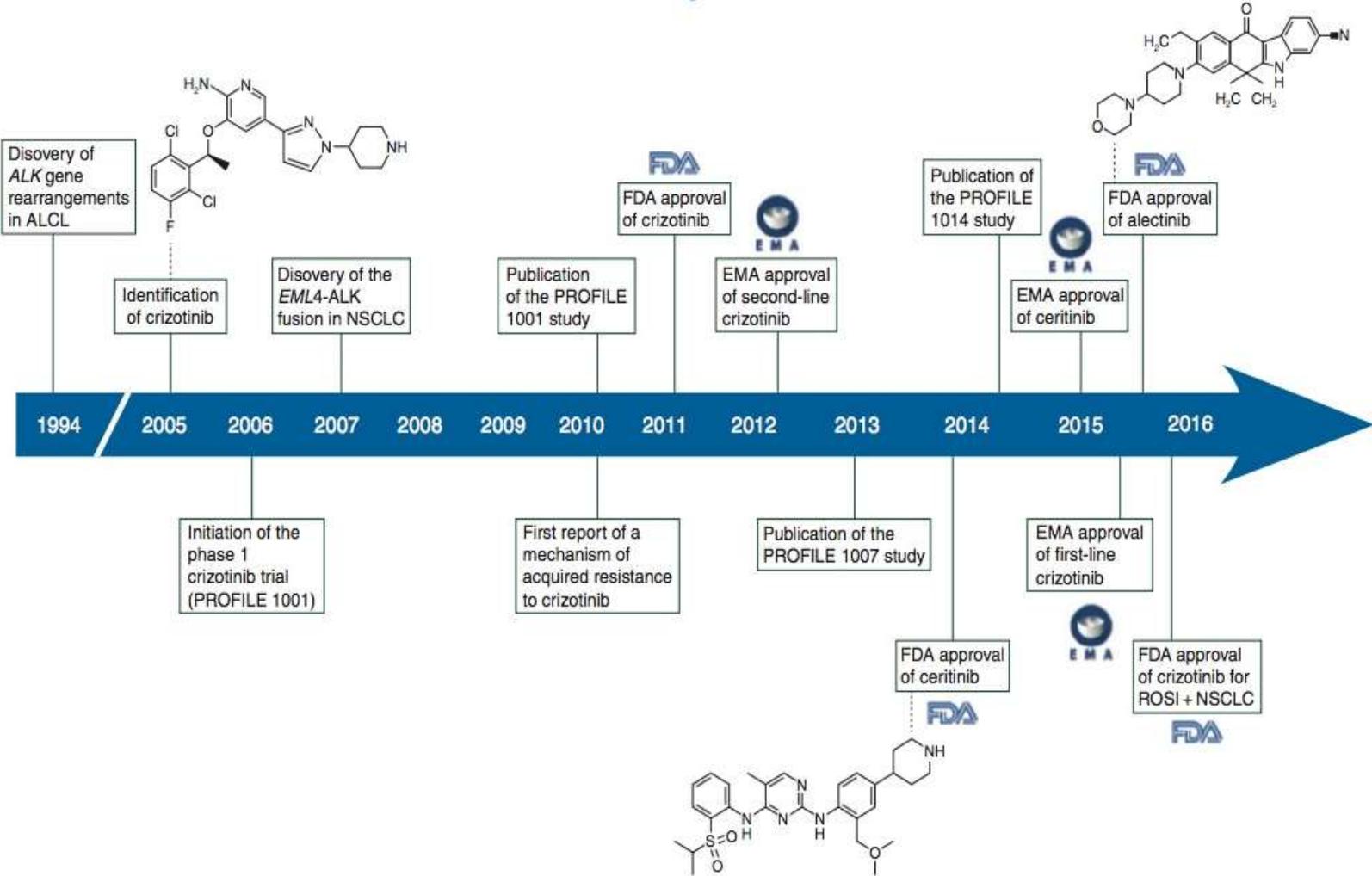
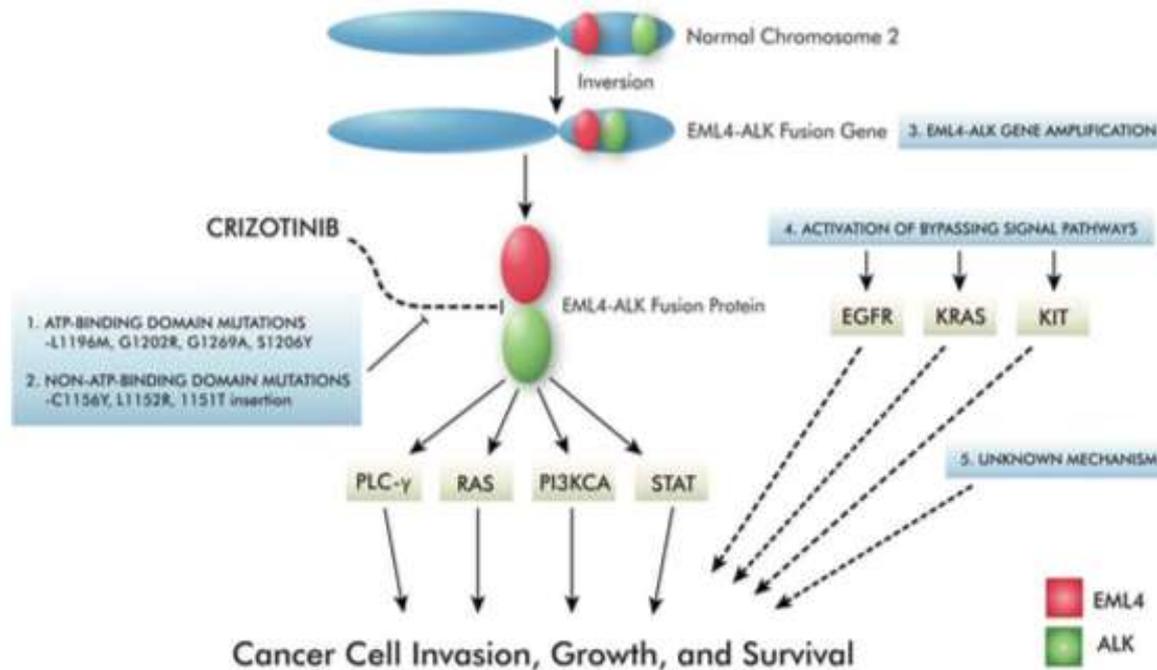


Figure 4. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in the ATP binding pocket of the ALK kinase domain. Visualisation of the ATP-binding pocket of the wild-type ALK kinase domain modelled with a selection of ALK TKIs, showing the variation in contact sites between different TKI molecules. (A) TAE684 (PDB: 2XB7) [111]. (B) Crizotinib (PF2341066, PDB: 2XP2) [112]. (C) Ceritinib (LDK378, PDB: 4MKC) [113]. (D) Alectinib (CH5424802, PDB: 3AOX) [114]. (E) Lorlatinib (PF06463922, PDB: 4CLI) [115]. (F). Brigatinib (AP26113, modelling kindly provided by Tianjau Zhou, ARIAD Pharmaceuticals) [116]. Figures were generated with PyMol showing the different inhibitors (*red*) interacting within the ATP binding pocket of ALK.

