



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in
Medicina Molecolare

Ciclo XXX

Alterations of MET gene in Non Small Cell Lung
Cancer and their role in new targeted therapy

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Luciano Polonelli

Tutor:
Chiar.mo Prof. Andrea Ardizzoni

Dottorando: Laura Casolari

Anni 2014-2017

INDICE

INTRODUZIONE

IL TUMORE DEL POLMONE

1.	Epidemiologia	7
2.	Fattori di rischio	9
3.	Anatomia patologica	9
4.	Mortalità	10
5.	Trattamenti	10

IL GENE MET

1.	Funzione del gene MET	13
2.	Alterazioni del gene MET	15

FARMACI ANTI-MET

1.	Anticorpi monoclonali	18
2.	Inibitori dell'attività tirosin-chinasica	19

PERCORSO DAL TARGET AL FARMACO

1.	Bersaglio e lead compounds	21
2.	Sperimentazione preclinica	22
3.	Sperimentazione clinica	23

PROGETTO DI RICERCA

29

MATERIALI E METODI

STUDI CLINICI

1.	Studio clinico CINC280A2201	32
2.	Studio clinico CINC280x2202	33
3.	Studio clinico TED11449	34

ALTERAZIONI DEL GENE MET

1.	Amplificazione gene MET	38
2.	Mutazioni gene MET	39
3.	Analisi mutazionale gene MET	41
4.	Analisi FISH gene MET	43

RISULTATI

STUDI CLINICI

1.	Studio clinico CINC280A2201	46
2.	Studio clinico CINC280x2202	50
3.	Studio clinico TED11449	51

ALTERAZIONI DEL GENE MET

- | | | |
|-----------|--------------------------------|-----------|
| 1. | Amplificazione gene MET | 53 |
| 2. | Mutazioni gene MET | 56 |

DISCUSSIONE	66
--------------------	-----------

RINGRAZIAMENTI	70
-----------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA	72
---------------------	-----------

INTRODUZIONE

IL TUMORE DEL POLMONE

1. EPIDEMIOLOGIA

Il carcinoma del polmone è il tipo di tumore più comune in termini di incidenza e mortalità nell'uomo mentre tra le donne è al terzo posto come incidenza ed è secondo, dopo il tumore al seno, come mortalità. Si calcola che un uomo su 9 e una donna su 47 corrano il rischio di ammalarsi di questa patologia, la cui prognosi è ancora ad oggi particolarmente sfavorevole. Nel 2012 ci sono stati 1,82 milioni di nuovi casi a livello globale e 1,56 milioni di decessi che rappresentano il 19,4% delle morti per cancro. In Italia i casi diagnosticati nel periodo 2007-2010 sono rappresentati per il 38% da adenocarcinoma (33% tra gli uomini e 48% tra le donne), per il 22% da carcinomi squamosi (26% negli uomini e 13% nelle donne) e per il 12% da tumori a piccole cellule. L'insorgenza di questa patologia negli uomini è prevalente nei soggetti al di sopra dei 50 anni mentre solo il 5% dei casi si riscontra in persone più giovani, anche nelle donne sotto i 50 anni è raro mentre nella fascia di età tra i 50 ed i 60 anni rappresenta la quarta neoplasia come incidenza e tra le donne al di sopra dei 70 anni è la terza neoplasia diagnosticata. Si registra una marcata diminuzione di incidenza negli uomini (in relazione ad una altrettanto modesta riduzione dell'abitudine al fumo) pari al 5,2% all'anno negli ultimi tempi mentre vi è un aumento dei nuovi casi tra le donne (2,7% all'anno dal 1996 al 2014).

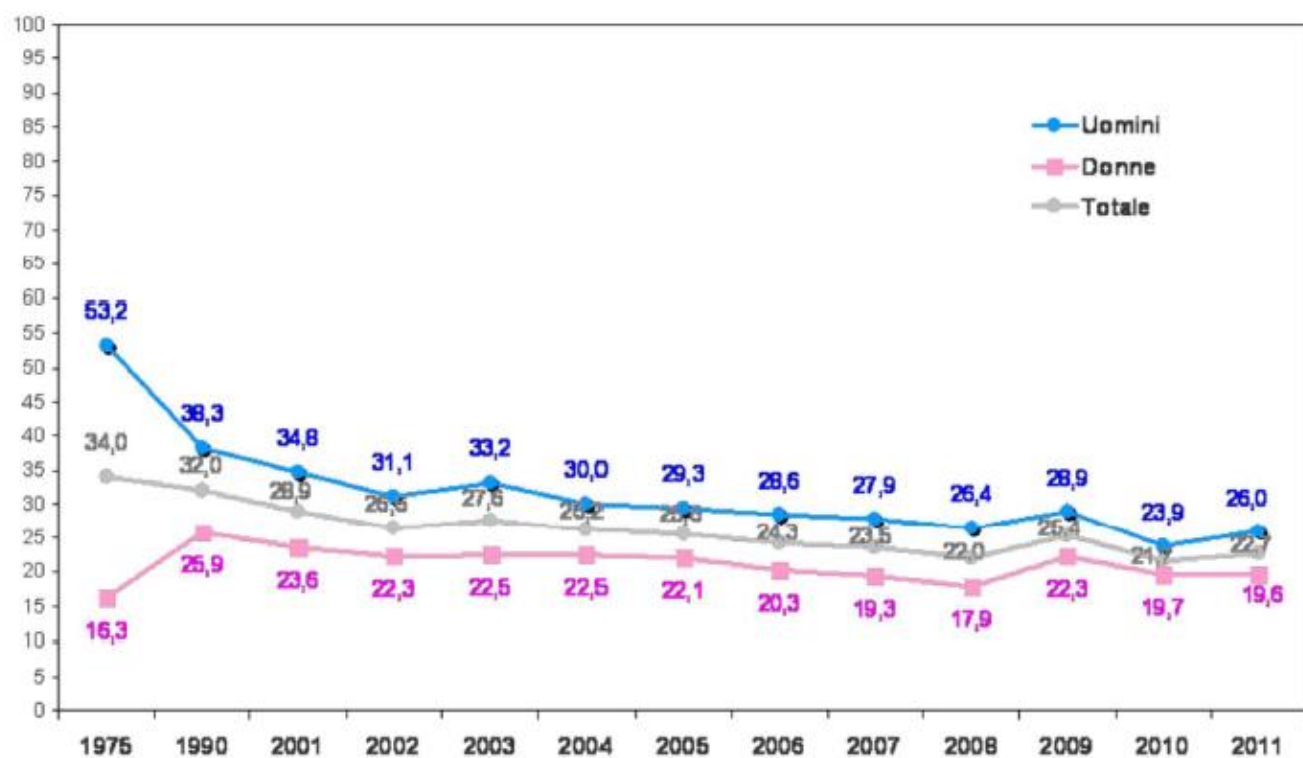


Figura 1 Smoking percentage in Italy from 1975 to 2011

2. FATTORI DI RISCHIO

La maggior parte dei casi di tumore al polmone (80-90 %) sono dovuti alla lunga esposizione al fumo di tabacco; tale rischio si incrementa con la quantità delle sigarette fumate e con la durata dell'abitudine al fumo. Il rischio relativo dei fumatori rispetto ai non fumatori è aumentato di circa 14 volte e aumenta ulteriormente fino a 20 volte nei forti fumatori. La sospensione del fumo di sigarette produce una forte riduzione del rischio. Ulteriori fattori di rischio sono l'esposizione ambientale o professionale a radon, asbesto e metalli pesanti e anche da processi infiammatori cronici quali la tubercolosi. I non fumatori esposti al fumo passivo presentano un aumento del rischio relativo di ammalarsi di tumore al polmone nel corso della loro vita.

3. ANATOMIA PATOLOGICA

Il tumore del polmone può essere diviso in due grandi categorie sulla base della biologia, terapia e prognosi: il tumore polmonare a piccole cellule, o *Small Cell Lung Cancer* (SCLC) e *Non Small Cell Lung Cancer* (NSCLC). Quest'ultimo a sua volta è suddiviso in tre sottotipi principali: l'adenocarcinoma, che rappresenta il 40% dei casi, il carcinoma a cellule squamose, riscontrato nel 30% dei pazienti, e il carcinoma a grandi cellule. L'adenocarcinoma a sua volta può essere suddiviso in sottotipi a prognosi diversa. L'istotipo a cellule lepidiche e il mucinoso sono quelli che solitamente hanno prognosi migliore e di essi sono distinguibili anche forme precancerose e neoplasie in situ. L'adenocarcinoma solido, il papillare hanno solitamente prognosi peggiore. Il grado di differenziazione dei NSCLC viene classificato sec. WHO in G1-2-3 (bene, moderatamente, scarsamente differenziato). Lo stadio patologico TNM del carcinoma polmonare viene classificato sec. UICC o AJCC in base alle dimensioni del tumore, la mono/bilateralità, l'infiltrazione della pleura viscerale e parietale, l'interessamento del bronco principale e delle stazioni linfonodali mediastiniche.

4. MORTALITÀ

Nella maggior parte dei casi, al momento della diagnosi, la malattia è già estesa: circa il 30-40% dei pazienti con NSCLC e il 60% dei pazienti con SCLC è infatti metastatico all'esordio. Il tumore del polmone rappresenta la prima causa di morte per tumore nei maschi (il 27% del totale delle morti) e la terza causa nelle donne, dopo mammella e colon-retto (11% del totale delle morti). Tra gli uomini è al primo posto come causa di morte oncologica in tutte le fasce di età (under 50, 50-69 e over 70) mentre tra le donne è la seconda causa di morte per neoplasia nelle under 70 mentre rappresenta la terza causa nelle ultrasessantenni. L'analisi degli andamenti temporali conferma un decremento della mortalità nei maschi a partire dal 1996 (7,2% all'anno negli ultimi tempi) ed un costante incremento nelle femmine (1,9% all'anno nel periodo 1996-2014). La percentuale di sopravvivenza a 5 anni registrata nel 2010 è di circa il 14% nei maschi e del 18% nelle femmine; la percentuale di sopravvivere per ulteriori 5 anni cambia notevolmente dopo la diagnosi, essendo per i sopravvissuti ad 1 e 5 anni rispettivamente 32% e 73% tra gli uomini e 38% e 75% tra le donne.

5. TRATTAMENTI

Le scelte terapeutiche sono determinate in base alla tipologia istologica, allo stadio di presentazione della malattia e sono rappresentate dalla chirurgia, dalla radioterapia e dalla terapia medica, che utilizza farmaci chemioterapici e farmaci di nuova generazione a bersaglio molecolare e l'immunoterapia.

Nel caso del NSCLC, la chirurgia è la scelta consigliata per i tumori con stadiazione fino a IIIA seguita da chemioterapia adiuvante che è stato dimostrato incrementare la sopravvivenza dei pazienti operati; nel caso di tumori non candidabili alla chirurgia una combinazione chemio-radioterapica integrata può essere proponibile per gli stadi IIIB. L'attuale standard di trattamento nei pazienti con Performance Status (PS) 0-1 e malattia metastatica è rappresentato dalla chemioterapia che prevede

l'utilizzo di un'associazione di farmaci chemioterapici che comprendono un derivato del platino e farmaci di seconda generazione (taxani, gemcitabina, vinorelbina, pemetrexed). Tali combinazioni producono risposte obiettive pari al 30-35% con sopravvivenze mediane libera da progressione di circa 5 mesi e sopravvivenze globali di 8-10 mesi. Uno studio randomizzato ha dimostrato che l'utilizzo di pemetrexed, associato al cisplatino, aumenta la sopravvivenza nei pazienti con istologia non squamosa mentre l'associazione gemcitabina-cisplatino è di maggior vantaggio nel caso di istologia squamosa.

Il trattamento della malattia metastatica ha subito un notevole cambiamento nell'ultimo decennio, grazie alle importanti scoperte ottenute in merito alla biologia ed ai pathway molecolari coinvolti nello sviluppo e progressione di questo tumore. Una più approfondita conoscenza molecolare infatti si è tradotta nello sviluppo di nuovi farmaci a bersaglio molecolare, le cosiddette "targeted therapies".

Negli ultimi anni sono stati identificati molteplici fattori sia prognostici che predittivi nel tumore non a piccole cellule del polmonare. Un marker predittivo è una biomolecola che è indicativa di una efficacia terapeutica ad un determinato trattamento. Un marker prognostico invece è una biomolecola in grado di fornire un'indicazione sulla sopravvivenza del paziente indipendentemente dal trattamento ricevuto.

I biomarcatori predittivi nel tumore del polmone comprendono l'oncogene di fusione ALK e le mutazioni sensibilizzanti di EGFR. Nuovi potenziali biomarcatori includono HER2, le mutazioni di BRAF V600E, i riarrangiamenti di ROS1 e RET e l'amplificazione/mutazione di MET.

Un esempio di farmaco per il quale non esistono biomarcatori predittivi è rappresentato dal bevacizumab, un anticorpo monoclonale con funzione antiangiogenetica, il cui utilizzo è stato approvato per i tumori non squamosi in combinazione con un regime chemioterapico di carboplatino e paclitaxel. La scoperta che specifiche mutazioni a carico del gene EGFR, a livello dell'esone 19 o 21, rappresentano un importante fattore predittivo di risposta agli inibitori orali di tirosin-chinasi quali gefitinib, erlotinib e afatinib, ha fatto sì che questi farmaci venissero approvati per i pazienti con NSCLC in stadio IV EGFR mutati. Grazie

all'introduzione di queste terapie a bersaglio è stato possibile ottenere tassi di risposta del 70% quasi, fino a poco tempo impensabili in questa patologia, con sopravvivenze mediane superiori a 20 mesi. Le mutazioni di EGFR vengono riscontrate in una percentuale variabile compresa tra il 15-18% circa dei NSCLC e sono più frequentemente riscontrate nelle donne, non fumatrici, di etnia asiatica e con istologia di adenocarcinoma. L'implementazione della strategia terapeutica con questi farmaci di nuova generazione è stata un chiaro esempio di medicina personalizzata in cui la scelta del farmaco viene effettuata sulla base di specifiche mutazioni driver.

Analogamente, l'identificazione del gene di fusione ALK-EML4, presente in circa il 4% dei NSCLC, soprattutto adenocarcinomi, quale importante fattore predittivo di risposta al trattamento crizotinib ha portato all'approvazione di tale farmaco in prima linea in pazienti con ALK riarrangiato. In questa sottopopolazione, l'impiego di crizotinib ha ottenuto risposte obiettive del 60% e sopravvivenza libera da progressione di circa 10 mesi.

Nei pazienti affetti da SCLC, la chemioterapia da sola o associata alla radioterapia rappresenta il trattamento di scelta in quanto circa il 90% dei pazienti presenta malattia localmente avanzata o metastatica e la chirurgia trova applicazione solo in rari casi. La combinazione di radio e chemioterapia è utilizzata in pazienti con tumore limitato al torace. In casi di malattia metastatica lo standard di terapia è costituito la chemioterapia con cisplatino ed etoposide che determina un elevato tasso di remissioni di malattia ed una sopravvivenza media di 7-10 mesi

IL GENE MET

1. FUNZIONE DEL GENE MET

Le terapie a target molecolare rappresentano una strategia promettente nella terapia mirata e personalizzata del tumore polmonare. L'identificazione dei principali meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo e progressione del tumore polmonare non a piccole cellule ha portato a ottenere risultati migliori e a prolungare la sopravvivenza dei pazienti affetti da tale neoplasia.

