



Du transfert en clinique des techniques moléculaires à haut débit aux prescriptions hors AMM

Pr Alexis Cortot

Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique, CHRU Lille

Institut de Biologie de Lille

Cours du GOLF, Paris, 10 octobre 2018

Liens d'intérêt

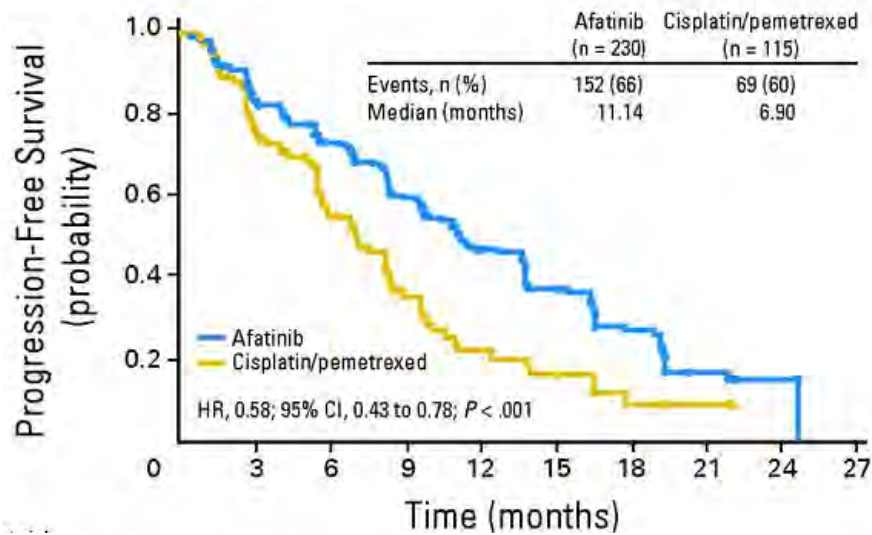
- Activité de conseil ou honoraires au cours des deux dernières années pour les sociétés suivantes : Astra-Zeneca, Boehringer-Ingelheim, BMS, Merck, MSD, Novartis, Pfizer, Takeda

Principe de la médecine de précision

- Cibler les mécanismes responsables de la croissance tumorale peut améliorer le pronostic des patients
- Ces mécanismes sont *individuels*
- Objectif : identifier les mécanismes de carcinogenèse à l'échelle individuelle afin de proposer un ciblage thérapeutique optimal

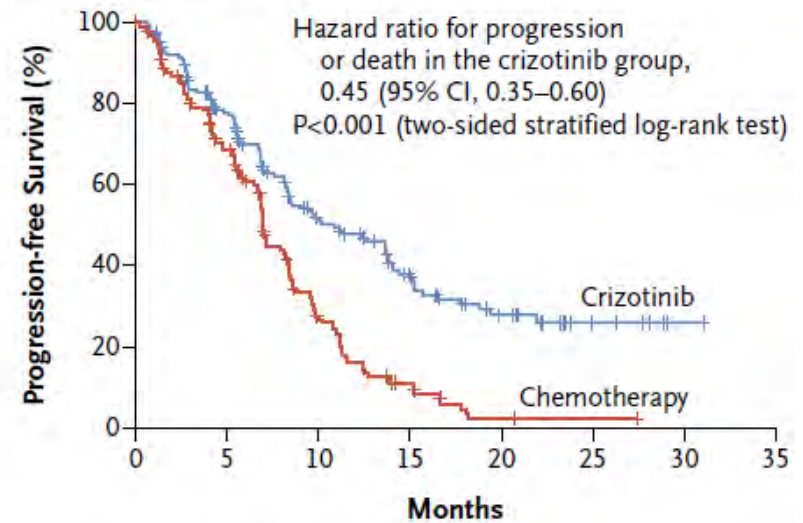
Les succès de la médecine de précision

Mutation EGFR



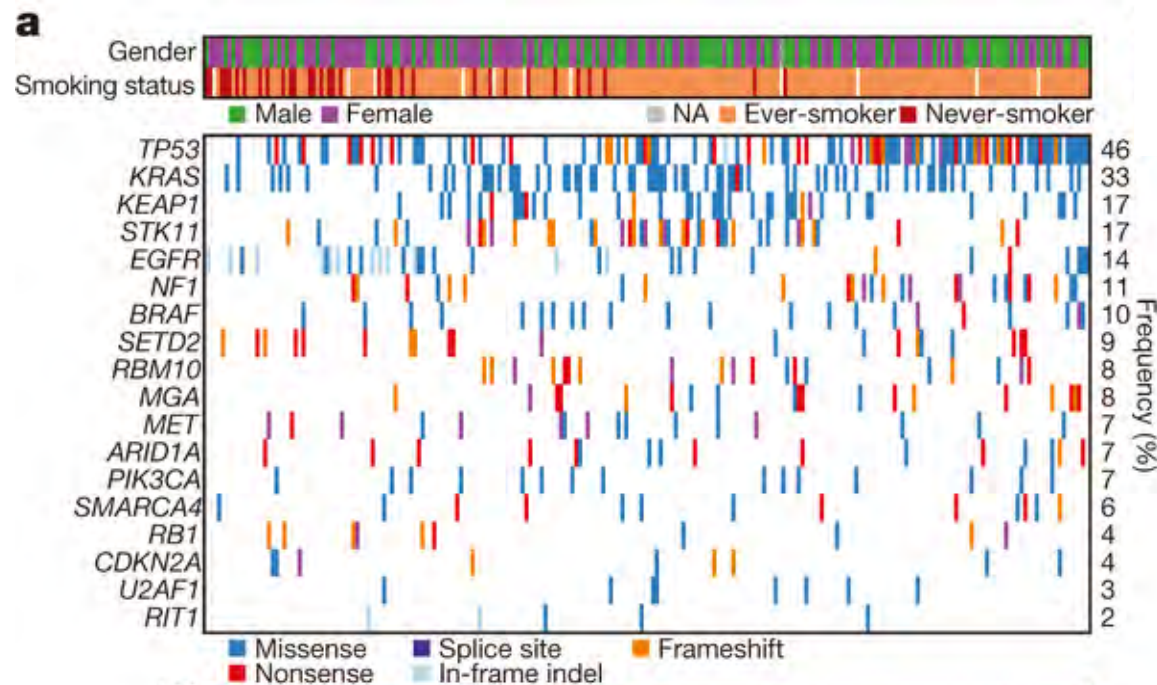
Réarrangement ALK

Progression-free Survival

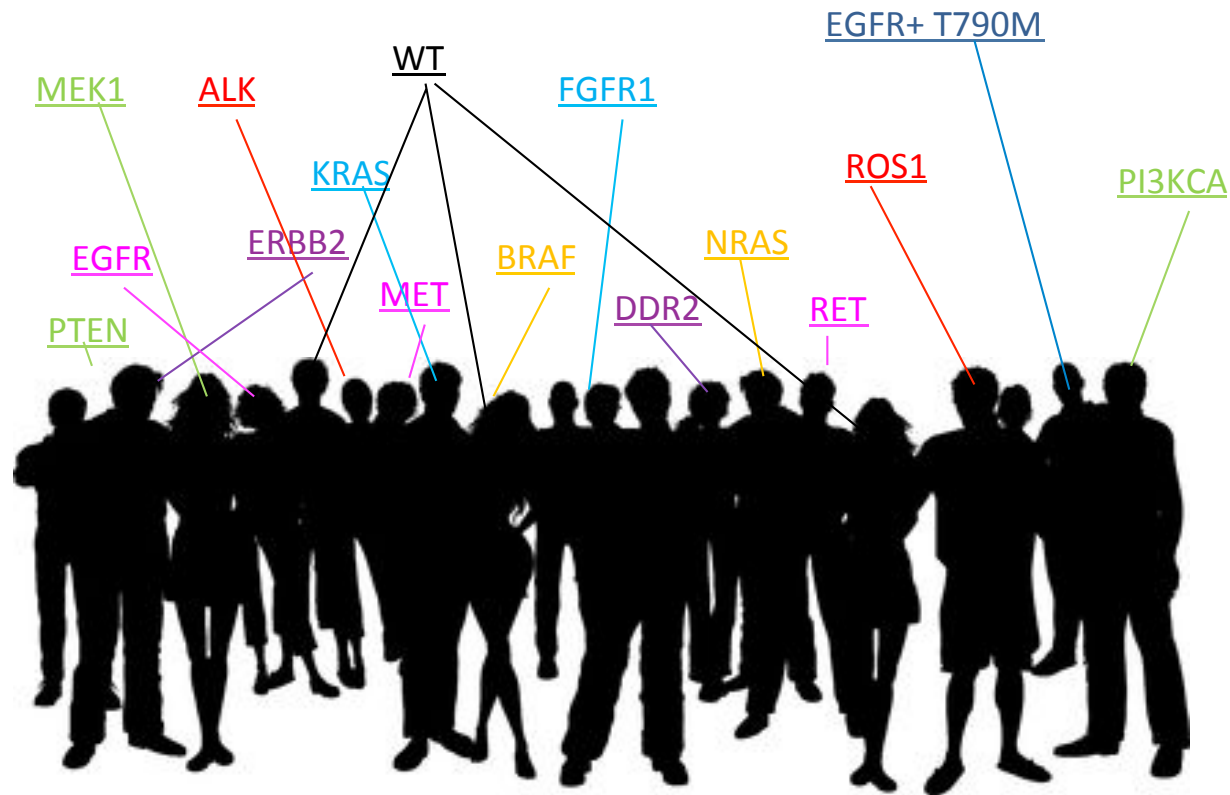


Les succès de la médecine de précision

- Peut-on étendre le principe à d'autres mutations?



Cancérologie moderne : une cible pour tous



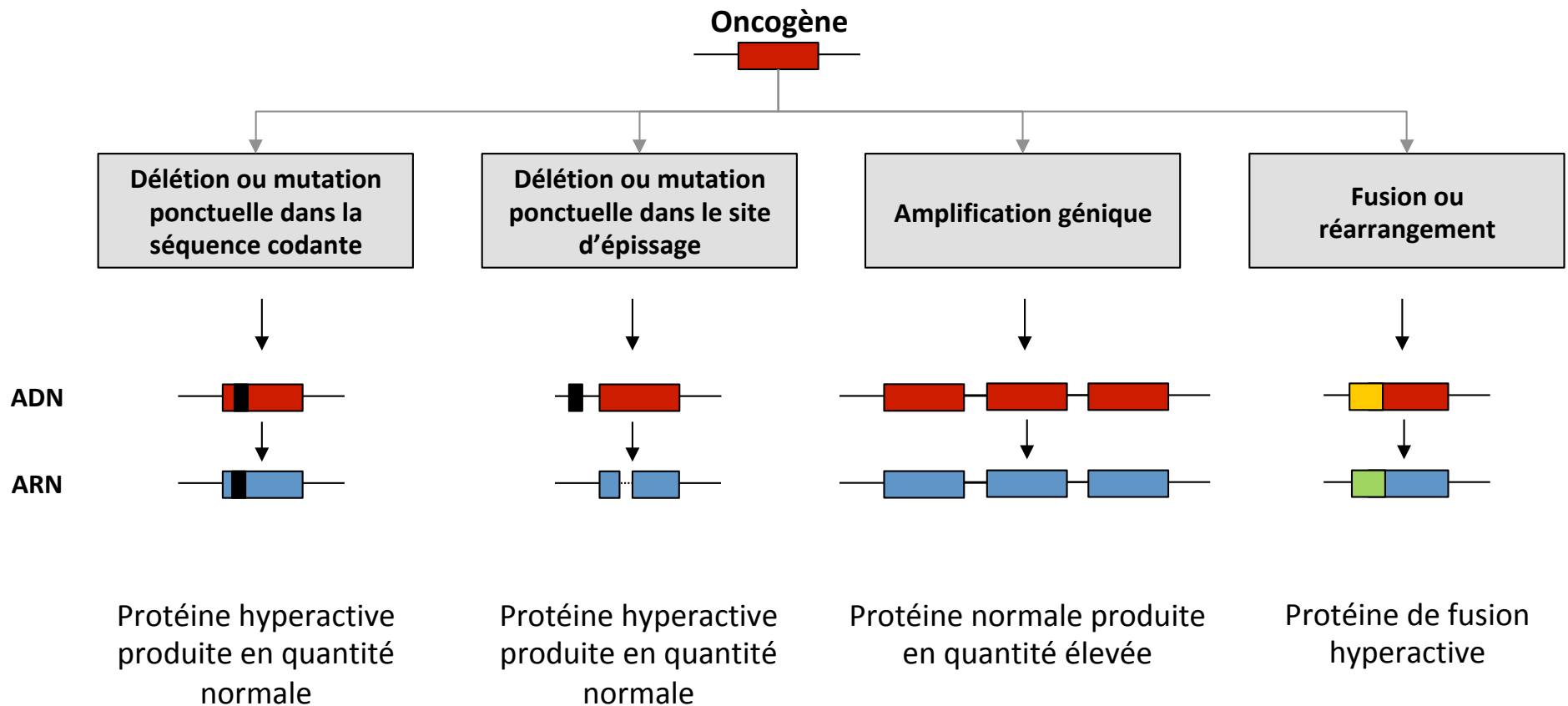
Développement de la médecine de précision

- Peut-on étendre le principe à d'autres mutations?
 1. Identifier les altérations d'intérêt
 2. Déterminer in vitro/in vivo les traitements actifs en présence de cette altération
 3. Mettre en place les tests permettant de rechercher cette altération
 4. Favoriser l'accès au traitement et confirmer son efficacité

Développement de la médecine de précision

- Peut-on étendre le principe à d'autres mutations?
 1. Identifier les altérations d'intérêt
 2. Déterminer in vitro/in vivo les traitements actifs en présence de cette altération
 3. Mettre en place les tests permettant de rechercher cette altération
 4. Favoriser l'accès au traitement et confirmer son efficacité

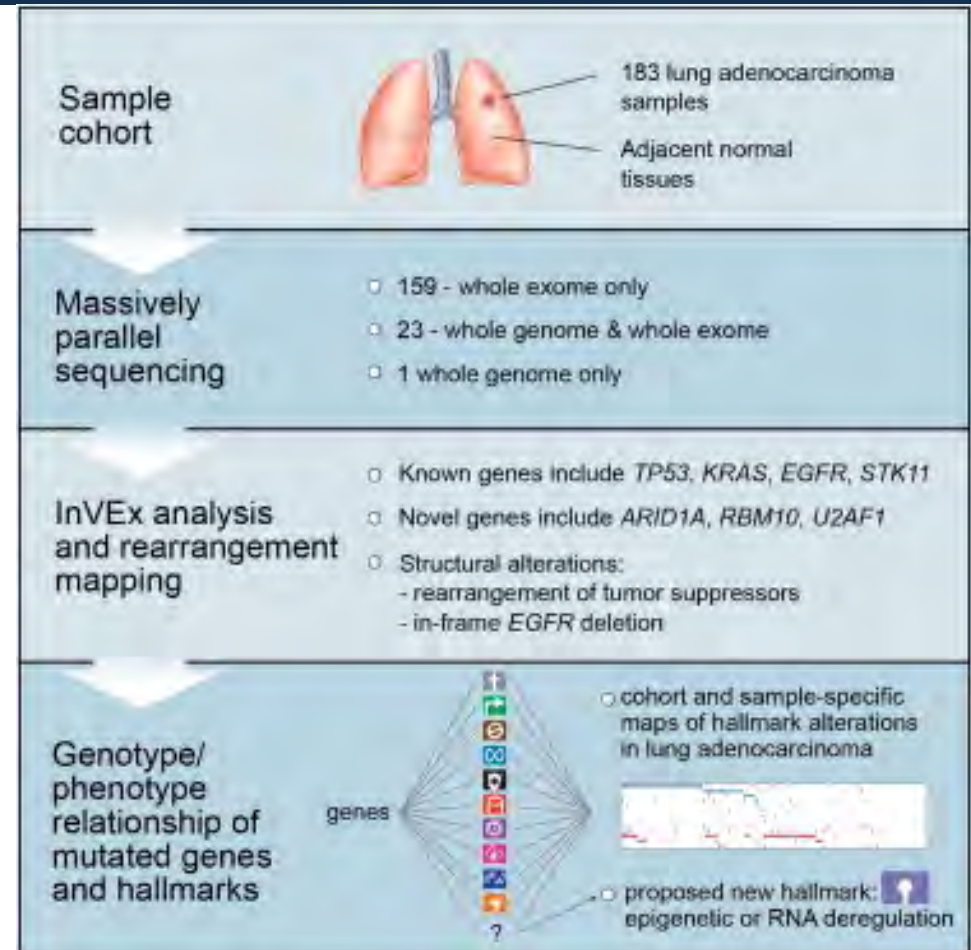
Le cancer est une maladie du génome



Identifier de nouvelles cibles

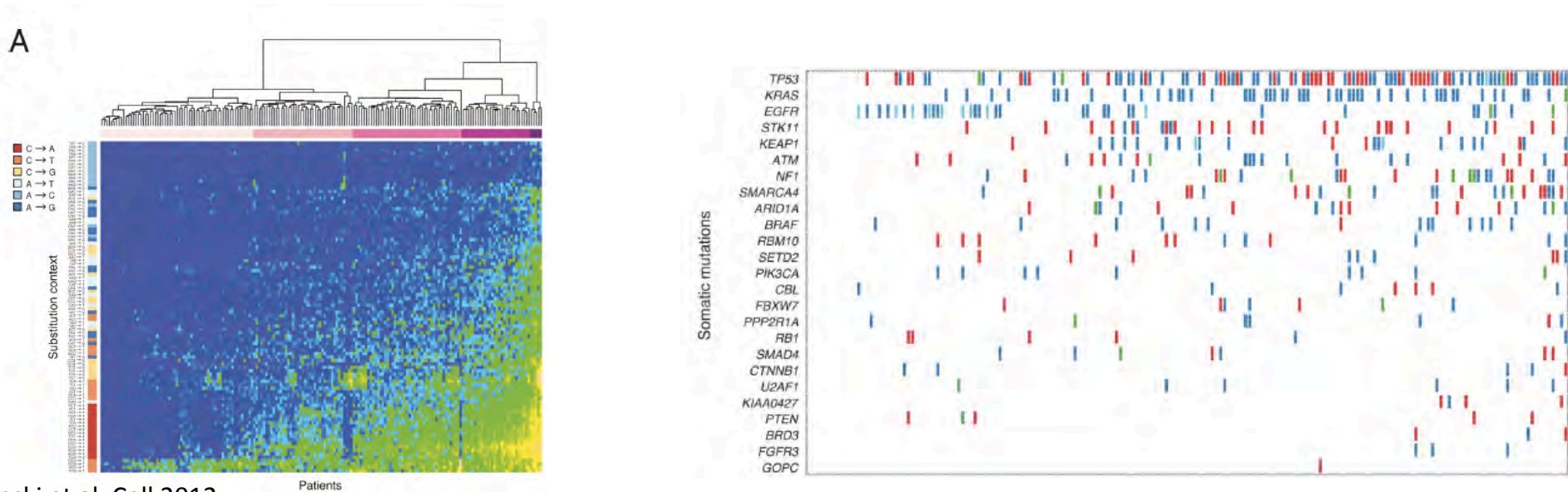
Comment identifier de nouvelles cibles?