Inibitori di ALK: timeline



Meccanismi di resistenza



- La resistenza al farmaco si instaura dopo 11 mesi in media di trattamento
 - Nuove mutazioni emergenti
 - Eterogeneità tumorale
 - Amplificazione genica
- Molecole analoghe efficaci nella resistenza al crizotinib
 - Lorlatinib, Brigatinib, Alectinib, Ceritinib

ALK: metodi di indagine

IHC:

- Cloni: D5F3, 5A4, 1A4, ALK1
- Companion diagnostico: D5F3 con sistema di amplificazione Ventana (kit D5F3 Ventana)

D5F3, 5A4

- Alta sensibilità (100%)
- Alta specificità (99%)



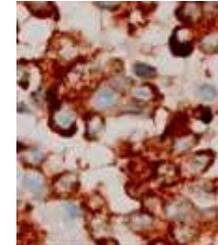
Score 0



Score 1



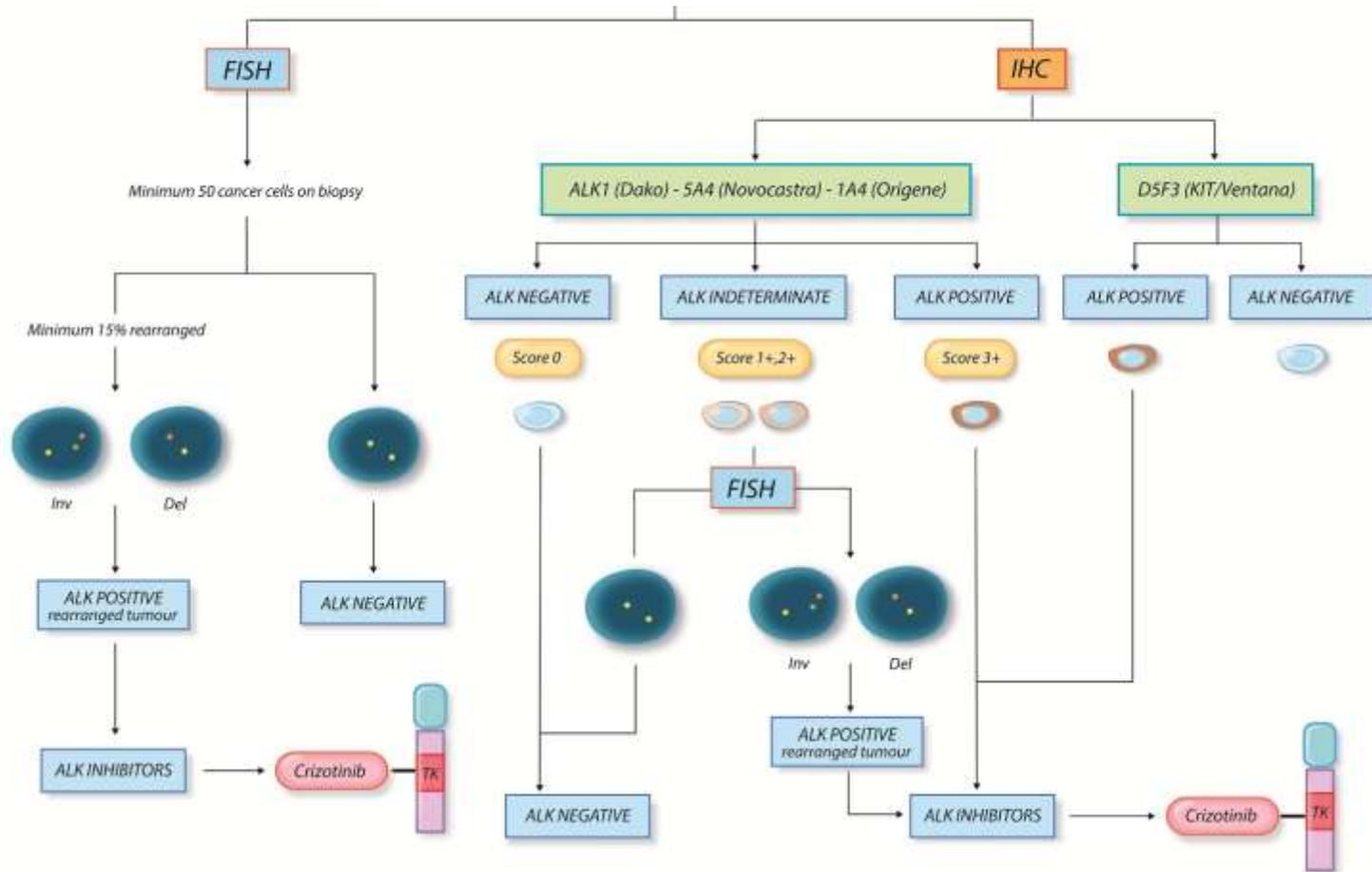
Score 2



Score 3

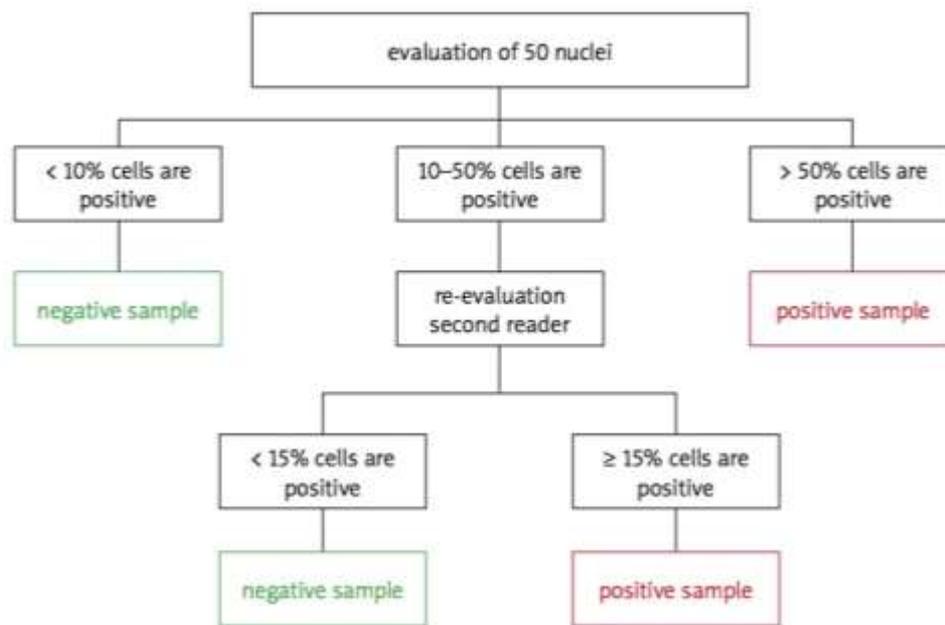
Diffusa e omogenea positività di membrana dei cloni ALK.

Riarrangiamenti di ALK
NSCLC non squamosi avanzati (Stadio III e IV)
NSCLC squamosi in non fumatori (Stadio III e IV)



ALK: metodi di indagine

FISH con sonda Break Apart