Il gene MET (Mesenchymal Epithelial Transition factor) è un proto-oncogene che codifica per la proteina c-MET, anche detta HGFR (hepatocyte growth factor receptor), un recettore transmembrana ad attività tirosin-chinasica prodotto da un precursore a singola catena, poi clivato in due subunità: una subunità alfa extracellulare e una subunità beta transmembrana unite da un ponte disolfuro.

Questo recettore e il suo specifico ligando HGF (Hepatocyte growth factor) sono principalmente coinvolti nella transizione epiteliale-mesenchimale delle cellule (epithelial-to-mesenchymal transition – EMT) e nella rigenerazione tissutale. In condizioni fisiologiche, MET è espresso dalle cellule epiteliali benché la sua presenza sia stata documentata anche nelle cellule endoteliali, epatociti, cellule ematopoietiche e melanociti dove gioca un ruolo cruciale per la gastrulazione, l'angiogenesi, la migrazione dei mioblasti, il rimodellamento osseo e lo sviluppo neurale.

Il legame di HGF induce la dimerizzazione di MET stimolando l'attivazione dell'attività tirosin-chinasica mediante la fosforilazione dei residui di tirosina Y1230, Y1234 e Y1235. L'attivazione di c-MET e delle vie di trasduzione del segnale a valle promuove la neo-angiogenesi tumorale, l'invasione cellulare e la metastatizzazione.

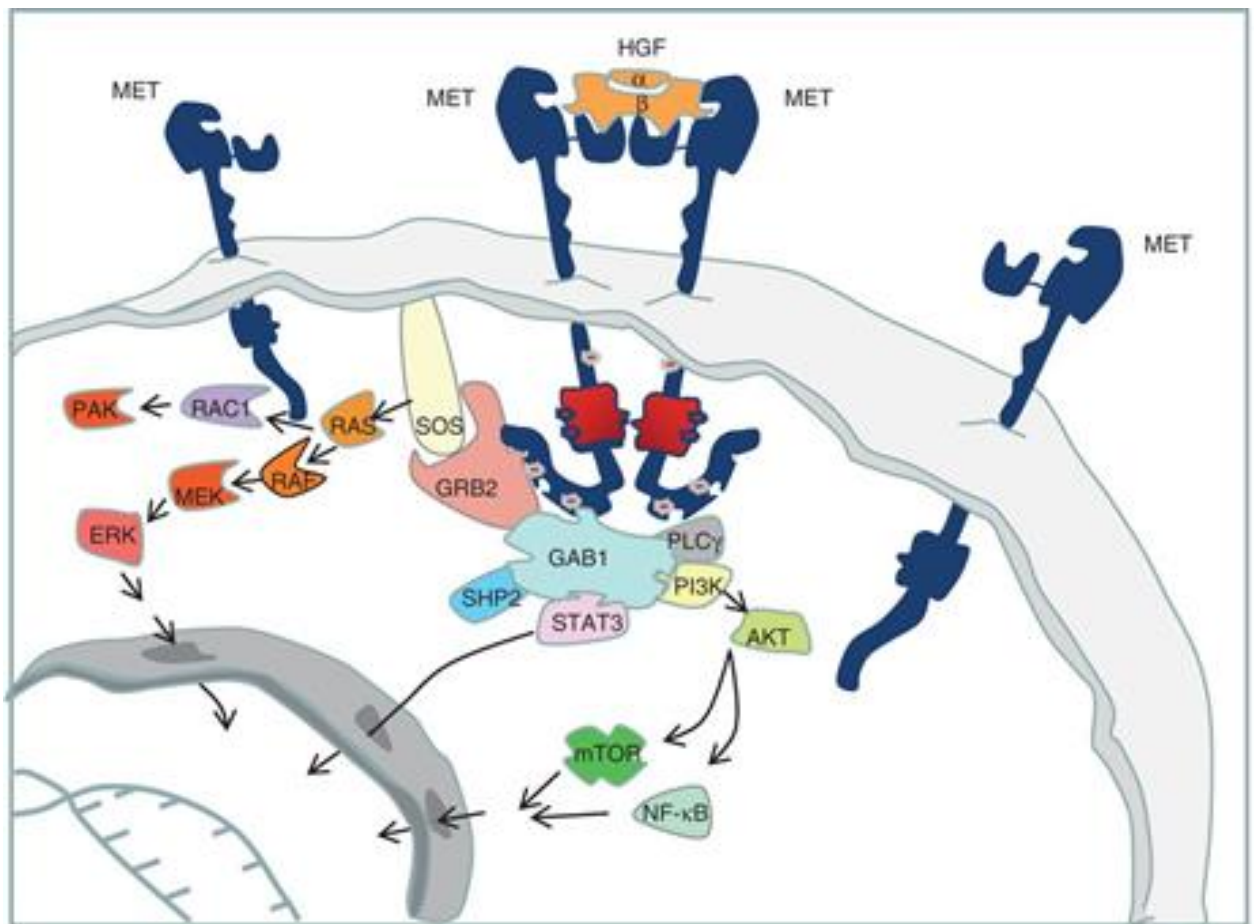


Figura 2 Pathway MET

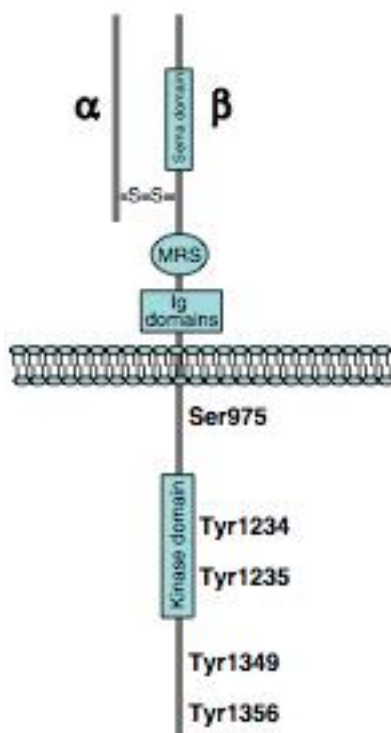


Figura 3 MET structure

2. ALTERAZIONI DEL GENE MET

Un'attivazione costitutiva di MET può essere causata da una sua iper-espressione, da un'amplificazione genica o da mutazioni a carico del dominio tirosin-chinasico e pertanto sembra correlare con una peggior sopravvivenza nei pazienti con tumore polmonare. L'espressione della proteina come biomarcatore immunoistochimico è stata proposta nel passato nonché oggetto di ampio dibattito. Tuttavia a differenza di altri oncogeni (es. HER2), per la risposta ai farmaci anti MET non sembra rilevante l'espressione della proteina totale bensì lo stato di fosforilazione della proteina. In tale ottica sarebbe quindi necessario utilizzare per l'immunoistochimica anticorpi specifici diretti contro forme fosforilate della proteina MET. Sfortunatamente gli anticorpi per le proteine fosforilate sono poco specifici e il target fosforilato spesso si altera precocemente nei tessuti fissati; per tali ragioni, l'utilizzo dell'immunoistochimica come test predittivo di risposta ai farmaci anti MET è limitato. Lo stato di amplificazione del gene MET si valuta più difficilmente rispetto ad altri geni per via della frequente presenza di polisomie del cromosoma 7 su cui è presente il locus di MET. Oltre al classico criterio di rapporto tra numero di copie del gene e copie del centromero 7, nel caso di MET sono state proposte nel tempo anche altri criteri basati sul numero di copie del gene indipendentemente dal rapporto e in base all'entità della polisomia. Inoltre, questi criteri differenti sono stati applicati utilizzando valori di cut-off diversi (es. alta o bassa polisomia, $<$ o $>$ 5 copie del gene) causando un'inevitabile confusione di nomenclatura e di classificazione della amplificazione di MET in studi o protocolli diversi.

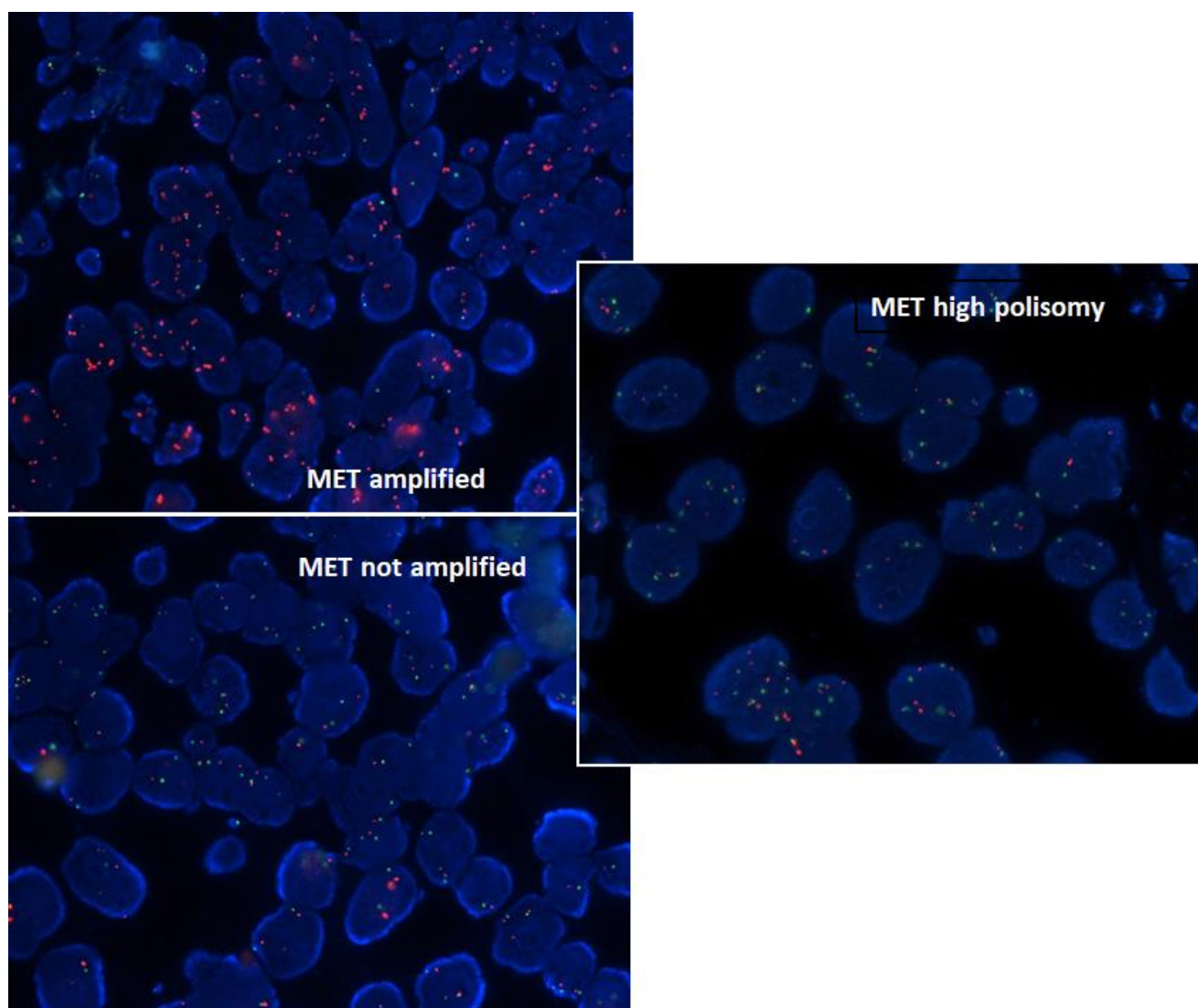


Figura 4 Amplificazioni MET

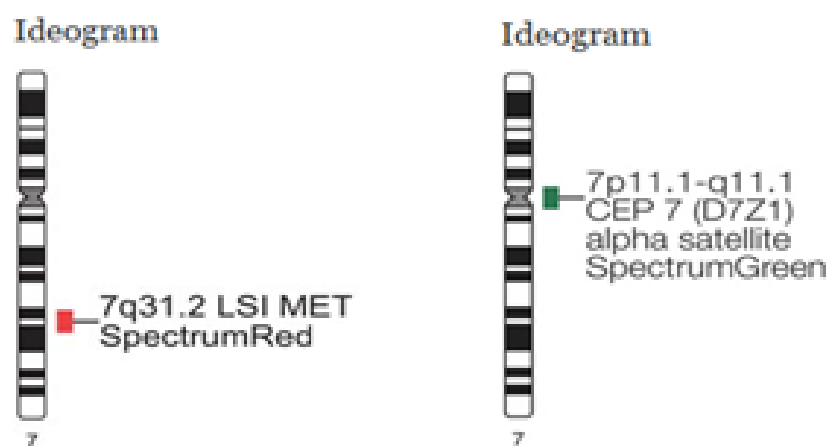


Figura 5 Probes FISH

Un altro meccanismo di attivazione del gene *MET* è la mutazione del sito di splicing a livello dell'esone 14. Questa mutazione porta alla formazione di una proteina troncata che non può essere distrutta attraverso il sistema della ubiquitinazione. In questo modo la proteina resta disponibile e funzionante a lungo nel citoplasma e sulla membrana cellulare, esercitando il suo potenziale oncogenico. Il recettore *MET* infatti, mediante l'attivazione della via di PI3K/AKT e di ERK, stimola la proliferazione ed inibisce l'apoptosi mentre attraverso il sistema dei fattori di trascrizione STAT promuove lo sviluppo di metastasi.

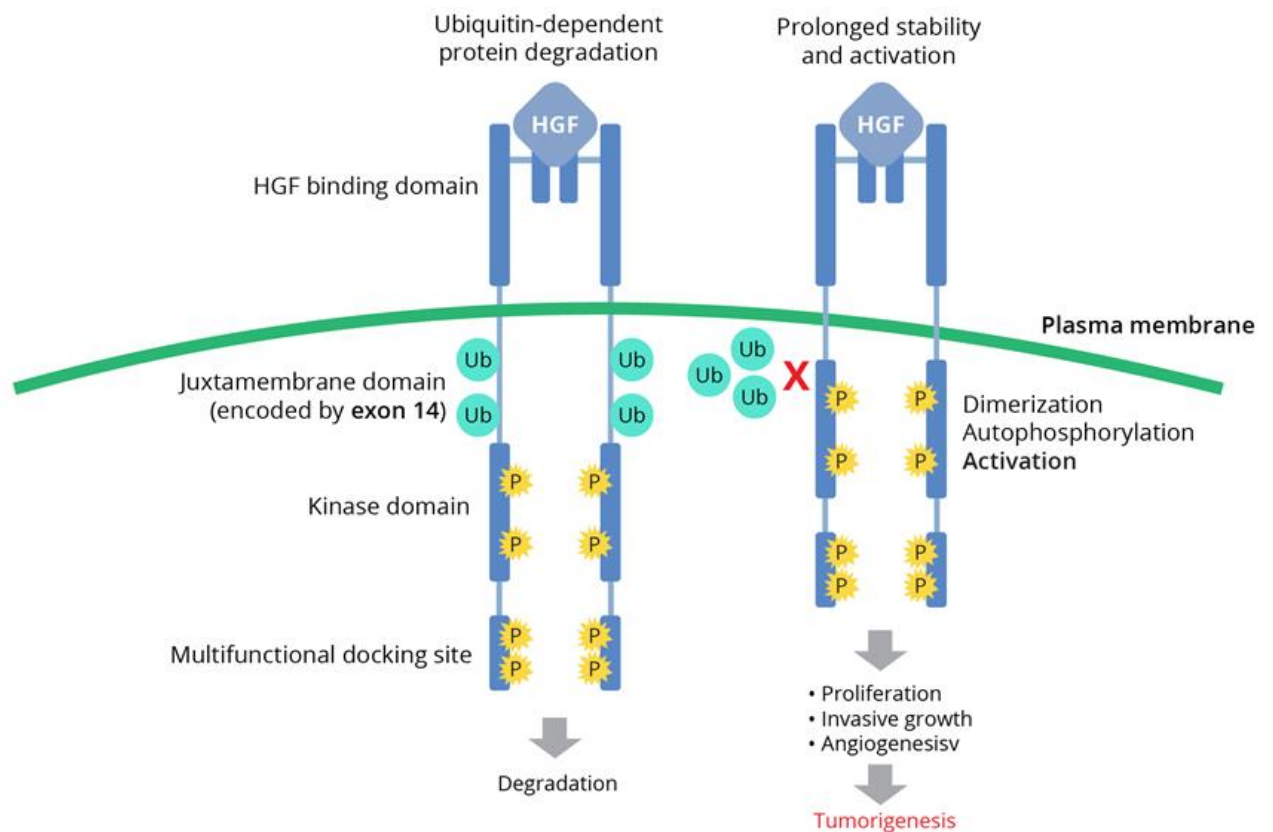


Figura 6 Alternative splicing exon 14

FARMACI ANTI MET

Il ruolo di MET nel NSCLC ha acquisito maggiore importanza dopo che l'attivazione di MET è stata indicata come uno dei principali meccanismi secondari di resistenza ai farmaci anti EGFR in pazienti con mutazioni sensibilizzanti di EGFR. Pertanto, anche alla luce di questo dato, sono stati sviluppati e testati finora molteplici inibitori di MET, alcuni dei quali hanno dimostrato anche risultati promettenti all'interno di trial clinici. La maggior parte di questi sono inibitori tirosin-chinasici o anticorpi.