Programmes de recherche dédiés



Identifier de nouvelles cibles

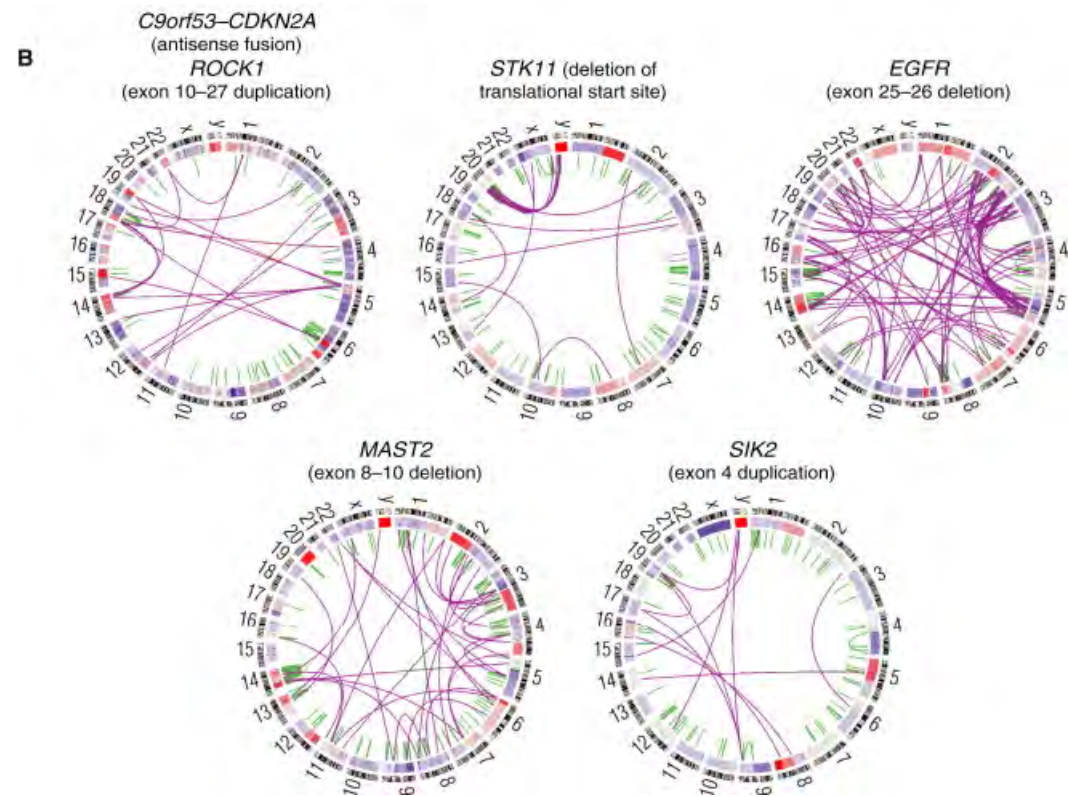
- De nombreuses mutations sont détectées dans l'ADN d'un adénocarcinome pulmonaire
- Distinguer les mutations non silencieuses (qui entraînent une modification de l'ARN et de la protéine) des mutations silencieuses
- Limiter l'analyse aux gènes d'intérêt (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs)



Imielinski et al. Cell 2012

Identifier de nouvelles cibles

- Recherche d'amplifications (CGH)
- Recherche de réarrangements (RNAseq)



Identifier de nouvelles cibles

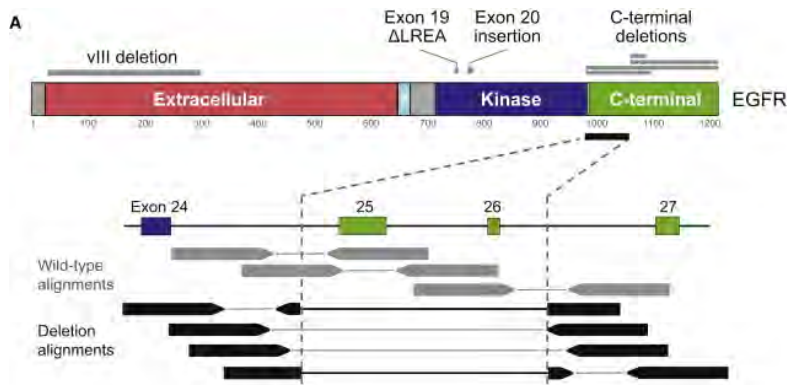
Table 1. Recurrent Molecular Alterations in Lung Adenocarcinoma, Squamous-Cell Carcinoma, and Small-Cell Carcinoma.*

Type of Alteration	Adenocarcinoma	Squamous-Cell Carcinoma	Small-Cell Carcinoma
Cell-cycle mutations	<i>TP53</i> (46%), <i>CDKN2A</i> (4%)	<i>TP53</i> (91%), <i>CDKN2A</i> (17%), <i>RB1</i> (7%)	<i>TP53</i> (92%), <i>RB1</i> (75%)
	<i>RTK/PI3K-MTOR</i> signaling <i>KRAS</i> (33%), <i>EGFR</i> (14%), <i>BRAF</i> (10%), <i>STK11</i> (17%), <i>MET</i> (8%), <i>NF1</i> (11%), <i>PIK3CA</i> (7%), <i>RIT1</i> (2%)	<i>RTK/PI3K-MTOR</i> signaling <i>PIK3CA</i> (16%), <i>PTEN</i> (8%), <i>HRAS</i> (3%)	<i>RTK/PI3K-MTOR</i> signaling: <i>PTEN</i> (5%)
Other mutations	Oxidative stress response: <i>KEAP1</i> (17%), <i>MYC</i> pathway; <i>MGA</i> (8%) Aberrant splicing: <i>U2AF1</i> (3%), <i>RBM10</i> (8%)	Oxidative stress response: <i>CUL3</i> (6%), <i>KEAP1</i> (12%), <i>NFE2L2</i> (15%) Squamous differentiation: <i>NOTCH1</i> (8%), <i>ASCL4</i> (3%), <i>NOTCH2</i> (5%)	Epigenetic deregulation: <i>EP300</i> (11%), <i>CREBBP</i> (10%) Neuroendocrine differentiation: <i>NOTCH1</i> (15%), <i>NOTCH2</i> (5%), and <i>NOTCH3</i> (9%)
Rearrangements	<i>ALK</i> (3–8%), <i>ROS1</i> (2%), <i>RET</i> (1%), <i>NTRK1</i> (3%), <i>NRG1</i> (2%), <i>BRAF</i> (3% in those who never smoked), <i>ERBB4</i> (1%)	<i>FGFRs</i> (rare)	<i>RB1</i> (13%), <i>TP73</i> (7%), <i>CREBBP</i> (4%), <i>PTEN</i> (4%), <i>RBL1</i> (3%)
Amplifications	<i>TTF1</i> (14%), <i>TERT</i> (18%), <i>EGFR</i> (7%), <i>MET</i> (4%), <i>KRAS</i> (6%), <i>ERBB2</i> (3%), <i>MDM2</i> (8%)	Chr3q: <i>SOX2</i> (43%), <i>TP63</i> (29%), <i>PIK3CA</i> (38%), <i>HES1</i> (26%) [†]	<i>MYC</i> family members (16%): <i>MYC</i> , <i>MYCN</i> , <i>MYCL1</i> , <i>SOX2</i> (27%), <i>FGFR1</i> (8%), <i>IRS2</i> (2%)
Deletions	<i>CDKN2A</i> (20%)	<i>CDKN2A</i> (27%), <i>PTEN</i> (3%)	<i>TP53</i> , <i>RB1</i> , <i>CDKN2A</i> , Chr3p (e.g., <i>FHIT</i> , <i>ROBO1</i>) [†]
Commonly altered pathways	<i>MAPK</i> and <i>PI3K</i> signaling, oxidative stress response, cell-cycle progression, RNA splicing and processing, nucleosome remodeling	Squamous-cell differentiation, oxidative stress response, <i>MAPK</i> and <i>PI3K</i> signaling	Cell-cycle regulation, <i>PI3K</i> signaling, regulation of nucleosome transcriptional and remodeling, <i>NOTCH</i> signaling and neuroendocrine differentiation

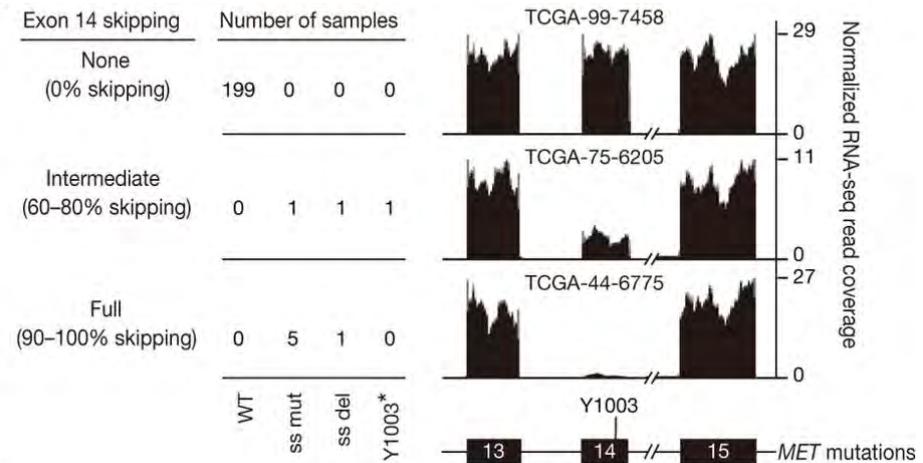
Identifier de nouvelles cibles

- De nouvelles altérations sont encore régulièrement identifiées
- Mutations plus rares ou de mécanisme plus complexe
- Quelle est la pertinence clinique d'une mutation?

Délétions rares EGFR



Saut d'exon 14 de MET dû à une mutation des sites d'épissage



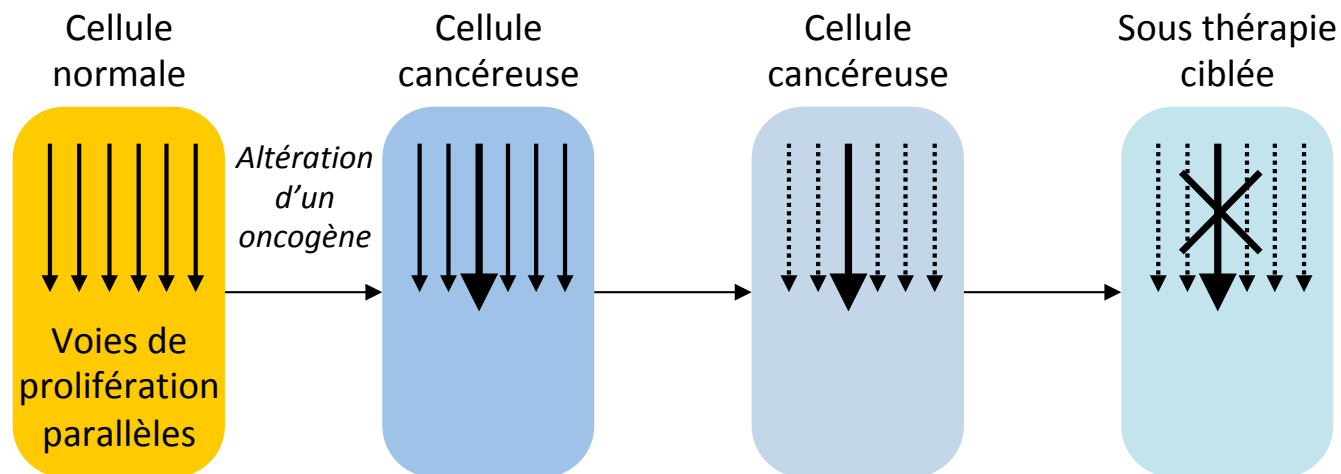
Imielinski et al. Cell 2012; TCGA Nature 2014

Développement de la médecine de précision

- Peut-on étendre le principe à d'autres mutations?
 1. Identifier les altérations d'intérêt
 2. Déterminer in vitro/in vivo les traitements actifs en présence de cette altération
 3. Mettre en place les tests permettant de rechercher cette altération
 4. Favoriser l'accès au traitement et confirmer son efficacité

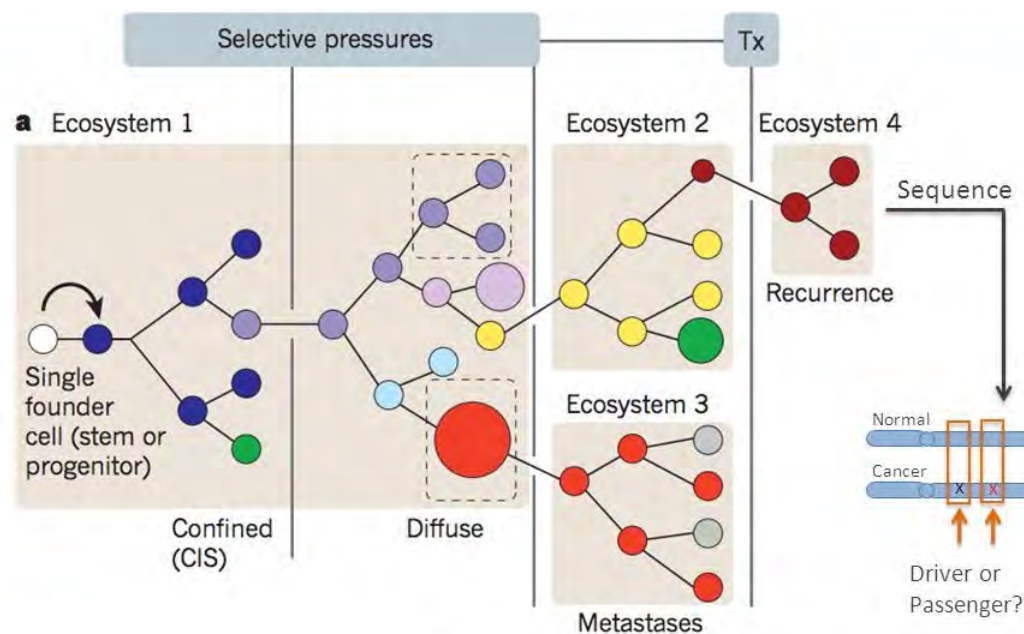
La cible est-elle accessible à un traitement?

- Pertinence clinique = mutation associée à une thérapie ciblée
 - Nécessité d'analyses fonctionnelles in vitro/in vivo
 - Recherche d'un phénomène **d'addiction oncogénique**
 - Identifier le « talon d'Achille » de la cellule cancéreuse



La cible est-elle accessible à un traitement?

- Distinguer les mutations « drivers » des mutations « passagers »
- Les mutations drivers confèrent un avantage prolifératif
- Les mutations passagers ont peu/pas de conséquences fonctionnelles



Greaves et Maley, Nature 2012

Une mutation peut refléter :

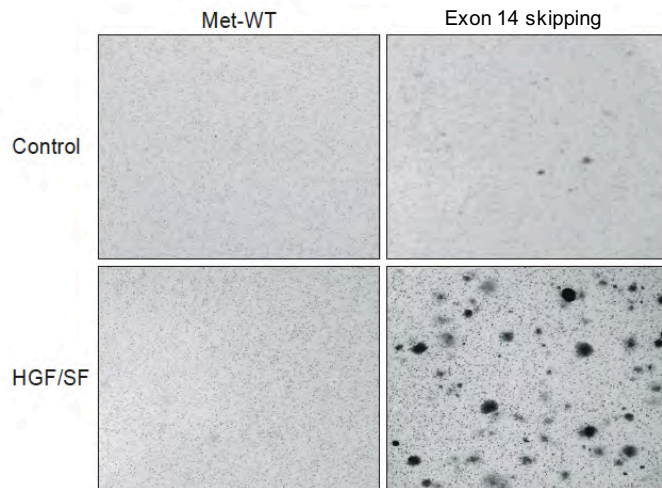
- Événement à l'origine de la survenue du cancer
- Événement ayant permis au cancer de devenir invasif
- Événement ayant permis au cancer de métastaser
- Événement ayant permis au cancer de résister au traitement
- Événement sans conséquence, lié à l'instabilité génomique de la cellule cancéreuse
- ...

