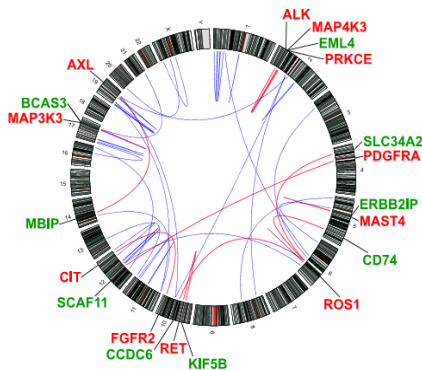


## ALK-ома легкого – что это такое?

Демидова И.А., лаборатория  
молекулярной диагностики МГОБ 62

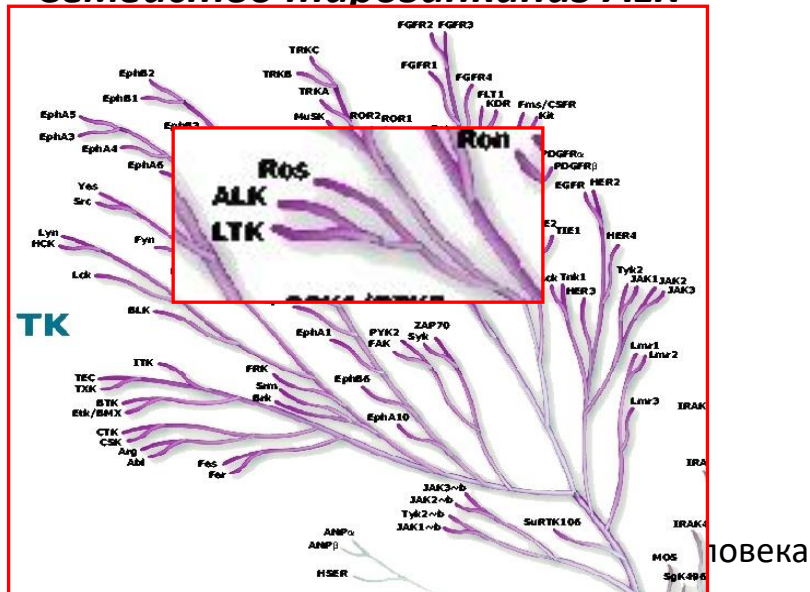
## Рearранжировки генов при солидных опухолях



- Известно более 280 генов, участвующих в реарранжировках при злокачественных опухолях
- Опухоли эпидермальной природы не менее часто несут транслокации, чем мезенхимальные и гематологические опухоли
- Однако реарранжировки, активирующие тирозинкиназы-двигатели онкогенеза довольно редки
- Транслокации с участием гена ALK – наиболее яркий пример, описаны для целого ряда опухолей

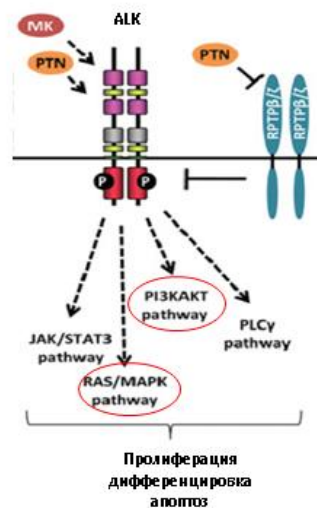
Medves S et al, J Cell Mol Med 2012, Ladanyi M et al, Nature 2012

## Семейство тирозинкиназ ALK



## Функции рецептора ALK в нормальной клетке

- Рецепторная тирозинкиназа
- Предполагаемые лиганды: плейотропин и мидкин (PTN, МК)
- Высоко экспрессируется в нервной ткани в эмбриональном периоде развития
- Во взрослом возрасте экспрессия крайне низка и привязана к определенным типам тканей
- Участвует в активации путей PI3K, RAS/MAPK, JAK/STAT и PLCγ, индуцируя пролиферацию клеток



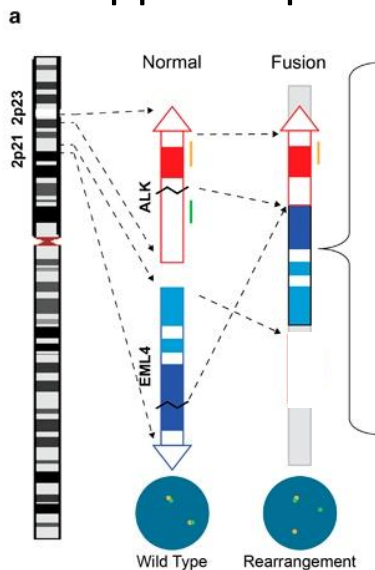
Palmer RH, Vernersson E. et al. B. Biochem J. 2009