1. ANTICORPI MONOCLONALI

Il rilotuzumab (Amgen) è un anticorpo monoclonale che si lega HGF, prevenendone l'interazione con MET. Tale farmaco è stato valutato in uno studio di fase I in tumori solidi in combinazione con bevacizumab o motesanib (inibitori del pathway VEGF) mostrando un profilo di tossicità accettabile . Uno studio di fase I/II ha valutato la combinazione di questo anticorpo con erlotinib ed anche in questo caso il profilo di sicurezza si è dimostrato accettabile .

Flicatuzumab (AVEO) ha un meccanismo d'azione simile e in alcuni di studi di fase 1 dove veniva testato in combinazione con erlotinib o gefitinib, si è stato ben tollerato. Da uno studio di fase II che comparava gefitinib versus gefitinib in combinazione con flicatuzumab, è emerso che in pazienti con NSCLC avanzato EGFR mutato e con bassa espressione di MET, il beneficio, in termini di PFS, è stato maggiore utilizzando la combinazione dei due farmaci rispetto al gefitinib da solo. Ciò suggerisce che l'inibizione di HGF/MET può ritardare la comparsa di meccanismi di resistenza a EGFR TKI in pazienti con mutazione EGFR .

L'anticorpo onartuzumab (Genetech-Roche) agisce sul dominio semaforina di MET, bloccando la dimerizzazione e la conseguente attivazione del recettore. Uno studio randomizzato di fase II condotto in pazienti affetti da NSCLC in stadio avanzato ha dimostrato come l'associazione di onartuzumab ed erlotinib sia associata ad una

migliore sopravvivenza libera da progressione (PFS) e sopravvivenza globale (OS) nei pazienti MET-positivi. Ciononostante, il successivo studio fase di III è stato prematuramente interrotto in quanto la combinazione ornatuzumab/erlotinib non è stata in grado di prolungare la sopravvivenza nemmeno nella coorte di pazienti MET-positivi, in contrasto con i risultati ottenuti nello studio di fase II.

2. INIBITORI DELL'ATTIVITA' TIROSIN-KINASICA

Tra gli inibitori dell'attività tirosin kinasica di MET, troviamo il tivantinib (Arque), una piccola molecola orale in grado di inibire la fosforilazione di c-MET in maniera selettiva. Dati preclinici suggeriscono che abbia anche attività citotossica in modo indipendente dallo stato di MET mediante distruzione della polimerizzazione dei microtubuli [85, 86, 87]. Un trial clinico di fase II ha valutato l'associazione di tivantinib con erlotinib e, sulla base dei risultati ottenuti, è stato condotto il trial di fase III MARQUEE, dove la combinazione tivantinib/erlotinib ha evidenziato un trend in aumento della sopravvivenza globale per i pazienti con carcinoma polmonare non-squamoso localmente avanzato o metastatico con alta espressione di MET.

Il farmaco cabozantinib (Ipsen) è una molecola con molteplici target (MET, VEGFR, FLT3, RET e KIT) che è stata approvata dall'FDA per il tumore metastatico midollare della tiroide. E' stato condotto uno studio di fase I/II per testare questo farmaco in combinazione con erlotinib in pazienti che hanno mostrato resistenza a quest'ultimo. L'incoraggiante risultato sull'attività di cabozantinib ha portato ad un altro studio di fase II con parziale risposta nel 13% dei pazienti.

Nel 2011 l'FDA ha approvato l'uso del farmaco crizotinib (pfizer) per il trattamento di pazienti con traslocazione ALK ma molti studi hanno dimostrato l'attività di tale molecola anche nei confronti di altri target molecolari come ROS1 e MET. Sono presenti in letteratura casi di beneficio clinico in pazienti con mutazioni MET e sono state provate combinazioni di farmaci come crizotinib ed erlotinib oppure triplette come erlotinib, crizotinib e bevacizumab per agire su più mutazioni simultaneamente risultando in un effetto sinergico.

Nei carcinomi polmonari non a piccole cellule MET può essere presente nei pazienti non pre-trattati ma può anche emergere dopo terapia con inibitori tirosin-chinasici e mediare la resistenza agli inibitori di EGFR. Sembra pertanto che MET abbia un ruolo importante anche nello sviluppo di resistenza a gefitinib/erlotinib; trial clinici sono attualmente in corso per saggiare l'ipotesi che combinazioni di inibitori di MET e di EGFR possano superare la resistenza acquisita.

Una lista esaustiva di inibitori MET attualmente in sperimentazione in clinical trials è disponibile sul sito

<https://ccrod.cancer.gov/confluence/display/CCRSSSCArchive/Home>

PERCORSO DAL TARGET AL FARMACO

Il percorso che porta alla nascita di un farmaco (1) passa necessariamente attraverso una serie di tappe che vanno dall'individuazione del meccanismo biologico su cui intervenire, alla determinazione del principio attivo, alla sperimentazione prima in laboratorio (fase preclinica) e poi sui pazienti (fasi cliniche), alla commercializzazione e al controllo degli eventuali effetti collaterali.

1. BERSAGLIO E LEAD COMPOUNDS

La ricerca farmacologica ha inizio dalla scoperta di un composto dotato di "attività farmacologica", in grado, cioè, di modificare un processo biologico. Questa tappa cruciale può essere suddivisa in due momenti fondamentali: l'individuazione di un bersaglio farmacologico e l'identificazione dei cosiddetti composti guida.

Il primo passaggio consiste nella determinazione del cosiddetto "bersaglio farmacologico", ossia l'elemento o il meccanismo biologico su cui intervenire per modificare il percorso di una malattia.

Una volta selezionato il bersaglio farmacologico si procede al secondo obiettivo, cioè all'identificazione di sostanze in grado di legarsi in modo specifico e selettivo al bersaglio e di modificarne i meccanismi d'azione in modo tale da ottenere un effetto terapeutico: queste sostanze vengono chiamate "lead compounds" o "composti guida" e sono i precursori del farmaco vero e proprio.

L'introduzione delle biotecnologie nell'industria farmaceutica ha costituito, con le tecniche di ingegneria genetica, un'innovazione per la produzione di una nuova categoria di farmaci, definiti anche biofarmaci o farmaci biotecnologici. L'importanza assunta dai farmaci biotecnologici è ormai dimostrata dal fatto che a livello mondiale questi prodotti rappresentano circa il 20% di tutti i nuovi farmaci approvati ogni anno.

Dalla scoperta alla entrata in commercio, il candidato nuovo farmaco attraversa un iter procedurale che dura almeno 10 anni. Fra le varie molecole studiate, la selezione di quello che sarà il principio attivo migliore del gruppo, adatto all'impiego sull'uomo, è suddivisa a livello internazionale in 4 fasi più quella preclinica

Una volta scoperta la molecola guida si parte con la sperimentazione. La prima serie di test viene effettuata in laboratorio e prende il nome di sperimentazione preclinica.

2. SPERIMENTAZIONE PRECLINICA

La sperimentazione preclinica ha lo scopo di:

- definire il profilo di attività del farmaco,
- definire il profilo di efficacia del farmaco e iniziare a valutarne l'eventuale tossicità per l'organismo,
- studiare la farmaco-dinamica del farmaco e cominciare a studiarne la formulazione più adatta per la somministrazione.

Per accertare la reale efficacia del farmaco il ricercatore utilizza i cosiddetti modelli sperimentali della malattia. Si tratta di sistemi biologici in cui vengono ricreate sperimentalmente le stesse caratteristiche della patologia: si possono usare colture di cellule fatte crescere in laboratorio, i cosiddetti modelli in vitro, oppure si può ricorrere agli animali da laboratorio, in questo caso si parla di modelli in vivo. Generalmente, il farmaco viene provato dapprima sui modelli cellulari, dopodiché l'esperienza acquisita in vitro si trasferisce sui sistemi in vivo che servono per arrivare a comprendere le proprietà farmaco-cinetiche di una sostanza, la scelta della dose, della via e della forma di somministrazione per ottimizzarne l'effetto terapeutico, ridurre al minimo gli effetti collaterali e ottenere un farmaco di facile assunzione.

L'indagine pre-clinica valuta poi in modo completo i potenziali rischi per l'uomo: la tossicità acuta ossia la quantità di farmaco che rappresenta la dose letale per un

animale da laboratorio e la tossicità subacuta e cronica che serve per studiare la dose tossica minima, la dose massima tollerata ed i fenomeni di tolleranza e accumulo della sostanza nei tessuti dell'animale.

Ci sono inoltre da verificare gli effetti genotossici (danneggiano il DNA), mutageni (inducono mutazioni genetiche), teratogeni (possono causare anomalie fetali) e cancerogeni (capaci di favorire l'insorgenza del cancro).

Al termine della fase pre-clinica restano poche molecole che possono passare alla fase clinica previa autorizzazione da parte degli organismi nazionali competenti. Solo una molecola su 10.000 riesce ad arrivare allo sviluppo clinico; e solo una su 10 riesce a superare con successo tutte le fasi dello sviluppo clinico e giungere ai pazienti come farmaco standard.

3. SPERIMENTAZIONE CLINICA

La sperimentazione clinica (2) comporta un iter lungo e costoso, le cui diverse fasi sono descritte e stabilite dalla legge in modo da garantire procedure etiche e in grado di minimizzare i rischi per i pazienti. Per indicare le sperimentazioni cliniche si usa spesso il termine inglese clinical trials, o quello più "italianizzato" trials clinici.

I punti cardine di ogni sperimentazione clinica sono:

- efficacia: capacità di raggiungere l'obiettivo terapeutico proposto.
- tollerabilità /sicurezza: capacità di esercitare effetti terapeutici senza indurre effetti non desiderati (rapporto beneficio/rischio).
- valore/qualità: capacità di aumentare l'aspettativa di vita, di migliorare la qualità di vita, di modificare il decorso di malattia, di ridurre il consumo di risorse sanitarie.

Il protocollo sperimentale di ogni sperimentazione clinica deve venir elaborato secondo le modalità della "Buona Pratica Clinica" (GCP = Good Clinical Practice)

(3) elaborate dalla "International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use", approvate dall'Agenzia Europea per la Valutazione dei Medicinali (EMA) e definitivamente recepite in Italia con il DM 15 Luglio 1997.

Le norme di GCP, fissando anche le responsabilità delle parti coinvolte, tendono al raggiungimento dei seguenti principali obiettivi:

- il benessere e la sicurezza dei soggetti arruolati;
- l' integrità e trasparenza, e quindi l'attendibilità dei dati;
- la loro verifica indipendente;
- la protezione dei soggetti e la confidenzialità delle informazioni mediche raccolte su di essi.

Ogni sperimentazione clinica e' inoltre soggetta alla vigilanza delle autorità competenti (AIFA=Agenzia Italiana del Farmaco, a livello nazionale ed EMA= European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, a livello europeo) e necessita, prima della sua effettuazione, della Autorizzazione alla Sperimentazione Clinica (ASC). In Italia la richiesta di ASC viene inoltrata al Ministero della Salute nel caso di farmaci già immessi in commercio (che necessitano di ripercorrere l'iter della sperimentazione ad esempio anche per piccole variazioni nella somministrazione ecc.) o all'Istituto Superiore di Sanità nel caso di farmaci di nuova istituzione. Le procedure di svolgimento di una sperimentazione clinica devono poi essere sottoposte al parere e all'approvazione dei Comitati Etici.

Fase 1

Studio preliminare sulla sicurezza e sulla modalità di azione Ha come obiettivo la definizione delle dosi accettabili, singole o ripetute, che non siano causa di eventi avversi; la determinazione della massima dose tollerata e la minima dose efficace; la determinazione del rapporto dose-effetto, la durata dell'effetto ed in ultimo lo studio della farmacocinetica.

Lo scopo principale di questa prima fase non è quindi quello di sperimentare l'efficacia del nuovo farmaco, ma quello di dare una prima valutazione sulla sua sicurezza e allo stesso tempo di determinare quello che accade al farmaco nel corpo umano: come viene assorbito, metabolizzato ed escreto.

In alcuni casi particolari, come per i farmaci antitumorali, la fase I non avviene sul volontario sano, bensì nel malato di tumore che voglia prendere parte liberamente ad un protocollo di sperimentazione. Questo avviene conseguentemente al fatto che, in generale, i farmaci antitumorali possono essere tossici e non sarebbe corretto sottoporre persone sane a questi trattamenti; inoltre, nel caso di miglior efficacia terapeutica del nuovo preparato, il paziente ne trarrebbe immediato beneficio.

Fase 2

Lo scopo principale è quello di valutare l'attività del farmaco in un ristretto numero di pazienti affetti dalla malattia o dalla condizione clinica per la quale il farmaco è proposto. Viene messo a punto lo schema posologico: dose media giornaliera, intervalli di somministrazione, durata del trattamento. In questa fase si ricerca inoltre il cosiddetto "dose finding", ossia la determinazione del dosaggio più adeguato, per l'uomo, anche in funzione dell'età o delle patologie concomitanti, per il migliore risultato clinico.

Identifica gli eventuali problemi e conferma la farmacocinetica nel paziente. Questa fase comporta anche studi di confronto con il placebo o con un farmaco di riferimento standard. La durata di questa fase si attesta all'incirca intorno ai due anni.