Algoritmo per la valutazione dei risultati.

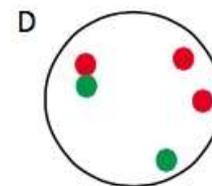
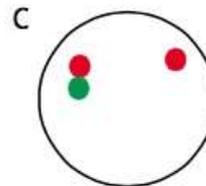
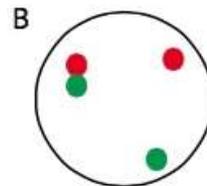
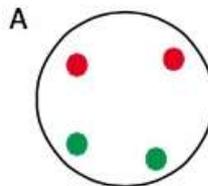
ALK riarrangiato:

A) due segnali distanti oltre due volte il diametro del più grande dei due segnali.

B) Un segnale fuso e due segnali singoli.

C) un segnale fuso e un segnale rosso con perdita del segnale verde per delezione del 5'.

D) Un segnale fuso e più di due segnali rossi e verdi.



Traslocazione del gene ALK in pazienti con Adenocarcinoma Polmonare selezionati dalla banca dati del Registro Tumori dell'ASP di Catanzaro (Lavecchia AM, Sutera A et al).

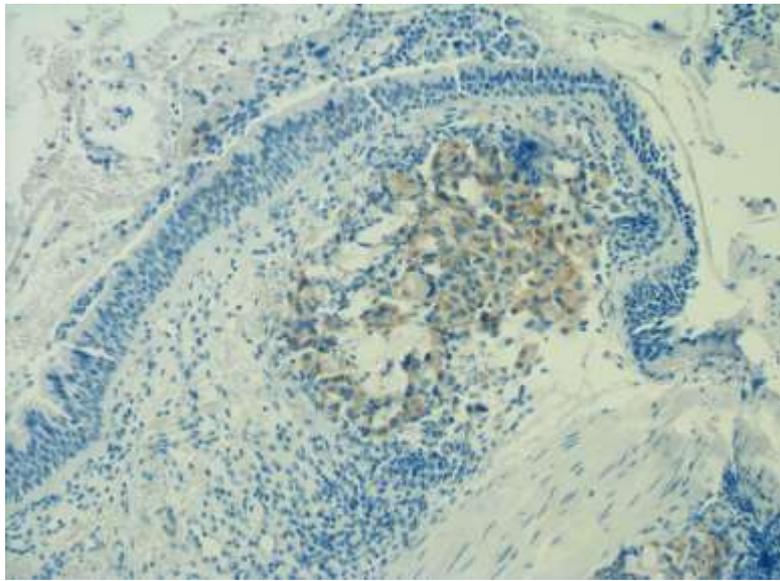
- 57 casi di adenocarcinoma
 - Rapporto M/F: 3/1 (43/14)
- Campioni in esame
 - Cell block 3 (5,2%)
 - Biopsie endoscopiche 34 (59,6%)
 - Biopsie chirurgiche 20 (35%)



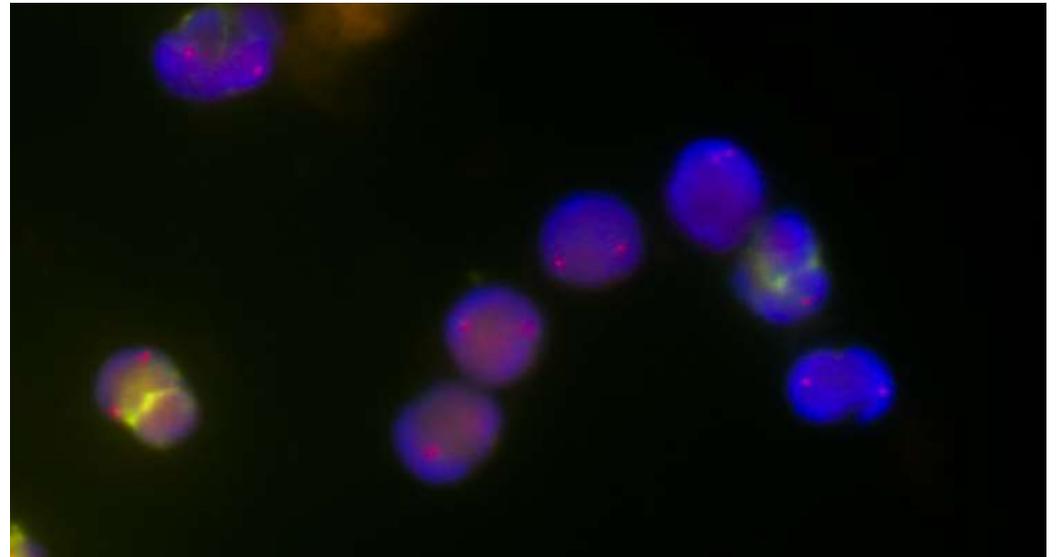
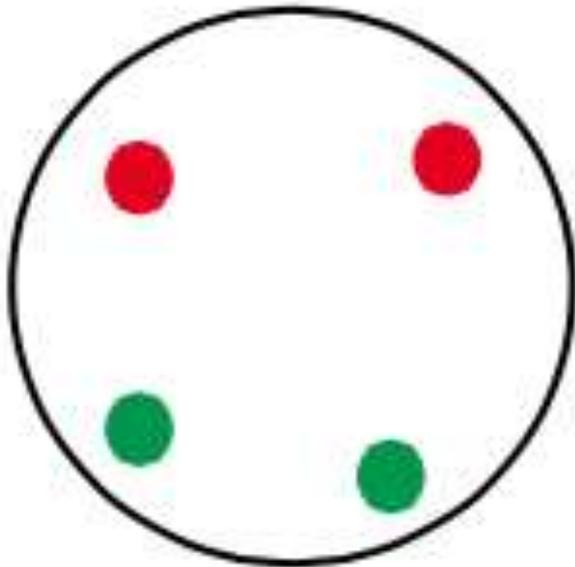
METODI