La cible est-elle accessible à un traitement?

- Utilisation de bases de données / analyse littérature
- Tests fonctionnels pour déterminer la pertinence de l'altération

Mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de MET

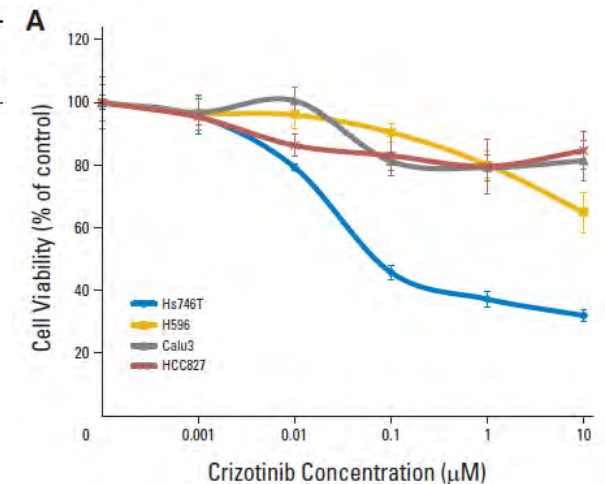
Formation de colonies (NIH3T3)



Formation de tumeurs chez la souris

Met construct	No. mice with tumors/ No. mice injected ^a	Mean tumor size, mm ² (mean ± S.D.) ^b
WT	0/6 ^c	0
Exon 14 skipping	6/6 (10)	57.8 ± 9.1

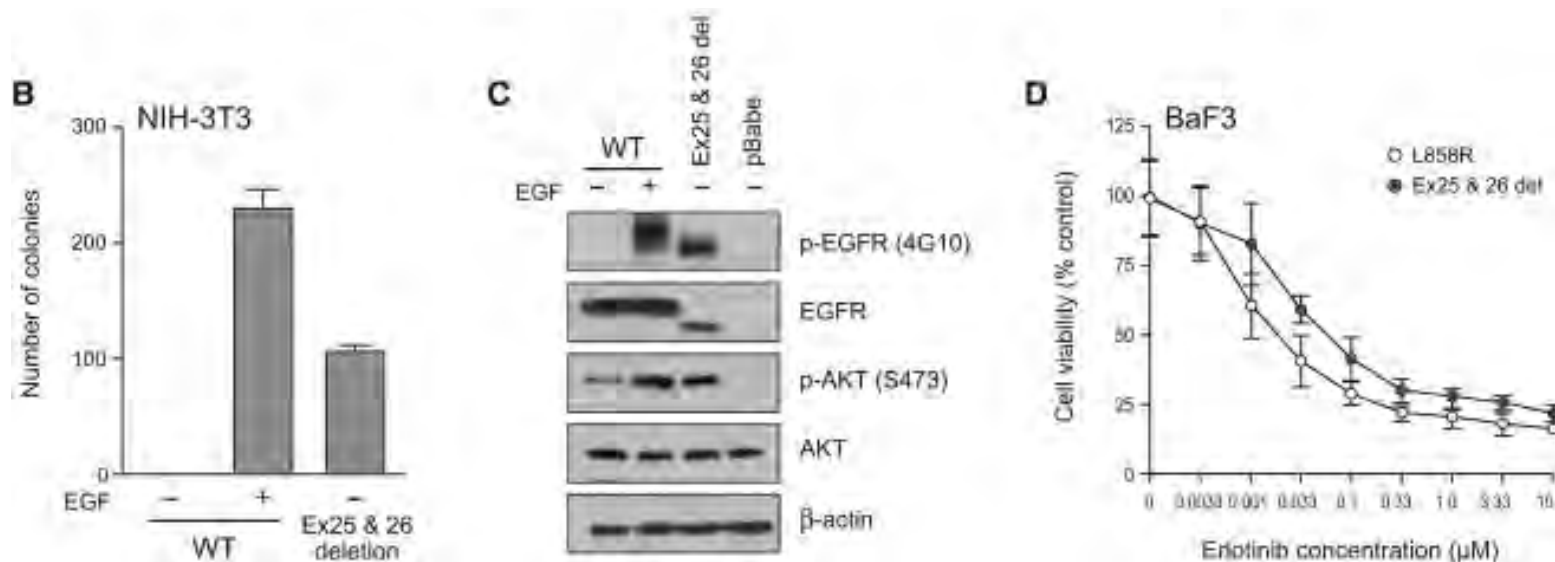
Sensibilité aux TKI



La cible est-elle accessible à un traitement?

- Déterminer s'il existe des traitements actifs en présence d'une altération moléculaire donnée

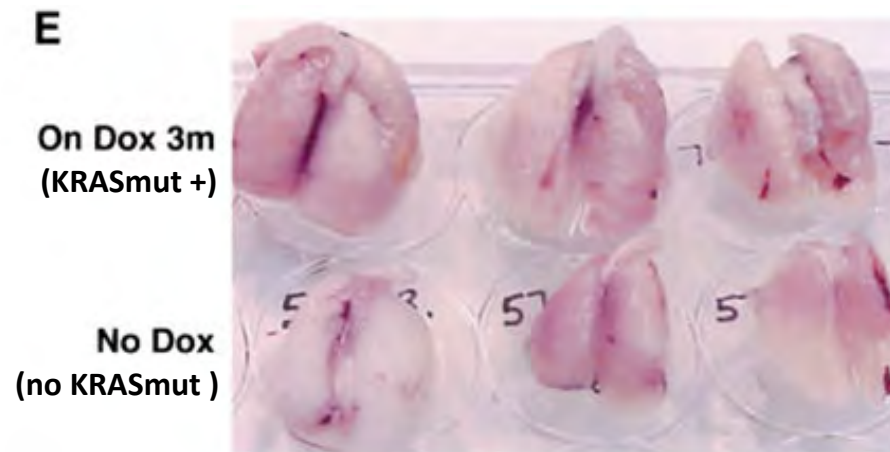
Délétions rares EGFR



La cible est-elle accessible à un traitement?

- Déterminer s'il existe des traitements actifs en présence d'une altération moléculaire donnée

Mutations KRAS



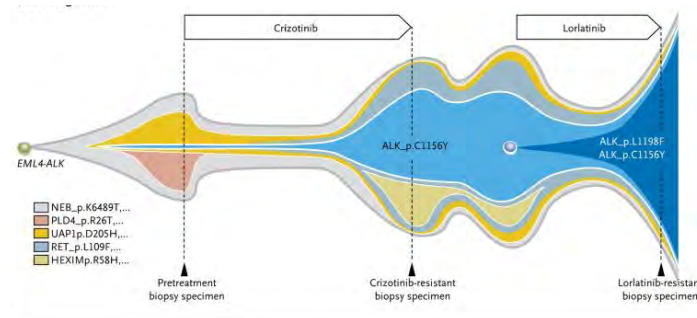
La cible est-elle accessible à un traitement?

- Challenge : développement d'unités de recherche translationnelle pour déterminer la pertinence d'une cible/ d'un mécanisme de résistance

Patiente 45 ans, adk ALK+

Progression après crizotinib, céritinib (G1202R), lorlatinib

Mutation complexe G1202R + G1269A...?

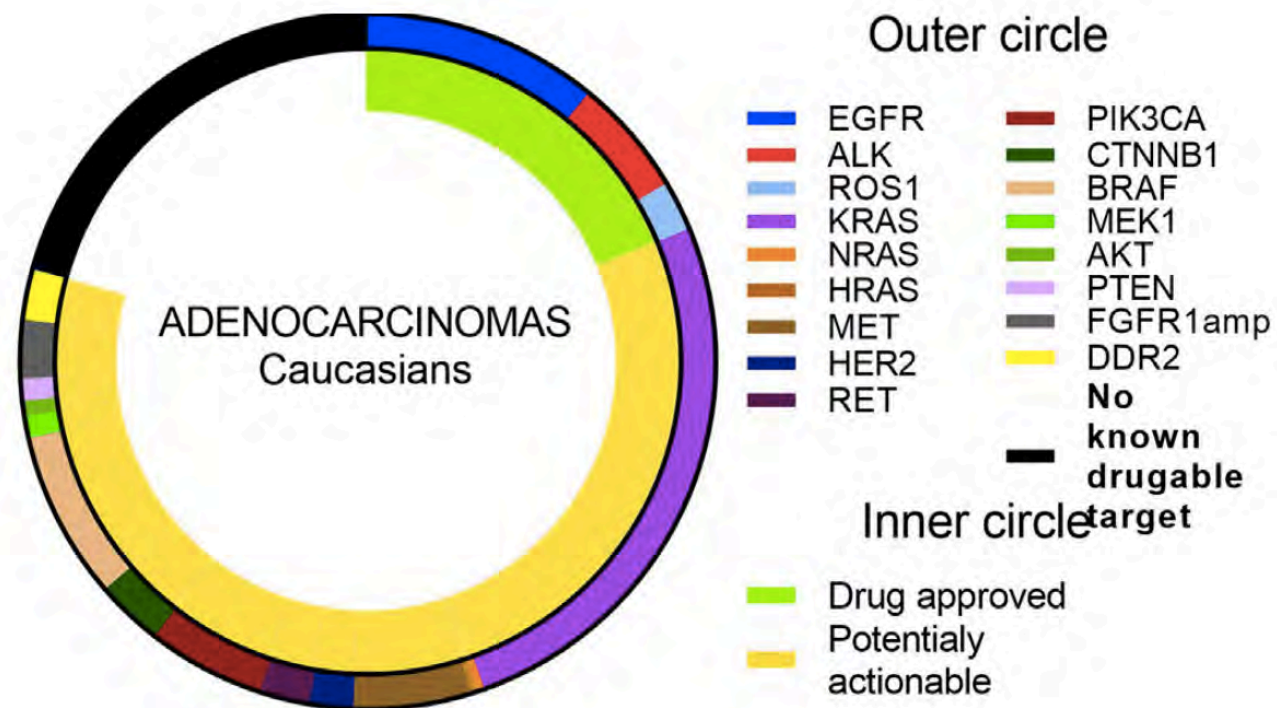


Mutation status	Cellular ALK Phosphorylation Mean IC50 (nM)				
	Crizotinib	Ceritinib	Alectinib	Brigatinib	Lorlatinib
Parental Ba/F3	763.9	885.7	890.1	2774.0	11293.8
EML4-ALK V1	38.6	4.9	11.4	10.7	2.3
EML4-ALK C1156Y	61.9	5.3	11.6	4.5	4.6
EML4-ALK I1171N	130.1	8.2	397.7	26.1	49.0
EML4-ALK I1171S	94.1	3.8	177.0	17.8	30.4
EML4-ALK I1171T	51.4	1.7	33.6 ^a	6.1	11.5
EML4-ALK F1174C	115.0	38.0 ^a	27.0	18.0	8.0
EML4-ALK L1196M	339.0	9.3	117.6	26.5	34.0
EML4-ALK L1198F	0.4	196.2	42.3	13.9	14.8
EML4-ALK G1202R	381.6	124.4	706.6	129.5	49.9
EML4-ALK G1202del	58.4	50.1	58.8	95.8	5.2
EML4-ALK D1203N	116.3	35.3	27.9	34.6	11.1
EML4-ALK E1210K	42.8	5.8	31.6	24.0	1.7
EML4-ALK G1269A	117.0	0.4	25.0	ND	10.0
EML4-ALK D1203N+F1174C	338.8	237.8	75.1	123.4	69.8

IC50 ≤ 50 nM
 IC50 > 50 < 200 nM
 IC50 ≥ 200 nM

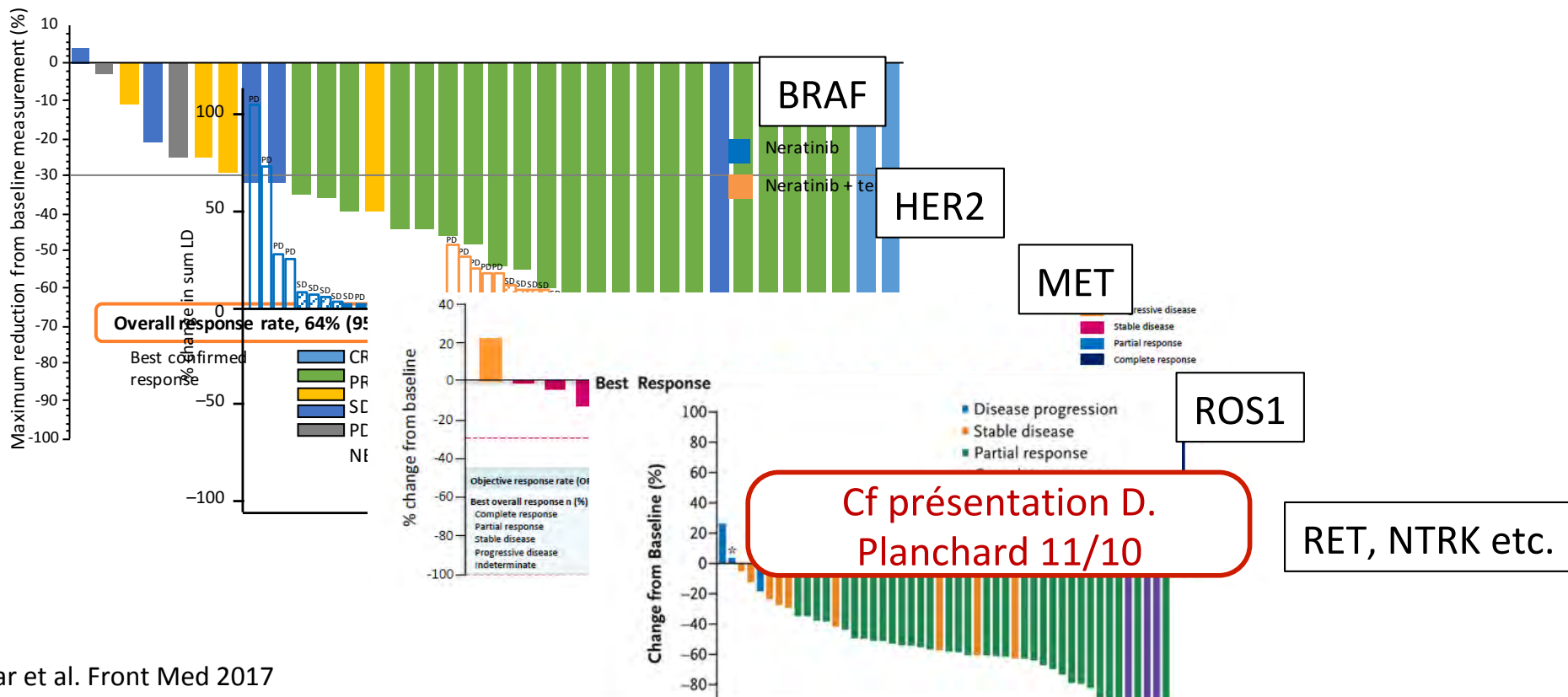
La cible est-elle accessible à un traitement?

- Cibles potentiellement accessibles à une thérapie ciblée



La cible est-elle accessible à un traitement?