Fase 3

Se la fase II fornisce risultati incoraggianti la fase III coinvolge un numero più ampio di pazienti al fine di approfondire i dati di efficacia, di valutare il dosaggio più opportuno, di monitorare gli eventuali effetti collaterali su un campione statisticamente più significativo. Rappresenta l'ultima verifica prima dell'entrata in commercio del farmaco, deve quindi soddisfare un numero molto ampio di requisiti tanto che può richiedere un certo numero di anni. Questi studi clinici su ampia scala vengono pianificati sempre più come ricerche internazionali e multicentriche che coinvolgono numerosi centri sperimentali in molti paesi.

Durante questa fase viene sempre controllata con molta attenzione la tollerabilità (insorgenza di effetti indesiderati e/o collaterali) del farmaco e la sua efficacia.

Per i farmaci che passano con successo la fase III della sperimentazione viene chiesta l'autorizzazione per la commercializzazione (AIC) (4) alle Autorità regolatorie in Italia mediante decreto del Ministero della Salute, dopo esame ed approvazione del dossier di valutazione da parte dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA). La commercializzazione del prodotto con AIC nazionale è consentita soltanto nel Paese in cui l'autorizzazione è stata accordata. Per tutti i paesi dell'Unione Europea l'autorizzazione è chiesta direttamente all'EMA. Durante queste procedure amministrative le Autorità Sanitarie nazionali ed internazionali verificano la validità delle sperimentazioni condotte, certificando che il nuovo farmaco può essere commercializzato. L'insieme delle informazioni cliniche e precliniche che guideranno nell'uso del farmaco vengono riportate, in concerto con l'Autorità Sanitaria, nella "scheda tecnica di prodotto", il cui contenuto è riassunto e semplificato nel foglietto illustrativo contenuto nella confezione del medicinale.

Fase 4

Anche quando un farmaco viene venduto ed utilizzato da migliaia di persone in uno o più paesi gli studi clinici continuano con la fase IV. Gli studi di fase IV sono volti a confermare la sicurezza e la tollerabilità a lungo termine del farmaco, su un ampio numero di pazienti. I dati che si ottengono sono statisticamente importanti, dato che

coinvolgono un gran numero di utilizzatori, spesso diversi per età, razza, sesso ecc.. Per raccogliere tutte le segnalazione relative ad un farmaco, dopo la sua immissione in commercio, è importante che i cittadini collaborino con il personale sanitario. I pazienti in cura con il nuovo medicinale dovrebbero quindi segnalare al proprio medico o al farmacista l'eventuale comparsa di qualsiasi effetto collaterale, anche di quelli indicati nel foglietto illustrativo (questo permette di compilare statistiche precise). Il medico è tenuto a segnalare la reazione avversa al dipartimento per la farmaco vigilanza tramite appositi moduli. Le segnalazioni vengono controllate ed eventualmente aggiunte nel foglietto illustrativo.

PROGETTO DI RICERCA

Il tumore al polmone, a causa dell'alta incidenza e mortalità, è una patologia di grande interesse scientifico che ha portato le case farmaceutiche a sviluppare nuove molecole atte ad aumentare sia la sopravvivenza che la qualità della vita dei pazienti. Solo circa il 18% dei pazienti ha un'aspettativa di vita maggiore o uguale a 5 anni ed una buona parte dei pazienti sono metastatici al momento della diagnosi. Circa il 75% dei casi diagnosticati sono costituiti da tumore al polmone non a piccole cellule (NSCLC) e, di questi, le istologie prevalenti sono adenocarcinomi e carcinomi squamosi.

Negli anni si è vista un'evoluzione del tipo di trattamenti somministrati in termini di efficacia ed effetti collaterali; lo sviluppo della target therapy ha portato ad un ampliamento della gamma di farmaci utilizzabili, sempre più selettivi in termini di istologia, presenza di specifiche mutazioni e background genetico dei pazienti.

Le alterazioni del gene MET non sono frequenti quanto quelle del gene EGFR ma determinano una prognosi sfavorevole e sono quindi un potenziale target farmacologico. MET è un recettore transmembrana che lega il fattore di crescita degli epatociti (HGF) ed attiva un pathway di trasduzione del segnale che conduce a divisione cellulare, dissociazione, migrazione ed angiogenesi. Un'espressione incontrollata di MET è correlata al cancro e può essere rappresentata da overespressione, amplificazione, mutazioni e splicing alternativo. La tecnica più utilizzata per la valutazione dell'amplificazione è la FISH (fluorescent in situ hybridization) che utilizza due sonde di diverso colore per evidenziare il gene in oggetto ed il centromero. Ciò permette di differenziare le polisomie, dalle vere amplificazioni in quanto in caso di polisomie si avrà un rapporto gene-centromero minore rispetto ad un'amplificazione cluster, dove il segnale della sonda del gene è molto maggiore rispetto al segnale della sonda del centromero. Ci sono vari criteri per definire se un paziente risulta amplificato, alcuni utilizzano il rapporto gene-centromero mentre altri valutano solo il gene copy number (GCN), cioè il numero di segnali della sonda legata al gene.

Il percorso da bersaglio molecolare a farmaco è molto lungo e costoso, solo una molecola su 10 mila giunge alla fine delle sperimentazioni in un periodo di tempo di circa 10/12 anni. La sperimentazione clinica è l'ultima tappa della ricerca farmaceutica, il momento in cui il farmaco, dopo i test in laboratorio e sugli animali,

può essere sperimentato sull'uomo. E' una tappa molto delicata ed importante dello sviluppo del farmaco ed è ampiamente regolamentata sia da normativa nazionale ed internazionale che da linee guida di buona pratica clinica (GCP). Gli studi sono svolti presso ospedali e cliniche e coinvolgono, oltre ovviamente ai pazienti, un team di persone quali medici, infermieri, data manager, comitati etici.

Sono stati aperti presso il nostro centro 3 studi con farmaci anti-MET, differenti tra loro per i criteri di inclusione, conduzione del trial e farmaci utilizzati. Sono stati arruolati in totale 7 pazienti, in due studi diversi, ma nessuno ha mostrato un beneficio clinico o una risposta parziale, la stabilità di malattia è stata la migliore risposta osservata.

In collaborazione con il laboratorio di Anatomia Patologica abbiamo effettuato lo studio delle alterazioni del gene MET, sia mutazioni che amplificazioni su tutti i tumori polmonari NSCLC avanzati quadruplo-negativi (RAS/ALK/ROS/EGFR) al fine di effettuare un pre-screening dei pazienti per un potenziale arruolamento negli studi clinici aperti presso il nostro centro, sia per redigere un database locale sull'incidenza delle alterazioni di MET.

MATERIALI E METODI

STUDI CLINICI

1. STUDIO CINC280A2201

E' uno studio di fase II che prevede tre coorti stratificate in base all'amplificazione del gene MET che viene valutata tramite FISH. Per poter essere arruolabili, i pazienti non devono presentare mutazioni nel gene EGFR nè riarrangiamenti ALK, devono aver già ricevuto una o due linee chemioterapiche ed avere documentata diagnosi di NSCLC in fase avanzata (stadio IIIB o IV). Pazienti con MET gene copy number (GCN) maggiore di 6, tra 4 e 6 e minore di 4 sono suddivisi rispettivamente nella coorte 1, 2 e 3. E' considerato un livello di amplificazione alto un GCN maggiore di 6, mentre un GCN compreso tra 4 e 6 è comunemente ritenuto basso. Ci sono molte pubblicazioni che suggeriscono come una bassa amplificazione MET (tra 3 e 5) costituisca un marker di prognosi sfavorevole; questi studi utilizzano metodologie differenti per determinare l'amplificazione del gene ed anche i relativi valori soglia. Le tre coorti di questo studio servono a identificare con più certezza il valore soglia corretto da utilizzare per distinguere una bassa amplificazione (con prognosi sfavorevole) da una alta. Un numero di copie del gene maggiore o uguale a 6 definisce una popolazione di pazienti che possono rispondere ad una terapia costituita da inibitori di MET, per confermare ciò in questo studio sono confrontate le risposte in termini di efficacia nelle tre coorti.

Il farmaco sperimentale è un potente inibitore di MET capace di bloccare la sua attivazione, in studi pre-clinici ha mostrato indurre la regressione del tumore in modelli animali e sono stati analizzati incoraggianti dati sulla sua attività ed efficacia in diversi trial di fase I. Da studi precedenti si è identificata la dose ottimale di 400 mg due volte al giorno (BID) con cicli di 21 giorni.

L'obiettivo primario di questo studio è dimostrare l'attività antitumorale del farmaco sperimentale e valutare la durata della risposta clinica; gli obiettivi secondari comprendono la valutazione dell' Overall Respons Rate (ORR), Time To Response (TTR), Progression Free Survival (PFS), Overall Survival (OS), safety profile e la

caratterizzazione farmacocinetica.

I pazienti arruolabili devono avere documentata diagnosi di NSCLC, essere EGFR wild type, riarrangiamento ALK negativo, aver ricevuto una o due precedenti terapie sistemiche ma nessun trattamento con crizotinib o altri inibitori di MET e HGF. Per quanto riguarda l'amplificazione MET, questo trial prevede 3 coorti: MET gene copy number (GCN) maggiore di 6, tra 4 e 6 e minore di 4. Tra i principali criteri di inclusione ed esclusione vi erano un Performance Status minore di 2, un'adeguata funzionalità midollare, renale ed epatica e l'assenza di comorbidità maggiori tali da interferire con la terapia sperimentale. I pazienti con metastasi cerebrali possono essere arruolati solo qualora queste siano state chirurgicamente asportate o irradiate e clinicamente e radiologicamente stabili.

Nel nostro centro sono stati valutati, previa firma del consenso informato, tredici pazienti (10 donne e 3 uomini) e, di questi, cinque sono stati arruolati nello studio. Quattro pazienti non sono stati arruolati in questo studio e non hanno mai iniziato il trattamento in quanto 2 coorti di trattamento, la coorte 2 e la coorte 3, erano state chiuse all'arruolamento per valutare i dati di efficacia del farmaco e tre pazienti non avevano sufficiente materiale da inviare al laboratorio centralizzato per poter determinare in quale coorte essere assegnati.

La ditta farmaceutica sponsor di questo studio, dopo l'analisi ad interim dei dati raccolti, ha definitivamente chiuso le coorti 2 e 3 ha consentito il proseguimento dell'arruolamento nella coorte 1 che è stata suddivisa in due sotto gruppi: ≥ 6 GCN < 10 (il cui arruolamento è attualmente chiuso) e GCN ≥ 10 . Ha inoltre aperto una quarta coorte per pazienti con mutazioni di MET che comportano l'escissione dell'esone 14.

2. STUDIO CINC280X2202

Questo trial clinico è uno studio di fase IB/II in pazienti con diagnosi di NSCLC che presentano mutazione EGFR e amplificazione MET che sono andati in progressione di malattia dopo trattamento con inibitori di EGFR.

La fase IB (dose escalation) si è conclusa a marzo 2014 ed ha portato alla determinazione della Recommended Phase 2 Dose (RP2D) che è 400 mg; sono state testate 7 dosi, da 100 mg fino a 600 mg di farmaco sperimentale, sempre associate a gefitinib 250 mg.

Il farmaco INC280 è un potente e selettivo inibitore di MET, è orale e viene assorbito rapidamente; viene assunto due volte al giorno in combinazione con gefitinib che invece prevede una sola dose giornaliera. L'obiettivo primario di questo studio sono la stima dell'attività clinica del farmaco sperimentale mentre tra gli obiettivi secondari ci sono la determinazione della sicurezza e tollerabilità, la valutazione dell'effetto farmacodinamico, determinare il profilo farmacocinetico e la sua potenziale interazione con gefitinib.

I pazienti arruolabili devono avere documentata diagnosi di NSCLC, essere EGFR mutati (ad esclusione di T790M), aver sviluppato resistenza a gefitinib o erlotinib e rispettare entrambe i seguenti requisiti:

- -copie del gene c-MET maggiore o uguale a 5, che corrisponde a un rapporto c-MET/centromero maggiore o uguale a 2
- -Immunistoichimica con 50% di cellule tumorali valori 3+ o 2+

Tra i principali criteri di inclusione ed esclusione vi erano un Performance Status minore di 2, un'adeguata funzionalità midollare, renale ed epatica e l'assenza di comorbidità maggiori tali da interferire con la terapia sperimentale. I pazienti con metastasi cerebrali possono essere arruolati solo qualora queste siano state chirurgicamente asportate o irradiate e clinicamente e radiologicamente stabili.

3. STUDIO TED11449

Lo studio TED11449 è uno studio di fase I che testa per la prima volta nell'uomo un nuovo farmaco inibitore di MET, chiamato SAR125844. Il centro di Bologna ha partecipato a questo trial nell'ambito della fase di espansione della coorte (dose

expansion), ossia una volta che è stata conclusa la prima parte di “dose escalation” in cui si è raggiunta la dose massima tollerata e definita pertanto la dose del farmaco raccomandata per lo studio di fase II.

Il farmaco in studio è un potente inibitore selettivo di MET che viene somministrato con schedula settimanale per via endovenosa in un’infusione della durata di 3 ore; ciascun ciclo comprende 4 somministrazioni.

Studi preclinici in vivo condotti su 2 modelli di carcinoma gastrico MET-amplificato hanno dimostrato che il SAR125844 induce un’inibizione dose- e tempo-dipendente della fosforilazione di MET nonché un’inibizione di pathways più a valle come PI3K/AKT e RAS/MAPK, determinando una regressione tumorale in entrambi i modelli di tumore gastrico. Analogamente, studi preclinici di tossicità condotti su ratti e sui cani, hanno evidenziato una discreta tollerabilità del farmaco e supportato l’impiego della schedula settimanale nell’uomo.

La prima fase dello studio (dose escalation) è stata avviata ad Agosto 2011 con l’obiettivo primario di definire, sulla base dell’insorgenza delle tossicità dose-limitanti (dose limiting toxicities – DLT) e con un classico disegno di studio 3+3, la dose massima tollerata di SAR125844. Tra gli obiettivi secondari vi erano la valutazione generale della sicurezza del farmaco, lo studio del profilo farmacocinetico e farmacodinamico del farmaco sperimentale, e l’identificazione di una possibile attività antitumorale del farmaco. I pazienti con diagnosi di neoplasia solida metastatica refrattaria ai trattamenti standard e con iperespressione o amplificazione del gene MET potevano essere potenzialmente candidati a partecipare allo studio. Tra Agosto 2011 e Agosto 2013 sono stati arruolati 33 pazienti in 9 differenti livelli di dose, da 50 mg/m² a 740 mg/m²; due tossicità dose-limitante sono state osservate al dosaggio di 740 mg/m² (rialzo G2 della creatinina e rialzo G3 delle transaminasi per una durata superiore ai 4 giorni), definendo questa dose come “non-tollerata”, e una tossicità dose-limitante al dosaggio di 570 mg/m². Tale dosaggio è stato pertanto definito come la dose massima tollerata. Tra gli effetti collaterali più frequentemente osservati, indipendentemente da una possibile relazione causale con il farmaco, si possono elencare: astenia (63%), vomito (36%), febbre (30%), nausea (30%), anoressia (27%) e diarrea (21%). Tuttavia, nessuno degli eventi avversi riportati è stato di grado maggiore di 3. Dal

punto di vista laboratoristico, le anomalie più frequentemente riportate sono state il rialzo delle transaminasi, (rialzo G3 di ALT nel 18% e di AST nel 21%) e un rialzo G3 della creatinina.

