

RECHERCHE DE MUTATIONS CIBLÉES DU GÈNE NRAS DANS LES TUMEURS COLORECTALES MÉTASTATIQUES (EXONS 2, 3 ET 4 : CODONS 12, 13, 61 ET 146) (RÉFÉRENCE – 2014.03.07)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : Hôpital général juif
- 1.2 **Date de transmission de la demande d'examen au MSSS** : 15 septembre 2014
- 1.3 **Date de réception de la demande à l'INESSS** : 31 octobre 2014
- 1.4 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 27 février 2015

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information scientifique et commerciale déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflit d'intérêts

Le D^r David S. Rosenblatt du CUSM se retire au moment de formuler l'avis de recommandation.

2 TECHNOLOGIE, SOCIÉTÉ ET LICENCE

2.1 Nom de la technologie

Analyse de mutations dans les exons 2, 3, et 4 du gène *NRAS* par TAAN en temps réel avec sondes TaqMan®.

2.2 Description brève de la technologie et précisions techniques et cliniques

Les demandeurs utilisent la trousse (NRAS Mutation Analysis Kit) de la compagnie EntroGen Inc. (Tarzana, CA, É.-U.). La trousse contient les amorces PCR et sondes TaqMan® nécessaires à l'amplification et à la détection spécifique de chacune des mutations à tester

(*NRAS* exon 2 : G12D, G12C, G12S, G13R et G13V. *NRAS* exon 3 : Q61H, Q61L, Q61K et Q61R. *NRAS* exon 4 : A146T).

La quantité totale d'ADN nécessaire à l'amplification est vérifiée en incluant des amorces pour amplifier un gène contrôle, la $\beta 2$ microglobuline. La détection des séquences mutées amplifiées repose sur l'hydrolyse de sondes fluorescentes (TaqMan®). Chaque sonde contient un fluorophore (FAM™ ou VIC®) à l'extrémité 5'. L'autre extrémité est marquée par une molécule qui masque la fluorescence par le principe FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)²¹. Pendant l'amplification PCR, au moment de l'élongation des amorces, si l'ADN polymérase rencontre une sonde TaqMan® parfaitement hybridée en aval, celle-ci sera hydrolysée. Par contre, si l'hybridation n'est pas parfaite, la sonde sera déplacée et donc, conservée intacte [Livak, 1999]. L'hydrolyse de la sonde génère une fluorescence qui s'intensifie d'un cycle PCR à l'autre, mesurable en temps réel [De Kok *et al.*, 2002] (voir le schéma présenté à l'annexe A). Les sondes *NRAS* sont marquées avec FAM™, alors que la sonde contrôle $\beta 2$ microglobuline est marquée avec VIC®. Le signal VIC® devrait être détecté dans tous les échantillons, alors que celui du FAM™ devrait être détecté uniquement pour les échantillons mutés *NRAS*.

2.3 Société ou développeur : Entrogen Inc. (Tarzana, CA, É.-U.).

2.4 Licence : Ne s'applique pas.

2.5 Brevet, le cas échéant : Ne s'applique pas.

2.6 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

- Canada : Recherche seulement;
- États-Unis : Recherche seulement;
- Union Européenne : Diagnostic (CE-IVD) et recherche.

2.7 Valeur pondérée : 250.

3 INDICATIONS CLINIQUES, MILIEUX DE PRATIQUE ET MODALITÉS D'ADMINISTRATION

3.1 Patients ciblés

Patients avec cancer colorectal métastatique réfractaires aux chimiothérapies standard, et chez qui un traitement incluant un anti-EGFR²² est envisagé : Erbitux® (cétuximab) ou Vectibix® (panitumumab).

3.2 Description de la maladie visée

Les plus récentes statistiques au Canada montrent que le cancer colorectal (CCR) est le deuxième cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes et le troisième chez les femmes. En effet, pour 2014, on estimait qu'au Québec, le nombre de nouveaux cas de CCR était de 3 600 pour les hommes et de 2 900 pour les femmes, soit 14,8 % et 11,7 % de tous les nouveaux cancers diagnostiqués. Le CCR est également parmi les cancers les plus

²¹ Le principe FRET repose sur la proximité physique entre un fluorophore rapporteur et une molécule qui masque la fluorescence (*quencher*) sur la sonde intacte.

²² EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor receptor*). L'EGFR est un récepteur à tyrosine kinase nécessaire à la croissance et à la différenciation cellulaire. L'EGFR est un proto-oncogène, c'est pourquoi il est la cible de thérapies anticancéreuses.

mortels; on estime qu'en 2014, 2 450 patients sont décédés du CCR au Québec, soit l'équivalent d'environ 12 % de tous les décès par cancer pour la même période [Société canadienne du cancer (SCC), 2014].

Au moment du diagnostic, environ 25 % des patients présentent d'emblée une maladie métastatique, tandis que 50 % des patients bénéficiant d'une chirurgie à visée curative développeront des métastases à distance [Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO), 2011; Sasson et Sigurdson, 2002]. La résection chirurgicale de la tumeur primaire et des métastases hépatiques, lorsque possible, représente une composante du traitement du CCR métastatique (CCRm). Le 5- fluorouracile (5-FU) et le leucovorin (LV) combiné à l'irinotécan (FOLFIRI) ou à l'oxaliplatine (FOLFOX) font partie du traitement standard à visée palliative du CCRm non résécable ou récidivant [Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO), 2011; De Gramont *et al.*, 2000; Cunningham et Glimelius, 1999].

L'EGFR est surexprimé dans environ 80 % des carcinomes colorectaux, faisant de la voie de l'EGF, une cible thérapeutique de choix [Cunningham *et al.*, 2005]. Cette surexpression est entre autres responsable de l'activation du cycle cellulaire, de l'envahissement tumoral et de la stimulation de l'angiogénèse [Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO), 2011; Mendelsohn et Baselga, 2000]. Parmi les molécules développées pour inactiver la voie de l'EGF, on compte les anti-EGFR, cétuximab (Erbix^{MC}, ImClone LLC) et panitumumab (Vectibix^{MC}, Amgen Inc.). Le cétuximab est un anticorps monoclonal chimérique murin/humain qui se lie de façon spécifique à HER1 (*human epidermal growth factor receptor 1*), inhibant la cascade tyrosine kinase afin d'induire l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose [Saridaki *et al.*, 2010]. Le panitumumab est un anticorps monoclonal recombinant entièrement humanisé qui possède le même mode d'action que le cétuximab [Keating, 2010]. Malgré une amélioration marquée de l'arsenal chimiothérapeutique, le taux de survie à 5 ans demeure faible (13 %) pour les formes métastatiques du CCR [American Cancer Society (ACS), 2015].