## Перестройки гена *ALK* при злокачественных опухолях

Нозология	Гены-партнеры	Частота встречаемости
Анапластическая Т-клеточная лимфома	9 партнеров, самый частый - <i>NPM</i>	Около 30% у взрослых, до 90% у детей
Воспалительная миофибробластическая опухоль	7 партнеров, самый частый – <i>TPM3</i>	36- 50% случаев
НМРЛ	5 партнеров, самый частый – <i>EML4</i>	2-5% случаев
ДБККЛ	<i>NPM, CLTC1, SQSTM1, SEC31A</i>	Не установлена
РМЖ	<i>EML4</i>	<5% (?)
Колоректальный рак	<i>EML4, C2orf44</i>	<5%
Плоскоклеточный рак пищевода	<i>TPM4</i>	Не установлена (<1%)
Рак почки	<i>VCL, EML4, TPM3</i>	Не установлена (<1%)

Palmer RH, Vernersson E. et al. B. Biochem J. 2009: Roskoski R, Pharm Research 2013

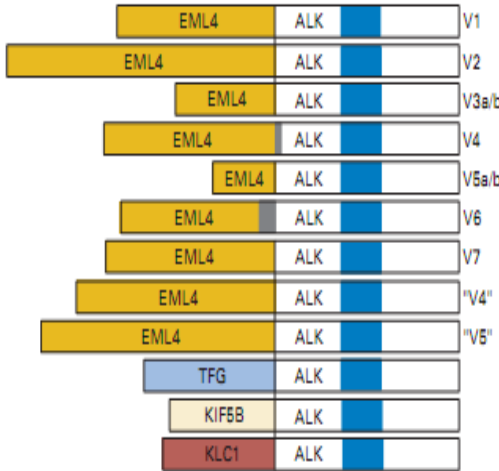
## Рearранжировки гена *ALK* при НМРЛ



- При НМРЛ обнаружены в 2007 г (Soda et al)
- Наиболее частый механизм образования (95%) – парацентрическая инверсия 2p и образование химерного онкогена *EML4/ALK*, часто – с частичной делецией 5' последовательностей *ALK*
- Межхромосомные перестройки с участием *KIF5B, TFG, KLC1* и *PTPN3* довольно редки

Soda et al, Nature 2007, Cheng et al, Modern Pathol 2012

## Химерные протеины с участием *ALK* при НМРЛ



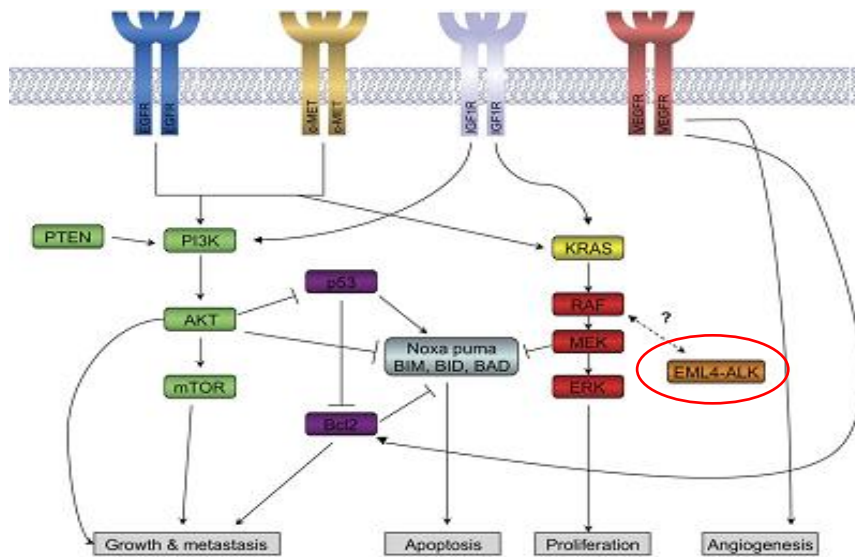
Известно как минимум 13 типов химерного транскрипта *EML4/ALK*

Во всех случаях в транслокации участвует тирозинкиназный домен *ALK* (экзоны 20(19) – 29)