Lo studio farmacocinetico ha evidenziato un tempo di emivita del farmaco pari a 18 ore a tutti i differenti livelli di dose, in assenza di un fenomeno di accumulo tra il giorno 1 e il giorno 22 del ciclo, con una clearance del farmaco pari a 32.2 L/h. Infine, in termini di attività antitumorale, sette pazienti hanno ottenuto una stabilità di malattia prolungata, superiore a 4 mesi e in 5 casi su 7 maggiore a 6 mesi; un paziente affetto da carcinoma polmonare non a piccole cellule con amplificazione del gene MET (alla FISH 76% delle cellule erano MET amplificate) ha ottenuto una risposta parziale di malattia confermata.

Sulla base di questi risultati e considerato il discreto profilo di tolleranza del farmaco, è stata avviata la seconda parte dello studio, di “dose expansion”, alla quale a partire da febbraio 2015 ha partecipato anche il nostro centro.

Gli obiettivi primari di questa fase sono quelli di confermare il profilo di sicurezza quando il farmaco sperimentale SAR125844 viene somministrato alla dose massima tollerata e di condurre una valutazione preliminare sull'effetto antitumorale del farmaco in pazienti affetti da neoplasie solide in stadio avanzato refrattarie a trattamenti standard con iperespressione/amplificazione di MET o positivi per P-MET, compresi pazienti con diagnosi di carcinoma polmonare non a piccole cellule. Gli obiettivi secondari invece sono del tutto analoghi alla prima fase dello studio con l'aggiunta della valutazione dello stato di amplificazione di MET sul DNA circolante.

Dopo un'iniziale fase in cui potevano essere arruolati pazienti con qualsiasi tipologia di tumore, purché MET-amplificati, lo Sponsor ha optato per ampliare la coorte solo con pazienti affetti da carcinoma non a piccole cellule che risultavano eleggibili solo se rispondevano ad uno dei seguenti criteri:

1. amplificazione del gene MET, definita dalla presenza di $\geq 10\%$ delle cellule aventi 4 o più copie del gene MET e con rapporto MET/centromero ≥ 2 . Eventuali mutazioni di MET potevano essere prese in considerazione caso per caso. L'indagine FISH deve essere effettuata su materiale tissutale fissato in formalina e prelevato nei 12 mesi precedenti dalla firma del consenso informato.

2. Presenza di phospho-MET, che deve essere effettuata su campione tumorale fresco, prelevato entro un mese dall'entrata in studio.

Tra i principali criteri di inclusione ed esclusione vi erano un Performance Status minore di 2, un'adeguata funzionalità midollare, renale ed epatica e l'assenza di comorbidità maggiori tali da interferire con la terapia sperimentale. I pazienti con metastasi cerebrali possono essere arruolati solo qualora queste siano state chirurgicamente asportate o irradiate e clinicamente e radiologicamente stabili.

ALTERAZIONI DEL GENE MET

1. AMPLIFICAZIONE DEL GENE MET

In letteratura sono presenti tre principali criteri di classificazione dell'amplificazione genica tramite FISH:

- UCCC (University of Colorado Cancer Center)
- Capuzzo Scoring System
- ASCO-CAP 2007 for HER3 amplification

UCCC (UNIVERSITY OF COLORADO CANCER CENTER) CRITERIA [Hirsch et al, 2003]

CATEGORY	CRITERIA	STATUS
DISOMY	≤ 2 GENE COPIES IN $> 90\%$ CELLS	NEGATIVE FOR AMPLIFICATION
LOW TRISOMY	≤ 2 GENE COPIES IN $\geq 40\%$ CELLS, 3 GENE COPIES IN $\geq 40\%$ CELLS, AND ≥ 4 GENE COPIES IN $< 10\%$ CELLS	
HIGH TRISOMY	≤ 2 GENE COPIES IN $\geq 40\%$ CELLS, 3 GENE COPIES IN $\geq 40\%$ CELLS, AND ≥ 4 GENE COPIES IN $< 10\%$ CELLS	
LOW POLISOMY	≥ 4 GENE COPIES IN 10 - 40% CELLS	
HIGH POLISOMY	≥ 4 GENE COPIES IN $\geq 40\%$ CELLS	POSITIVE FOR AMPLIFICATION
GENE AMPLIFICATION	GENE CLUSTER AND RATIO MET/CEP7 ≥ 2 ; OR ≥ 15 GENE COPIES IN $\geq 10\%$ CELLS	

CAPUZZO SCORING SYSTEM [Capuzzo et al, 2009]

CRITERIA	STATUS
MEDIUM GENE COPY NUMBER < 5	NEGATIVE FOR AMPLIFICATION
MEDIUM GENE COPY NUMBER ≥ 5	POSITIVE FOR AMPLIFICATION

ASCO-CAP 2007 FOR HER3 AMPLIFICATION

CRITERIA	STATUS
RATIO [MET/CEP7] ≤ 1.8	NEGATIVE FOR AMPLIFICATION
RATIO [MET/CEP7] : 1.8 - 2.2	BORDERLINE FOR AMPLIFICATION
RATIO [MET/CEP7] ≥ 2.2	POSITIVE FOR AMPLIFICATION

Tabella 1 MET amplification criteria

Il metodo UCCC suddivide in due sottogruppi gli amplificati positivi: 40% di cellule con un numero di copie MET ≥ 4 oppure geni cluster con ratio ≥ 2 oppure un numero di cellule $\geq 10\%$ con un GCN ≥ 15 . Il Capuzzo system utilizza il GCN 5 come soglia per distinguere gli amplificati dai non amplificati ed il criterio ASCO-CAP valuta il rapporto gene/centromero per determinare la positività all'amplificazione che è suddivisa in tre fasce: non amplificata, borderline e positiva all'amplificazione.

Non c'è ancora unanimità nel definire l'amplificazione del gene MET, gli studi clinici adottano criteri diversi nel selezionare i pazienti amplificati e questo rende non facile paragonare i risultati ottenuti.

Il Laboratorio di Anatomia Patologica dell'Ospedale Sant'Orsola-Malpighi utilizza il criterio UCCC e, dai dati raccolti, è emerso che il rapporto gene/centromero da solo non permette di cogliere le polisomie ma solo le amplificazioni cluster. Sono stati calcolati sia il ratio MET/CEP7 che la % di cellule con il GCN ≥ 4 in quanto entrambi sono necessari per determinare la positività di amplificazione secondo il metodo UCCC.

2. MUTAZIONI DEL GENE MET

In letteratura è stata ampiamente descritta la presenza di mutazioni del gene MET: la più studiata è l'escissione dell'esone 14 causata da uno splicing alternativo. Mutazioni nei siti donatori ed accettori di splicing possono determinare un'incorretta conformazione di splicing che comporta la rimozione dell'esone 14, situato nella juxtamembrana della proteina. Questo esone è importante perché contiene il sito di legame per CBL ubiquitina ligasi che si lega alla tirosina in posizione 1003 e porta alla degradazione della proteina. Mutazioni che causano l'escissione dell'esone o uno splicing incompleto comportano una scorretta regolazione del turnover della proteina che permane più a lungo nella membrana cellulare. Molti studi hanno valutato la frequenza di mutazioni in questo sito di MET in quanto le alterazioni di questo gene possono comportare una resistenza (5%) ai farmaci TKI nei pazienti con mutazioni EGFR. Possono anche essere presenti in pazienti naïve, che non hanno mai ricevuto terapie oncologiche ma la frequenza è più bassa. I pazienti che

presentano più spesso mutazioni sono anziani e fumatori.

La percentuale di mutazioni MET è più alta nei tumori del polmone rispetto a tutti gli altri tipi di carcinoma testati, negli adenocarcinoma avviene nel 3-4% dei casi mentre nel tipo sarcomatoide si arriva al 30% circa. Essendo l'istologia sarcomatoide refrattaria alla chemioterapia, una terapia mirata contro questa mutazione potrebbe rappresentare una valida opzione per questo tipo di pazienti.

E' stata studiata la conformazione proteica mediante cristallografia e si è visto che MET adotta una conformazione inattiva con il loop di attivazione che abbraccia il sito di legame ATP mediante un legame che coinvolge l'aspartato 1228 (D1228) e la lisina 1110 (K1110). Questo legame stabilizza la posizione della tirosina 1230 (Y1230) che si trova nel loop di attivazione ed è chiusa nel sito di legame ATP mediante interazione con alanina 1226 (A1226). I farmaci anti-MET TKI di tipo I legano la conformazione autoinibitoria mediante interazione dell'anello aromatico dell'inibitore con Y1230 di MET. Una mutazione di Y1230 può abolire il legame con l'inibitore e le mutazioni Y1230 e D1228 sono le più frequenti nella resistenza agli anti-MET di tipo I. Gli inibitori di tipo II legano la conformazione DFG-out di MET e hanno meno dipendenza da questa interazione.

Nel 2003 e 2005 sono state rese note le mutazioni R988C e T1010I, nel 2006 è stata scoperta la mutazione Y1003 nella regione juxtamembrana e da allora gli studi delle alterazioni che causano l'escissione dell'esone 14 sono molto aumentati e sono stati testati numerosi farmaci per valutare il tasso di risposta dei pazienti portatori di questo tipo di mutazione.

3. ANALISI MUTAZIONALE GENE MET

Selezione del campione istologico

Per ciascun caso, è stato selezionato dal patologo il blocchetto istologico con il più alto arricchimento in cellule tumorali e la minor quantità di cellule normali/stromali/infiammatorie. L'area scelta è stata disegnata sul vetrino colorato in EE e successivamente macro-dissezionata con bisturi sterile e posta in provetta. 3 sezioni dello spessore di 10 μ m sono state tagliate su vetrino, e a seconda delle dimensioni dell'area selezionata, da 1 a 3 sezioni usate per l'estrazione del DNA. Per ciascun caso è stata definita la percentuale di arricchimento in cellule tumorali su cellule totali presenti nell'area selezionata.

Estrazione del DNA e quantificazione

Il DNA genomico è stato estratto mediante il kit QIAamp DNA FFPE tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo le istruzioni della ditta produttrice, con digestione overnight del lisato tissutale con proteinase K ed eluizione finale in 50 μ l di acqua distillata. La concentrazione del DNA estratto è stata valutata con metodica di real time PCR usando il Kit Quantifiler (Applied Biosystems, Foster City, CA). Il DNA è stato conservato a -20 °C fino all'uso.

Analisi mutazionale del gene MET esone 14 mediante PCR e sequenziamento diretto

Nei campioni istologici con arricchimento in cellule tumorali >25%, la ricerca di mutazioni è stata eseguita con il metodo di sequenziamento diretto dopo amplificazione in PCR.

Le reazioni di PCR sono state eseguite con le seguenti coppie di primers su termociclatore (modello 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems).

GENE	EXON	PRIMERS	FRAGMENT (bp)	REFERENCES
MET	14	F: 5'-tgggcactgggtcaaagtctc-3'	218	<i>Aguirre I et al. Translational Oncogenomics 2006; 1: 11-18</i>
		R: 5'-tacctcagtgggtgtgacattgtt-3'		

I prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il kit MINELUTE PCR purification kit (Qiagen), visualizzati e quantificati dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%. Le reazioni di sequenza sono state eseguite utilizzando il kit Big-Dye terminator sequencing kit v.3.0 (Applied Biosystems) applicando le stesse coppie di primers forward e reverse. Dopo purificazione mediante precipitazione con etanolo le sequenze sono state caricate su sequenziatore (modello 3730XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems). I risultati dei cromatogrammi sono stati interpretati utilizzando il programma Chromas software version 1.45 (Technelysium Pty Ltd, Australia).

Il saggio in Sanger permette di valutare tutte le mutazioni presenti all'interno dell'esone 14 e le mutazioni presenti nelle regioni introniche tra l'esone 13-14 e 14-15 del gene MET (contenenti siti di splicing), ovvero dalla posizione genomica g.116411827 alla posizione g.116412107.

4. ANALISI FISH GENE MET

L'ibridazione in situ fluorescente è stata utilizzata per l'analisi del locus cromosomico 7q31.2 (LSI MET) e del centromero del cromosoma 7.

Per l'analisi sono state utilizzate le sonde MET Spectrum Red FISH Probe kit e Cep7(D7Z1) Spectrum Green Probe della Abbott Molecular (Abbott Park, Illinois, USA).

Per la sparaffinatura i vetri sono stati posti in stufa a 60°C per 48h successivamente altre 24h in xilolo sempre in stufa a 60°C.

Il processo di sparaffinatura è proseguito con bagni in xilolo e poi i vetri sono stati reidratati in alcol a concentrazione decrescente, fino ad arrivare all'acqua.

Il pretrattamento del tessuto è stato effettuato utilizzando il kit FISH Tissue Implementation (Zytovision GmbH , Bremerhaven, Germania). Il tessuto è stato trattato a 98°C per 12'(per pezzi operatori) e per 8' (per biopsie) con una soluzione fornita dal kit (PT1) a base di acido citrico, dopo un lavaggio in acqua le sezioni sono poi trattate con pepsina per 10'(per pezzi operatori) e per 6' (per biopsie) e incubate in camera umida a 37°C per 8'. Dopo aver lavato i vetrini in Wash Buffer SSC (WB1) per 1 minuto e per 1 minuto in acqua , vengono disidratati i vetri in scala crescente di alcol e infine viene applicata la sonda. Poiché le sonde fluorescinate sono altamente fotosensibili è necessario, da questo punto in avanti lavorare in condizioni di buio. Ai vetrini viene applicato il coprioggetto, sigillato con uno strato di RubberCement e vengono posti nel ThermoBrite, un sistema semiautomatico programmabile per ISH e FISH. Il programma per MET/CEN 7 prevede un primo step di 5' di denaturazione a 73°C e la successiva fase di ibridazione a 37°C overnight (16-20 h).

Il giorno seguente, sempre lavorando al buio, vengono effettuati i lavaggi, con un apposito buffer, per eliminare la sonda non legata. I lavaggi post ibridazione sono fatti con una soluzione di 2xSSC/0,3% NP40, due lavaggi a temperatura ambiente da 1 minuto intervallati da uno a 73°C per 3 minuti.

Per la controcolorazione viene applicato il 4', 6 diamidino-2-fenilindolo (DAPI) con soluzione anti fading, per evitare il rapido decadimento del segnale fluorescente, quindi viene applicato il corpioggetto e fissato con smalto.

Conservazione ed analisi

I vetrini sono stati conservati al buio a +4°C fino alla conta dei segnali.

La conta è stata effettuata con un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse 80 (Nikon Corporation, Tokio, Giappone) equipaggiato con filtri di eccitazione ed emissione Spectrum Green, Spectrum Orange e DAPI in grado di visualizzare i segnali fluorescenti verdi e arancioni delle sonde e il blu del controcolorante per i cromosomi e i nuclei. Le immagini sono state analizzate con il software Nis Elements (Nikon Corporation).

Sono stati contati, per ogni caso, i segnali presenti in 50 cellule del tessuto tumorale .

Per la conta sono state prese in considerazione soltanto le cellule in cui appare almeno un segnale per ciascuna sonda, seguendo le linee guida .

Una volta contati i segnali i vetri possono essere conservati a -20°C per un'eventuale rilettura successiva.

RISULTATI

STUDI CLINICI

1. STUDIO CINC280A2201

Il paziente n.1 presentava un GCN di 4,8 ed è rientrato nella coorte 2; ha effettuato solo il primo ciclo di trattamento ma ha interrotto prematuramente l'assunzione del farmaco sperimentale a causa di complicazioni dovute ad un pregresso intervento (protesi esofagea) che le impediva la corretta assunzione del farmaco.