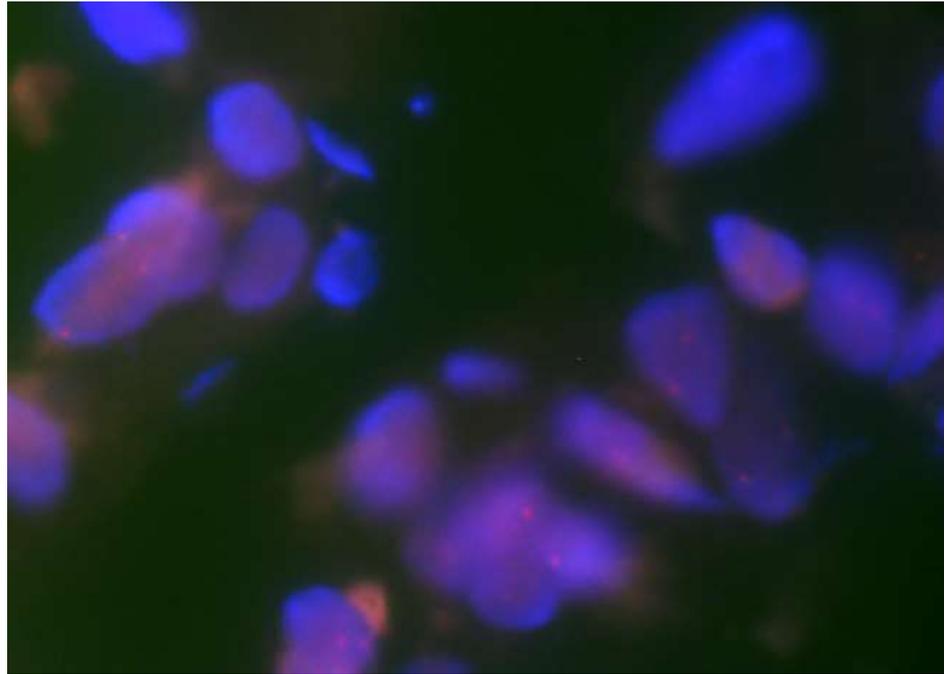
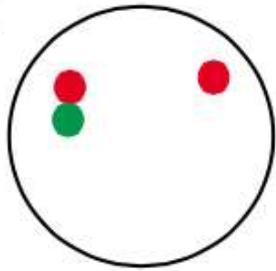
- Immunoistochimica
 - CD246, ALK1protein (1:50) (Dako)
 - Sistema di rivelazione Envision High Ph
 - Autostainer Link48
- ALK FISH DNA Probe Split Signal (Dako)
 - Sezioni da 4 micron
 - Green: ALK 5'
 - Orange: ALK 3'

IHC: ALK1 +



FISH ALK: positivo traslocazione





FISH ALK: Positivo per delezione al 5'