Химерные протеины экспрессируются с различной интенсивностью, отличаются конформационными особенностями и скоростью распада

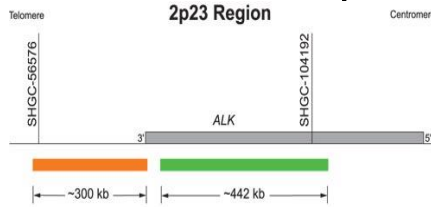
Show and Engelman, J Clin Oncol 2013; Heuckmann et al, Clin Cancer Res 2012

## Роль химерных протеинов *EML4/ALK* в онкогенезе НМРЛ

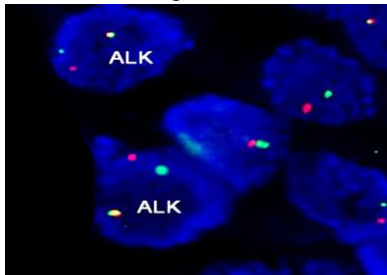


West L et al. PloS ONE 2012

## Метод FISH для определения перестроек *ALK*



LSI ALK Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe



- FDA рекомендует Vysis LSI ALK Break Apart Rearrangement Probe Kit
- Кроме того, существуют пробы Dako, Metasystems, Abnova, Kreatech (тот же принцип), а также Kreatech и ZytoVision для определения слитного сигнала *EML4/ALK*

<https://www.abbottmolecular.com>

## Достоинства и недостатки метода

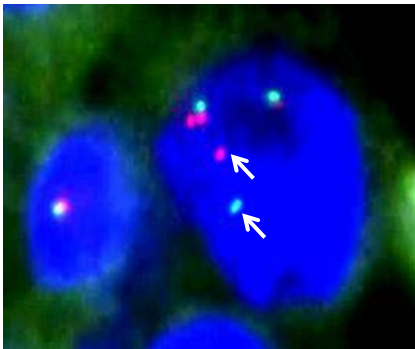
- |  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Достоинства:</li> <li>• Прямой метод</li> <li>• Способен определять практически любые виды перестроек</li> <li>• Пригоден для исследования архивных блоков, цитологических препаратов, отпечатков и т.д.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Недостатки:</li> <li>• Дорог и требователен к преаналитической фазе</li> <li>• Необходимо достаточное количество материала</li> <li>• Требуется соответствующей квалификации исполнителя</li> </ul> |
|--|--|

## Рекомендации ESP по определению перестроек *ALK* при НМРЛ методом FISH

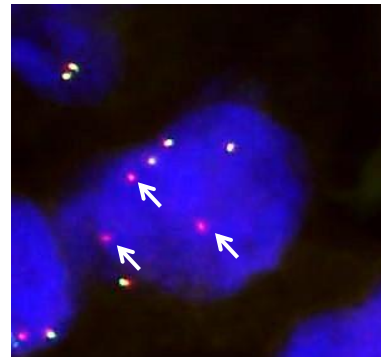
- FDA рекомендует обязательное применение метода FISH для подтверждения реарранжировки *ALK* после любого скринингового метода
- Приняты следующие рекомендации по подсчету:
  - не менее 50 ядер в 4 различных зонах опухоли;
  - критерием разрыва является расстояние между сигналами в 2 красных сигнала;
  - пороговый уровень – не менее 15% ядер с перестройкой
  - при обнаружении > 20%, но < 50% ядер с перестроенным сигналом обязателен подсчет образца вторым специалистом

Thunissien et al, Virch Arch 2012

## Варианты перестройки *ALK* при использовании метода FISH



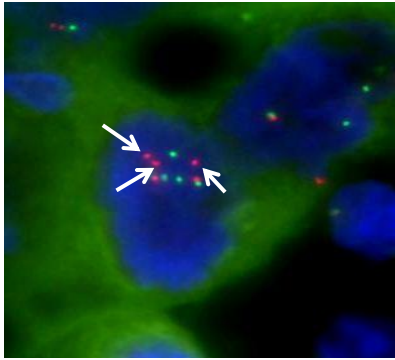
**Типичное расхождение двух сигналов**



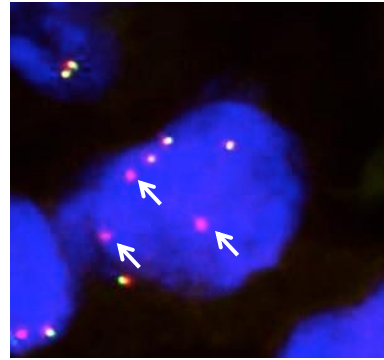
**Потеря зеленого сигнала: перестройка с частичной делецией**