3.3 Nombre de patients visés : 500 patients par année.

3.4 Spécialités médicales et autres professionnels concernés

Anatomopathologie, hémato-oncologie.

3.5 Modalités d'administration du test

Les spécimens de tumeurs colorectales sur lesquels les investigations moléculaires RAS peuvent être réalisées proviennent d'une biopsie ou d'une résection chirurgicale. Des tissus fraîchement congelés ou fixés et enrobés en paraffine peuvent être utilisés.

4 CONTEXTE TECHNOLOGIQUE

4.1 Nature de la technologie diagnostique

Complémentaire à l'analyse mutationnelle du gène *KRAS*. Actuellement, le *Répertoire* compte 2 codes, soit :

- 20067 (VP = 224) : Mutation du gène *KRAS* (Laboratoire de pathologie moléculaire – HGJ)²³

²³ Le laboratoire désigné utilise une trousse de la compagnie Entrogen Inc. pour détecter les mutations dans les exons 2,3, et 4 du gène *KRAS* (communications électroniques personnelles avec M. George Chong, Ph.D., 19 janvier 2015).

- 60152 (VP = 96) : Détection de mutation par TAAN en temps réel, analyse de fonte en haute résolution et séquençage (Laboratoire d'hématologie-biologie moléculaire – CHUM).

4.2 Brève description de la situation technologique actuelle

Selon la liste des médicaments disponibles en établissement (14 novembre 2014), le cétuximab ou le panitumumab sont indiqués en monothérapie pour le traitement de troisième intention du CCRm exprimant l'EGFR chez les personnes :

- présentant un gène *KRAS* non muté;
- présentant un statut de performance selon l'ECOG de 0 à 2;
- réfractaires aux chimiothérapies à base d'irinotécan et d'oxaliplatine et qui ont reçu un traitement par fluoropyrimidine.

La durée initiale de traitement est de 3 mois. Lors des demandes subséquentes, le médecin doit fournir la preuve d'un effet clinique bénéfique par l'absence de progression de la maladie confirmée par imagerie. Le statut de performance selon l'ECOG doit demeurer de 0 à 2. Les durées de traitement subséquentes sont de 4 mois.

Dépendamment des études, l'évaluation du statut d'un marqueur moléculaire peut s'effectuer de différentes façons. Concernant la mise en évidence de mutations somatiques du gène *KRAS*, et plus précisément les codons 12 et 13 de l'exon 2, l'amplification PCR ciblée suivie d'un séquençage Sanger ou d'un pyroséquençage sont des techniques fréquemment utilisées.

4.3 Brève description des avantages évoqués de la nouvelle technologie

La confirmation de l'absence de mutations somatiques aux codons 12 et 13 du gène *KRAS* est un prérequis pour que les patients aux prises avec un CCR avancé chimioréfractaire puissent bénéficier d'une thérapie avec anti-EGFR [Morton et Hammond, 2009]. Toutefois, le taux de réponse aux anti-EGFR n'est que de 20 % [Sartore-Bianchi *et al.*, 2009]. De nouvelles données cliniques suggèrent que des mutations touchant d'autres molécules de la voie de signalisation dépendante de l'EGFR pourraient être impliquées. Les demandeurs veulent donc tester le statut du gène *NRAS*, en plus du *KRAS*, afin d'exclure un traitement aux anti-EGFR chez des patients porteurs d'une mutation pour l'un ou l'autre des deux gènes.

4.4 Coût de la technologie et des options : Il n'a pas été évalué.

5 DONNÉES PROBANTES

5.1 Pertinence et validité clinique

5.1.1 Remplacement d'un autre test : Non.

5.1.2 Valeurs prédictive et pronostique

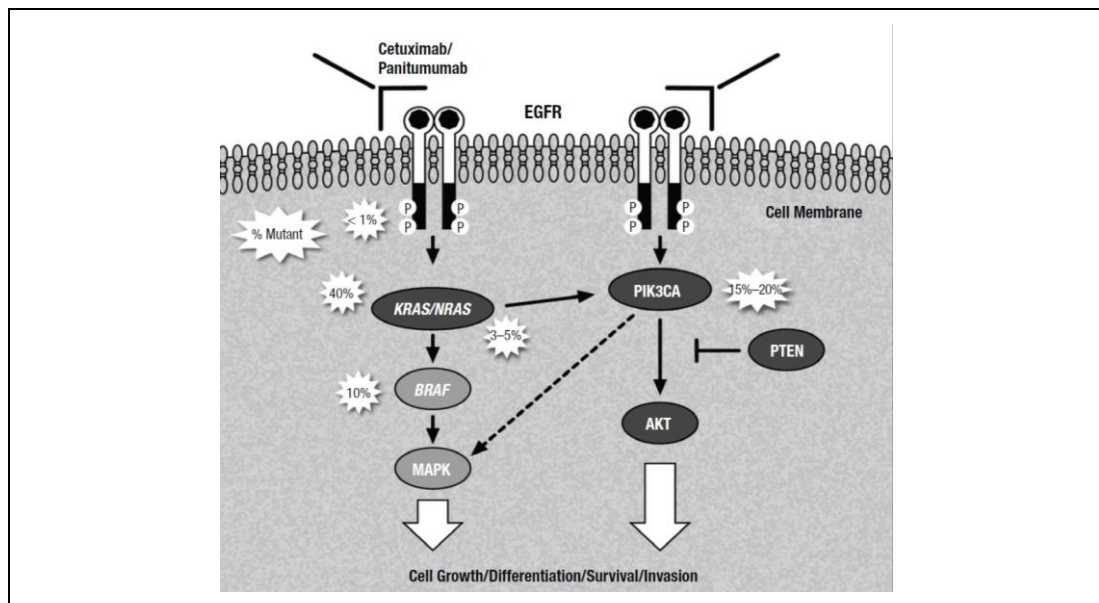
Le génome humain contient trois gènes *RAS* très homologues, mais fonctionnellement distincts (*KRAS*, *NRAS* et *HRAS*). Les protéines RAS sont de petites GTPases impliquées dans un cycle alternant entre un état inactif, liées au GDP, et un état actif, liées au GTP²⁴. L'activation des protéines RAS déclenche un signal intracellulaire qui se propage par de multiples protéines médiatrices qui engendrent la transduction d'un signal de prolifération

²⁴ GDP : guanosine diphosphate; GTP : guanosine triphosphate.

vers le noyau (voir la figure 1). Les résidus de la portion carboxy-terminale des protéines RAS sont hautement divergents, ce qui influence leurs modifications post-traductionnelles et leurs confèrent une spécificité de localisation propre [Schubbert *et al.*, 2007]. Des mutations oncogéniques touchant un des gènes *RAS* se retrouvent dans environ 30 % des cancers humains. La fréquence à laquelle les gènes sont touchés dépend du type tumoral. En effet, *KRAS* est davantage impliqué dans les tumeurs du pancréas, colorectales, de l'endomètre, des voies biliaires, du poumon et du col de l'utérus, alors que pour *NRAS*, des mutations somatiques activatrices sont plus fréquemment retrouvées chez les mélanomes et leucémies myéloïdes [Schubbert *et al.*, 2007].