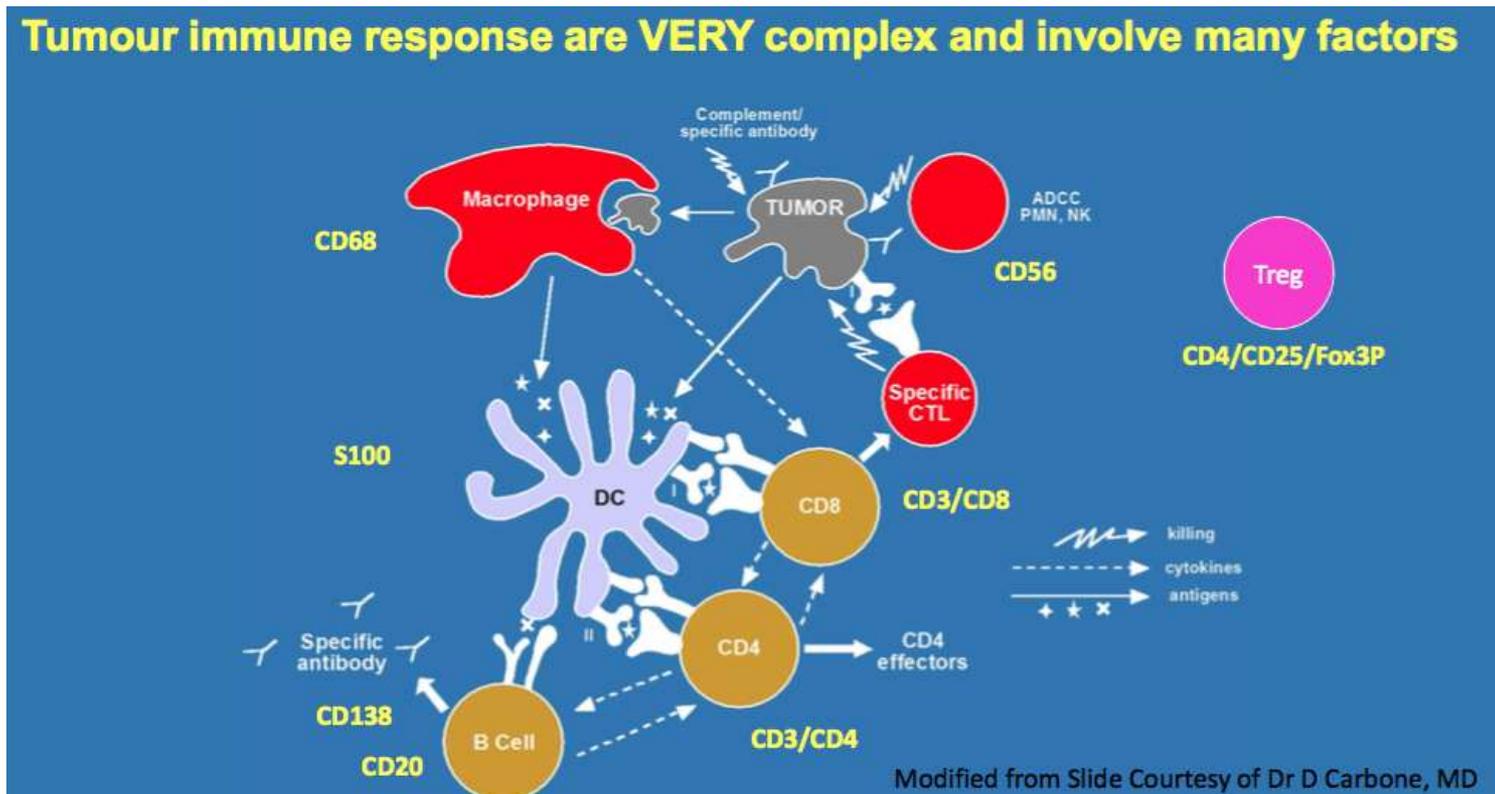
RISULTATI

Sesso	Età	Materiale	Istotipo	Stadio	CT/RT	OS	FISH	IHC
M	48	b. endosc.	adenoCa solido	IIIA	no	6 m	Trasl.	pos
M	69	citoincluso	adenoCa NOS	IV	si	14 m	Del 5'	neg
M	74	b. endosc.	adenoCa solido	IV	no	ukn	Trasl.	neg

Incidenza di traslocazione di ALK pari al 5,2 %

Il check-point immunitario PD-1/PD-L1

- I meccanismi di insorgenza e progressione dei tumori coinvolgono il sistema immunitario e in particolare il microambiente immunologico del tumore alterando i check-point immunitari dell'ospite.



PD-1

- PD-1 è una proteina trans-membrana membro della famiglia dell'immunoglobulina CD28/Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4), uno dei più importanti recettori inibitori espressi dai linfociti T.
- PD-1 è espresso da linfociti T e B, monociti, cellule NK, cellule dendritiche e dai linfociti intratumorali (TIL)
- PD-1 ha due ligandi: PD-L1 (CD274) e PD-L2 (CD273)



PD-L1

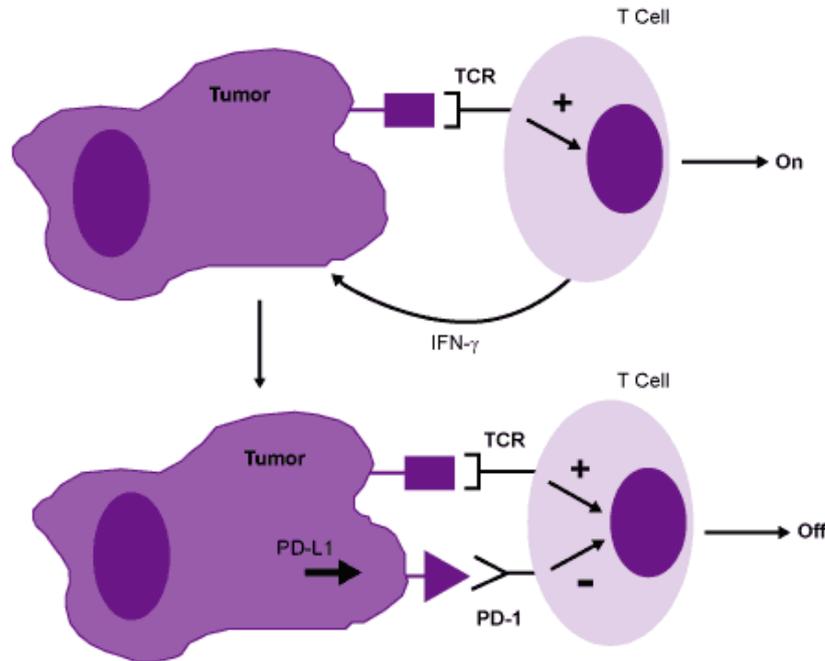
- PD-L1 è espresso su linfociti T inattivi, linfociti B, cellule dendritiche e macrofagi, endoteli vascolari e le cellule delle isole pancreatiche
- PD-L1 risulta espresso in numerose neoplasie (NSCLC, melanoma, carcinoma renale, carcinoma gastrico, carcinoma epatocellulare, leucemie, mielomi e altri tumori).
- PD-L1 è presente nel citoplasma e a livello di membrana delle cellule neoplastiche in modo non uniforme
- PD-L1 è indotta da numerose molecole pro-infiammatorie (IFN-gamma, TNF-alfa, GM-CSF, VEGF, citochine IL-10, IL-4 prodotte da linfociti T e da cellule stromali del microambiente tumorale).

PD-L2

- PD-L2 è espresso prevalentemente su macrofagi e cellule dendritiche, cellule che presentano l'antigene con un ruolo di regolazione dell'attivazione e polarizzazione dei linfociti T.
- PD-L2 è meno presente sulle cellule neoplastiche.