Собственные данные лаборатории МГОБ 62

## Увеличение копийности и частичная делеция *ALK*



Увеличение копийности  
перестроенной аллели



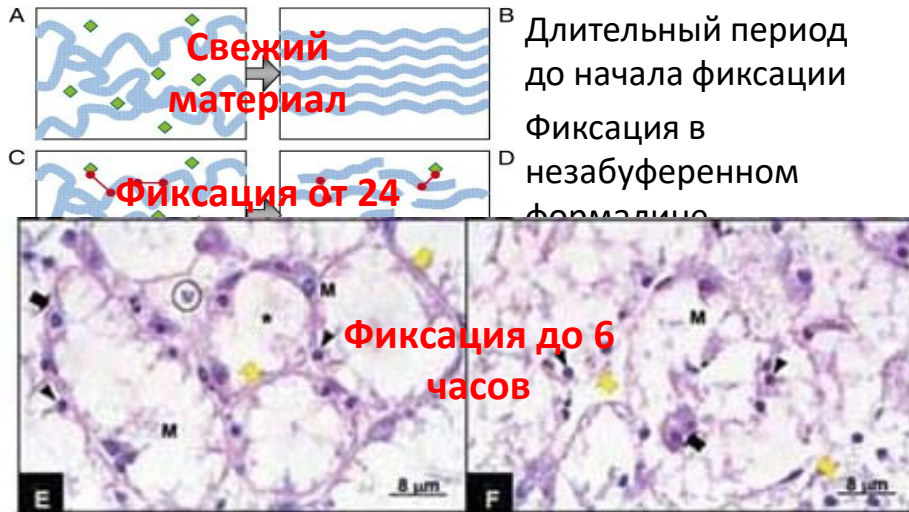
Увеличение копийности с  
частичной делецией 5'*ALK*

Собственные данные лаборатории МГОБ 62

## Сложные случаи

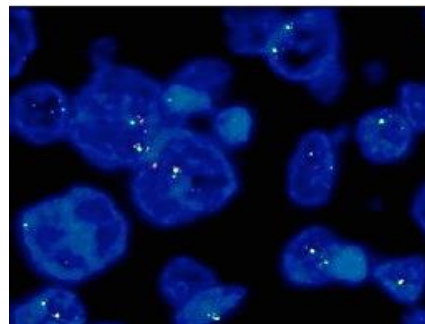
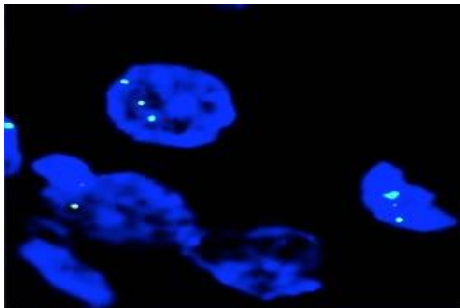
- Малое количество клеток в препарате
- Дефекты преаналитической фазы
- Сложности в проведении анализа и интерпретации результатов исследования

## Сложности преаналитической фазы



John A. Kiernan, Pathology 1993, Rodrigez NL et al, J Appl Oral Sci 2010

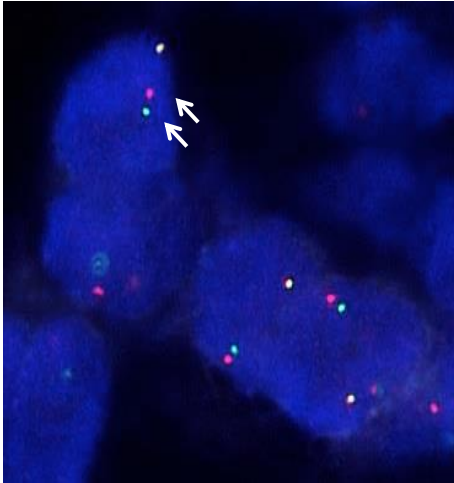
## Дефекты FISH, связанные с недостаточной или избыточной фиксацией препаратов