La fréquence des mutations activatrices *KRAS* et *NRAS* parmi les tumeurs colorectales est différente. En effet, plusieurs études ont démontré que 40 % des CCR arborent des mutations somatiques aux codons 12 et 13 du gène *KRAS*, entraînant ainsi une activation constitutive de la voie des MAP kinases indépendante du récepteur des EGF. Les données issues d'analyses rétrospectives planifiées d'études randomisées de phase III évaluant l'impact du statut *KRAS* sur l'efficacité clinique du cétuximab ou du panitumumab en monothérapie, respectivement combiné aux meilleurs soins de soutien, chez des patients atteints d'un CCR avancé réfractaire, sont présentées au tableau 1 [Amado *et al.*, 2008; Karapetis *et al.*, 2008; Jonker *et al.*, 2007; Van Cutsem *et al.*, 2007].

Figure 1 Fréquences mutationnelles des gènes impliqués dans les voies de signalisation RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT et qui affectent la réponse aux anti-EGFR



Source : De Mattos-Arruda *et al.*, 2011.

Tableau 1 Valeurs prédictive et pronostique du statut KRAS

ÉTUDES	TRAITEMENT (N)	STATUT KRAS (%)	TAUX DE RÉPONSE OBJECTIVE	SURVIE MÉDIANE SANS PROGRESSION	SURVIE GLOBALE MÉDIANE
Karapetis <i>et al.</i> , 2008	Cétuximab vs MSS (198 vs 196)	Non muté (58)	12,8 % vs 0 %	3,7 vs 1,9 mois (HR=0,40; p<0,001)	9,5 vs 4,8 mois (HR=0,55; p<0,001)
		Muté (42)	1,2 % vs 0 %	1,8 vs 1,8 mois (HR=0,99)	4,5 vs 4,6 mois (HR=0,98)
Amado <i>et al.</i> , 2008	Panitumumab vs MSS (208 vs 219)	Non muté (57)	17 % vs 0 %	12,3 vs 7,3 semaines (HR=0,45; p<0,001)	8,1 vs 7,6 mois (HR=0,99)
		Muté (43)	0 % vs 0 %	7,4 vs 7,3 semaines (HR=0,99)	4,9 vs 4,4 mois (HR=1,02)

Adapté de CEPO, 2011.

Abréviations : HR : hazard ratio; N : nombre; MSS : meilleurs soins de soutien.

Concernant les mutations somatiques *NRAS* dans les tumeurs colorectales, les fréquences observées sont beaucoup plus faibles, soit de 3 % à 9,6 %, dépendamment des études. Contrairement à *KRAS* où ce sont les glycines 12 et 13 (G12 et G13) qui sont fréquemment mutées, pour *NRAS*, il s'agit de la glutamine 61 (Q61), située dans l'exon 3, qui est le codon le plus souvent touché [De Roock *et al.*, 2010]. Les mutations *NRAS* et *KRAS* sont mutuellement exclusives. Le tableau 2 présente un résumé des principales études répertoriées. En 2011, Lin et ses collaborateurs ont publié une revue systématique dont l'objectif était d'évaluer le bénéfice clinique potentiel d'une thérapie aux anti-EGFR en fonction du statut moléculaire de gènes autres que *KRAS*, dont *NRAS*. Les auteurs ont repéré une seule étude rétrospective multicentrique de qualité acceptable menée sur des tumeurs de patients atteints d'un CCRm réfractaires aux chimiothérapies standard et ayant reçu le cétuximab combiné à de la chimiothérapie [Lin *et al.*, 2011; De Roock *et al.*, 2010]. Parmi toutes les tumeurs évaluées (n = 649), seulement 82 % (302/370) de celles confirmées non mutées pour *KRAS* avaient des informations à la fois sur le statut *NRAS* et l'issue clinique des patients. Les données de fréquence sont présentées au tableau 2, soit 4,1 % (13/315) des tumeurs non mutées *KRAS* étaient mutées pour *NRAS*. Notons que les patients de l'étude de De Roock 2010 ont reçu des régimes variés de cétuximab.

Tableau 2 Fréquence des mutations NRAS dans les tumeurs colorectales

ÉTUDES	CCR	MÉTHODE	MUTATIONS KRAS N (%)		MUTATIONS NRAS N(%)		
			CODONS 12/13	AUTRES CODONS	GLOBALE	CODONS	NOUVEL AA (N)**
Gasparini <i>et al.</i> , 2014	N = 94 KRAS G12-13 wt (Sanger)	PSQ	12/94 (13)	Q61 : 5 (5) A146 : 5 (5) K117 : 0 (0)	9/94 (9,6)	G12/13 : 3 (3) Q61 : 6 (6)	?
Di Bartolomeo <i>et al.</i> , 2014	N = 28	Sanger	11/23 (48)	0/23 (0)	1/22 (4,5)	G12 : 1 (4,5)	D(1)
Douillard <i>et al.</i> , 2013	N = 641 KRAS G12-13 wt	HRM + Sanger	0/641 (0)	Q61 : 24/638 (3,8) A146 : 28/620 (4,5) K117 : 8/620 (1,3)	48/641 (7,5)	G12 : 17/637 (2,7) G13 : 5/637 (0,8) Q61 : 26/636 (4,1)	D(10) <u>V(3)</u> C(3) <u>A(1)</u> R(5) K(14) R(7) H(3) L(2)
Peeters <i>et al.</i> , 2013	N = 288	PCR ASO + NGS	117/280 (42)	Q61 : 7/284 (2,5)	14/282 (5,0)	G12 : 7 (2,5) G13 : 1 (0,4) Q61 : 6 (2,1)	D(4) S(2) C(1) V(1) K(3) L(2) H(1)
Shen <i>et al.</i> , 2013	N = 676	Sanger	219/674 (32)	Q61 : 14/672 (2,1)	26/621 (4,2)	G12 : 8/630 (1,3) G13 : 3/630 (0,5) Q61 : 13/643 (2)	D(5) <u>V(3)</u> <u>D(2)</u> R(1) R(8) L(2) H(2) K(1)
Vaughn <i>et al.</i> , 2011	N = 2 121	PSQ	900/2121 (42,4)	Q61 : 19/513 (3,7) A146 : 17/513 (3,3)	26/513 (5,1)	G12 : 9 (1,8) G13 : 1 (0,2) Q61 : 16 (3,1)	D(6) C(2) S(1) <u>D(1)</u> K(8) R(5) L(3)
Beadling <i>et al.</i> , 2011	N = 236	Mass Array	78/236 (33 %)	A59 : 1 (0,4) Q61 : 6 (2,5)	8/236 (3,4)	G12 : 4 (1,7) G13 : 1 (0,4) Q61 : 3 (1,3)	D(3) <u>R(1)</u> R(1) K(1) R(2)
Janku <i>et al.</i> , 2011	N = 105	PSQ	49/97 (51)	?	2/31 (6)	?	?
De Roock <i>et al.</i> , 2010	N = 747	Mass Array	271/747* (36)	Q61 : 16/747 (2,1) A146 : 15/747 (2,0)	17/644 (2,6)	G12 : 4 (0,6) G13 : 1 (0,2) Q61 : 12 (1,8)	D(1) C(2) S(1) R(1) K(4) R(4) L(3) H(1)