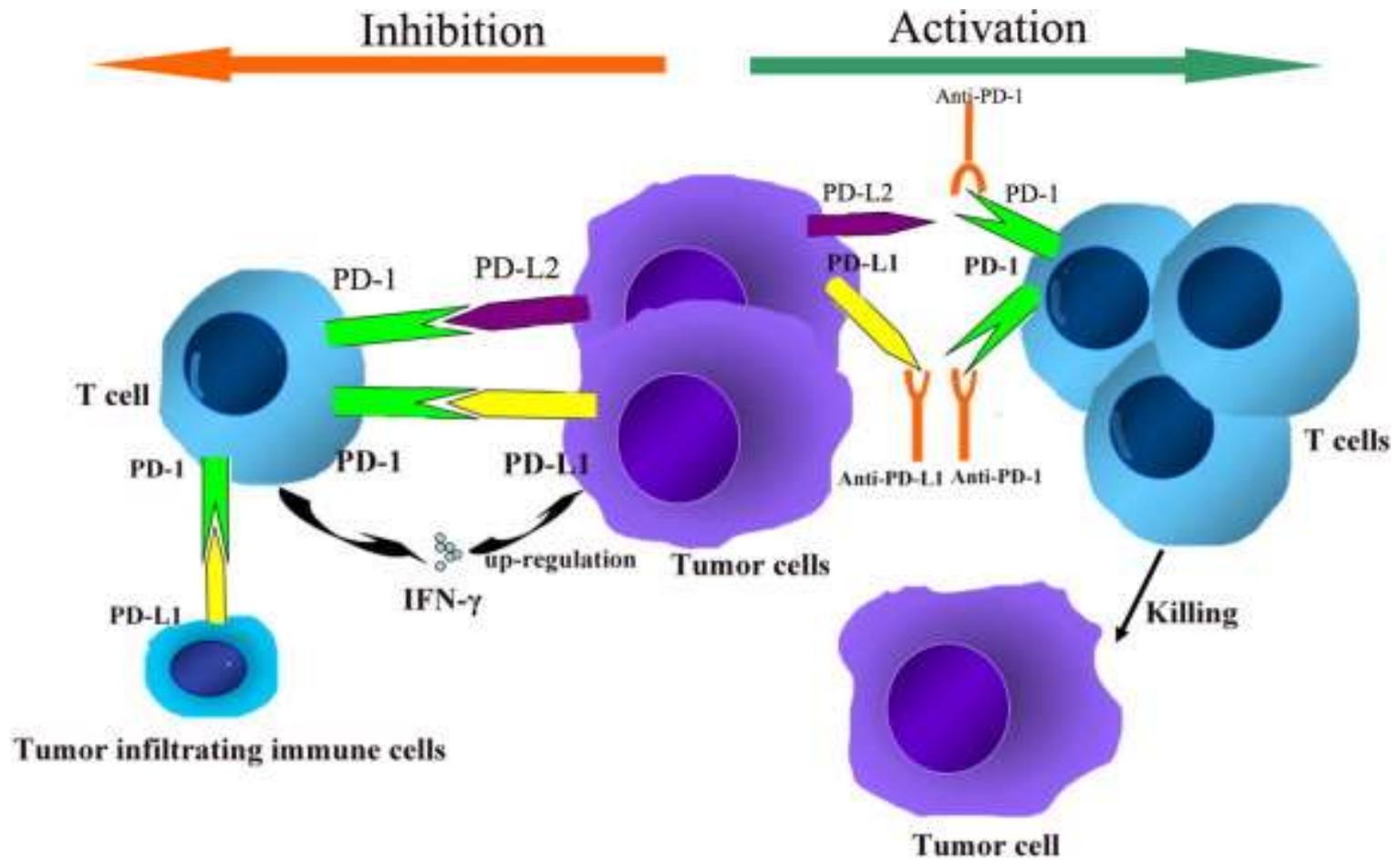
Meccanismo di escape

- Le cellule neoplastiche producono neoantigeni che il SI riconosce come estranei attivando la risposta immunitaria mediata dai linfociti T citotossici contro le cellule tumorali.
- A questo punto le cellule neoplastiche upregolano la produzione di molecole di superficie capaci di legarsi ai recettori linfocitari e di bloccare l'attivazione dei linfociti T citotossici.



PD-1/PD-L1

- Oggi, il pathway PD-1/PD-L1 costituisce il meccanismo più importante nello sviluppo di farmaci immunoterapici nel NSCLC.
- anticorpi monoclonali contro:
 - PD-1: es. nivolumab e pembrolizumab
- anticorpi monoclonali contro:
 - PD-L1: es. atezolizumab e durvalumab.



PD-1/PD-L1

2016

- Companion diagnostic nel NSCLC per Keytruda (pembrolizumab; Merck & Co) - Agilent/Dako PD-L1 IHC 22C3 pharmDx test.
- Complementary diagnostics per il NSCLC e per il melanoma per Opdivo (nivolumab; Bristol-Myers Squibb) – Agilent/Dako PD-L1 IHC 28-8 pharmDx test.
- Complementary diagnostics per i carcinomi ureteliali per il Tecentriq (atezolizumab; Roche) - Ventana PD-L1 (SP142) assay

2017

- Complementary diagnostics per i carcinomi ureteliali IMFINZI™ (durvalumab; Roche) - Ventana PD-L1 (SP263) Assay
- FDA test di supporto per la risposta ma non necessario per la selezione, per l'elevato tasso di risposta nei PD-L1 positivi, con la presenza di una sottopopolazione di PD-L1 negativi che risponde alla terapia.

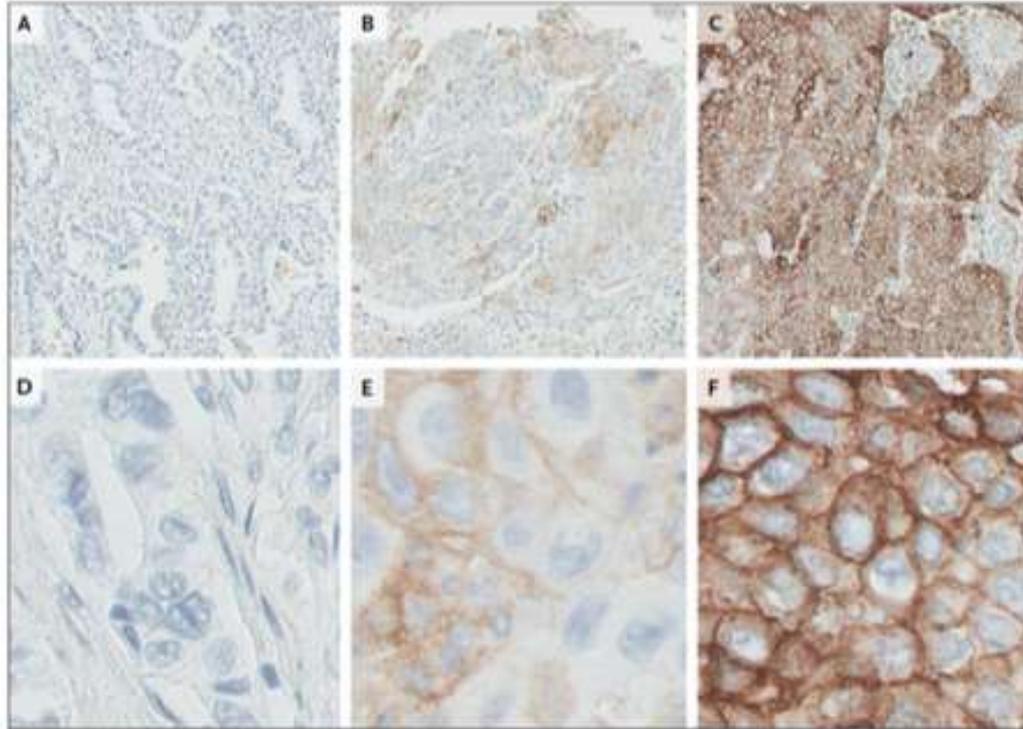
PD-L1

- l'espressione immunoistochimica di PD-L1 sulle cellule neoplastiche miglior marcatore predittivo di risposta clinica agli agenti immunoterapici
- cloni 22C3 e 28-8 (Agilent/DAKO) SP142 e SP263 (Ventana/Roche)
- intensità di espressione, percentuale di cellule neoplastiche, combinazione di intensità e percentuale (H-score)