Собственные данные лаборатории МГОБ 62



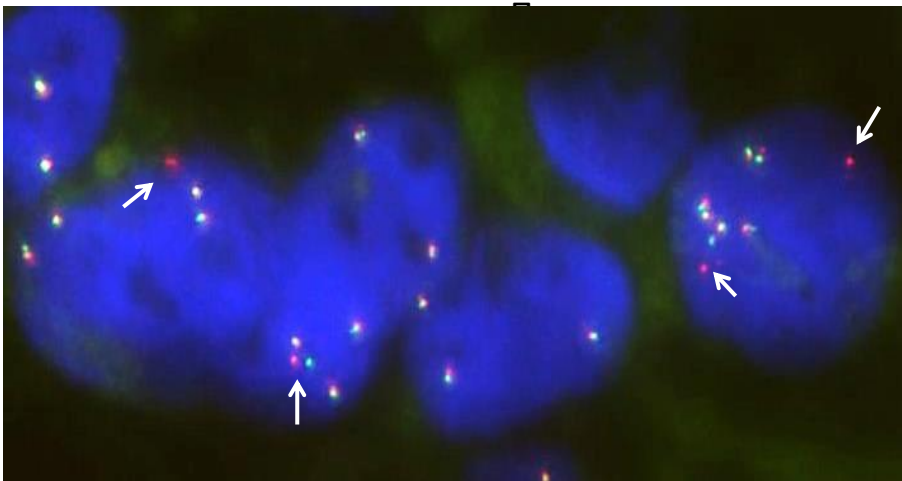
## Сложности анализа – типичная инверсия 2p



- При типичной инверсии расстояние между 2 сигналами составляет всего 12,5 Мб
- Применение рекомендованного порогового уровня разрыва в размере 2-х сигналов может привести к ошибке
- Иногда при длительной обработке пепсином возникает подобный артефакт – сигналы лежат отдельно, не образуя слитный желтый сигнал