Abréviations : AA : acide aminé; ASO : allèle spécifique PCR; CCR : cancer colorectal; HRM : high-resolution melting; N : nombre; PCR : polymerase chain reaction; PSQ : pyroséquençage; WT : wild type.

*Les fréquences spécifiques aux codons diffèrent de la fréquence globale car 4 échantillons portaient des mutations multiples : 1X(G12V+G12S), 1X(A146T+Q61L) et 2 p.G12V+p.A146T et 1 échantillon portait une mutation sur le codon 59.

**Les mutations faux-sens soulignées ne sont pas couvertes par la trousse d'EntroGen Inc.

Quelques études ont démontré un bénéfice clinique associé à l'utilisation d'un anti-EGFR chez les patients atteints d'un CCRm et dont le statut mutationnel du gène *NRAS* était négatif. Les données concernant l'ampleur de ces bénéfices cliniques sont présentées au tableau 3.

L'étude PRIME avait pour objectif principal d'évaluer les bénéfices cliniques associés à l'ajout du panitumumab au FOLFOX4 (5-fluoro-uracile, acide folinique et oxaliplatine), en première intention chez 512 patients *KRAS* et *NRAS* non mutés. L'étude a démontré que l'ajout du panitumumab a été associé à une amélioration significative des valeurs médianes de survie sans progression (10,1 versus 7,9 mois) et de survie globale (25,8 versus 20,2 mois). À l'inverse, parmi les 108 cas de statut *RAS* muté, un effet délétère statistiquement significatif a été associé à la prise du panitumumab [Douillard *et al.*, 2013].

L'étude PEAK avait pour objectif principal d'évaluer les bénéfices cliniques associés à l'ajout du panitumumab au FOLFOX6 (5-fluoro-uracile, acide folinique et oxaliplatine) par rapport à l'ajout du bévacizumab au FOLFOX6, en première intention de traitement d'un CCRm. L'étude a démontré que les patients de statut *KRAS* et *NRAS* non muté du groupe avec panitumumab affichait une médiane de survie sans progression significativement plus élevée que celle de l'autre groupe (13,0 versus 9,5 mois). Également en termes de survie globale, les résultats se sont avérés meilleurs chez les patients *RAS* non mutés ayant reçu l'anti-EGFR (médianes de 25,8 versus 20,2 mois), sans toutefois atteindre un seuil statistiquement significatif [Schwartzberg *et al.*, 2014].

L'étude OPUS évaluait l'efficacité clinique du FOLFOX combiné au cétuximab en première ligne de traitement pour un CCRm [Bokemeyer *et al.*, 2011]. Les récents résultats concernant le rôle du statut *RAS* étendu (*KRAS* et *NRAS*) ont démontré que ce dernier était associé à une amélioration significative des valeurs médianes de survie sans progression (12,0 versus 5,8 mois; HR : 0,43; $p = 0,018$) par rapport au groupe ayant reçu le FOLFOX seulement [Tejpar *et al.*, 2014]. Ces nouvelles données représentent un gain de 6,2 mois alors que les résultats initiaux, calculés relativement au statut *KRAS* seul, montraient une amélioration de SSP de 1,1 mois (8,3 versus 7,2 mois; HR : 0,57; $p = 0,0064$) [Bokemeyer *et al.*, 2011].

L'étude CRYSTAL avait pour objectif principal d'évaluer les bénéfices cliniques associés à l'ajout du cétuximab au FOLFIRI (5-fluoro-uracile, acide folinique et irinotécan) par rapport au FOLFIRI seul, en première intention de traitement d'un CCRm. Les plus récentes analyses ont démontré que les patients de statut *KRAS* et *NRAS* non muté du groupe avec panitumumab affichait une médiane de survie sans progression significativement plus élevée que celle de l'autre groupe (11,4 versus 8,4 mois; HR : 0,56; $p = 0,0002$). Également en termes de survie globale, les résultats se sont avérés meilleurs chez les patients *RAS* non mutés ayant reçu l'anti-EGFR (médianes de 28,4 versus 20,2 mois; HR : 0,69; $p = 0,0024$) par rapport au groupe n'ayant reçu que le FOLFIRI [Ciardiello *et al.*, 2014].

Tableau 3 Bénéfice clinique d'un anti-EGFR en fonction du statut *NRAS* chez des patients atteints d'un CCRm