- Cibles potentiellement accessibles à une thérapie ciblée



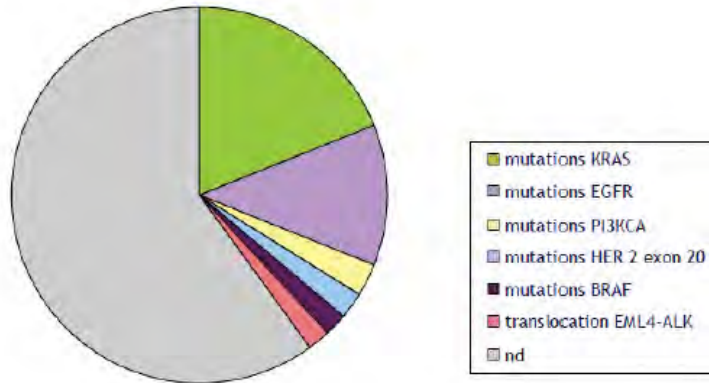
Développement de la médecine de précision

- Peut-on étendre le principe à d'autres mutations?
 1. Identifier les altérations d'intérêt
 2. Déterminer in vitro/in vivo les traitements actifs en présence de cette altération
 3. Mettre en place les tests permettant de rechercher cette altération
 4. Favoriser l'accès au traitement et confirmer son efficacité

Détecter les altérations pertinentes en routine

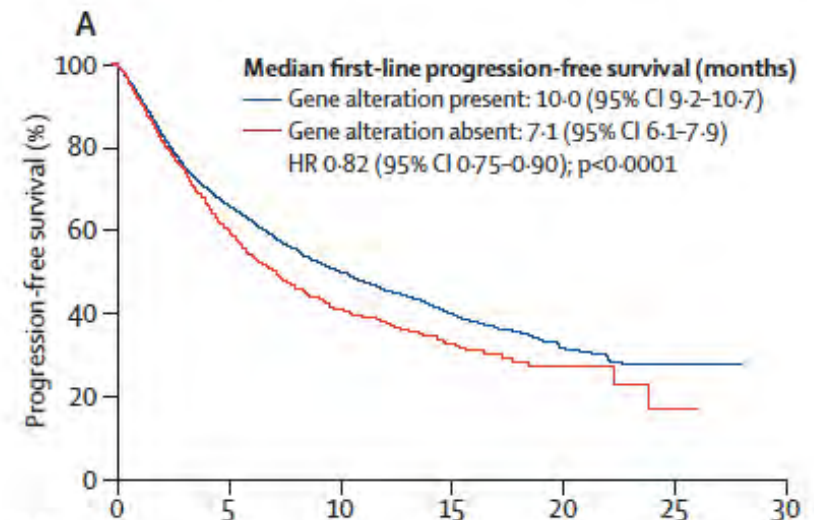
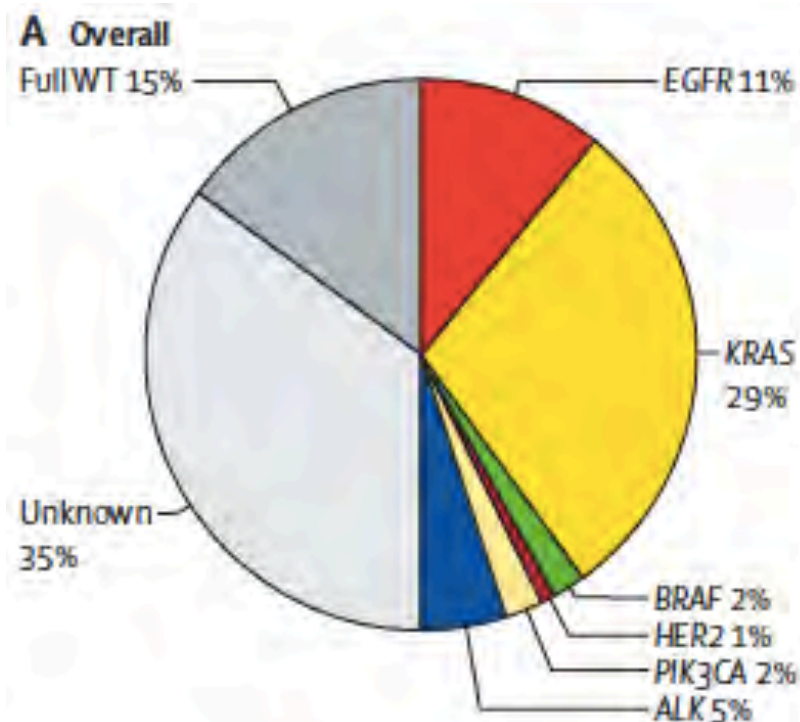
- Séquençage gène par gène, méthode de Sanger
- Utilisé tant que le nombre de cibles était limité

Liste biomarqueurs émergents INCa - 2011



Détecter les altérations pertinentes en routine

- Biomarqueurs France



Number at risk							
Gene alteration present	3498	1873	1134	453	119	8	0
Gene alteration absent	1126	504	251	90	17	2	0

Détecter les altérations pertinentes en routine

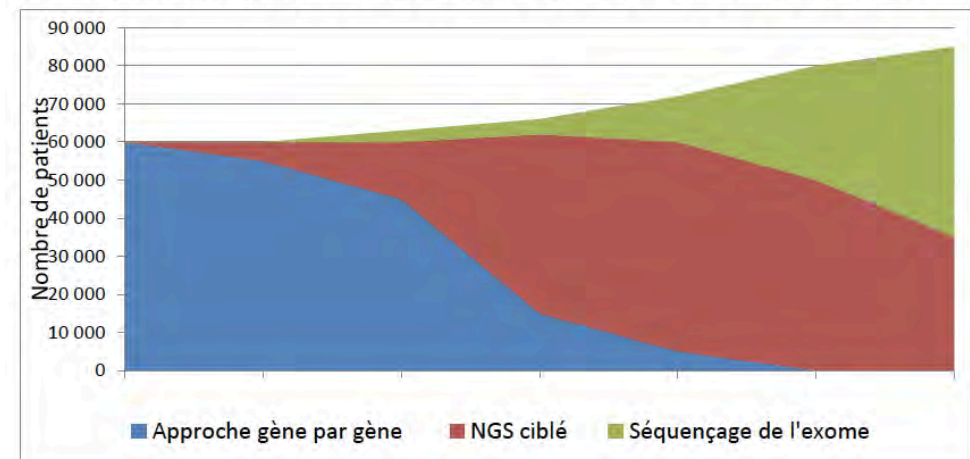
- Evolution vers le séquençage de nouvelle génération (NGS)
1. Restriction aux altérations les plus fréquentes – Nécessité d'identifier de nouvelles cibles, mécanismes de résistance
 2. Saturation des capacités des plateformes

Indications hors cancer du poumon

Pathologie	Biomarqueur(s)	Molécules prescrites
Cancer du sein	Amplification d'HER2	Trastuzumab, Pertuzumab, Lapatinib
Cancer de l'estomac	Amplification d'HER2	Trastuzumab
Cancer colorectal	Mutations de KRAS Mutations de NRAS	Panitumumab, Cetuximab
GIST	Mutations de KIT Mutations de PDGFRA	Imatinib
Cancer du poumon	Mutations d'EGFR Translocation d'ALK Translocation de ROS1	Gefitinib, Erlotinib, Afatinib, Osimertinib Crizotinib, Ceritinib Crizotinib
Mélanome	Mutation de BRAF V600	Vemurafenib, Dabrafenib, Cobimetinib, Trametinib
Leucémies	Détection de BCR-ABL Mutations d'ABL	Imatinib, Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib, Ponatinib
Leucémie lymphoïde chronique	Délétion 17p Mutation de TP53	Idelalisib
Syndrome myéloprolifératif	Réarrangement de PDGFR	Imatinib
Syndrome myélodysplasique	Réarrangement de PDGFR	Imatinib
Leucémie chronique à éosino.	Réarrangement FIP1L1-PDGFR	Imatinib

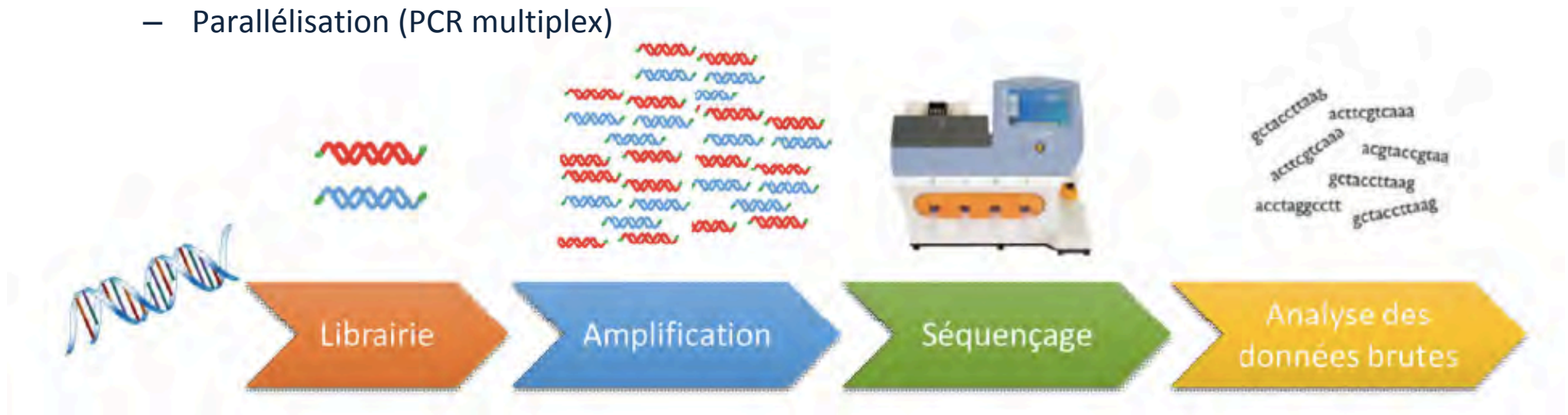
Développement anticipé du NGS et de l'exome

Fig. 40. Evolution envisagée pour le séquençage extensif du génome tumoral d'ici la fin du Plan cancer



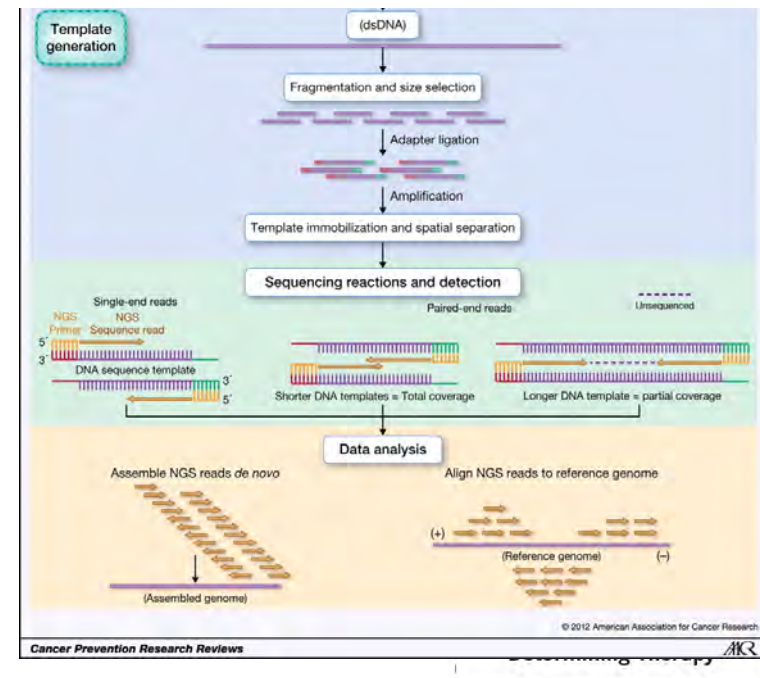
Détecter les altérations pertinentes en routine

- Evolution vers le séquençage de nouvelle génération (NGS)
 - Intégration (système combinant les avantages de la PCR et des puces)
 - Miniaturisation
 - Parallélisation (PCR multiplex)



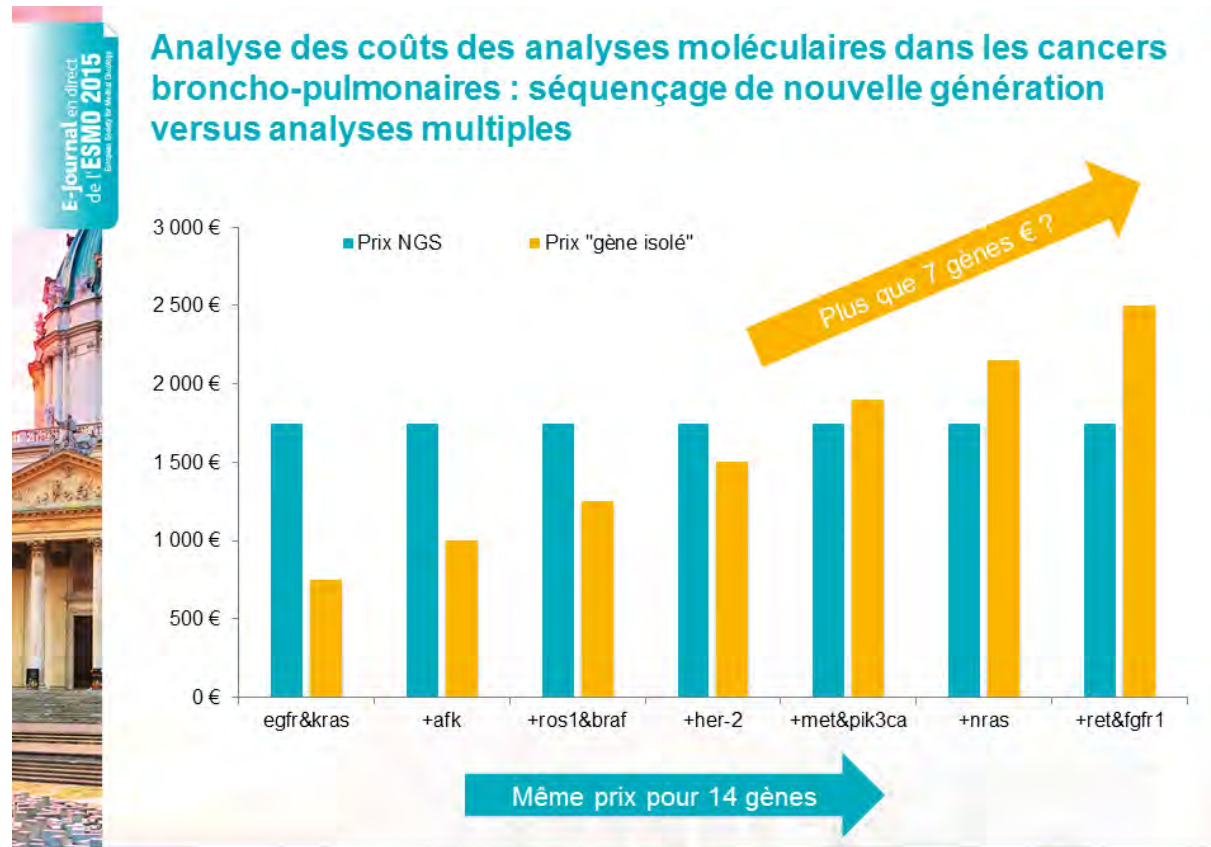
Détecter les altérations pertinentes en routine

- Evolution vers le séquençage de nouvelle génération (NGS)
 - Possibilité de détecter de multiples mutations
 - Possibilité de quantifier les mutations
 - Possibilité de détecter des mutations présentes en faible pourcentage
 - Economie de matériel biologique



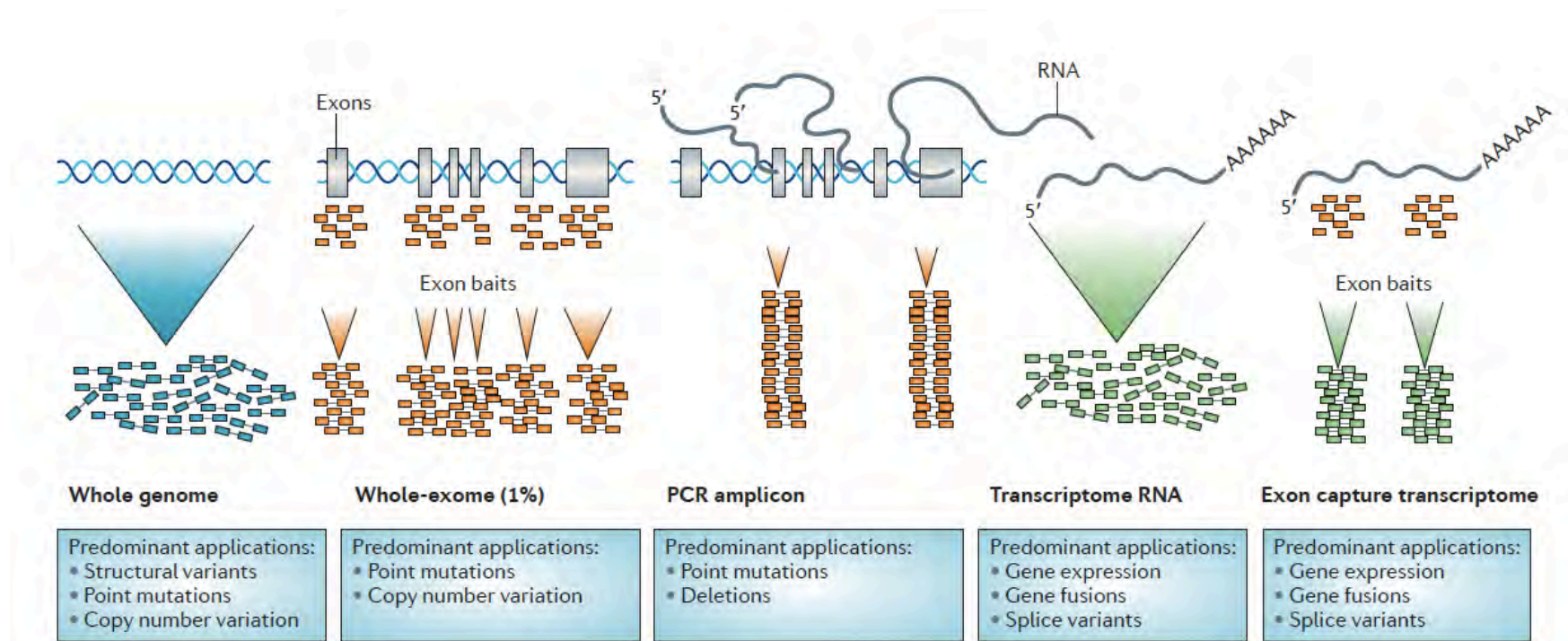
Séquençage de nouvelle génération NGS

Coût NGS



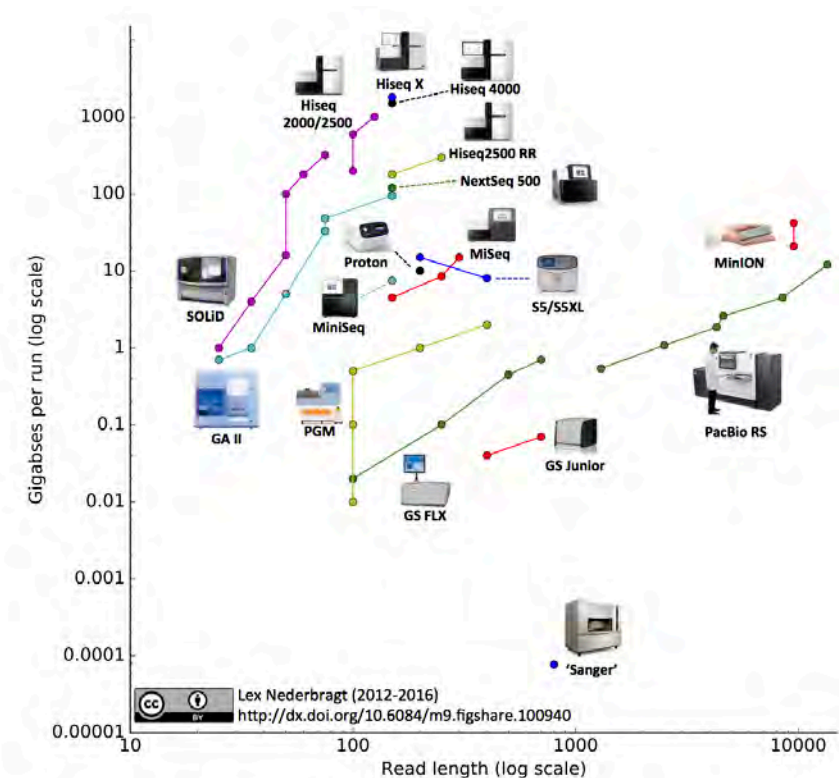
Détecter les altérations pertinentes en routine

- Applications du Séquençage de nouvelle génération (NGS)



Détecter les altérations pertinentes en routine

- Séquençage de nouvelle génération (NGS)
 - NGS de tout l'exome – limites :
 - Coût
 - Taille des données générées
 - Analyse complexe des données
 - NGS ciblé – avantages :
 - Focalisation sur les régions d'intérêt
 - Diminution du coût
 - Analyse simplifiée
- Evolution technologique rendant plus accessible l'analyse de l'exome à moyen terme



Détecter les altérations pertinentes en routine

- Panels commerciaux NGS ciblé

Table 1. Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Research Panel v2.