PD-L1

- Studio KEYNOTE-024: efficacia della chemioterapia con pembrolizumab nella prima linea di trattamento del NSCLC in stadio avanzato
 - EGFR wild-type e ALK negativo
 - PD-L1 (clone 22C3) $\geq 50\%$, senza nessun riferimento al tipo di intensità di reazione evidenziata (da 1+ a 3+).
- PD-L1 $\geq 1\%$ potrebbe rappresentare il cut-off nel trattamento in seconda linea del pembrolizumab.

22C3 Ab



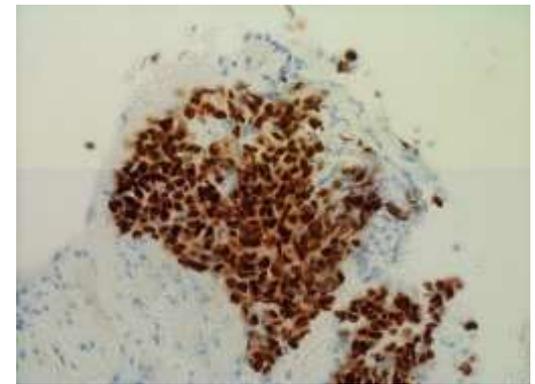
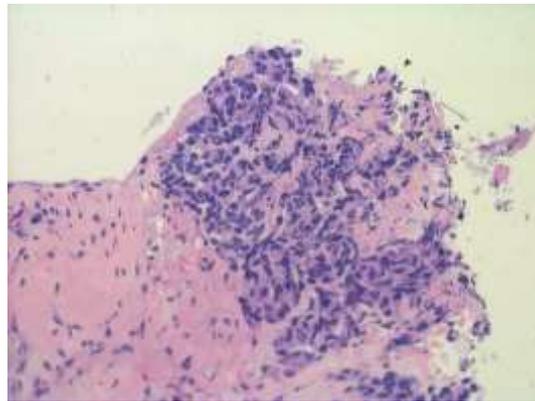
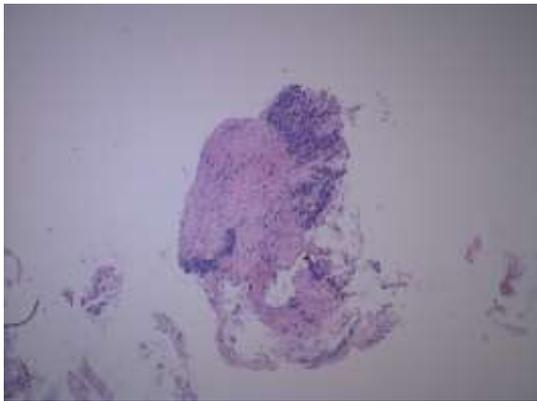
CRITICITA'

- Differenti cloni da utilizzare

	Pembrolizumab Merck	Nivolumab Bristol-Myers Squibb	Atezolizumab Roche/Genentech	Durvalumab AstraZeneca	Avelumab Pfizer/Merck Serono
Sample Source and Collection	PD-L1 Assay	Dako automated IHC assay (28-8 Ab)	Central laboratory IHC assay Ventana PD-L1 (SP142)	Ventana automated IHC (BenchMark ULTRA using Ventana PD-L1 (SP263) clone)	Dako assay Clone 73-10
	Surface expression of PD-L1 on tumour specimen	Surface expression of PD-L1 on tumour cells	Surface expression of PD-L1 on TILs or tumour cells	Surface expression of PD-L1 on tumour cells	Surface expression of PD-L1 on tumour cells
	Ph I: Fresh or archival tissue	Archival or fresh tissue	Archival or fresh tissue	Unknown	Unknown
Definition of Positivity*	<p>IHC Staining: Strong vs weak expression PD-L1 expression required for NSCLC for enrollment Note that one arm of KEYNOTE 001 trial requires PD-L1+ tumours</p> <p>Tumour PD-L1 expression: 50% PD-L1+ cut-off: 32% (41/129) 1 49% PD-L1+ cut-off: 36% (46/129)</p>	<p>IHC Staining: Strong vs weak expression Patients not restricted by PD-L1 status in 2nd- & 3rd-line Ph III 1st-line trial in PD-L1+</p> <p>Tumour PD-L1 expression: 1% PD-L1 + cut off 5% PD-L1+ cut-off: 59% (10/17) 5% PD-L1+ cut-off: 49% (33/68) 10% PD-L1 + cut off</p>	<p>IHC Staining Intensity (TC: 0, 1, 2, 3): IHC 3 (≥50% PD-L1+) IHC 2,3 (≥5% PD-L1+) IHC 1,2,3 (≥1% PD-L1+) IHC 0,1,2,3 (all patients with evaluable status)^{6,7} PD-L1 expression required for NSCLC for enrolment in Ph II trials</p> <p>IC: TIL PD-L1 expression: IHC 3 (≥10% PD-L1+): 11% (6/53) PD-L1 low (IHC 1, 0): 62% (33/53)</p>	<p>IHC Staining Intensity: Not presented to date</p> <p>Tumour PD-L1 expression: PD-L1 + cut off 25%</p> <p>PD-L1+: 34% (20/58) PD-L1: 50% (29/58)</p>	<p>IHC Staining Intensity: Not presented to date</p> <p>Tumour PD-L1 expression (all doses): PD-L1 + cut off 1%</p> <p>PD-L1+: 34% (20/58) PD-L1: 50% (29/58)</p>