ÉTUDES	N PATIENTS	TRAITEMENT (INTENTION)	TAUX DE RÉPONSE OBJECTIVE	VALEUR PRONOSTIQUE/PRÉDICTIVE
Gasparini <i>et al.</i> , 2014 Rétrospectif	94	P-Mab (2 ^e et +)	Global : 17 % (16/94) Soit 3 patients avec RC dont 1 et 13 avec RP. Parmi ceux-ci, 2 patients avec <i>NRAS</i> Q61 muté (1 RC et 1 RP).	<i>RAS</i> étendu* (WT vs muté) TTP : 7,4 vs 5,2 sem. p = 0,044
Di Bartolomeo <i>et al.</i> , 2014	23	TEGAFOX-E (1 ^{ère})	<i>RAS</i> étendu (WT vs muté) : 64 % (7/11) vs 33 % (4/12) 1 patient <i>NRAS</i> G12D (NR)	<i>RAS</i> étendu (WT vs muté) SSP : 44 vs 9 semaines; HR : 4,7; p = 0,003 SG : 76 vs 54 semaines; HR : 1,5; p = NS
Schwartzberg <i>et al.</i> , 2014 Prospectif	285	FOLFOX6 + P-Mab ou B-Mab (1 ^{ère})	<i>RAS</i> étendu WT : 64 % (56/88) vs 61 % (49/82)	<i>RAS</i> étendu (WT vs muté) SSP : 13 vs 9,5 mois; HR : 0,65; p = 0,029 SG : 41,3 vs 28,9 mois; HR : 0,63; p = NS
Peeters <i>et al.</i> , 2013 Rétrospectif	288	P-Mab vs MSS (2 ^e et +)	<i>NRAS</i> (WT vs muté) : 17 % (22/126) vs 0 % (0/9)	<i>NRAS</i> WT (P-Mab vs MSS) : SSP : HR : 0,39; P < 0,001 <i>NRAS</i> muté (P-Mab + MSS vs MSS) : SSP : HR : 1,94; P = NS
Douillard <i>et al.</i> , 2013 Prospectif-Rétrospectif	656	P-Mab + FOLFOX4 vs FOLFOX4 (1 ^{ère})	Non évalué	<i>RAS</i> étendu WT (P-Mab + FOLFOX4 vs FOLFOX4) : SSP : 10,1 vs 7,9 mo; HR : 0,72; p = 0,004 SG : 25,8 vs 20,2 mo; HR : 0,77; p = 0,009 <i>RAS</i> étendu muté (P-Mab + FOLFOX4 vs FOLFOX4) : SSP : 7,3 vs 8,7 mo; HR : 1,31; p = 0,008 SG : 15,5 vs 18,7 mo; HR : 1,21; p = 0,04
De Roock <i>et al.</i> , 2010 Rétrospectif	649	C-Mab + chimio. (2 ^e et +)	<i>NRAS</i> (muté vs WT) : 7,7 % (1/13) vs 38,1 % (110/289) OR : 0,14; p = 0,013	<i>NRAS</i> (muté vs WT) : SSP : 14 vs 26 semaines; HR : NS SG : 38 vs 50 semaines; HR : NS

Abréviations : ASO : allèle spécifique oligo; B-Mab : bévaccizumab; chimio. : chimiothérapie; C-Mab : cétuximab; HR : hazard ratio; M : masculin; mo : mois; MSS : meilleurs soins de soutien; N : nombre; NGS : next-generation sequencing; NS : non significatif; OR : odds ratio; PCR : polymérase chain reaction; P-Mab : panitumumab; PSQ : pyroséquençage; RC : réponse complète; RP : réponse partielle; SG : survie globale; SSP : survie sans progression; TEGAFOX-E : cétuximab, oxaliplatine et UFT; TTP : time to progression; WT : wild type.

* Le terme « *RAS* étendu » fait référence au regroupement des deux gènes *RAS*, soit *KRAS* et *NRAS*. Les études ayant fourni des données de bénéfices cliniques pour un *RAS* étendu n'ont pas de données propres au statut *NRAS*.

5.2 Validité clinique

Aucune étude réalisée spécifiquement avec la trousse proposée par les demandeurs ou la technologie TaqMan® n'a été répertoriée dans la littérature. Il est donc impossible de déterminer précisément l'ampleur du bénéfice clinique associé à l'identification des mutations NRAS par cette technique. Toutefois, sur la base d'une validité analytique démontrée, il est possible d'extrapoler un bénéfice clinique minimalement équivalent à celui présenté dans la section sur la pertinence clinique et ce, peu importe la technique moléculaire employée.

5.3 Validité analytique (ou technique)

Les données de validité analytique provenant de la compagnie Entrogen Inc. sont présentées ci-dessous. Les performances analytiques de la trousse ont été validées pour les appareils PCR en temps réel suivants : ABI StepOne, 7500 Fast, Qiagen Rotor-Gene® Q et Roche LightCycler 480.

PARAMÈTRE	PRÉSENCE	ABSENCE	SANS OBJET
Répétabilité (<i>accuracy</i>)	X		
Reproductibilité (précision)	X		
Sensibilité analytique (limite de détection)	X		
Spécificité analytique (réactions croisées)	X		
Effet de matrice			X
Concordance	X		
Corrélation entre test et comparateur	X		

Limite de détection

Il est nécessaire d'effectuer la réaction PCR avec approximativement 20 ng d'ADN. Le contrôle interne devrait donner une valeur Ct entre 26 et 31. Une mutation présente dans seulement 1 % des séquences pourrait ne pas être détectée si la valeur Ct du contrôle interne de l'échantillon est supérieure à 31.

Répétabilité

La répétabilité de l'essai a été établie en utilisant des échantillons contrôles conservés en paraffine et synthétiques. Les expériences ont été réalisées à partir de dilutions indépendantes de l'échantillon et de deux lots de réactifs différents. Le tableau 4 présente les valeurs Ct moyennes obtenues sur 18 répétitions en 3 jours.

Tableau 4 Répétabilité de la trousse « NRAS Mutation Analysis Kit » telle que signalée par le fabricant EntroGen Inc.

MUTATION	VALEUR Ct FAM (ÉCART-TYPE)	VALEUR Ct VIC (ÉCART-TYPE)
G12D	26,88 (0,0301)	24,34 (0,0453)
G12S	27,36 (0,0548)	24,24 (0,0895)
G12C	26,97 (0,0429)	24,33 (0,0156)
G13R	27,37 (0,1671)	24,30 (0,0632)
G13V	27,37 (0,121)	24,36 (0,0115)
Q61K	27,47 (0,0325)	24,35 (0,0613)
Q61L	27,87 (0,0815)	24,40 (0,0438)
Q61R	26,74 (0,0632)	24,33 (0,0349)
Q61H	27,24 (0,1354)	24,54 (0,033)
A146T	27,84 (0,8917)	24,35 (0,0158)

Précision (*accuracy*)

La précision de l'essai a été établie à partir de l'ADN isolé de 121 échantillons de tumeurs colorectales conservées dans la paraffine et de 5 lignées cellulaires avec mutations KRAS ou BRAF connues DNA. L'expérience a été répétée 2 fois et les résultats ont été comparés à ceux obtenus par séquençage bidirectionnel du même échantillon. Les résultats sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 Précision de la trousse « NRAS Mutation Analysis Kit » telle que signalée par le fabricant EntroGen Inc.

MUTATION	PCR EN TEMPS RÉEL (N = 121)	SÉQUENÇAGE (N = 121)
Aucune	91	91
G12D	2	2
G12S	1	1
G12C	0	0
G13R	1	1
G13V	1	1
Q61K	10	10
Q61L	2	2
Q61R	13	13
Q61H	0	0
A146T	0	0

Réactivité croisée

Pour déterminer la réactivité croisée des amorces PCR, celles-ci ont été testées sur des contrôles synthétiques dilués à 20 % par la mesure des valeurs Ct sur un appareil ABI 7500 Fast (voir le tableau 6).