Sample type	FFPE samples
Application	Somatic mutation detection
Genes	<i>KRAS</i> , <i>EGFR</i> , <i>BRAF</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>AKT1</i> , <i>ERBB2</i> , <i>PTEN</i> , <i>NRAS</i> , <i>STK11</i> , <i>MAP2K1</i> , <i>ALK</i> , <i>DDR2</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>MET</i> , <i>TP53</i> , <i>SMAD4</i> , <i>FBX7</i> , <i>FGFR3</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>ERBB4</i> , <i>FGFR1</i> , and <i>FGFR2</i>
Primer pairs, amplicon length	92 pairs of primers in a single pool 92 amplicons with an average length of 162 bp
Input DNA required	10 ng
Observed performance	Percent of amplicons with the target base coverage at 500x: >95% Average panel uniformity: 95% Average percent reads on target: 98%
Multiplexing	2 samples per Ion 314™ Chip with at least 500x sequencing coverage 8 samples per Ion 316™ Chip with at least 500x sequencing coverage 16 samples per Ion 318™ Chip with at least 500x sequencing coverage

Détecter les altérations pertinentes en routine

- Panels larges :
 - Panels commerciaux (type Oncomine)
 - Solutions commerciales « clés en main » (type Foundation One)

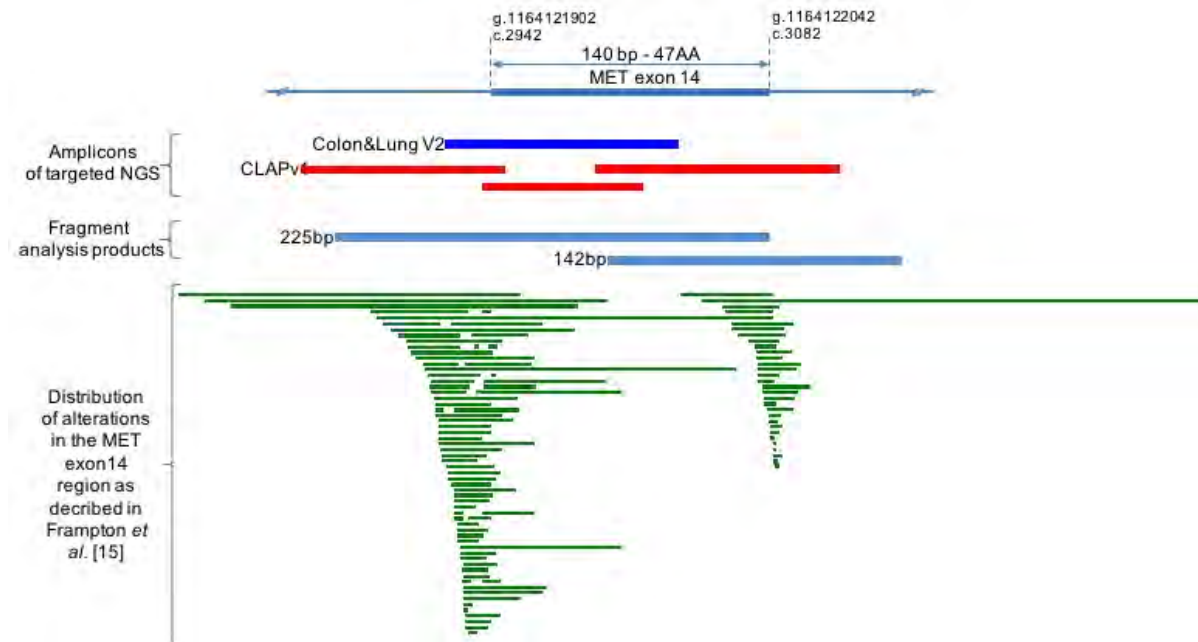
FOUNDATIONONE® CURRENT GENE LIST*

FoundationOne® is a pan-cancer comprehensive genomic profile, which interrogates the entire coding sequence of 315 cancer-related genes plus introns from 28 genes often rearranged or altered in cancer.

CURRENT GENE LIST									
ABL1	BRAF	CHEK1	FANCC	GATA3	JAK2	MITF	PDCD1LG2	RBM10	STAT4
ABL2	BRCA1	CHEK2	FANCD2	GATA4	JAK3	MLH1	PDGFRA	RET	STK11
ACVR1B	BRCA2	CIC	FANCE	GATA6	JUN	MPL	PDGFRB	RICTOR	SUFU
AKT1	BRD4	CREBBP	FANCF	GID4 (C17orf39)	KAT6A (MYST3)	MRE11A	PDK1	RNF43	SYK
AKT2	BRIP1	CRKL	FANCD3	DLI1	KDM5A	MSH2	PIK3C2B	RO51	TAF1
AKT3	BTG1	CKLF2	FANCL	GNAT1	KDM5C	MSH6	PIK3CA	RPTOR	TBX3
ALK	BTX	CSF3R	FAS	GNA13	KDM6A	MTOR	PIK3CB	RUNX1	TERC
AMER1 (FAM123B)	C10orf30 (EMSY)	CTCF	FAT1	GNAG	KDR	MULTYH	PIK3CG	RUNX1T1	TERT (promoter only)
APC	CARD11	CTNNA1	FBXW7	GNAS	KIFAP1	MYC	PIK3R1	SDHA	TET2
AR	CBFB	CTNNA1	FGF10	GPR124	KEL	MYCL (MYCL1)	PIK3R2	SDHB	TGFBR2
ARAF	CBL	CUL3	FGF14	GRIN2A	KIT	MYCN	PLCG2	SOHC	TNFAIP3
ARFRP1	CCND1	CYLD	FGF19	ORM3	KLHL6	MYD88	PM52	SOHD	TNFRSF14
ARID1A	CCND2	DAXX	FGF23	GSK3B	KMT2A (MLL)	NF1	POLD1	SETD2	TDPI
ARID1B	CCND3	DDR2	FGF3	H3F3A	KMT2C (MLL3)	NF2	POLE	SF3B1	TDPA
ARID2	CCNE1	DICER1	FGF4	HGF	KMT2D (MLL2)	NFE2L2	PPP2R1A	SLIT2	TP53
ASK1	CD274	DNMT3A	FGF6	HNF1A	KRAS	NFKB1A	PRDM1	SMAD2	TSC1
ATM	CD79A	DOT1L	FGFR1	HRAS	LMO1	NKX2-1	PREX2	SMAD3	TSC2
ATR	CD79B	EGFR	FGFR2	HSD3BB1	LRP1B	NOTCH1	PRKARIA	SMAD4	TSHR
ATRX	CDC73	EP300	FGFR3	HSP90AA1	LYN	NOTCH2	PRKC1	SMARCA4	U2AF1
AURKA	CDH1	EPHA3	FGFR4	IDH1	LZTR1	NOTCH3	PRKDC	SMARCB1	VEGFA
AURKB	CDK2	EPHA5	FH	IDH2	MAGI2	NPM1	PRSS8	SPO	VHL
AXIN1	CDK4	EPHA7	FLCN	IGFBP	MAP2K1	NRAS	PTCH1	SNCAIP	WISP3
AXL	CDK6	EPHB1	FLT3	IGF2	MAP2K2	NSD1	PTEN	SOC3	WT1
BAP1	CDK8	ERBB2	FLT3	IKBKE	MAP2K4	NTRK1	PITPN1	SOX10	XPO1
BAR1D1	CDKN1A	ERBB3	FLT4	IKZF1	MAP3K1	NTRK2	GKI	SOX2	ZBTB2
BCL2	CDKN1B	ERBB4	FOXO2	IL7R	MCL1	NTRK3	RAC1	SOX9	ZNF217
BCL2L1	CDKN2A	ERG	FOXO1	INHBA	MDM2	NUP93	RAD50	SPEN	ZNF703
BCL2L2	CDKN2B	ERF1	FRS2	INPP4B	MDM4	PAK3	RAD51	SRP	
BCL6	CDKN2C	ESR1	FUBP1	IRF2	MED12	PALB2	RAF1	SPTA1	
BCOR	CEBPA	EZH2	GABRA6	IRF4	MEF2B	PARK2	RANBP2	SRC	
BCORL1	CHD2	FAM46C	GATA1	IRS2	MEN1	PAX5	RARA	STAG2	
BLM	CHD4	FANCA	GATA2	JAK1	MET	PBRM1	RB1	STAT3	
SELECT REARRANGEMENTS									
ALK	BRAF	BRD4	ETV4	FGFR1	KIT	MYC	NTRK2	RARA	TPRSS2
BCL2	BRCA1	EGFR	ETV5	FGFR2	MSH2	NOTCH2	PDGFRA	RET	
BCR	BRCA2	ETV1	ETV6	FGFR3	MYB	NTRK1	RAF1	ROS1	

Détecter les altérations pertinentes en routine

- Possibilité de développer des panels « maison » répondant à des besoins spécifiques
- Exemple des mutations MET exon 14
- Développement d'un panel spécifique couvrant les 2 sites d'épissage et l'exon 14

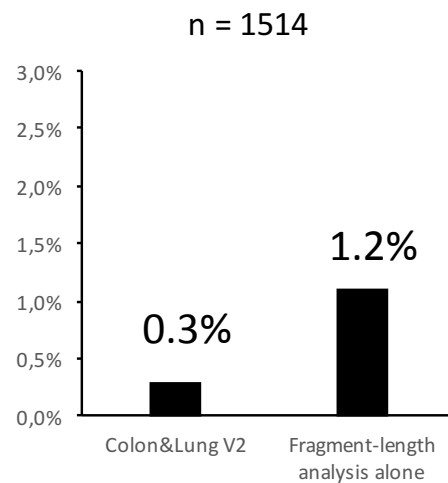


Détecter les altérations pertinentes en routine

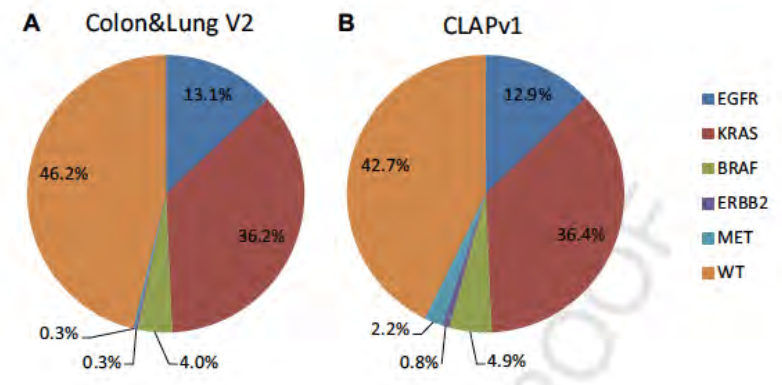
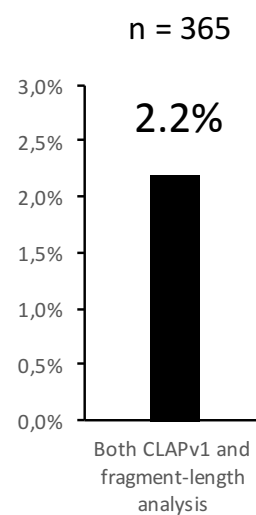
Résultats

L'utilisation de ce panel, couplé à une analyse de fragments, augmente le taux de détection de 0.3% à 2.2%

A

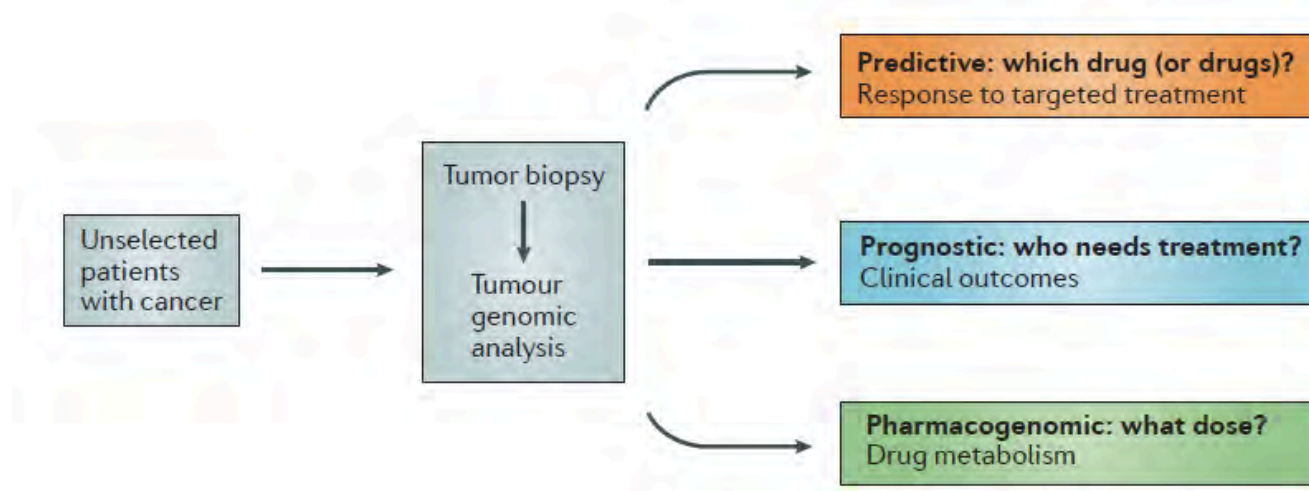


B



Quelles informations apporte le NGS?

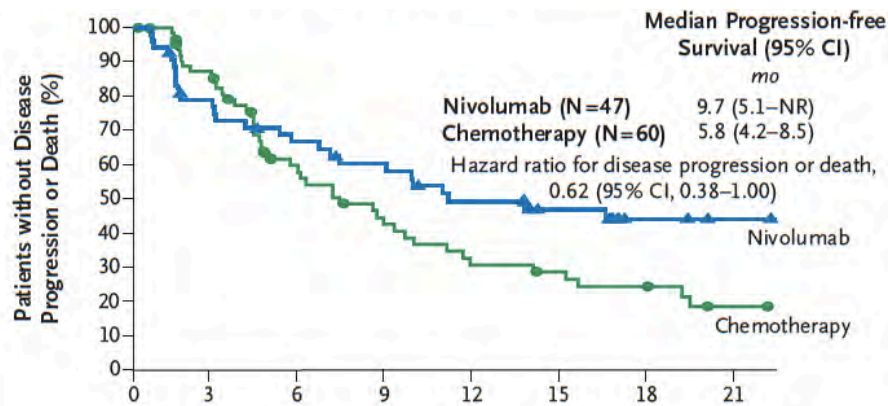
- Au-delà de l'identification de cibles accessibles à un traitement, le NGS apporte d'autres informations:
- Identification de marqueurs associés à une sensibilité ou résistance à certains traitements
- Identification de marqueurs pharmacogénomiques
- Identifications d'anomalies constitutionnelles de susceptibilité à certaines maladies



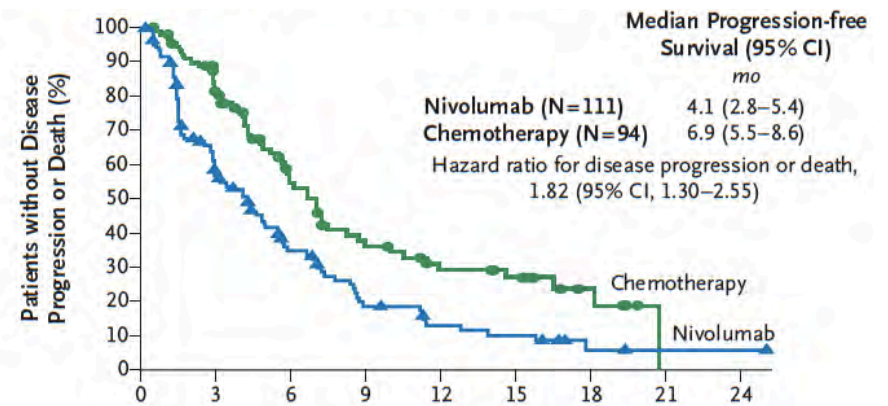
Quelles informations apporte le NGS?