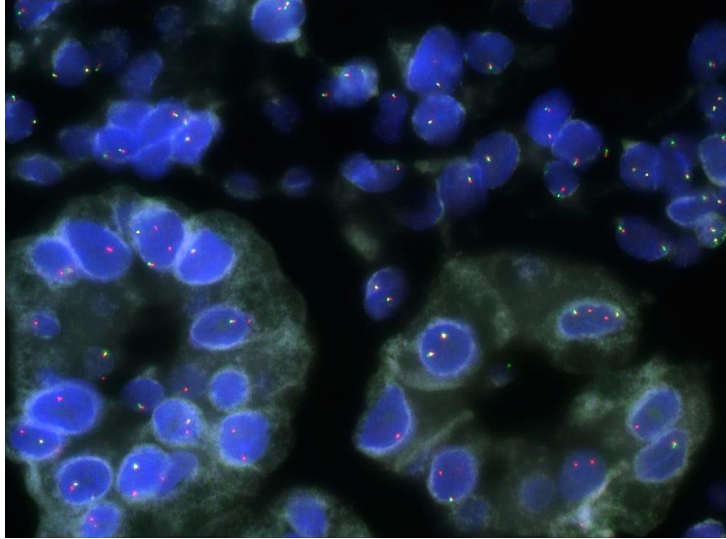
Собственные данные лаборатории МГОБ 62

## Сложности анализа – увеличение копийности неперестроенного гена



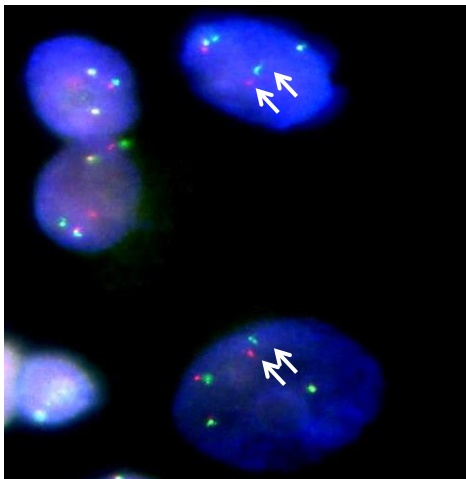
Собственные данные лаборатории МГОБ 62

## Сложности анализа – внутриопухолевая гетерогенность

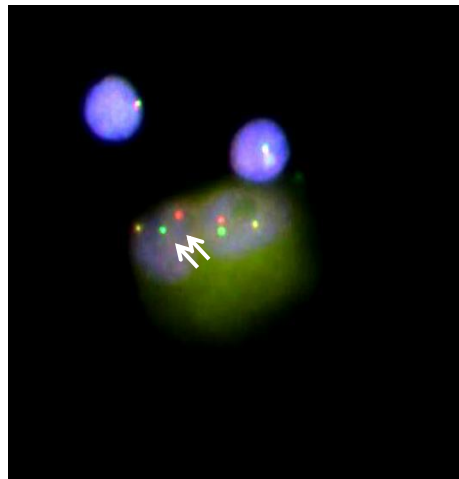


Собственные данные лаборатории МГОБ 62

## Сложный материал - исследование цитологических препаратов и плеврального выпота



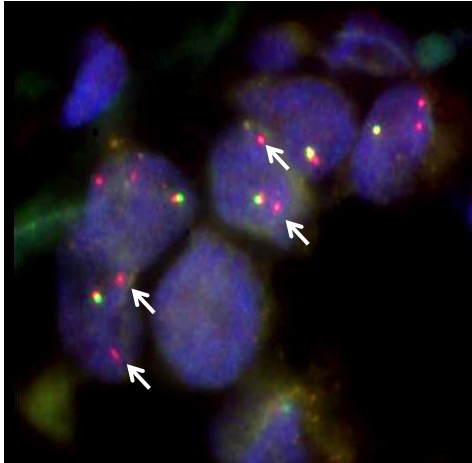
**Цитологический препарат**



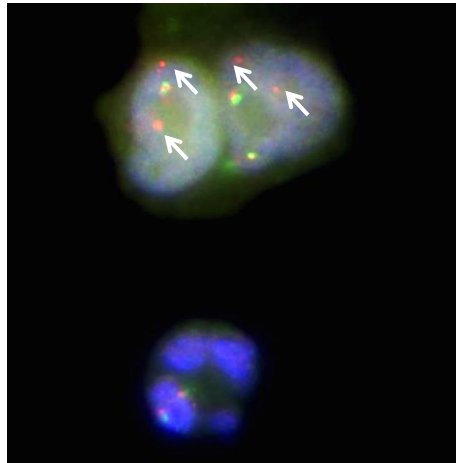
**Клетки плеврального выпота**

Собственные данные лаборатории МГОБ 62

## Сложный материал - исследование окрашенных препаратов



Окрашенный архивный гистологический препарат



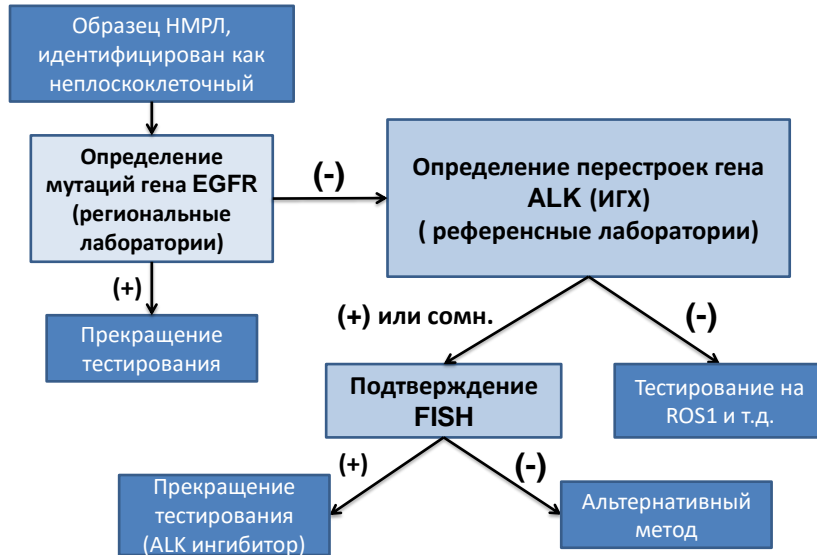
Окрашенный цитологический препарат

Собственные данные лаборатории МГОБ 62

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ  
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ДИАГНОСТИКИ  
В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

практическое руководство для врачей  
[www.cancergenome.ru](http://www.cancergenome.ru)