Tableau 6 Réactivité croisée des amorces de la trousse « NRAS Mutation Analysis Kit » telle que signalée par le fabricant EntroGen Inc.

Amorce	G12D	G12S	G12C	G13R	G13V	Q61K	Q61L	Q61R	Q61H	A146T
G12D	29,85									
G12S		32,73								
G12C			31,63							
G13R				30,15						
G13V					31,62					
Q61K						32,38				
Q61L							29,85		35,73	
Q61R								33,05		
Q61H									30,9	
A146T										31,29

Note : La réactivité croisée peut différer si l'ADN gabarit a été isolé d'échantillons tumoraux conservés en paraffine.

Limite des blancs

Plusieurs lots de réactifs ont été utilisés au cours d'essais conçus pour évaluer l'ampleur du signal émis en absence d'ADN gabarit (bruit de fonds). Aucun signal en provenance des amorces destinées à l'amplification du gène contrôle ou de NRAS n'a été enregistré.

Les demandeurs²⁵ ont également fourni des données internes de validation. Celles-ci sont présentées en annexe (voir l'annexe B)

5.4 Recommandations d'autres organismes

Le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recommande de tester les statuts de KRAS et de NRAS sur le tissu tumoral des patients avec CCRm. Ceux-ci ne devraient pas être traités avec un anti-EGFR (cétuximab ou panitumumab) [NCCN, 2015].

L'EGAPP (Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention) en 2013 concluait que les preuves entourant l'évaluation du statut NRAS chez les patients atteints d'un cancer colorectal sont insuffisantes relativement aux bénéfices cliniques recherchés d'un traitement avec anti-EGFR [EGAPP, 2013].

Selon l'European Medicines Agency (2014), la détermination du statut NRAS non muté est requise pour un traitement incluant un anti-EGFR (cétuximab et panitumumab)²⁶.

²⁵ Transmis à l'INESSS par M. George Chong, Ph. D., 27 janvier 2015.

La Federación de Sociedades Españolas de Oncología (FESEO, 2014) recommande de tester les statuts de KRAS et de NRAS parmi les patients atteints d'un CCRm chez qui un traitement aux anti-EGFR est envisagé. Seuls les patients dont ces 2 gènes ne portent pas de mutations devraient recevoir le traitement [Garcia-Alfonso *et al.*, 2015].

6 RÉPERCUSSIONS POSSIBLES DE L'INTRODUCTION DE L'ANALYSE

6.1 Effet sur les ressources matérielles et humaines

Considérant l'introduction potentielle de ce test au *Répertoire*, davantage d'échantillons tumoraux à tester seraient à prévoir. À titre indicatif, pour 2013-2014, le KRAS a été testé à 677 reprises par le code 20067 et à 342 reprises par le code 60152²⁷. Étant donné que 60 % des échantillons tumoraux sont déclarés non mutés pour le KRAS, ceux-ci pourraient être testés NRAS.

6.2 Conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de la santé et des services sociaux québécois

Une étude sur les conséquences économiques montre que l'évaluation du statut RAS étendu (KRAS et NRAS exons 2, 3 and 4) a un coût très faible par rapport aux économies réalisées en ne traitant pas les 18 % de patients porteurs des mutations RAS (sans compter KRAS exon 2) avec une thérapie anti-EGFR (aussi bien Erbitux et Vectibix) [Kircher *et al.*, 2015], ce qui pourrait se traduire par des économies substantielles pour le système de santé québécois.

6.3 Principaux enjeux organisationnels, éthiques ou autres (social, juridique, politique)

Actuellement, au Québec, les critères d'admissibilité à un traitement aux anti-EGFR pour un CCR avancé ne prennent en considération que le statut KRAS non muté (aucun codon spécifié) [Régie de l'assurance maladie du Québec (RAMQ), 2014].

7 EN BREF

7.1 Pertinence clinique

Les personnes atteintes d'un cancer colorectal métastatique réfractaire à la chimiothérapie standard peuvent bénéficier d'une thérapie ciblée anti-EGFR. Il a été démontré que les 40 % des patients dont la tumeur est KRAS mutée (exon 2) n'ont aucun bénéfice clinique associé à la prise d'un traitement. Toutefois, la voie de signalisation dépendante de l'EGFR implique d'autres molécules effectrices, dont la protéine NRAS, hautement homologue à KRAS. Environ 5 % des personnes atteintes d'un CCRm, arborent des mutations somatiques dans le gène NRAS, ce qui expliquerait l'absence de bénéfices cliniques associés à la prise d'un anti-EGFR chez ceux-ci, et ce, même dans un contexte où le gène KRAS est non muté.

7.2 Validité clinique

Très peu d'études ont fourni des données de bénéfices cliniques uniquement pour le statut du gène NRAS. Des études rétrospectives ont montré qu'une thérapie incluant un anti-EGFR

²⁶ European Medicines Agency. Erbitux, cetuximab [Product information]. Disponible à : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf ; Vectibix, panitumumab [Product information]. Disponible à : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000741/WC500047710.pdf.

²⁷ Communications électroniques personnelles avec Mme Johanne Nicole du MSSS, 19 janvier 2014.

chez des patients de statut mutationnel RAS étendu négatif, c'est-à-dire *KRAS* et *NRAS* (exons 2, 3 et 4) non mutés, est associé à un bénéfice clinique significatif en termes de réponse tumorale objective, de survie sans progression et de survie globale. Cependant, quelques cas issus des cohortes *KRAS* négatif et *NRAS* positif semblent avoir bénéficié d'une thérapie ciblée anti-EGFR. Certaines études ont montré un effet délétère associé à la prise des médicaments cétuximab ou panitumumab chez des patients de statut RAS muté.

7.3 Validité analytique

Les données de validation technique présentées par le fabricant ont respecté les normes de l'Union Européenne (CE-IVD). Sur la base des données fournies par le demandeur, il semble que la trousse respecte exigences en matière de robustesse analytique.

7.4 Recommandations d'autres organismes

Dépendamment des pays, le statut mutationnel de *NRAS*, en plus de celui de *KRAS*, est considéré ou non relativement à l'accès aux thérapies ciblées anti-EGFR pour des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique.