- Identification de marqueurs en dehors de la cible associés à une sensibilité ou résistance à certains traitements
- Exemple de la charge mutationnelle (TMB) et immunothérapie

Charge mutationnelle élevée

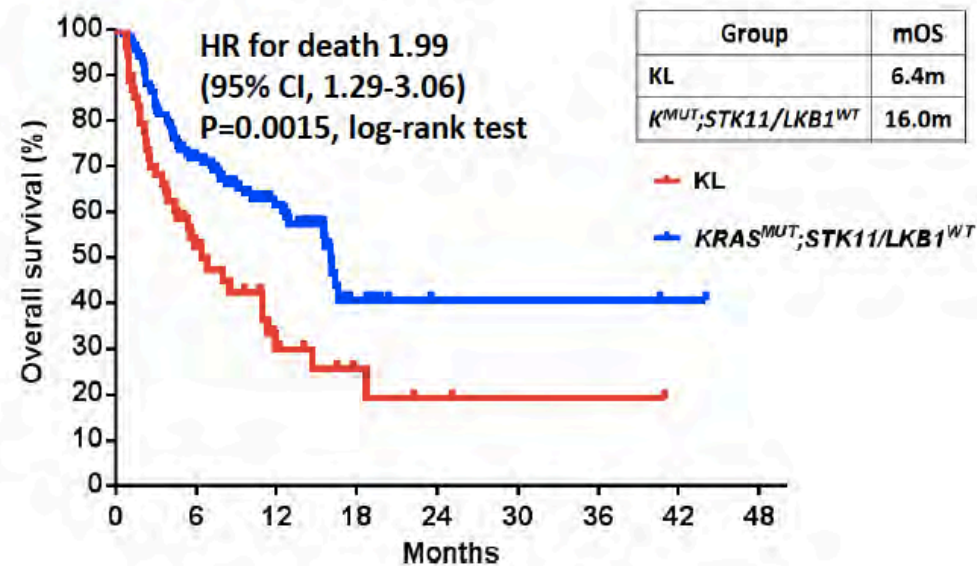


Charge mutationnelle basse ou intermédiaire



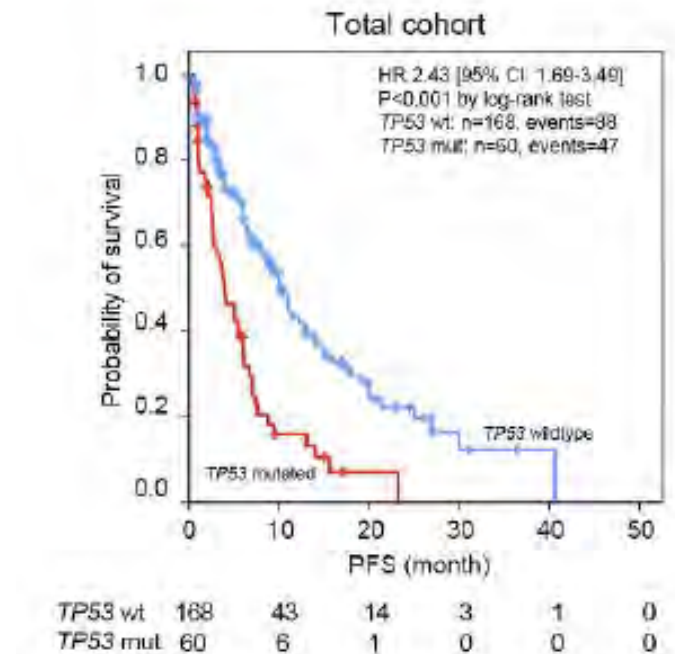
Quelles informations apporte le NGS?

- Identification de marqueurs en dehors de la cible associés à une sensibilité ou résistance à certains traitements
- Exemple des mutations STK11 et immunothérapie chez les patients KRAS-mutés



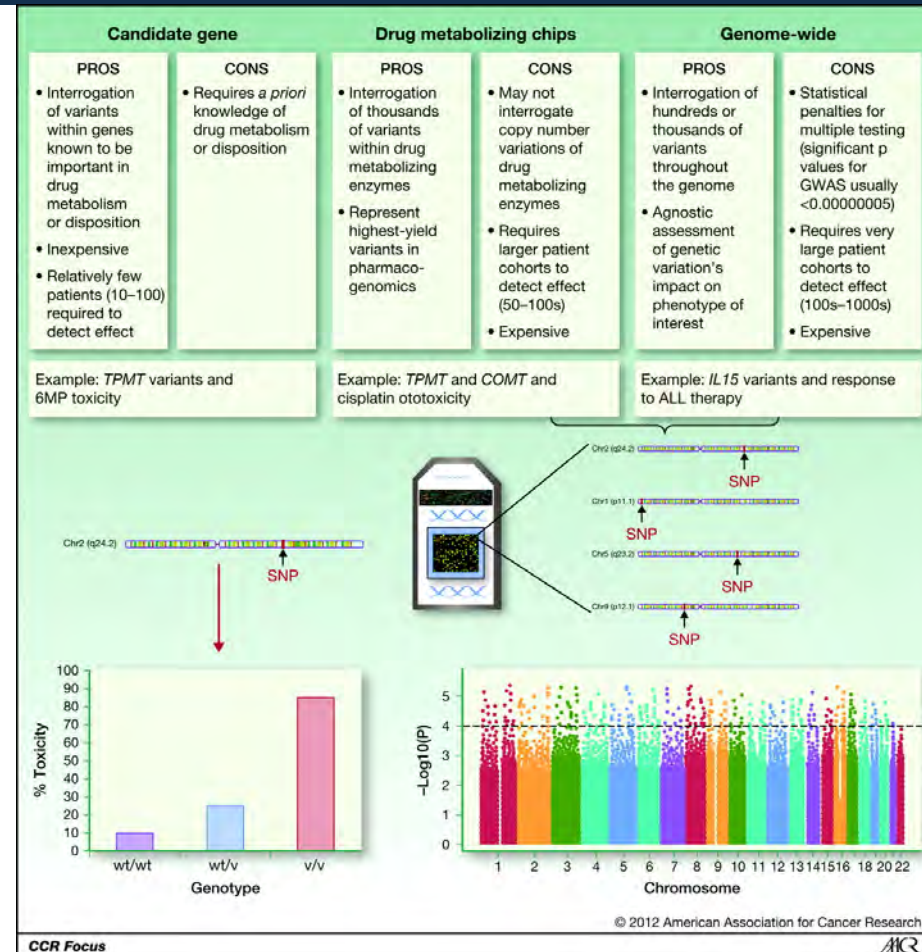
Quelles informations apporte le NGS?

- Identification de marqueurs en dehors de la cible associés à une sensibilité ou résistance à certains traitements
- Exemple des mutations TP53 chez les patients ALK-réarrangés



Quelles informations apporte le NGS?

- **Identification de marqueurs pharmacogénomiques**
- Anomalies constitutionnelles
- Exemple de la toxicité à l'irinotecan, ototoxicité du cisplatine



Quelles informations apporte le NGS?

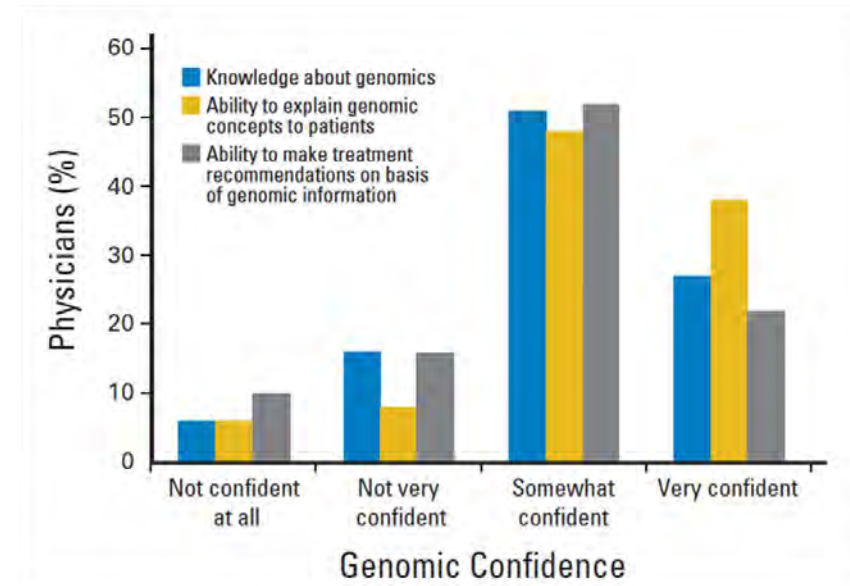
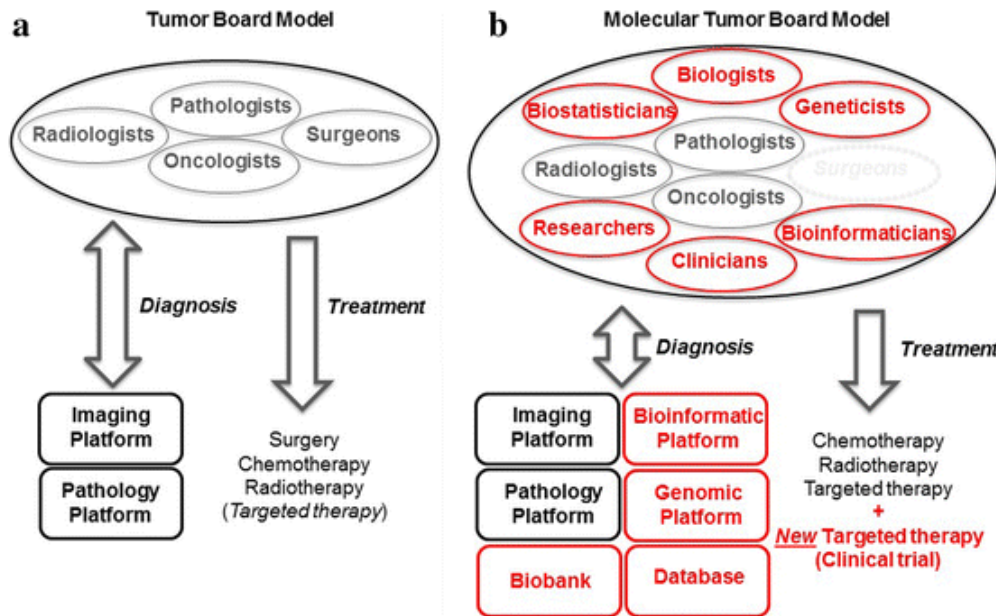
- **Identifications d'anomalies constitutionnelles de susceptibilité à certaines maladies**

ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing

Robert C. Green, MD, MPH^{1,2}, Jonathan S. Berg, MD, PhD³, Wayne W. Grody, MD, PhD⁴⁻⁶, Sarah S. Kalia, ScM, CGC¹, Bruce R. Korf, MD, PhD⁷, Christa L. Martin, PhD, FACMG⁸, Amy L. McGuire, JD, PhD⁹, Robert L. Nussbaum, MD¹⁰, Julianne M. O'Daniel, MS, CGC³, Kelly E. Ormond, MS, CGC¹¹, Heidi L. Rehm, PhD, FACMG^{2,12}, Michael S. Watson, PhD, FACMG¹³, Marc S. Williams, MD, FACMG¹⁴ and Leslie G. Biesecker, MD¹⁵

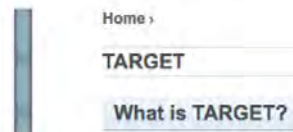
Comment fait-on pour interpréter un NGS?

- Intérêt de la RCP moléculaire



Comment fait-on pour interpréter un NGS?

- Développement de bases de connaissances



Comment fait-on pour interpréter un NGS?

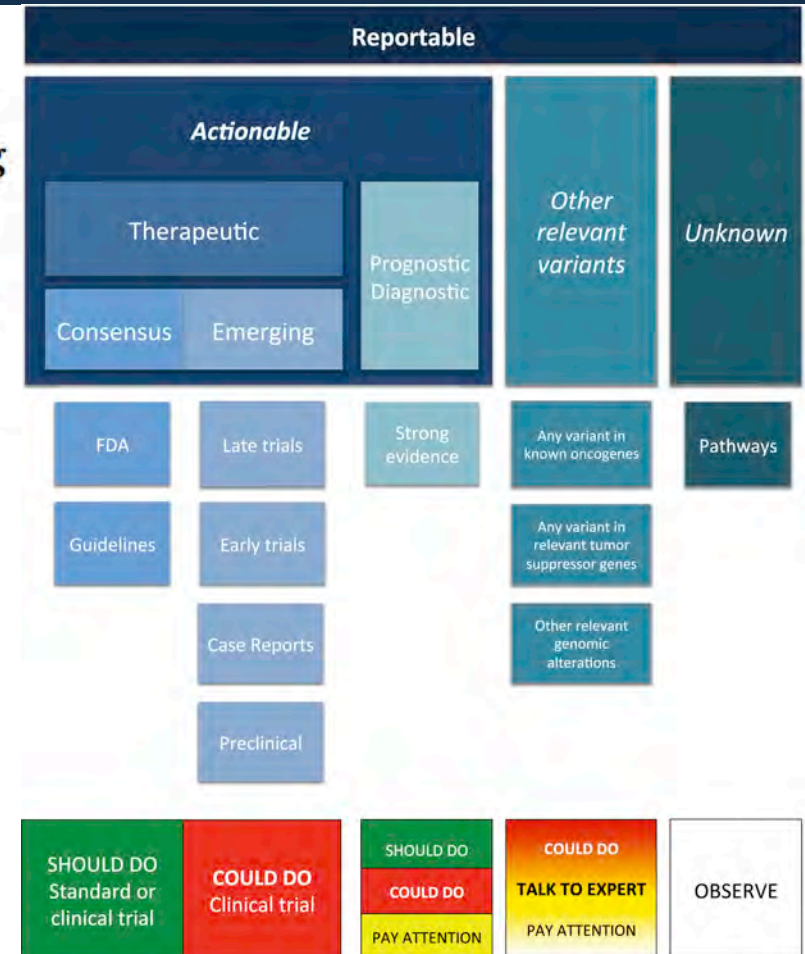
Review

Standardized decision support in next generation sequencing reports of somatic cancer variants

Rodrigo Dienstmann^{a,*}, Fei Dong^a, Darrell Borger^b, Dora Dias-Santagata^a, Leif W. Ellisen^b, Long P. Le^a, A. John Iafrate^a

^aMassachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Molecular Pathology Lab, USA

^bMassachusetts General Hospital Cancer Center and Harvard Medical School, 55 Fruit St GRJ, Boston, MA 02114, USA



Comment fait-on pour interpréter

Review

Standardized decision support in next generation sequencing reports of somatic cancer variants

Rodrigo Dienstmann^{a,*}, Fei Dong^a, Darrell Berger^b, Dora Dias-Santagata^a, Leif W. Ellisen^b, Long P. Le^a, A. John Iafrate^a

^aMassachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Molecular Pathology Lab, USA

^bMassachusetts General Hospital Cancer Center and Harvard Medical School, 55 Fruit St GRJ, Boston, MA 02114, USA

Dienstmann et al. Mol Oncol 2014

Table 1 – Challenges for interpreting genomic data in cancer.

Is this an activating or inactivating mutation?

1. Some mutations are activating and confer oncogene-addiction in specific contexts (FGFR2^{S252W} or FGFR2^{N549C} in endometrial cancer, effectively targeted by FGFR inhibitors ponatinib and BG398 in preclinical models). Others generate markedly reduced kinase activity and loss-of-function (FGFR2^{R251Q} and FGFR2^{S447T} in melanoma, with no predicted benefit with FGFR targeting).

Does this mutation engender sensitivity to specific targeted therapeutics?

1. Some activating mutations based on *in vitro* models do not confer sensitivity to agents targeting the mutant protein (AKT^{E17K} in breast cancer, effectively targeted by non-allosteric AKT inhibitors but not by allosteric AKT inhibitors; MEK^{C121S} in melanoma, not inhibited by allosteric MEK inhibitors).

2. With inhibitors of the mutant kinase, level of sensitivity depends on the potency of the agent (EGFR^{T790M} in lung cancer, resistant to first-generation EGFR inhibitors but higher sensitivity to novel irreversible inhibitors; ABL1^{T315I} in chronic myeloid leukemia, resistant to imatinib and sensitive to ponatinib; ERBB2^{L757S} in breast cancer, resistant to lapatinib and sensitive to neratinib).

3. With downstream pathway inhibitors, level of sensitivity strongly depends on the functional effects of the mutation (activating BRAF^{V600E} and NRAS^{G61} mutations confer sensitivity to MEK inhibitors in melanoma; BRAF^{V473C} reduces kinase activity and confers sensitivity to dasatinib in lung cancer, but not to MEK inhibitors).

4. For rare variants in oncogenes, there is no definitive preclinical or clinical data to suggest sensitivity or resistance to targeted therapy (activating PDGFR mutations in the tyrosine kinase domain render tumors susceptible to PDGFR inhibitors in gastrointestinal stromal tumors, but the sensitivity of novel variants in the trans-membrane domain of the gene is currently unknown).

5. Mutations that predict responsiveness to a therapy in some contexts, such as BRAF inhibitors in BRAF^{V600E} mutant melanoma, may be associated with entirely different clinical interpretations in others. In colorectal cancer, for example, BRAF^{V600E} mutations would direct towards combination of targeted therapies (BRAF plus EGFR inhibitors). It is important to emphasize that sensitivity is tumor context-specific and is influenced by concomitant genomic alterations.

How to select therapy in case of multiple genomic alterations?