Il GCN del secondo paziente è stato di 4,3 ed anche questo è stato arruolato nella coorte 2. Ha effettuato tre cicli di terapia con relativa buona tolleranza ad eccezione di un rialzo della creatinina di grado 2 ha comportato l'interruzione temporanea del farmaco. La prima rivalutazione radiologica mostrava progressione di malattia ed è stato discontinuato il farmaco.

Il paziente numero tre presentava un GCN di 8,2 ed è rientrato nella coorte 1, alta amplificazione. Ha effettuato 5 cicli di terapia ma una serie di eventi di versamento pleurico e pericardico hanno comportato il ricovero per procedure di drenaggio/toracentesi e la relativa sospensione temporanea del farmaco. La seconda rivalutazione mostrava una stabilità di malattia, confermando la prima TC fatta, ma si è deciso di discontinuare il farmaco per progressione clinica. Questo paziente presentava, oltre ad alterazione di MET, anche riarrangiamento di ROS1 e, dopo l'uscita dallo studio, ha cominciato una terapia con crizotinib che ha documentata azione sia verso ROS1 che verso MET. La buona risposta a questo farmaco fa supporre la prevalenza dell'effetto di ROS1 rispetto a MET in questo paziente.

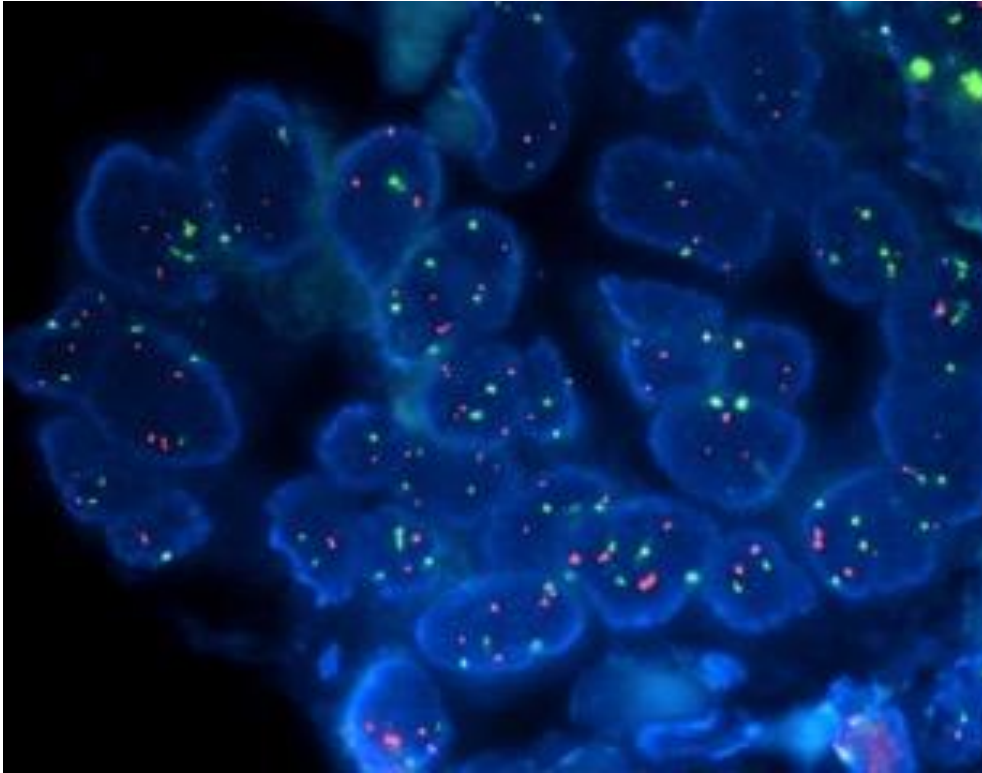


Figura 7 Patient 3, met amplification, green CEP7 probe, red MET probe

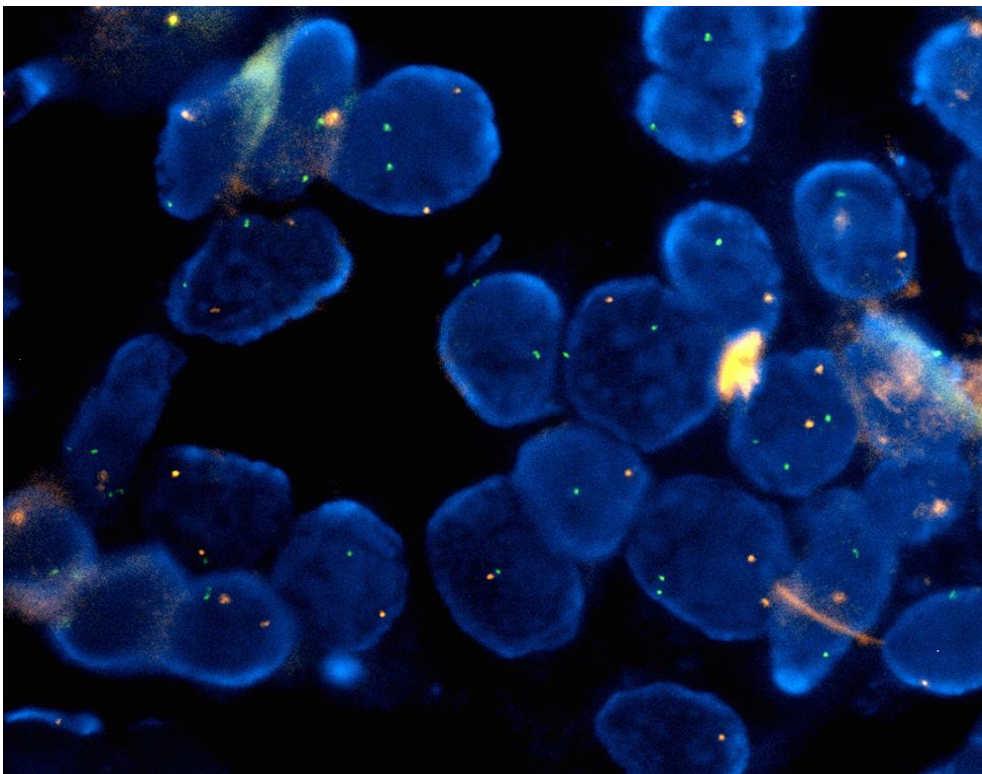


Figura 8 Patient 3, ROS-1 rearrangement, split red and green signifying the presence of ROS1 rearrangement

L'ottavo paziente arruolato aveva un GCN elevato (6,9) ed è stato assegnato alla coorte 1. Ha effettuato 3 cicli di terapia ben tollerati, la prima tc di ristadiatione mostrava progressione di malattia ed è stato discontinuato dallo studio.

La paziente numero 12 era stata pre-screenata presso il nostro laboratorio ed era risultato un GCN molto elevato, è stato fatto firmare il consenso e spedito il materiale tissutale per la conferma centralizzata dell'alterazione genetica che ha rilevato un gene copy number di 29,1. E' stato completato solo il primo ciclo di terapia prima della discontinuazione per progressione clinica e radiologica di malattia.

Anche l'ultimo paziente era stato pre-screenato presso il nostro laboratorio ed era risultato positivo per una mutazione nell'esone 14, che però non è stata riscontrata dal laboratorio centralizzato in quanto lo studio clinico valuta solo le mutazioni nei siti donatori ed accettori di splicing mentre in questo caso la mutazione si trovava dentro l'esone 14. Per questo motivo non è stato possibile arruolare il paziente nel protocollo ed è risultato uno screening failure.

In generale non si è osservato un beneficio clinico importante nei pazienti trattati col farmaco sperimentale, la paziente 3 è l'unica che ha completato 5 cicli di terapia in assenza tuttavia di beneficio clinico-radiologico tale per cui la paziente ha dovuto interrompere il farmaco. Non abbiamo osservato sostanziale differenza di effetto terapeutico tra i pazienti con media amplificazione rispetto ai pazienti con $GCN \geq 6$, però il numero di soggetti trattati è tale per cui non è possibile trarre delle conclusioni. Lo sponsor ha però deciso di non riaprire le coorti medio e basso amplificato e ciò fa presupporre che i dati ricavati non siano favorevoli.

PATIENT	GCN	MUT	COHORT	ENROLLED	CYCLES
1	4,8	-	2	Y	1
2	4,3	-	2	Y	3
3	8,2	-	1	Y	5
4	4,7	-	2	N	-
5	3,3	-	3	N	-
6	3,9	-	3	N	-
7	-	-	-	N	-
8	6,9	-	1	Y	3
9	-	-	-	-	-
10	5,3	-	2	N	-
11		-	-	-	-
12	29,1	N	1	Y	1
13	3,4	-	-	N	-

Tabella 2 Study CINC280A2201

2. STUDIO CINC280X2202

Nel nostro centro sono stati valutati, previa firma del consenso informato, 8 pazienti (6 donne e 2 uomini) ma nessuno presentava un'amplificazione del gene tale da poter essere arruolato nello studio.

I primi dati di efficacia della fase II mostrano PR nel 17% dei casi, gli AE più frequenti sono stati nausea/vomito e la maggior parte degli AE sono stati di grado 1 e 2. Il 32% dei pazienti ha manifestato almeno un Serious Adverse Event (SAE), dei quali il 7,2% sospetto essere relato al trattamento.

PATIENT	FISH			Immunohistochemistry			
	cMET signals	CEP7 signals	cMET/C EP7 signals	% tumor cell	High (3+)	Medium (2+)	Low (1+)
1	241	247	1	5	0%	90%	10%
1 bis	261	234	1,1	15	0%	30%	40%
2	158	163	1	20	0%	0%	0%
3	203	379	0,5	25	0%	10%	90%
4	153	238	0,6	5	0%	90%	9%
5	182	199	0,9	30	0%	0%	0%
6	867	240	3,6	25	0%	0%	0%
6 bis	233	140	1,7	30	40%	60%	0%
7	111	137	0,8	10	0	0	0
8	SCREENING FAILURE/T790M						

Tabella 3 Study CINC280X2202

3. STUDIO TED11449

Nel nostro centro sono stati valutati mediante pre-screening 20 pazienti (8 donne e 12 uomini) i quali, previa firma del consenso informato, hanno acconsentito a fornire il materiale biologico su cui condurre le analisi FISH del caso. L'esame è stato condotto mediante sonda Abbott Vysis MET ed era richiesta la conta di 60 cellule per poter determinare l'amplificazione di MET. Solo due pazienti sono risultati positivi e quindi arruolabili nello studio clinico.

Nella prima paziente, una donna di 62 anni con diagnosi di adenocarcinoma polmonare in progressione dopo una terapia di prima linea a base di carboplatino + paclitaxel seguita da due cicli di mantenimento con pemetrexed, l'analisi FISH condotta su campione bioptico aveva evidenziato una percentuale di cellule con più di 4 copie del gene MET dell'82% e con un rapporto gene/centromero di 5,17. La paziente, avendo soddisfatto tutti i criteri di inclusione ed esclusione, è pertanto risultata eleggibile ed ha iniziato il trattamento sperimentale. Per tossicità epatica, con rialzo G3 dei valori di ALT, con durata tuttavia inferiore ai 4 giorni e per questo motivo non classificabile come tossicità dose-limitante, la paziente ha effettuato solo 3 somministrazioni delle 4 previste nel primo ciclo; la successiva TC di ristadiatione, condotta al termine del primo ciclo come da protocollo, ha evidenziato un quadro di progressione di malattia per cui la paziente ha interrotto definitivamente il trattamento.

Nel secondo paziente, un uomo di 76 anni con diagnosi di adenocarcinoma polmonare in progressione dopo terapia di prima linea con carboplatino e docetaxel, l'analisi FISH ha evidenziato la presenza del 60% di cellule con più di 4 copie MET ed un rapporto gene/centromero pari a 2,32. Una volta concluse le procedure di screening, e dopo aver soddisfatto tutti i criteri di inclusione ed esclusione dello studio, il paziente ha avviato trattamento con discreta tolleranza. Ha effettuato 5 cicli di terapia, la prima TC di rivalutazione ha mostrato stabilità di malattia ed anche la seconda. Dopo il quinto ciclo, le immagini radiologiche ha evidenziato progressione di malattia ed il paziente ha discontinuato il farmaco sperimentale.

PATIENT	cMET signals/nucleus	CEP7 chromosome probes/nucleous	cMET/CEP7 signals	% cell with MET gene copy number>4 and ration ≥ 2	Potential patient
1	2,78	2,78	1,03	1,67	N
2	2,48	2,47	1,03	0	N
3	2,53	2,32	1,11	0	N
4	0	0	0	0	N
5	3,67	3,42	1,07	0	N
6	3,95	3,65	1,16	5	N
7	2,72	2,6	1,07	1,67	N
8	2,2	2,17	1,02	0	N
9	2,43	2,42	1,01	0	N
10	3	2,82	1,06	1,67	N
11	11,62	2,27	5,17	82	Y
12	2,92	4,25	0,69	0	N
13	//	//	//	//	N
14	3,52	3,15	1,13	3,33	N
15	0	0	0	0	N
16	2,47	2,36	1,07	0	N
17	0	0	0	0	N
18	3,03	3,03	1	0	N
19	5,18	4,45	1,16	5	N
20	9,48	4,68	2,32	60	Y

Tabella 4 Study TED11449

ALTERAZIONI DEL GENE MET

1. AMPLIFICAZIONE DEL GENE MET

2016

Sono stati valutati 25 pazienti presso il nostro policlinico (16 maschi e 9 femmine) e 7 sono risultati amplificati (28%). Di questi, 3 sono amplificazioni cluster ed i restanti 4 presentano polisomia. E' stato anche calcolato il rapporto gene/centromero e solo in 4 casi su 7 questo è ≥ 2 . Quindi il ratio MET/CEP7 da solo avrebbe dato risultato negativo in tre casi dove invece il GCN mostra amplificazione dovuta a polisomia.

	GENDER	UCCC 2003	RATIO	% cell >=4 copie MET		GENDER	UCCC 2003	RATIO	% cell >=4 copie MET
1	M	a. (alta polisomia)	2,21	100%	14	M	n.a. (bassa polisomia)	1,1	35,00%
2	M	n.a. (bassa polisomia)	1,09	33,30%	15	M	a. (alta polisomia)	1,39	92,50%
3	M	n.a. (bassa polisomia)	1,05	35,00%	16	F	n.a. (bassa polisomia)	1,04	35,00%
4	M	n.a. (bassa polisomia)	1,15	20,00%	17	M	n.a. (bassa trisomia)	1,07	5,00%
5	M	n.a. (alta trisomia)	1	10,00%	18	F	n.a. (bassa trisomia)	0,91	35,00%
6	M	n.a. (disomia)	0,8	1,70%	19	M	n.a. (disomia)	0,59	7,50%
7	M	n.a. (bassa polisomia)	1,1	38,30%	20	M	a. (alta polisomia)	1,08	46,70%
8	M	n.a. (bassa trisomia)	0,83	6,60%	21	F	a. (ampl. Cluster)	8,91	100,00%
9	F	n.a. (bassa trisomia)	0,98	10,00%	22	M	a. (ampl. cluster)	4,07	92,50%
10	F	n.a. (bassa trisomia)	1	3,30%	23	F	n.a. (bassa trisomia)	0,97	10,00%
11	M	a. (ampl. Cluster)	6,09	92,50%	24	F	n.a. (bassa polisomia)	1,21	38,00%
12	F	n.a. (alta trisomia)	1	10,00%	25	F	a. (alta polisomia)	1,1	92,5
13	M	n.a. (disomia)	0,99	0,00%					

2017

Da inizio 2017 ad oggi sono stati esaminati 11 pazienti (5 maschi e 6 femmine) secondo il criterio UCCC e solo tre (27%) presentano alta amplificazione, tutti di tipo cluster. Nessuno dei tre ha un rapporto gene/centromero ≥ 2 .

