

Možnosti precizní medicíny v klinické praxi onkologa

Stanislav John

Ústav lékařské biologie a genetiky, LF UK v Hradci Králové

Klinika onkologie a radioterapie, FN Hradec Králové

Náročnost onkologické léčby vede ke snaze o její vysokou individualizaci a racionální využívání. Pokročilé molekulární analýzy nádorové i nenádorové tkáně se přitom využívají stále častěji a měly by nám pomoci této individualizaci dosáhnout. Zejména s ohledem na nově zaváděné léčivé prostředky v podobě cílené léčby a imunoterapie jsou některé druhy molekulárních testů přímo vyžadovány. Někdy můžeme testovat i nad rámec běžných povinností a přinést další varianty do léčebného algoritmu onkologického pacienta. Jaké jsou tedy možnosti molekulárních analýz v ambulancích klinických onkologů v České republice?

Klíčová slova: precizní onkologie, cílená léčba, prediktivní vyšetření, sekvenování.

Options of precision medicine in clinical oncological practice

The complexity of oncological treatment has resulted in an effort towards high individualization and rational use. Indeed, advanced molecular analyses of tumour and non-tumour tissues are being used more increasingly and should help us achieve this individualization. Particularly in terms of newly introduced medicinal products in the form of targeted (biological) therapy and immunotherapy, some types of molecular test are even required. Sometimes, we can perform testing above and beyond our normal obligations and bring additional variants in the treatment algorithm of a cancer patient. So, what are the options of molecular analyses in clinical oncological practice in the Czech Republic

Key words: precision oncology, targeted therapy, predictive testing, sequencing.

Úvod

Poznání molekulární podstaty obrovské heterogenity tumorů je zásadní k upřesnění diagnózy, prognózy a individualizaci terapie a formuje tak koncept precizní onkologie jako takové. Přechod lidského genomu a jeho následná analýza ruku v ruce s rozvojem pokročilých a často multiparalelních sekvenčních metod nové generace (NGS) nám v tomto snažení pomáhá a zpřesňuje tradiční morfologické a imunohistochemické techniky. K posunu od sledování změn na úrovni proteinů směrem k testování a určení významu DNA se dále přidávají i epigenetické změny DNA či zkoumání malých nekódujících molekul RNA. Opravdovou

výzvu však představuje rozluštění a pochopení všech jejich vzájemných interakcí.

Vzhledem k propojení základního výzkumu s farmaceutickým průmyslem a následnou onkologickou léčbou se rychlost, ale též nároky na molekulární diagnostiku, neuvěřitelně zvýšily. S tím kupříkladu neoddelitelně souvisí i zlevňování masově používaných analytických metod, jako právě NGS, variací polymerázové řetězové reakce, čipů a jiných. Společným rysem pokročilých metod k detekci molekulárních změn je rychlost vyšetřování velkého množství vzorků a/nebo velkého množství cílových sekvencí (mutací) najednou, stejně tak epigenetických změn (např. metylace) nebo celogenomového sekvenování.

Povinné testování

Uplynulo již 22 let od schválení použití trastuzumabu v léčbě pokročilého tumoru prsu. Jednalo se o první indikaci, která byla vázána na specifický molekulární test nádorové tkáně, v tomto případě zvýšenou expresi *HER2* genu (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) (1). Trastuzumab získal obdobné schválení při terapii tumorů žaludku a zkoumá se jeho použití i u jiných typů nádorů s vysokou expresí genu *HER2* (2, 3). Hledání dalších molekulárních markerů účinnosti léčby vyústilo v povinné či doporučené testování i u jiných diagnóz. V současné době se nově schvalovaná protinádorová terapie většinou vůbec neobejde bez patřičné-

ho molekulárního testu, k němuž by se vázalo její použití.

V ČR je relevance testů nádorové tkáně spjata pouze s akreditovanými laboratořemi, v indikovaných případech je plně hrazeno plátcem péče. Další způsobem je testování nad běžný rámec, případně využití akademických studií a dalších sponzorovaných programů. Poslední možností je komerčním testováním.

Mezi nepodkořitelné minimum v klinické praxi se dostalo vyšetření výše jmenovaného genu/proteinu HER2 (v prvním stupni imunohistochemicky, dále dle výsledku *in situ* hybridizace) tumorů prsu a též žaludku před indikací anti-HER2 léčby. Též u triple-negativního tumoru prsu musí být vyšetřena pozitivita PD-L1 před použitím imunoterapie. U nemalobuněčného plicního karcinomu by se měly vyšetřovat aktivační mutace *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) s určitou možností využití i tekutých biopsií; fúze ROS (ROS Proto-oncogene 1) a přestavby *ALK* (Anaplastic Lymphoma Receptor Tyrosine Kinase) při zvažované léčbě tyrozinkinázovými inhibitory či imunohistochemické vyšetření PD-L1 (Programmed Death-ligand 1) před eventuální imunoterapií v první linii léčby. Dále u kolorektálního karcinomu (CRC) se zjišťují aktivační mutace *KRAS* (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog) a *NRAS* (Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog) před léčbou EGFR inhibitory. Maligní melanomy jsou testovány na přítomnost mutace V600E genu *BRAF* (Murine Sarcoma Viral V-Raf Oncogene Homolog B1) před použitím BRAF inhibitorů. Došetření přítomnosti somatické či zárodečné mutace *BRCA1* a 2 (Breast Cancer Type 1/2 Susceptibility Protein) je nutné u tumorů vaječníku před léčbou inhibitory PARP (Poly-ADP-ribose Polymerase).