8 AVIS EN BREF DE L'INESSS

Recherche de mutations ciblées du gène *NRAS* dans les tumeurs colorectales métastatiques

Le statut de la technologie diagnostique

- ☐ Établie
- ☒ Innovatrice
- ☐ Expérimentale (pour la recherche uniquement)
- ☐ Remplacement de la technologie _____ qui devient obsolète

La recommandation de l'INESSS

- ☐ Avis de recommandation d'introduction (voir commentaires additionnels)
- ☐ Avis de refus d'introduction
- ☒ Avis de réévaluation lorsque de nouvelles données probantes seront disponibles sur l'utilité clinique de cette analyse. Les connaissances sur ce sujet évoluent très rapidement et davantage de données pourraient être disponibles à court terme.

Recommandation additionnelle

- ☐ Lien à faire avec l'inscription de médicaments, si test compagnon
- ☐ Décision de production d'un guide d'usage optimal
- ☐ Production d'indicateurs dans le cas d'un besoin de vigilance

RÉFÉRENCES

- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(10):1626-34.
- American Cancer Society (ACS). Cancer facts and figures 2015. Atlanta, GA : ACS; 2015. Disponible à : <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>.
- Beadling C, Heinrich MC, Warrick A, Forbes EM, Nelson D, Justusson E, et al. Multiplex mutation screening by mass spectrometry evaluation of 820 cases from a personalized cancer medicine registry. *J Mol Diagn* 2011;13(5):504-13.
- Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zubel A, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: The OPUS study. *Ann Oncol* 2011;22(7):1535-46.
- Ciardiello F, Lenz HJ, Kohne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezinek I, et al. Treatment outcome according to tumor RAS mutation status in CRYSTAL study patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) randomized to FOLFIRI with/without cetuximab. *J Clin Oncol* 2014;32(15 Suppl):abstract 3506.
- Comité de l'évolution des pratiques en oncologie (CEPO). Utilisation des anticorps monoclonaux de la classe des anti-EGFR pour le traitement de troisième intention ou plus du cancer colorectal métastatique. Québec, Qc : Direction québécoise du cancer; 2011. Disponible à : <http://collections.banq.qc.ca/ark:/52327/2064810>.
- Cunningham D et Glimelius B. A phase III study of irinotecan (CPT-11) versus best supportive care in patients with metastatic colorectal cancer who have failed 5-fluorouracil therapy. V301 Study Group. *Semin Oncol* 1999;26(1 Suppl 5):6-12.
- Cunningham MP, Essapen S, Thomas H, Green M, Lovell DP, Topham C, et al. Coexpression, prognostic significance and predictive value of EGFR, EGFRvIII and phosphorylated EGFR in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2005;27(2):317-25.
- De Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000;18(16):2938-47.
- De Kok JB, Wiegerinck ET, Giesendorf BA, Swinkels DW. Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotides (MGB probes). *Hum Mutat* 2002;19(5):554-9.
- De Mattos-Arruda L, Dienstmann R, Tabernero J. Development of molecular biomarkers in individualized treatment of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2011;10(4):279-89.

- De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010;11(8):753-62.
- Di Bartolomeo M, Pietrantonio F, Perrone F, Dotti KF, Lampis A, Bertan C, et al. Lack of KRAS, NRAS, BRAF and TP53 mutations improves outcome of elderly metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab, oxaliplatin and UFT. *Target Oncol* 2014;9(2):155-62.
- Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013;369(11):1023-34.
- Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention Working Group (EGAPP). Recommendations from the EGAPP Working Group: Can testing of tumor tissue for mutations in EGFR pathway downstream effector genes in patients with metastatic colorectal cancer improve health outcomes by guiding decisions regarding anti-EGFR therapy? *Genet Med* 2013;15(7):517-27.
- Garcia-Alfonso P, Garcia-Foncillas J, Salazar R, Perez-Segura P, Garcia-Carbonero R, Musulen-Palet E, et al. Updated guidelines for biomarker testing in colorectal carcinoma: A national consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol* 2015;17(4):264-73.
- Gasparini G, Buttitta F, D'Andrea MR, Tumolo S, Buonadonna A, Pavese I, et al. Optimizing single agent panitumumab therapy in pre-treated advanced colorectal cancer. *Neoplasia* 2014;16(9):751-6.
- Janku F, Lee JJ, Tsimberidou AM, Hong DS, Naing A, Falchook GS, et al. PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers. *PLoS One* 2011;6(7):e22769.
- Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007;357(20):2040-8.
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008;359(17):1757-65.
- Keating GM. Panitumumab: A review of its use in metastatic colorectal cancer. *Drugs* 2010;70(8):1059-78.
- Kircher SM, Mohindra N, Nimeiri H. Cost estimates and economic implications of expanded RAS testing in metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 2015;20(1):14-8.
- Lin JS, Webber EM, Senger CA, Holmes RS, Whitlock EP. Systematic review of pharmacogenetic testing for predicting clinical benefit to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Am J Cancer Res* 2011;1(5):650-62.
- Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999;14(5-6):143-9.