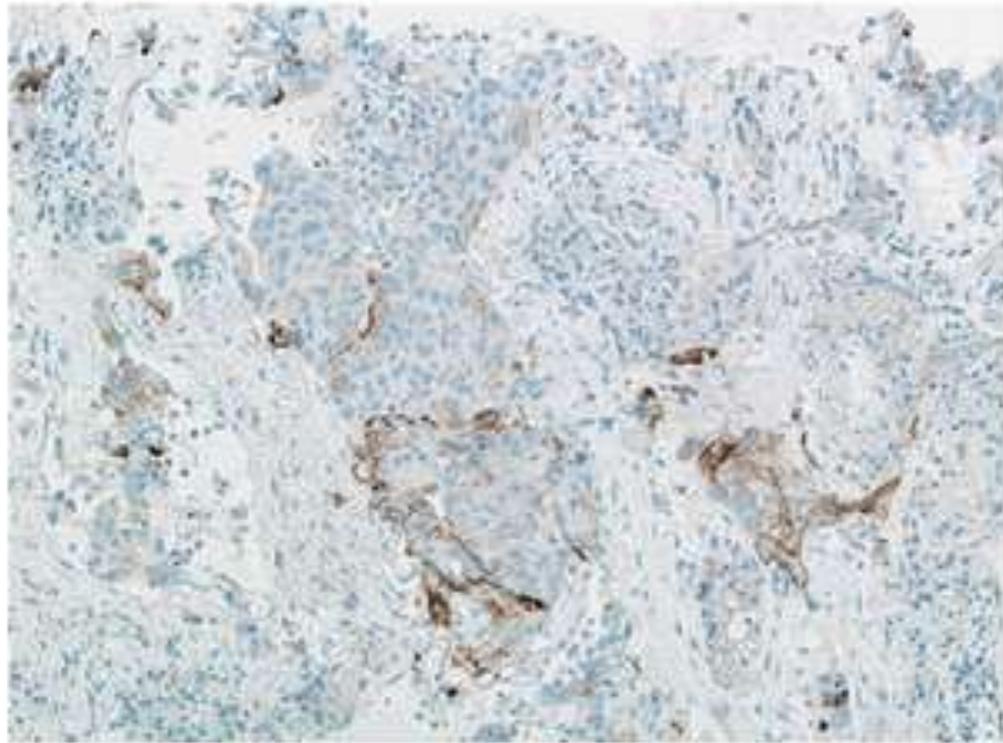
CRITICITA'

- Limitata quantità di tessuto



CRITICITA'

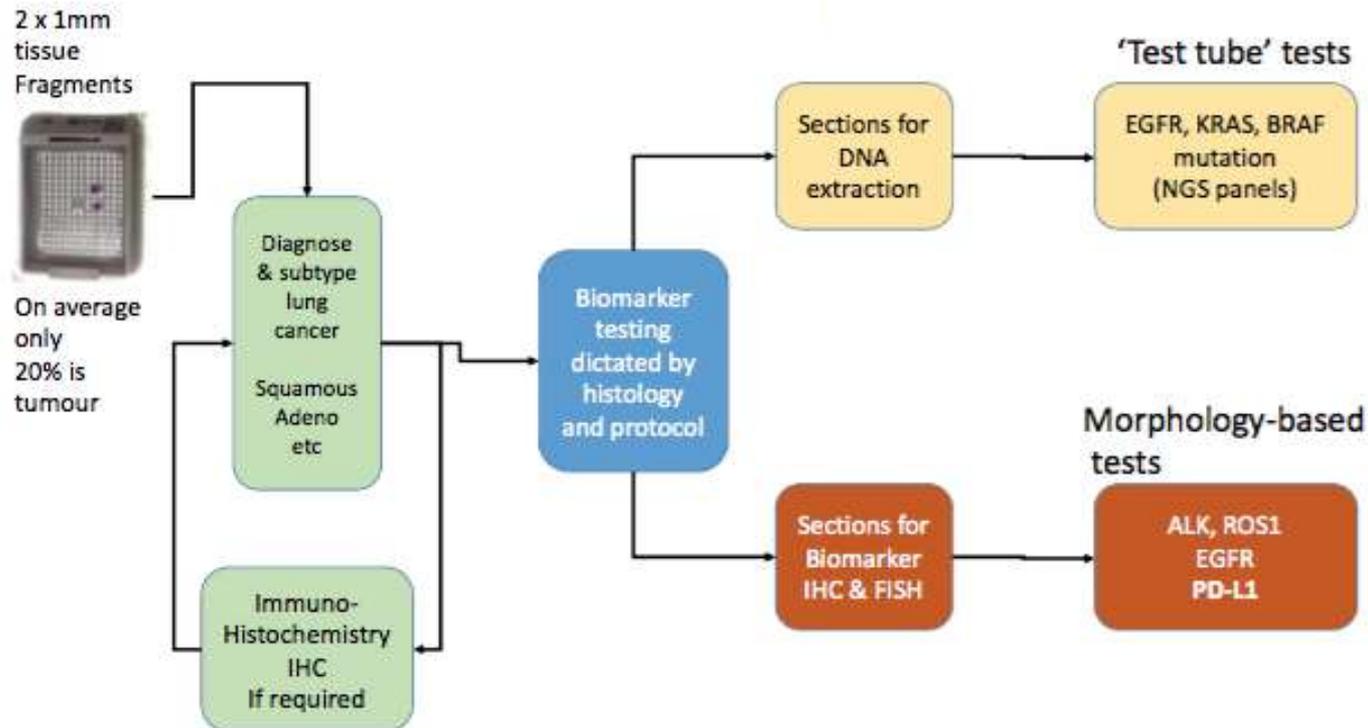
- Eterogeneità di colorazione



CRITICITA'

- Standardizzazione del test e interpretazione dei risultati.
 - Almeno 100 cellule vitali
 - Colorazione lineare di membrana
 - Intensità di colorazione
 - Percentuale di cellule
 - Valutazione della componente cellulare stromale reattiva.

Algoritmo diagnostico nel NSCLC



Effettuare il test

- alla diagnosi di NSCL avanzato
- sempre nei SCC
- dopo EGFR ed ALK negli adenocarcinomi

Conclusioni

- La necessità di ottenere molte informazioni da campioni sempre più piccoli comporta da un lato una gestione ottimale dei tessuti, dall'altro l'acquisizione di nuove conoscenze tecniche e scientifiche, con la consapevolezza che un errore di procedura o di interpretazione può incidere pesantemente su scelte terapeutiche e sull'outcome di malattie finora ritenute incontrollabili.
- Tutto questo impatta inoltre con i mezzi economici a disposizione.
- Il continuo scambio di informazioni in una gestione multidisciplinare costituisce probabilmente il presupposto per ottimizzare costi e risultati.