## Алгоритм RUSSCO для определения перестроек ALK



Собственные данные лаборатории МГОБ 62

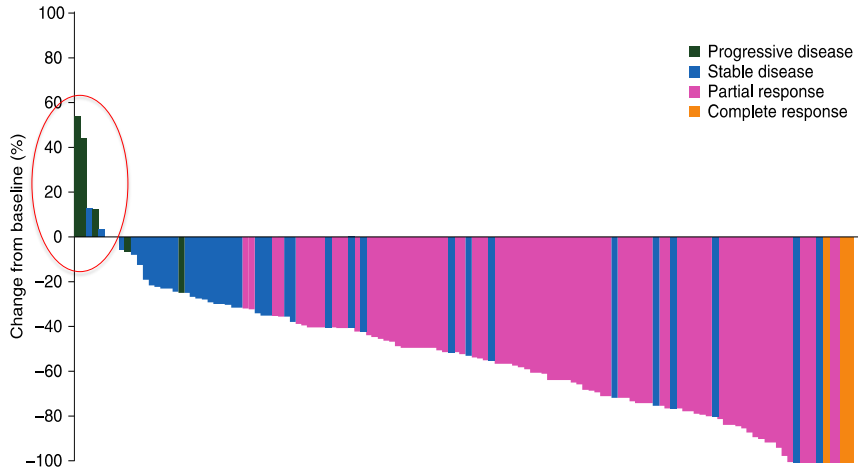
## Результаты определения перестроек гена ALK (02.12-12.16)



	ALK	
	абс.	%
Да - мутация выявлена	500	6,9%
Нет - мутация отсутствует	6010	82,9%
Не определен	740	10,21%
<b>Всего</b>	<b>7250</b>	<b>100,00%</b>

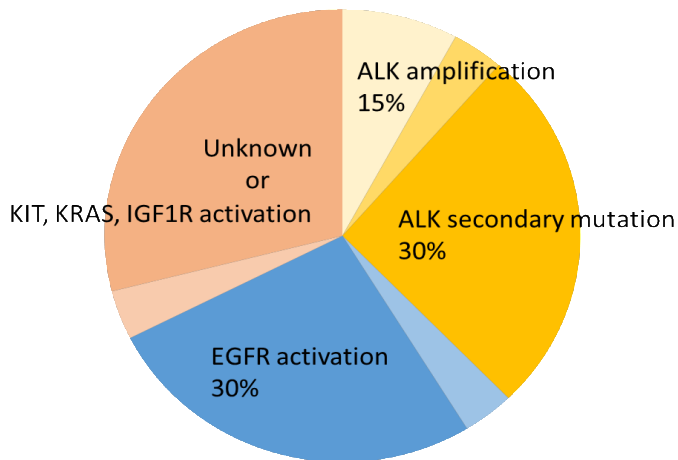
Данные RUSSCO; [www.rosoncoveb.ru](http://www.rosoncoveb.ru) [www.cancergenome.ru](http://www.cancergenome.ru)

## Первый зарегистрированный препарат - кризотиниб



Blackholl & Capuzzo, *Annals of Oncology* 2016

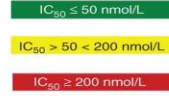
## Причины первичной и вторичной резистентности



Isozaki, Takegava and Kiura, *Cancers* 2015

## Новые препараты

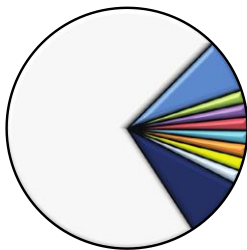
Mutation status	Crizotinib	Ceritinib	Alectinib	Brigatinib	Lorlatinib
Parental Ba/F3	763.9	885.7	890.1	2774.0	11293.8
<i>EML4-ALK</i> V1	38.6	4.9	11.4	10.7	2.3
<i>EML4-ALK</i> C1156Y	61.9	5.3	11.6	4.5	4.6
<i>EML4-ALK</i> I1171N	130.1	8.2	397.7	26.1	49.0
<i>EML4-ALK</i> I1171S	94.1	3.8	177.0	17.8	30.4
<i>EML4-ALK</i> I1171T	51.4	1.7	33.6 <sup>a</sup>	6.1	11.5
<i>EML4-ALK</i> F1174C	115.0	38.0 <sup>a</sup>	27.0	18.0	8.0
<i>EML4-ALK</i> L1196M	339.0	9.3	117.6	26.5	34.0
<i>EML4-ALK</i> L1198F	0.4	196.2	42.3	13.9	14.8
<i>EML4-ALK</i> G1202R	381.6	124.4	706.6	129.5	49.9
<i>EML4-ALK</i> G1202del	58.4	50.1	58.8	95.8	5.2
<i>EML4-ALK</i> D1203N	116.3	35.3	27.9	34.6	11.1
<i>EML4-ALK</i> E1210K	42.8	5.8	31.6	24.0	1.7
<i>EML4-ALK</i> G1269A	117.0	0.4	25.0	ND	10.0
<i>EML4-ALK</i> D1203N+F1174C	338.8	237.8	75.1	123.4	69.8
<i>EML4-ALK</i> D1203N+E1210K	153.0	97.8	82.8	136.0	26.6