2017				
	GENDER	UCCC 2003	RATIO	% cell >=4 copie MET
1	M	n.a. (bassa trisomia)	1,07	10
2	M	n.a. (bassa polisomia)	1,13	23,3
3	M	n.a. (bassa polisomia)	0,93	25%
4	F	n.a. (bassa trisomia)	1,07	3%
5	F	a. (alta polisomia)	1,3	95%
6	F	n.a. (bassa polisomia)	1,09	20%
7	F	a. (alta polisomia)	1,23	82,50%
8	F	n.a. (bassa polisomia)	0,97	38,30%
9	M	a. (alta polisomia)	1,07	90,00%
10	M	n.a. (bassa trisomia)	1,07	2,50%
11	F	n.a. (bassa polisomia)	1,1	35,00%

2. MUTAZIONI DEL GENE MET

2016

Nell'ottica della collaborazioni tra aziende della regione sono stati analizzati, per la presenza di mutazioni del sito di splicing dell'esone 14, 79 campioni provenienti dall'Azienda Ospedaliera di Modena e 18 dall'Azienda Ospedaliera Universitaria di Parma ottenendo un totale di 142 casi valutati. Sono state riscontrate 13 mutazioni (9%) così suddivise:

- 5 delezioni
- 2 delezioni/inserzioni
- 6 sostituzioni, così suddivise:
 - 1 sostituzione C>T
 - 1 sostituzione A>G
 - 2 sostituzioni G>A
 - 1 sostituzione G>T
 - 1 sostituzione G>C

4 mutazioni su 13 sono state riscontrate all'interno dell'esone 14, identificate con le seguenti sigle:

- c.3029C>T che ha comportato la seguente sostituzione aminoacidica p.T1010I (da treonina a isoleucina)
- c.3047_3062delinsG p.N1017_Y1022>S
- c.3082+1del
- c.3082G>C che ha comportato la seguente sostituzione amminoacidica p.D1028H (da acido aspartico a istidina)

Le restanti 9 alterazioni si trovano alle estremità dell'esone 14, nei siti donatore ed accettore di splicing, e sono così identificate:

- g.116412045 A>G
- g.116411870_116411914del c.2942-32_2954del45
- g.116412044_116412051delTATATTCinsAAA
- g.116412043 G>A
- g.116412043 G>A
- g.116411875_116411889del15
- g.116412043 G>T
- g.116411881_116411905del25
- g.116411887_116411903del17

5 di queste 9 mutazioni si trovano nel sito donatore di splicing, le restanti nel sito accettore.

Non sono state valutate altri tipi di mutazioni per tutti i pazienti ma, da dati parziali, abbiamo trovato solo in un caso in cui la mutazione del gene MET coesisteva con un altro tipo di alterazione. Questo paziente presentava una mutazione all'interno dell'esone 14, più precisamente la sostituzione T1010I, in concomitanza della mutazione KRAS.

N°	Mutazioni MET-14 Sanger	Analisi Molecolare (EGFR/KRAS/ ALK)		N°	Mutazioni MET-14 Sanger	Analisi Molecolare (EGFR/KRAS/ ALK)
1	WT	NA		26	WT	NA
2	WT	NA		27	WT	WT
3	WT	NA		28	g.11641204 3 G>A	NA
4	WT	NA		29	g.11641204 3 G>A	NA
5	WT	NA		30	WT	NA
6	WT	WT		31	WT	NA
7	WT	WT		32	WT	WT
8	WT	WT		33	WT	NA
9	WT	WT		34	WT	NA
10	WT	NA		35	WT	G12V
11	WT	NA		36	g.11641187 5 11641188	WT
12	WT	WT		37	WT	WT
13	WT	NA		38	WT	WT
14	WT	NA		39	WT	NA
15	WT	NA		40	WT	NA
16	WT	NA		41	WT	NA
17	WT	WT		42	WT	NA
18	WT	G12C		43	WT	NA
19	WT	L858R		44	WT	NA
20	WT	NA		45	WT	NA
21	WT	NA		46	WT	NA
22	WT	NA		47	WT	G13C
23	WT	NA		48	WT	WT
24	WT	NA		49	g.11641204 3 G>T	NA
25	WT	NA		50	WT	NA

Tabella 5 Mutations 2016, part1; WT=wild type,NA=not available

N°	Mutazioni MET-14 Sanger	Analisi Molecolare (EGFR/KRAS/ ALK)		N°	Mutazioni MET-14 Sanger	Analisi Molecolare (EGFR/KRAS/ ALK)
51	WT	NA		76	WT	NA
52	WT	NA		77	WT	NA
53	WT	NA		78	WT	NA
54	WT	NA		79	WT	G12C
55	WT	WT		80	WT	mut EGFR (L858R)
56	WT	NA		81	WT	wt EGFR - wt KRAS wt
57	N.A.	WT		82	WT	NA
58	WT	WT		83	WT	wt EGFR wt KIT / ALK -
59	WT	WT		84	WT	wt EGFR - wt KRAS / ALK
60	WT	NA		85	WT	wt EGFR - mut KRAS
61	WT	NA		86	WT	mut KRAS (p.G12D)
62	WT	NA		87	WT	mut KRAS (p.G12A)
63	WT	NA		88	c.3029C>T p.T1010I	mut KRAS (p.G12C)
64	WT	NA		89	WT	NA
65	WT	NA		90	WT	NA
66	WT	NA		91	WT	mut KRAS (p.G12C)
67	WT	NA		92	g.11641204 5 A>G	NA
68	WT	NA		93	WT	wt EGFR - wt KRAS / ALK
69	WT	NA		94	WT	NA
70	WT	NA		95	WT	wt EGFR - wt KRAS / ALK -
71	WT	NA		96	g.11641187 0 11641191	WT EGFR
72	WT	NA		97	WT	WT EGFRKRAS-
73	WT	NA		98	WT	WT EGFR- /ROS1-RET-
74	WT	NA		99	WT	WT EGFR- KRAS -ALTRA
75	WT	NA		100	WT	WT EGFR- KRAS - / BRAF

Tabella 6 Mutations 2016, part2; WT=wild type,NA=not available

N°	Mutazioni MET-14 Sanger	Analisi Molecolare (EGFR/KRAS/ ALK)		N°	Mutazioni MET-14 Sanger	Analisi Molecolare (EGFR/KRAS/ ALK)
101	WT	wt EGFR -wt KRAS - wt		122	WT	wt EGFR -wt KRAS
102	WT	WT		123	c.3082+1del	wt EGFR -wt KRAS
103	WT	wt EGFR -wt KRAS		124	WT	wt EGFR -wt KRAS
104	WT	wt EGFR -wt KRAS		125	WT	NA
105	g.11641204 4 11641205	wt EGFR -wt KRAS		126	WT	NA
106	WT	wt EGFR -wt KRAS		127	WT	NA
107	WT	NA		128	WT	NA
108	c.3047_3062 delinsG	WT		129	WT	NA
109	WT	WT EGFR GLY12VAL		130	WT	NA
110	WT	wt EGFR -wt KRAS		131	WT	NA
111	WT	wt EGFR -wt KRAS		132	WT	NA
112	WT	wt EGFR -wt KRAS		133	.881_1164119	NA
113	WT	wt EGFR -wt KRAS V600E		134	WT	NA
114	WT	wt EGFR -wt KRAS		135	WT	NA
115	WT	WT EGFR GLY12SER		136	.887_1164119	NA
116	WT	WT EGFR GLY12VAL		137	c.3082G>C p.D1028H	NA
117	WT	NA		138	WT	NA
118	WT	NA		139	WT	NA
119	WT	wt EGFR -wt KRAS		140	WT	NA
120	WT	WT		141	WT	NA
121	WT	EGFR WT GLY13ASP		142	WT	NA

Tabella 7 Mutations 2016, part3; WT=wild type,NA=not available

In base all'istologia, i 142 campioni analizzati si suddividono in 78 sarcomatoidi e 64 non sarcomatoidi (prevalentemente adenocarcinomi). I sarcomatoidi rappresentano una percentuale non altissima dei tumori polmonari non a piccole cellule ma, da letteratura, la frequenza di mutazioni dell'esone 14 è più alta rispetto alle altre istologie.

Sono stati selezionati 78 pazienti, 66 maschi e 12 femmine, con istologia sarcomatoide e la frequenza di mutazioni MET è del 9% con 7 mutazioni rilevate. Di questi 7 pazienti solo una è donna, 2 sono non fumatori e nessuno ha mutazioni di altri geni (EGFR, KRAS, ALK, ecc). Prevalle la variante pleomorfa con 5 casi su 7 mentre gli altri due sono , ci sono 4 pazienti con sottotipo a cellule fusate, 4 casi su 7, seguita da due soggetti con cellule giganti e solo uno a cellule fusate/giganti. 3 alterazioni comportano una sostituzione e le restanti 4 causano delezione di un numero di nucleotidi che va da 15 a 25. 1 sola mutazione si trova all'interno dell'esone, in posizione c.3082, mentre si suddividono in 4 nel sito donatore di splicing e 2 nel sito accettore. Ci sono due diverse sostituzioni nella posizione g.116412043: G>A e G>T mentre due pazienti presentano la stessa delezione: g.116411875_116411889del15.

	GENDER	MET	EGFR	ALK	KRAS		GENDER	MET	EGFR	ALK	KRAS
1	M	wt	NA	NA	NA	40	M	wt	wt	wt	wt
2	F	wt	NA	NA	NA	41	M	wt	wt	wt	G12V
3	F	wt	NA	NA	NA	42	M	wt	wt	wt	wt
4	M	wt	NA	NA	NA	43	M	wt	wt	wt	wt
5	M	wt	NA	NA	NA	44	M	wt	wt	wt	wt
6	M	wt	NA	NA	NA	45	M	g.116412043G>A	wt	wt	wt
7	M	g.116411881_116411905del25	NA	NA	NA	46	M	wt	wt	wt	wt
8	F	wt	NA	NA	NA	47	M	wt	wt	wt	wt
9	M	wt	NA	NA	NA	48	M	wt	wt	wt	wt
10	M	g.116411887_116411903del17	NA	NA	NA	49	M	wt	wt	wt	wt
11	M	c.3082G>C p.D1028H	NA	NA	NA	50	M	wt	wt	wt	wt
12	F	wt	NA	NA	NA	51	M	wt	wt	wt	wt
13	M	wt	NA	NA	NA	52	M	wt	wt	wt	wt
14	M	wt	NA	NA	NA	53	M	wt	wt	wt	G12V
15	M	wt	NA	NA	NA	54	M	wt	wt	wt	wt
16	M	wt	NA	NA	NA	55	M	wt	wt	wt	wt
17	M	wt	wt	wt	wt	56	M	wt	wt	wt	wt
18	M	wt	NA	NA	NA	57	M	wt	wt	wt	wt
19	M	wt	wt	wt	G12D	58	F	wt	wt	wt	G12C
20	M	wt	wt	wt	wt	59	F	wt	wt	wt	wt
21	F	wt	wt	wt	wt	60	M	wt	wt	wt	wt
22	F	wt	wt	wt	G13C	61	M	wt	wt	wt	wt
23	F	wt	wt	wt	wt	62	F	wt	wt	wt	wt
24	M	wt	wt	wt	wt	63	M	wt	wt	wt	wt
25	M	wt	wt	wt	G12C	64	M	wt	wt	wt	wt
26	M	wt	wt	wt	wt	65	M	wt	wt	wt	wt
27	M	wt	wt	wt	G12C	66	M	wt	wt	wt	wt
28	M	wt	wt	wt	wt	67	M	wt	wt	wt	wt
29	M	wt	wt	wt	wt	68	M	wt	wt	wt	wt
30	M	wt	wt	wt	wt	69	M	g.116412043G>T	wt	wt	wt
31	M	wt	wt	wt	wt	70	M	wt	wt	wt	wt
32	M	wt	wt	wt	G12D	71	M	wt	wt	wt	wt
33	M	wt	wt	wt	wt	72	M	wt	wt	wt	wt
34	M	wt	wt	wt	G12C	73	M	wt	wt	wt	G12C
35	F	wt	wt	wt	G12D	74	M	wt	wt	wt	wt
36	F	g.116411875_116411889del15	wt	wt	wt	75	M	wt	wt	wt	wt
37	M	g.116411875_116411889del15	wt	wt	wt	76	M	wt	wt	wt	wt
38	M	wt	wt	wt	wt	77	M	wt	L858R	wt	wt
39	M	wt	wt	wt	G13C	78	M	wt	wt	wt	wt

Tabella 8 Sarcomatoid histology; WT=wild type,NA=not available

2017

Nel 2017, fino a ora, è stata condotta l'analisi di mutazione del gene MET su 25 pazienti presso il nostro ospedale (14 femmine e 11 maschi) e sono state trovate due mutazioni (8%), entrambe sostituzioni; una all'interno dell'esone 14 e l'altra nel sito donatore di splicing.

- c.3082G>C che ha comportato la seguente sostituzione amminoacidica p.D1028H
- g.116411866G>A

Non sono state testate per tutti i pazienti le mutazioni EGFR e KRAS ma, secondo le informazioni in nostro possesso, le due mutazioni MET non presentano altre alterazioni genetiche concomitanti.

	GENDER	EGFR	KRAS	MET MUTAZIONI
1	F	NA	NA	WT
2	M	WT	WT	WT
3	M	DEL19	NA	WT
4	F	NA	GLY12CYS PYRO (43,9%)	WT
5	F	NA	NA	WT
6	F	DEL.19	NA	WT
7	F	WT	WT PYRO	WT
8	F	WT	WT PYRO	WT
9	M	WT	GLY12CYS PYRO (60,5%)	WT
10	M	NA	NA	WT
11	M	NA	NA	c.3082G>C p.D1028H
12	F	WT	WT	g.116411866G>A
13	M	NA	NA	WT
14	F	DEL19+T790M	NA	WT
15	M	NA	NA	WT
16	M	NA	NA	WT
17	F	NA	NA	WT
18	M	NA	NA	WT
19	F	NA	NA	WT
20	F	NA	NA	WT
21	F	NA	NA	WT
22	F	NA	NA	WT
23	F	NA	NA	WT
24	M	WT	WT	WT
25	M	NA	NA	WT

Tabella 9 Mutations 2017

DISCUSSIONE

I tre studi clinici esaminati presentano differenti criteri di inclusione dei pazienti e diversi modi di valutazione delle alterazioni del gene MET. Lo studio clinico CINC280X2202 prevede la valutazione presso un laboratorio centrale utilizzando sia la metodica FISH che l'immunoistochimica, per l'arruolamento nello studio TED ci si basa sulla valutazione presso il laboratorio locale di Anatomia Patologica tramite FISH mentre per lo studio CINC280A2201 il campione tissutale è valutato presso un laboratorio centrale tramite FISH.