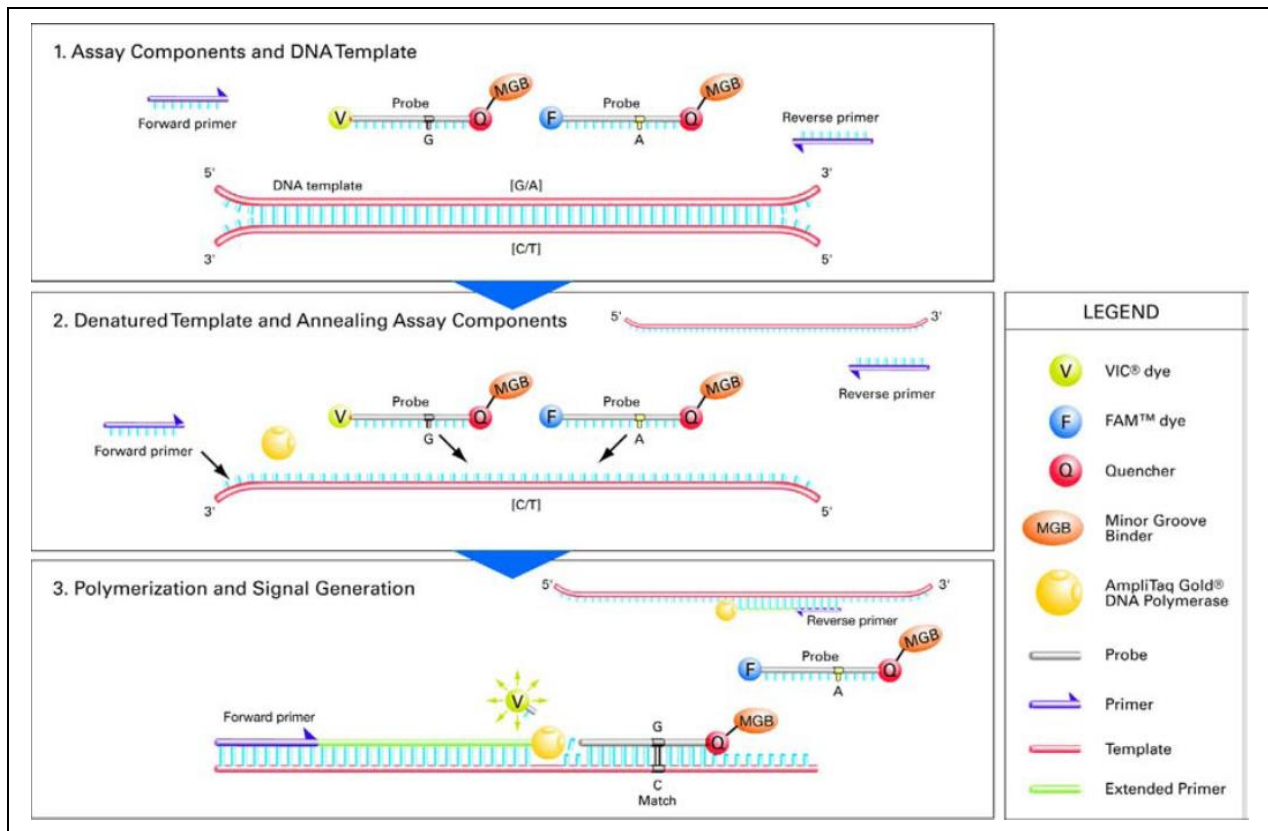
- Mendelsohn J et Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000;19(56):6550-65.
- Morton RF et Hammond EH. ASCO Provisional Clinical Opinion: KRAS, cetuximab, and panitumumab—Clinical implications in colorectal cancer. *J Oncol Pract* 2009;5(2):71-2.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical practice guidelines in oncology. Colon cancer. Version 2.2015. Fort Washington, PA : NCCN; 2015. Disponible à : http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.
- Peeters M, Oliner KS, Parker A, Siena S, Van Cutsem E, Huang J, et al. Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(7):1902-12.
- Régie de l'assurance maladie du Québec (RAMQ). Liste des médicaments - Établissements. Québec, Qc : RAMQ; 2014. Disponible à : <http://collections.banq.qc.ca/ark:/52327/bs2425039>.
- Saridaki Z, Georgoulas V, Souglakos J. Mechanisms of resistance to anti-EGFR monoclonal antibody treatment in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2010;16(10):1177-87.
- Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, Molinari F, De Dosso S, Saletti P, et al. Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PLoS One* 2009;4(10):e7287.
- Sasson AR et Sigurdson ER. Surgical treatment of liver metastases. *Semin Oncol* 2002;29(2):107-18.
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7(4):295-308.
- Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, et al. PEAK: A randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(21):2240-7.
- Shen Y, Wang J, Han X, Yang H, Wang S, Lin D, Shi Y. Effectors of epidermal growth factor receptor pathway: the genetic profiling of KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS mutations in colorectal cancer characteristics and personalized medicine. *PLoS One* 2013;8(12):e81628.
- Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques canadiennes sur le cancer 2014. Toronto, ON : SCC; 2014. Disponible à : <http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canada%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2014-FR.pdf>.
- Tejpar S, Lenz HJ, Kohne CH, Heinemann V, Ciardiello F, Esser R, et al. Effect of KRAS and NRAS mutations on treatment outcomes in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated first-line with cetuximab plus FOLFOX4: New results from the OPUS study. *J Clin Oncol* 2014;32(Suppl 3):abstract LBA444.

Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(13):1658-64.

Vaughn CP, Zobel SD, Furtado LV, Baker CL, Samowitz WS. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50(5):307-12.

ANNEXE A

Essai TaqMan®



Tiré de TaqMan® Life Technologies. TaqMan® SNP genotyping Assays. Product Bulletin. Disponible à : https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_040597.pdf.

ANNEXE B

Données internes de validation (Hôpital général juif)

Accuracy

Test name	Mutation Analysis of Exons 2,3, and 4 of the <i>N-Ras</i> Oncogene
Aims	To compare samples with and without mutations by 2 different methods, namely High Resolution Melting (HRM) and the Entrogen N-RAS kit.
Samples	32 previously tested BRAF negative samples were screened by HRM to look for N-Ras mutation positive samples.
Methodology	Positive samples are sequenced for confirmation and characterization. These positive samples and some negative samples, identified by HRM are then tested using the Entrogen N-Ras kit.
Experimental results	One exon 2 mutation was found: G12D. Two exon 3 mutations were found: 2x Q61R. No exon 4 mutation was found by HRM. All 3 mutations were detected by the Entrogen kit. All negative samples tested negative by the Entrogen kit.
Interpretation	The Entrogen kit can accurately identify positive and negative samples.
Outcome/limitations	- There is still the need to validate accuracy for the detection of all 10 mutations detectable by the Entrogen kit. Due to the rarity of some mutations and non-availability of commercial standards, this is an on-going process and both HRM and the Entrogen kit are run in parallel. - Standards from Horizon Dx will be used to complete accuracy validation as they become available commercially.

Limit of detection

Test name	Mutation Analysis of Exons 2,3, and 4 of the <i>N-Ras</i> Oncogene
Aims	To determine the limit of detection (LOD) of the Entrogen N-Ras kit for the exon 3 mutation Q61K
Samples	Q61K Standard from Horizon Diagnostics (Cambridge, UK) at dilutions of 5%, 1% and 0.5%.
Methodology	Dilute 5% Stock Standard with 100% WT DNA. 5% ----- use undiluted 1% ----- 2uL 5% Q61K + 8uL WT 0.5% ----- 1uL 5% Q61K + 9uL WT
Experimental results	Refer to Table 1.
Interpretation	LOD established at 1% at a Ct value of <40 on the Roche LC 480.

Ct values of the 3 dilutions of Q61K for 4 test runs

	Q61K 5%	Q61K 1%	Q61K 0.5%
Run #1 VIC	28.63	28.58	28.67
Run #2 VIC	28.48	28.48	28.69
Run #3 VIC	28.57	28.61	28.73
Run #4 VIC	28.63	28.48	28.73
Run #1 FAM Pos Ctrl 27.74	35.79	39.40	43.03
Run #2 FAM Pos Ctrl 27.22	37.45	40.20	40.74
Run #3 FAM Pos Ctrl 27.61	36.22	38.73	39.75
Run #4 FAM Pos Ctrl 27.69	34.91	38.84	39.50
Mean	36.09	39.29	40.76