Molekulární analýzy nad rámec běžné klinické praxe

Řada molekulárních vyšetření je doporučována buď k upřesnění diagnózy, prognózy nebo rozšíření léčby nad garantované možnosti.

Patří k nim vyšetření genové amplifikace *CCND1* (Cyclin D1) u hormonálně dependentních tumorů prsu k preferenční léčbě inhibitory aromatázy, amplifikace genu *TOP2A* u HER2 pozitivních tumorů prsu před léčbou antracykliny a trastuzumabem (prokázaná odpověď) (4, 5). Vyšetření mutace V600E genu *BRAF* kolorektálního karcinomu je negativně prognostické a nejspíše i nega-

tivně prediktivní pro léčbu chemoterapií, na jejím základě je ale možné zažádat plátce o úhradu kombinované léčby EGFR inhibitoru + BRAF inhibitoru (6). Mikrosatelitová nestabilita (MSI) či proteinová mismatch-repair insuficience MMR nám pomáhá nejen s určením nulového benefitu adjuvantní chemoterapie na bázi 5FU u stadia II, ale též bychom měli u takovýchto pacientů s generalizovaným CRC zvážit imunoterapii (pembrolizumab, nivolumab; vázáno opět na žádost o schválení úhrady) (7, 8). Dalšími kandidáty na specifické vyšetření, které může mít důsledky v odpovídající léčbě malé podskupiny pacientů s metastatickým CRC, je amplifikace *HER2* (9). Stejně jako u kolorektálního karcinomu je pro BRAF mutované pacienty s neskvamózním tumorem plicí následně možné žádat o úhradu kombinované léčby BRAF inhibitoru tentokrát ale s MEK inhibitorem. Před léčbou gastrointestinálních stromálních tumorů (GIST) se doporučuje doplnit mutační profil genu *c-KIT* (V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog) a *PDGFRA* (Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha), které mají v tomto případě prediktivní význam pro léčbu imatinibem (10). Zárodečná nebo somatická mutace tumor-supresorových genů *BRCA1/2* se až v 5 % vyskytuje u pacientů s pankreatickým duktálním adenokarcinomem. Vzhledem k velmi špatné prognóze a malé účinnosti standardní chemoterapie může léčba PARP inhibitorem (olaparib) přinést další benefit (11). Souhlas s testováním somatických mutací u těchto pacientů byl recentně vydán po dohodě mezi Českou onkologickou společností, Společností českých patologů a Všeobecnou zdravotní pojišťovnou.

Některé molekulární znaky mohou mít prediktivní význam napříč různými typy nádorů. Patří k nim fúze genu *NTRK* (Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase) před léčbou příslušnými inhibitory (v ČR se jedná o larotrectinib; specifický léčebný program byl právě ukončen a entrectinib, specifický léčebný program probíhá). V největší míře by se měla fúze *NTRK* vyskytovat u karcinomu slinných žláz či sekrečního adenokarcinomu prsu, ale prokázán byl i u dalších solidních nádorů (12).

Obdobně léčba imunoterapií (nivolumab, pembrolizumab) u jiných než indikovaných diagnóz dle patřičné vyhlášky, by měla být účinnější při prokázané MSI či MMR insuficienci, dále též pomáhá vyšetření celkové mutační nálože nádoru (TMB) (13).

Tumor-specifické polygenní testy můžeme využít k určení rizika rekurence příslušného nádoru a naplánovat dle tohoto výsledku i adekvátně radikální léčbu. Týká se to zejména tumorů prsu, kde testy OncotypeDx a MammaPrint prokázaly benefit i v prospektivních studiích (14, 15). Indikace je zatím omezena pro rozhodnutí o adjuvantní léčbě hormon-pozitivních tumorů po splnění dalších dílčích podmínek, případně se žádá o úhradu testu plátcem péče.

Genetické testování

Výzkum nenádorové („zdravé“) tkáně z hlediska možných predispozic ke vzniku tumorů představuje další cestu ke zlepšení výsledků (ne) onkologické péče a léčby. Hereditární nádorové syndromy zahrnují oproti sporadickému výskytu jen malou část populace onkologických pacientů, avšak zastoupení se liší mezi jednotlivými diagnózami. Klinicky jsou hereditární nádorové syndromy kromě rodinného výskytu charakterizovány dřívějším vznikem nádorů či duplicitními až multiplicitními tumory. Včasné odhalení nádorové predispozice a vyjádření reálného rizika ke vzniku tumoru dovoluje potom takové jedince dále důkladněji sledovat a případně přistoupit i k některým preventivním opatřením (mastektomie, hysterektomie, kolektomie).

Veškeré molekulární analýzy včetně sdělení výsledků pokrevním příbuzným jsou ale možné pouze se souhlasem konkrétní osoby.