Anche il background genetico dei pazienti è diverso: per essere arruolati nello studio CINC280A2201, i pazienti non devono presentare mutazioni a carico dei geni EGFR e ALK, lo studio CINC280X2202 richiede la mutazione del gene EGFR mentre per lo studio TED non vi erano indicazioni specifiche riguardo la caratterizzazione molecolare dei soggetti arruolati.

Infine, ogni studio discrimina in modo differente in base all'amplificazione di MET: lo studio CINC280X2202 permette l'arruolamento di pazienti con copie del gene c-MET maggiore o uguale a 5, che corrisponde a un rapporto c-MET/centromero maggiore o uguale a 2, nello studio TED è la presenza di $\geq 10\%$ delle cellule aventi 4 o più copie del gene MET e con rapporto MET/centromero ≥ 2 mentre lo studio CINC280A2201 prevede l'arruolamento di pazienti con bassa, media ed alta amplificazione.

Nessuno dei pazienti arruolati presso il nostro centro nell'ambito di questi studi clinici è andato incontro a risposta parziale secondo criteri RECIST v 4.0; la miglior risposta ottenuta è stata una stabilità di malattia. Il paziente arruolato nello studio TED ha completato cinque cicli di terapia prima della conferma di progressione di malattia. Nello studio CINC280A2201 due pazienti sono stati inclusi nella coorte di media amplificazione e hanno assunto il farmaco, rispettivamente, per un ciclo e per tre cicli. I restanti due pazienti appartenenti alla coorte di alta amplificazione hanno completato rispettivamente tre e cinque cicli prima della progressione di malattia.

Complessivamente i farmaci sperimentali sono stati sempre ben tollerati, in assenza di tossicità di grado 3 o 4 secondo CTACE. Nella coorte ad alta amplificazione dello studio CINC280A2201, uno dei pazienti arruolati presentava inoltre una traslocazione a carico di ROS1. È interessante notare come questo paziente non

abbia risposto alla terapia con inibitore di MET, ma stia al momento rispondendo al trattamento successivo con crizotinib: questo suggerisce come il driver principale della malattia in questo caso specifico sia ROS1. Ulteriori studi clinici con farmaci anti-MET verranno aperti presso il nostro centro e ciò aiuterà a valutare l'efficacia e l'importanza della target therapy nei pazienti, nonché il ruolo di MET nei pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule.

Dall'analisi condotta presso il nostro laboratorio, la frequenza di mutazioni nel gene MET è di circa il 9% (15 mutazioni su 167 pazienti), suddivise in 5 delezioni, 8 sostituzioni e due delezioni/inserzioni. 10 mutazioni su 15 sono situate nelle regioni fiancheggianti l'esone 14,6 si trovano nel sito donatore di splicing e 4 nel sito accettore. Solo 1 paziente presentava concomitanza di un'altra alterazione genetica (mutazione KRAS) mentre negli altri casi non c'erano altri geni mutati.

Nel 2016 sono state individuate 13 mutazioni (9%) su 142 pazienti (provenienti da Bologna, Parma e Modena), 78 pazienti avevano istologia sarcomatoide ed il 9% di questi presentavano mutazioni dell'esone 14. Nel 2017 sono stati esaminati 25 pazienti presso il nostro ospedale e solo 2 (8%) presentavano mutazioni di MET.

Per quanto riguarda l'amplificazione del gene MET, sono stati valutati 36 pazienti tra il 2016 ed il 2017 presso il nostro ospedale. Nel 2016 sono state trovate 6 amplificazioni su 25 soggetti mentre nel 2017 risultavano amplificati 3 pazienti su 11.

E' stato utilizzato il criterio UCCC (University of Colorado Cancer Center) per valutare l'amplificazione tramite FISH ma in letteratura non c'è unanimità sul modo migliore per determinare su un paziente è amplificato oppure no. L'utilizzo del rapporto gene/centromero non permette di apprezzare le polisomie mentre il GCN individua qualsiasi tipo amplificazione. Anche negli studi clinici non c'è un solo modo di valutare, e quindi poter arruolare nel protocollo, i pazienti e ciò non consente di poter paragonare esattamente i risultati ottenuti nei diversi protocolli.

In due anni abbiamo stimato la presenza di amplificazione del gene MET nel 28% dei pazienti testati, 10 casi su 36. Di questi 10, il 70% è costituito da polisomie che non sono considerate vere amplificazioni da tutti i tre criteri elencati in precedenza.

Nel 2016 il numero medio del rapporto MET/CEP7 è 1,7 (su 25 pazienti), nel 2017 invece è 1,09 (11 pazienti). Considerando i casi totali si ha un campione di 36 soggetti con un ratio medio di 1,2.

Concludendo, dai dati in nostro possesso si evince che le terapie sperimentali in pazienti con amplificazione del gene MET non hanno portato a risposta radiologica nei pazienti da noi trattati. Ad oggi non abbiamo ancora arruolato pazienti con mutazioni di MET; dai dati raccolti in letteratura, questo sottogruppo di pazienti sembra presentare tassi di risposta migliori alle terapie molecolari mirate rispetto ai pazienti con amplificazione di MET.

Per quanto concerne la probabile associazione tra l'istologia di tipo sarcomatoide e la maggiore incidenza di mutazioni di MET, dai dati ottenuti dal nostro database si evince una frequenza minore rispetto a quella descritta in letteratura.

Infine, in linea con i risultati già ottenuti, la frequenza di amplificazioni identificata nel nostro laboratorio è risultata maggiore rispetto alle mutazioni ed entrambe si sono mantenute costanti nel tempo.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Professor Ardizzoni per avermi consentito di svolgere questo Dottorato presso il reparto di oncologia da lui diretto, in questi tre anni ho potuto ampliare le mie conoscenze in merito alle sperimentazioni cliniche in tutti i loro aspetti e far parte di un team affiatato e produttivo. Abbiamo costruito un gruppo di lavoro basato sull'aiuto reciproco, sulla sinergia e con l'obiettivo di migliorare costantemente. La qualità del nostro lavoro è cresciuta nel tempo e stiamo ampliando lo staff per poter gestire meglio la complessità degli studi clinici che aumenta sempre più.

Un sentito ringraziamento al dipartimento di Anatomia Patologica per la gentilezza e disponibilità sempre dimostrata nei miei confronti e per la collaborazione col reparto di oncologia, sempre efficiente e tempestiva. In particolare sono riconoscente al Dottor Fiorentino ed alle Dottoresse Altimari, Capizzi e Gruppioni per la professionalità, competenza e gentilezza

Sono riconoscente al Dottor Rihawi per il suo aiuto e la sua pazienza in questi anni, grazie alle mie colleghe per il supporto, il conforto e per trovare sempre il lato comico nelle situazioni più disperate. Ringrazio il Dottor Tognetto, la Dottoressa Salvagni e tutto il team di fase 1, con i quali ho lavorato fino ad ora. Abbiamo raggiunto importanti obiettivi e superato situazioni critiche sempre credendo nell'importanza del nostro lavoro.

Un enorme grazie alla mia famiglia per esserci sempre stata, per avermi ascoltata e motivata in questi tre anni.

BIBLIOGRAFIA

Angevin E, Spitaleri G, Rodon, J et al: A first-in-human phase I study of SAR125844, a selective MET tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors with MET amplification. Eur J cancer 2017, 87:131-139

Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, et al. Met, metastasis, motility and more. Nat Rev Mol Cell Biol 2003;4:915-25.

Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, et al: Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. J Clin Oncol 27:1667-1674, 2009

Cappuzzo F, Jänne PA, Skokan M, et al. MET increased gene copy number and primary resistance to gefitinib therapy in non-small-cell lung cancer patients. Ann Oncol 2009;20:298-304

Chen YT, Chang JW, Liu HP, et al. Clinical implications of high MET gene dosage in non-small cell lung cancer patients without previous tyrosine kinase inhibitor treatment. J Thorac Oncol 2011;6:2027-35

Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. Nat Rev Drug Discov 2008;7:504-16.

Cui JJ. Targeting receptor tyrosine kinase MET in cancer: small molecule inhibitors and clinical progress. J Med Chem 2014;57:4427-53

D'Arcangelo M, Cappuzzo F. Focus on the potential role of ficlatuzumab in the treatment of non-small cell lung cancer. *Biologics* 2013;7:61-8.

Dziadziuszko R, Wynes MW, Singh S, et al. Correlation between MET gene copy number by silver in situ hybridization and protein expression by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012;7:340-7.

Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al: MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316: 1039-1043, 2007

Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov* 2015;5:850-9

Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2008;27:85–94

Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Woude GV. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer*. 2012 Jan 24;12(2):89–103

Giorgio V. Scagliotti, et al. A phase III, randomized, double-blind study of tivantinib plus erlotinib versus placebo plus erlotinib in previously treated patients with locally advanced or metastatic, non squamous, non-small cell lung cancer. *Clinical lung cancer*

Go H, Jeon YK, Park HJ, et al. High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol 2010;5:305-13

Heist RS, et al. MET exon 14 skipping in non-small cell lung cancer. Oncologist 2016 apr;21(4)481-6

Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, Webb CP, Weirich G, Kishida T, et al. Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Oct 14;94(21):11445–50

Jenkins RW, Oxnard GR, Elkin S, et al: Response to crizotinib in a patient with lung adenocarcinoma harboring a MET splice site mutation. Clin Lung Cancer 16:e101-e104, 2015

Koeppen H, Yu W, Zha J, et al. Biomarker analyses from a placebo-controlled phase II study evaluating erlotinib±onartuzumab in advanced non-small cell lung cancer: MET expression levels are predictive of patient benefit. Clin Cancer Res 2014;20:4488-98.

Koeppen H, Rost S, Yauch RL. Developing biomarkers to predict benefit from HGF/MET pathway inhibitors. J Pathol 2014;232:210-8

Kong-Beltran M, Seshagiri S, Zha J, et al. Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of Met in lung cancer. Cancer Res 2006;66:283-9

Krishnaswamy S, Kanteti R, Duke-Cohan JS, Loganathan S, Liu W, Ma PC, et al. Ethnic differences and functional analysis of MET mutations in lung cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2009 Sep 15;15(18):5714–23

Kurzrock R, Sherman SI, Ball DW, et al. Activity of XL184 (cabozantinib), an oral tyrosine kinase inhibitor, in patients with medullary thyroid cancer. J Clin Oncol 2011;29:2660-6.

Landi L, Minuti G, Salvini J, et al. MET overexpression and gene amplification in NSCLC : a clinical perspective. Dovepress 2013;4:15-25.

Lee CC, Yamada KM. Identification of a novel type of alternative splicing of a tyrosine kinase receptor. Juxtamembrane deletion of the c-met protein kinase C serine phosphorylation regulatory site. J Biol Chem 1994;269:19457–61.

Linee guida ICH-GCP (D.M. 15 luglio 1997)

Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, et al. cMET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. Cancer Res 2003;63:6272–81

Ma PC. Functional Expression and Mutations of c-Met and Its Therapeutic Inhibition with SU11274 and Small Interfering RNA in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer Res. 2005 Feb 15;65(4):1479–88

Ma PC, Tretiakova MS, MacKinnon AC, et al. Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:1025-37.

Mark M. Awad, Lowe Center for Thoracic Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA Impaired c-Met Receptor Degradation Mediated by MET Exon 14 Mutations in Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 34, No 8 (March 10), 2016: pp 879-881

Maryam Zenali^{1*} and James deKay^{2*}, Zesheng Liu³, Stanley Hamilton¹, Zhuang Zuo⁴, Xinyan Lu⁵, Rania Bakkar⁶, Gordon Mills³, Russell Broaddus Retrospective Review of MET Gene Mutations. *Oncoscience*, 2(5),533-541.

Mendenhall MA, Goldman JW: MET-mutated NSCLC with major response to crizotinib. *J Thorac Oncol* 10:e33-e34, 2015

Mok TS, Park K, Geater SL, et al. A randomized phase (PH) 2 study with exploratory biomarker analysis of ficlatuzumab (F) a humanized hepatocyte growth factor (HGF) inhibitory mAb in combination with gefitinib (G) versus G in Asian patients (pts) with lung Adenocarcinoma (LA). *Ann Oncol* 2012;23:ix391.

Okuda K, Sasaki H, Yukiue H, Yano M, Fujii Y. Met gene copy number predicts the prognosis for completely resected non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2008;99:2280–5.

Onozato R, Kosaka T, Kuwano H, Sekido Y, Yatabe Y, Mitsudomi T. Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers. *J Thorac Oncol* 2009;4:5–11.

Paik PK, Drilon A, Fan PD, et al: Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov* 5:842-849, 2015

Park S, Choi YL, Sung CO, et al. High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients. *Histol Histopathol* 2012;27:197-207.

Peruzzi B. Targeting the c-MET signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Jun 15;12(12):3657-60

Peters S, Adjei AA. MET: a promising anticancer therapeutic target. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:314-26.

Rosen PJ, Sweeney CJ, Park DJ, et al. A phase Ib study of AMG 102 in combination with bevacizumab or motesanib in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2010; 16:2677-87

Sacco JJ, Clague MJ: Dysregulation of the Met pathway in non-small cell lung cancer: Implications for drug targeting and resistance. *Transl Lung Cancer Res* 4:242-252, 2015

Sadiq AA, Salgia R. MET as a possible target for non–small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:1089–96.

Scagliotti GV, Novello S, von Pawel J. The emerging role of MET/HGF inhibitors in oncology. *Cancer Treat Rev* 2013;39:793–801.

Schrock AB, Lai A, Ali SM, Miller VA, Raez LE. Mutations of MET Y1230 as an acquired mechanism of crizotinib resistance in non-small cell lung cancer with MET exon 14 skipping. *J Thorac Oncol* 2017 jul;12(7):e89-e90

Seo J-S, Ju YS, Lee W-C, Shin J-Y, Lee JK, Bleazard T, et al. The transcriptional landscape and mutational profile of lung adenocarcinoma. *Genome Res* 2012;22:2109–19.

Sequist LV, von Pawel J, Garmey EG, et al. Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:3307-15.

Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011;3:75ra26.

Spigel DR, Edelman MJ, O'Byrne K, et al. Onartuzumab plus erlotinib versus erlotinib in previously treated stage IIb or IV NSCLC: Results from the pivotal phase III randomized, multicenter, placebo-controlled METLung (OAM4971g) global trial. *J Clin Oncol* 2014;32:abstr 8000.

Tarhini AA et al. Phase I/II study of rilotuzumab (AMG 102), a hepatocyte growth factor inhibitor, and erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 2017 Aug 1, 123(15):2936-2944

Thanyanan Reungwetwattana¹, Sai-Hong Ignatius Ou MET exon 14 deletion (METex14): finally, a frequent-enough actionable oncogenic driver mutation in non-small cell lung cancer to lead MET inhibitors out of “40 years of wilderness” and into a clear path of regulatory approval. *Transl Lung Cancer Res* 2015;4(6):820-824

The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511: 543–50

Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:834-48.

Waqar SN, Morgensztern D, Sehn J: MET mutation associated with responsiveness to crizotinib. *J Thorac Oncol* 10:e29-e31, 2015

Wakelee HA, Gettinger SN, Engelman JA, et al. A phase Ib/II study of XL184 (BMS 907351) with and without erlotinib (E) in patients (pts) with non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2010;28:abstr 3017.

Weir BA, Woo MS, Getz G, et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 2007;450:893-8.

Wickramasinghe D, Kong-Beltran M. Met Activation and Receptor Dimerization in Cancer: A Role for the Sema Domain. *Cell Cycle*. 2005 Mar 2;4(5):683–5