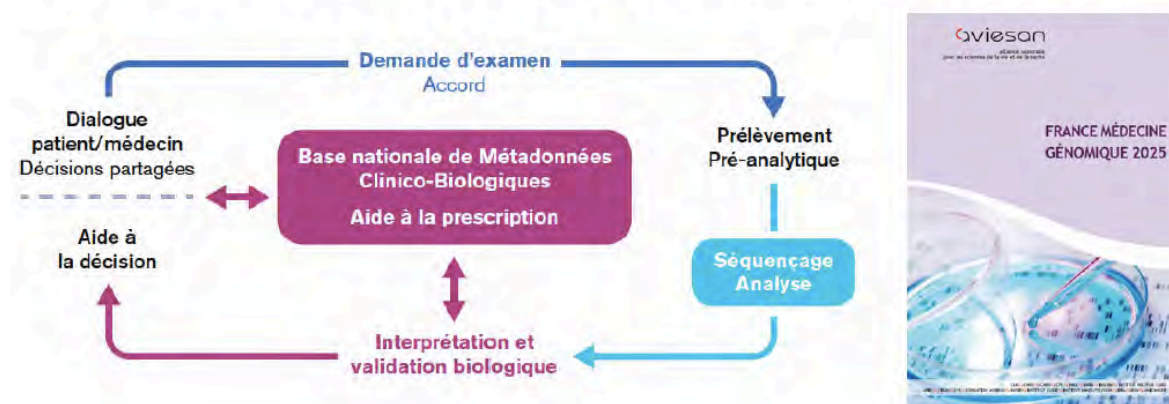
1. The finding of concomitant genomic alterations in a tumor sample collected before systemic therapy can have important biological and therapeutic implications (in the setting of BRAF^{V600E} mutant melanoma, NF1 loss predicts resistance to single-agent BRAF inhibitors; identification of BRAF^{V600E} and MEK^{T124S} in melanoma does not predict resistance to BRAF inhibitors; in KRAS mutant lung cancer, loss-of-function STK11 mutations engender resistance to the combination of MEK inhibitors and docetaxel).

2. In relapsed samples after targeted therapies, identification of “acquired” genomic alterations may be linked to resistance mechanisms and help define subsequent therapies (in EGFR mutant lung cancer progressing to erlotinib, the finding of MET amplification directs to combination therapy with EGFR and MET blockade).

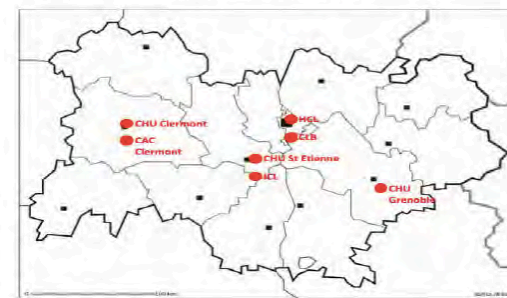
3. On the other hand, prioritizing therapy in the setting of multiple “targetable” alterations is not as straightforward as in previous examples, especially when both targeted drugs are still in early phases of clinical development (activating KRAS^{G12D} mutation in pancreatic cancer, targeted by downstream PI3K pathway + MEK inhibitors, often coexist with CDKN2A loss-of-function mutations, which may theoretically predict sensitivity to CDK inhibitors; in prostate cancer, PTEN deletion directs to PI3K pathway inhibitors and the coexistence of BRCA2 loss supports the use of PARP inhibitors).

Comment fait-on pour interpréter un NGS?

- Challenge : Améliorer la recherche des altérations à large échelle, pour la routine : renforcement des plateformes génomiques



SEQOIA

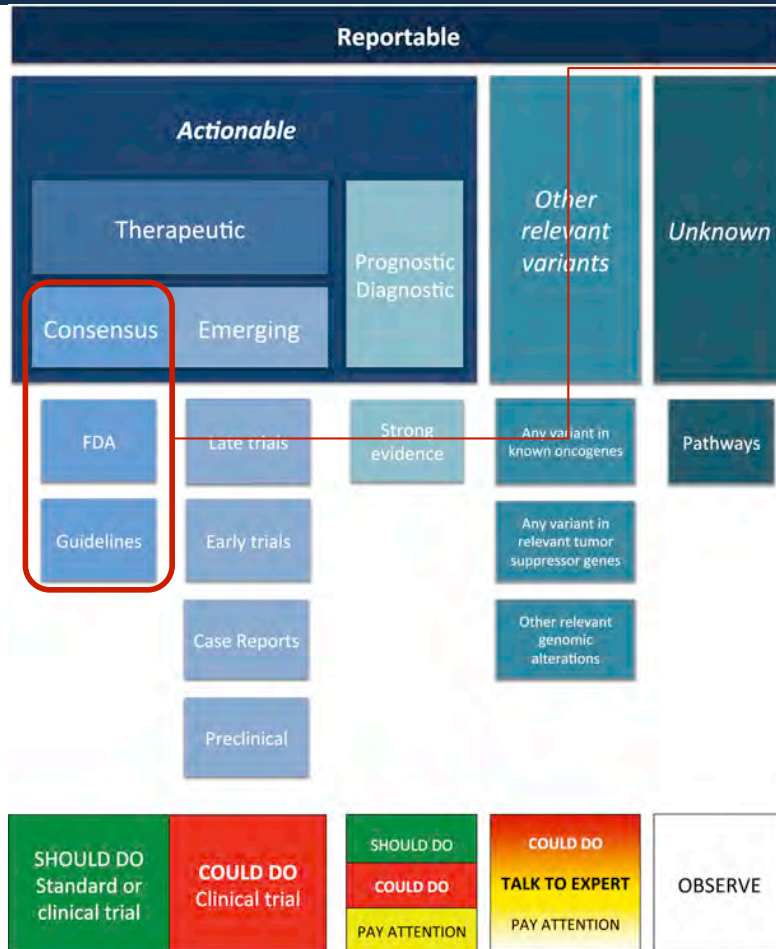


AURAGEN

Les succès de la médecine de précision

- Peut-on étendre le principe à d'autres mutations?
 1. Identifier les altérations d'intérêt
 2. Déterminer in vitro/in vivo les traitements actifs en présence de cette altération
 3. Mettre en place les tests permettant de rechercher cette altération
 4. Favoriser l'accès au traitement et confirmer son efficacité

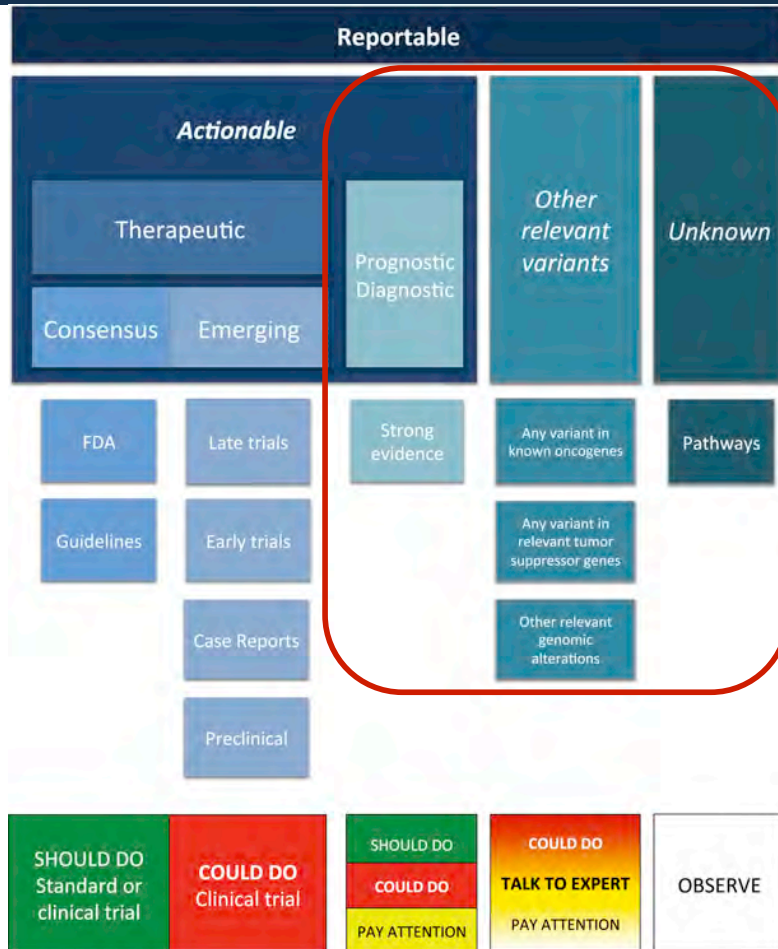
Favoriser l'accès au traitement



Prescription dans l'AMM

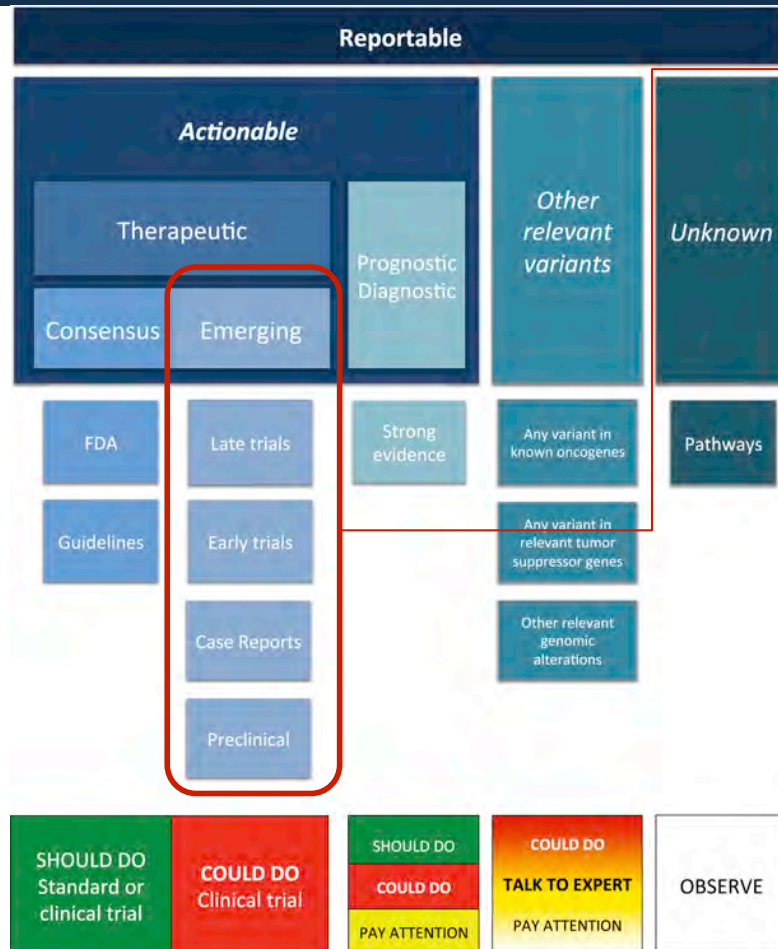
- EGFR, ALK
- ROS1, BRAF... Problème du remboursement

Favoriser l'accès au traitement



Pas de traitement en dehors d'un essai

Favoriser l'accès au traitement



Discussion au cas par cas :

- Essai dès que possible
- Prescription hors-AMM à discuter en RCP en tenant compte:
 - Du niveau de preuve de l'activité du traitement envisagé
 - Des alternatives thérapeutiques

Favoriser l'accès au traitement

Prescription hors-AMM

Principe : La prescription d'une spécialité pharmaceutique doit être conforme à son AMM ou son ATU

Dérogation : La prescription d'une spécialité non conforme à son AMM ou ATU est possible si *en l'absence d'alternative médicamenteuse appropriée* :

- Une RTU (recommandation temporaire d'utilisation) est établie par l'ANSM
- Le **prescripteur le juge indispensable au regard des données acquises de la science**


En pratique :

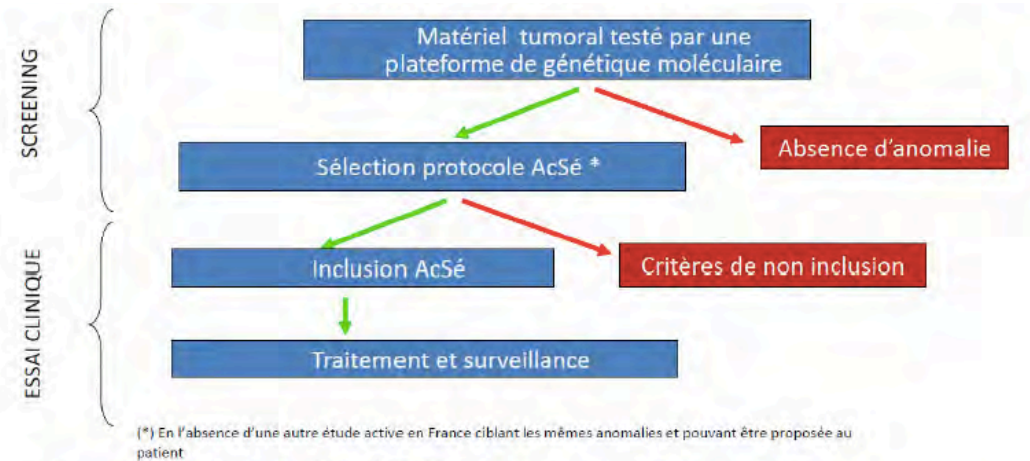
- les traitements standards doivent avoir été tentés auparavant
- l'information d'une prescription hors-AMM doit être donnée au patient et tracée dans le dossier

Favoriser l'accès au traitement

Accès aux traitements : programme AcSé

Modèle de collaboration avec les plateformes

AcSé Moléculaire <i>ALK, MET, ROS, BRAF</i>	AcSé Crizotinib Essai	AcSé Vemurafenib Essai
	10000 à 18000 patients 14000 à 25000 tests	
28 plateformes de génétique moléculaire INCa	200 à 420 patients	
	 promoteur	Jusqu'à 250 Centres investigateurs

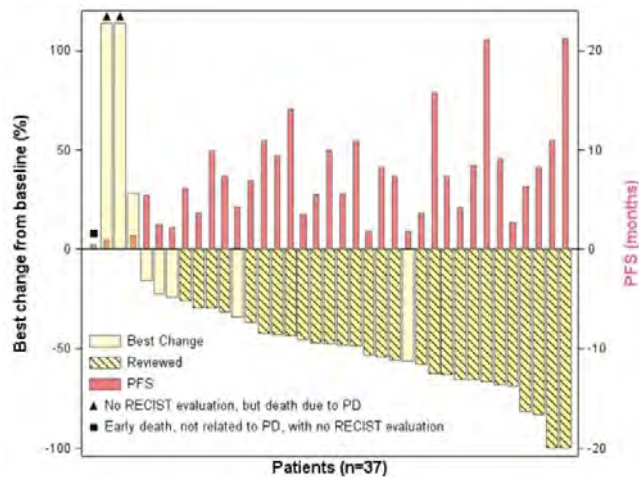


Favoriser l'accès au traitement

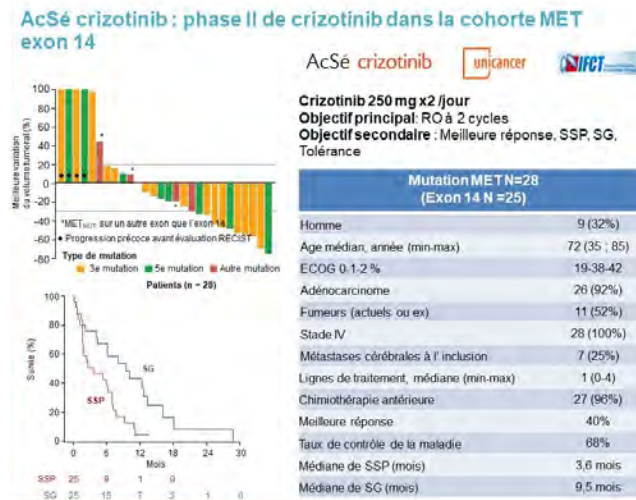
Accès aux essais : programme AcSé

Exemple d'AcSé crizotinib et AcSé vemurafenib

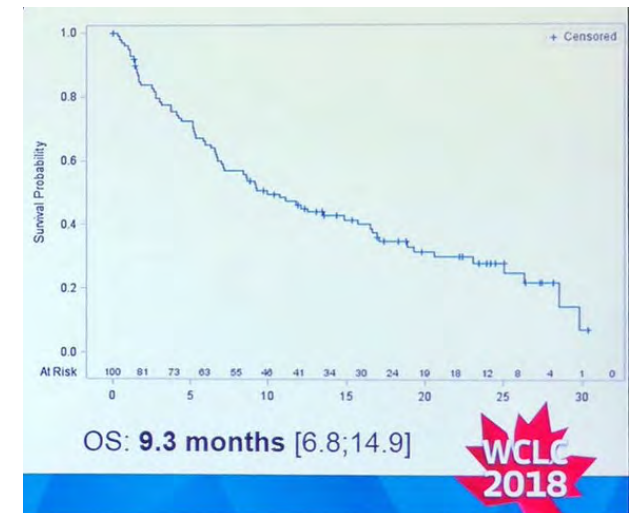
ROS1



MET exon 14



BRAF



Favoriser l'accès au traitement

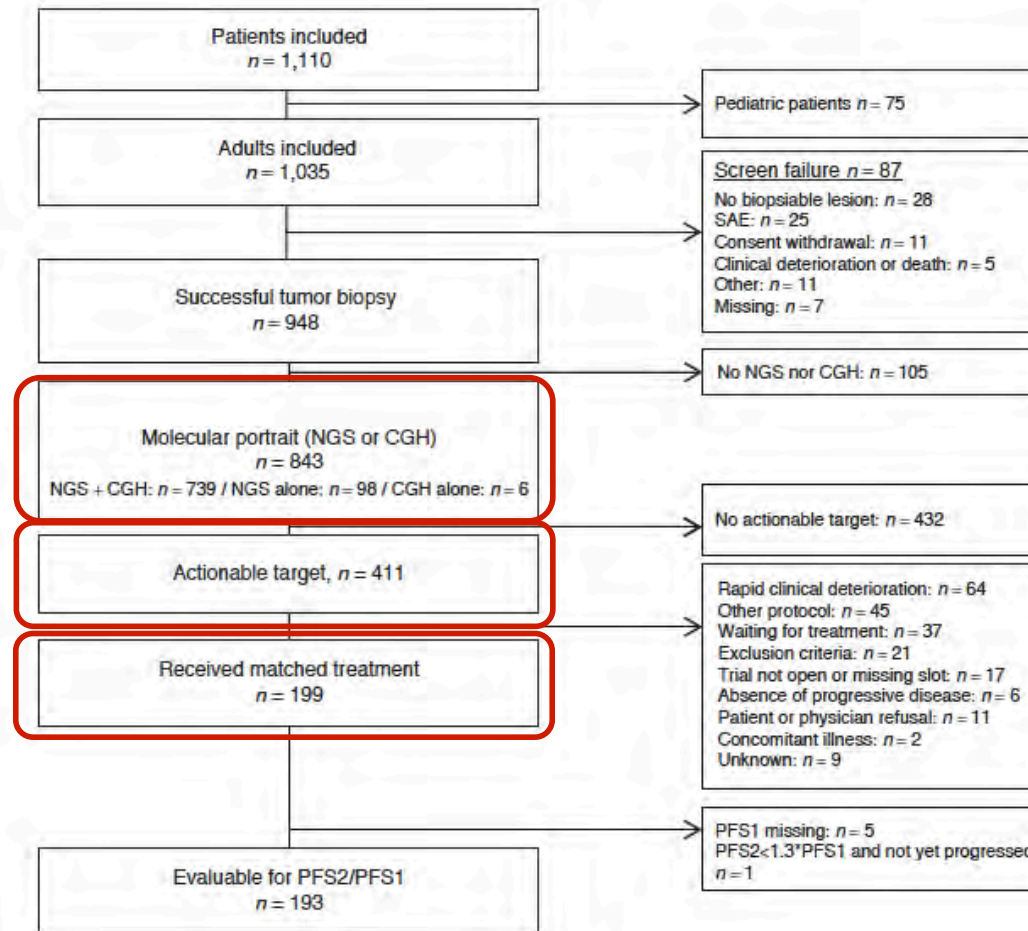
Accès aux traitements : programmes de screening moléculaire avec orientation vers essais cliniques