Gainor et al *Cancer Discovery* 2016

## Спектр эффективности в клиническом приложении

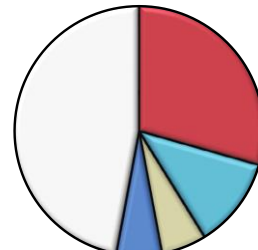
Crizotinib-resistant specimens  
N = 55



Ceritinib-resistant specimens  
N = 24

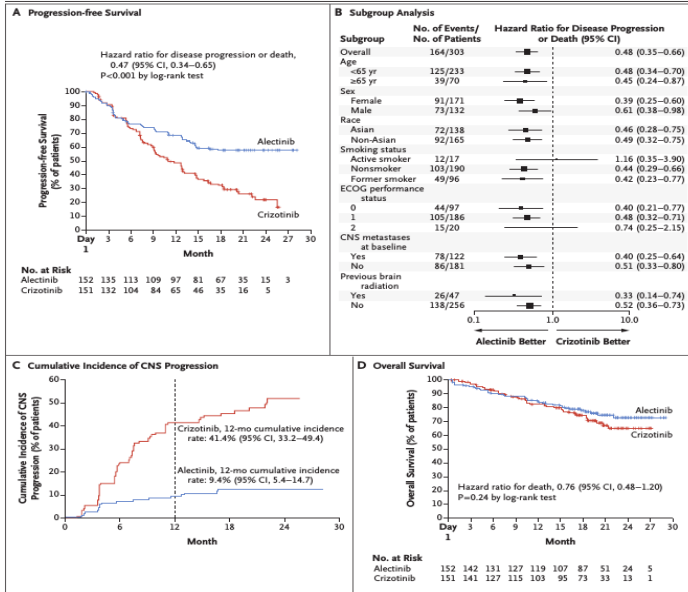


Alectinib-resistant specimens  
N = 17



Gainor et al *Cancer Discovery* 2016

## Результаты прямого сравнения кризотиниба и алектиниба



Peters et al NEJM 2017

## Рекомендации NCCN 1.2019

Printed by user on November 11, 2019 2:27:10 PM. For personal use only; not approved for circulation. Copyright © 2019 National Comprehensive Cancer Network, Inc. All rights reserved.

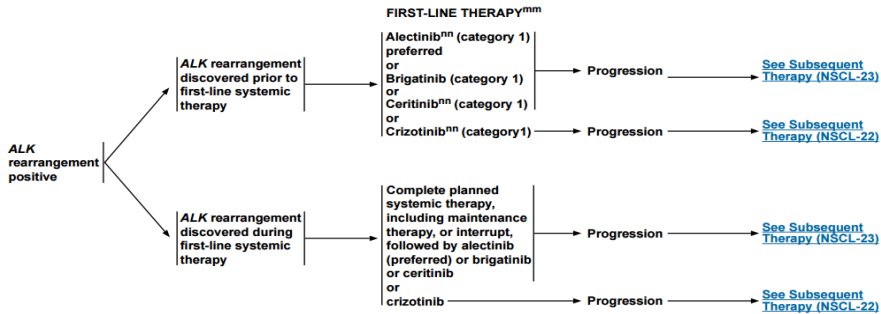


National Comprehensive Cancer Network®

### NCCN Guidelines Version 1.2019 Non-Small Cell Lung Cancer

[NCCN Guidelines Index](#)  
[Table of Contents](#)  
[Discussion](#)

#### ALK REARRANGEMENT POSITIVE<sup>hh</sup>



<sup>hh</sup>See Principles of Molecular and Biomarker Analysis (NSCL-G).  
<sup>mm</sup>See Targeted Therapy for Advanced or Metastatic Disease (NSCL-J).  
<sup>nn</sup>For performance status 0-4.

Note: All recommendations are category 2A unless otherwise indicated.  
Clinical Trials: NCCN believes that the best management of any patient with cancer is in a clinical trial. Participation in clinical trials is especially encouraged.

Version 1.2019, 10/19/18 © National Comprehensive Cancer Network, Inc. 2018. All rights reserved. The NCCN Guidelines® and this illustration may not be reproduced in any form without the express written permission of NCCN®.

Спасибо за внимание!