Exemple de l'essai **MOSCATO**

- Etude prospective
- Patients avec tout type de cancer, ayant déjà reçu une ligne de traitement, sans mutation connue accessible à une thérapie ciblée
Analyse NGS ciblé + CGH (amplifications/délétions) + RNA seq
- Objectif : démontrer une amélioration de la PFS sous traitement guidé par la biologie moléculaire par rapport à la PFS précédente

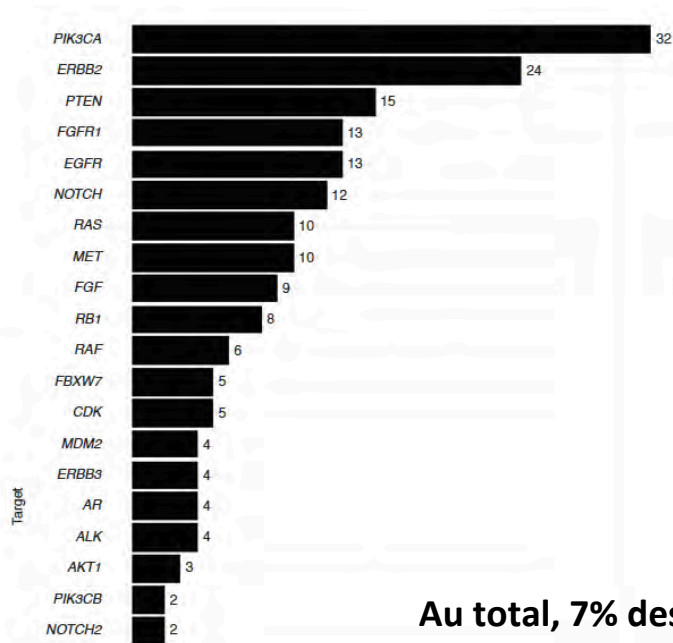
Favoriser l'accès au traitement

Résultats

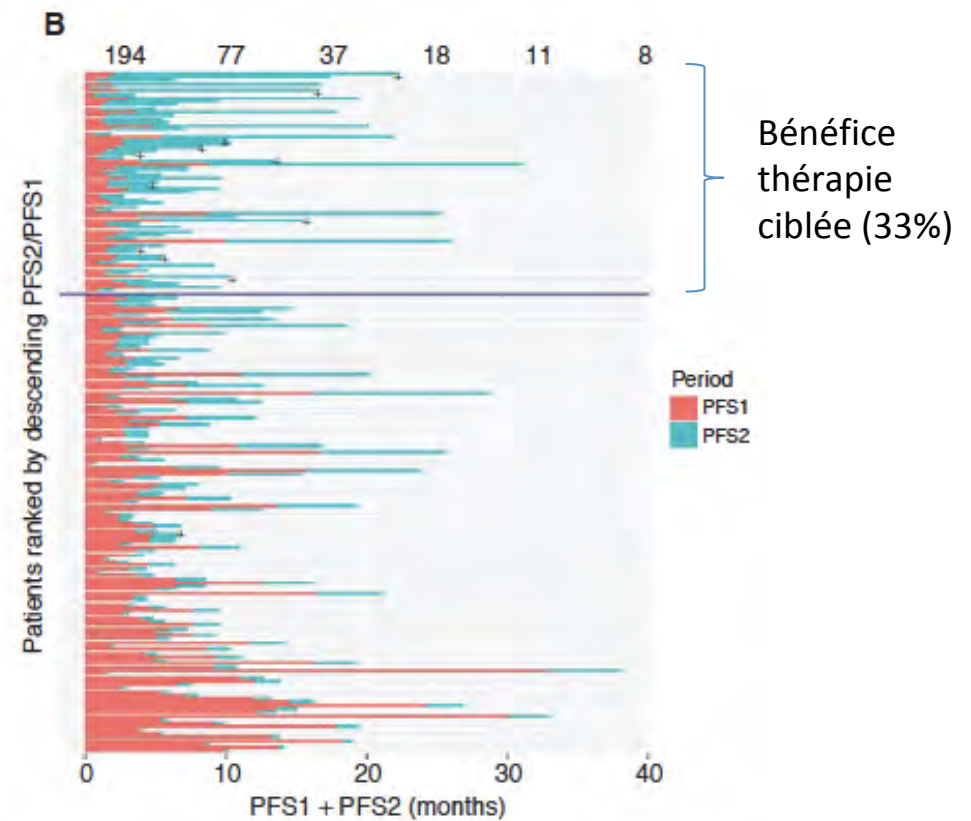


Favoriser l'accès au traitement

Résultats



Au total, 7% des patients ont bénéficié de cette approche



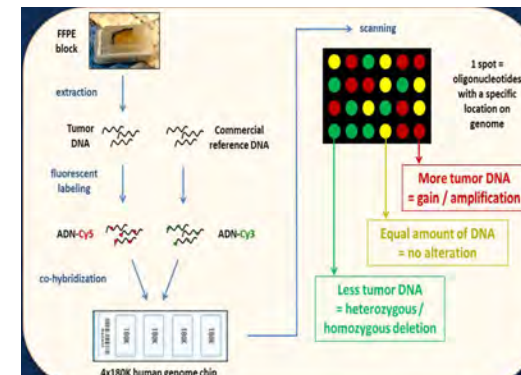
Favoriser l'accès au traitement

Accès aux traitements : programmes de screening moléculaire avec orientation vers essais cliniques

Exemple de l'essai **PROFILER**

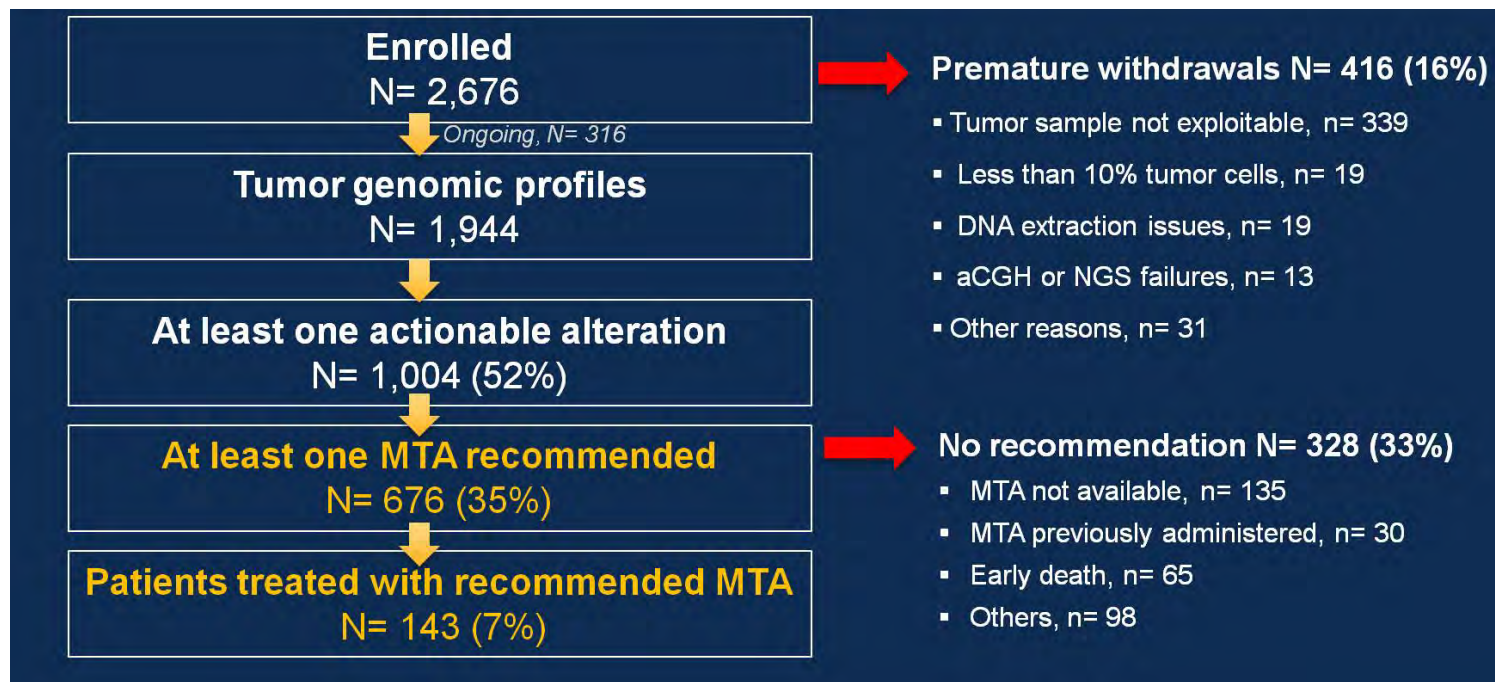
- Etude prospective
 - Patients avec tout type de cancer
 - Echantillon tumoral disponible
- Analyse NGS ciblé + CGH (amplifications/délétions)

ABL1	CSF1	FGFR4	KIT	PDGFB	ROR1	SRC
AKT1	CSF1R	FLT1	KRAS	PDGFRA	ROR2	STK11
AKT2	DDB2	FLT3	MERTK	PDGFRB	ROS1	TEK
ALK	DDR1	FLT4	MET	PIK3CA	RYK	TIE1
APC	DDR2	GNAQ	MPL	PIK3R1	SDHAF2	TP53
AXL	EGFR	HRAS	MST1R	PTCH1	SDHB	TSC1
BRAF	ERBB2	IGF1R	MTOR	PTEN	SDHC	TSC2
BRCA1	FGFR1	JAK2	MUSK	RAF1	SDHD	TYRO3
BRCA2	FGFR2	JAK3	NRAS	RB1	SMARCB1	VHL
CDKN2A	FGFR3	KDR	PDGFA	RET	SMO	



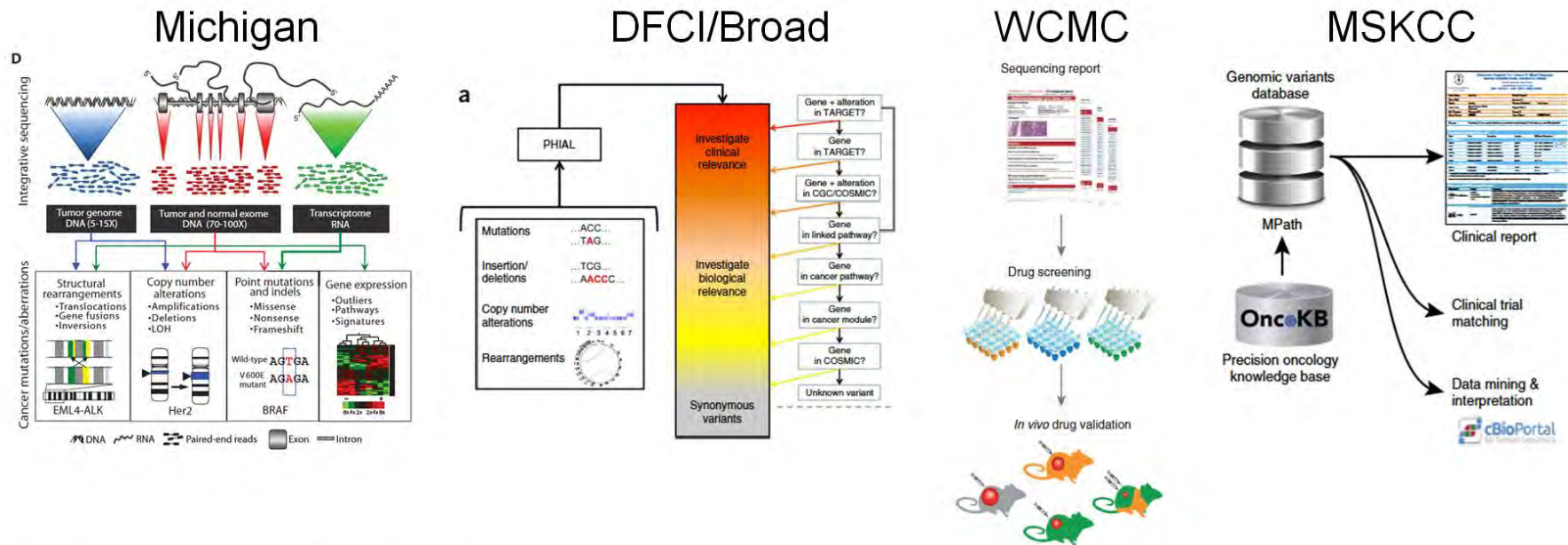
Favoriser l'accès au traitement

Résultats



Favoriser l'accès au traitement

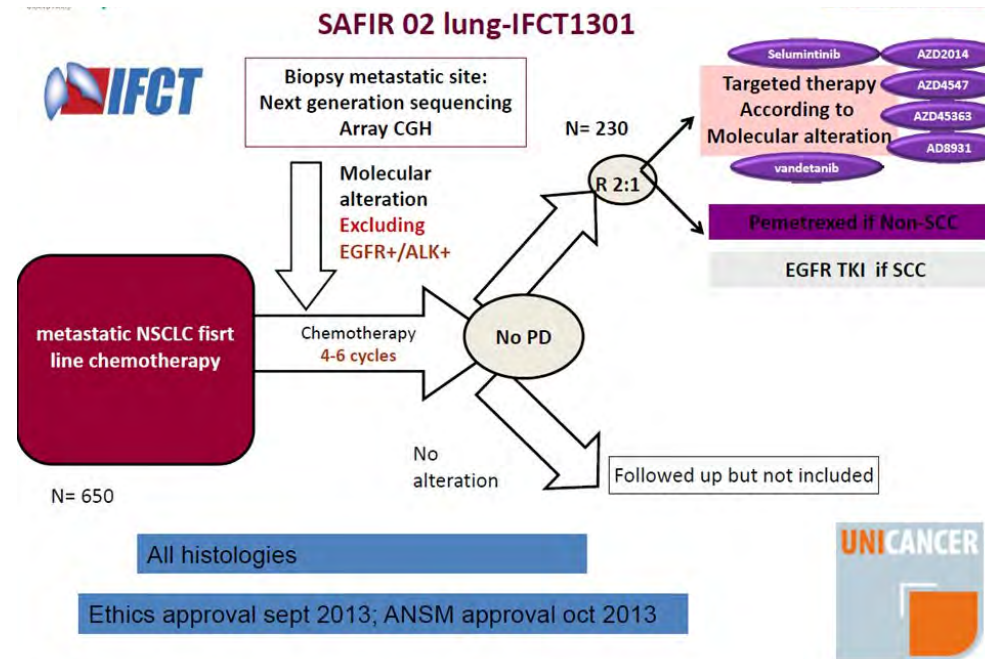
Développement de programmes de screening moléculaire



Favoriser l'accès au traitement

Challenge : développement d'essais capables de démontrer l'intérêt d'un traitement guidé par la biologie moléculaire

Exemple de l'essai SAFIR02



Conclusion

- Le séquençage à haut débit est une opportunité de détecter plus de cibles accessibles à une thérapie ciblée
- Une validation préclinique de l'intérêt des cibles identifiées est une étape indispensable
- Les résultats de séquençage haut débit doivent être discutés en RCP moléculaire
- La priorité doit être donnée vers l'orientation en essai clinique. Les prescriptions hors-AMM sont envisageables en l'absence d'alternative thérapeutique
- Des essais de validation de l'intérêt du guidage moléculaire pour la décision thérapeutique sont en cours