Genetické vyšetření se zaměřuje v první době na anamnézu probanda, historii nádorových onemocnění v rodině a dále na jeho osobní anamnézu. Z tohoto pohovoru a dostupných klinických dat je vyjádřeno riziko a eventuálně přistoupeno k molekulární analýze – většinou bílých krvinek. Nevýšetřují se jednotlivé mutace samostatně, ale jsou vytvořeny celé analytické panely, které nejlépe odpovídají zastoupení mutací v dané populaci. V České republice tomu odpovídá panel CZE CANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) obsahující přes 200 genů spojených s predispozicí k nádorovému onemocnění (16).

Některé hereditární syndromy jsou podmíněny polygenně, a proto nelze v řadě případů riziko zdravým jedincům vyjádřit (17).

Komerční testování

Stejně jako při standardním genetickém či genomickém testování se ke komerčním testům více využívají celé panely genů než jejich

jednotlivé mutace. Toto řešení je velmi efektivní a vzhledem k vyšší dostupnosti moderního přístrojového vybavení se vyplatí časově, ekonomicky a též tím maximálně využijeme často omezené množství nádorové tkáně.

I v podmínkách České republiky se dá využít komerčního testování. Tato vyšetření jsou nabízena různými subjekty, často v návaznosti na další výzkum. Jedná se o testy, které může využít i sám pacient a test si objednat. Existuje zde ale riziko, že nabízená schémata testovaných molekulárních změn budou obsahovat geny, u kterých není přínos dostatečně prokázán s odpovídajícími důsledky pro pacienta.

Prvními projekty, které prokázaly svoji účinnost napříč celému spektru solidních tumorů byly FoundationOne CDx a MSK-IMPACT (18, 19). Oba testy jsou schváleny americkým hlavním regulátorem FDA (Food and Drug Administration). První jmenovaný je dostupný i v České republice, hodnotí více než 300 různých genů z parafinových bločků nádorové tkáně a dokáže stanovit MSI a TMB. Dále lze využít službu Foundation One Liquid, která využívá zatím menší diagnostický panel, ale toto vyšetření se provádí

z periferní krve pacienta při nemožnosti zajištění dostatečného množství nádorové tkáně. Poslední službou je Foundation One Heme, která je vhodná zejména pro hematologické malignity a sarkomy. Součástí zprávy je vždy popis nalezených molekulárních změn s návrhem terapie či dostupného vhodného klinického hodnocení.

Indikace genomických testů nad rámec běžné péče

Rozhodnutí o genomickém testování nad rámec běžné péče je většinou v gesci ošetřujícího onkologa. Na širší možnosti molekulární diagnostiky s navazující onkologickou léčbou reagovala řada větších zdravotnických zařízení ustanovením celých poradních týmů, tzv. molekulárních tumour boards. V těchto týmech by měl být zastoupen kromě zmíněného onkologa též klinický genetik, patolog, molekulární patolog nebo biolog. Jejich úkolem je správná indikace genomických vyšetření tumorů a následná léčba pacientů podle zjištěných výsledků. Například odlišení klíčových „driver“ mutací od méně důležitých „passenger“ mutací, u kterých by bylo použití specifické léčby neúčinné.

Bohužel, stále nelze takto komplexně testovat všechny pacienty, mezinárodní zkušenosti doporučují vyšetřovat vzácnější typy nádorů, nádory neznámého primárního zdroje či pacienty v dobrém stavu nereagujícími na standardní onkologickou léčbu (20).

Závěr

Molekulární analýzy tumorů a indikace příslušné individualizované terapie jsou bez diskuse budoucností celé onkologie. Na tento trend reagují i zadavatelé klinických hodnocení, ve větším míře se objevují studie léčivých přípravků pro více typu tumorů, najednou charakterizovaných určitou molekulární změnou (tzv. basket studie). Genomické a genetické testování představuje v současné době nejvyšší stupeň v cestě za precizní onkologií.

* dostupnost testování, možnosti různých laboratoří i úhrady léčivých přípravků se mohou rychle měnit

*Podpořeno MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906)
a Podpořeno programem PROGRES Q40/2.*

LITERATURA

- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 2001; 344(11): 783–792.
- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, 2010; 376(9742): 687–697.
- Cruz E, Kayser V. Monoclonal antibody therapy of solid tumors: clinical limitations and novel strategies to enhance treatment efficacy. *Biologics*, 2019; 13: 33–51.
- Fountzilas G, Dafni U, Bobos M, Kotoula V, et al. Evaluation of the prognostic role of centromere 17 gain and HER2/topoisomerase II alpha gene status and protein expression in patients with breast cancer treated with anthracycline-containing adjuvant chemotherapy: pooled analysis of two HelLENic Cooperative Oncology Group (HeCOG) phase III trials. *BMC Cancer*, 2013; 13: 163.
- Mills JN, Rutkovsky AC, Giordano A. Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*, 2018; 41: 59–65.
- Ducruex M, Chamseddine A, Laurent-Puig P, Smolenski C, et al. Molecular targeted therapy of BRAF-mutant colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol*, 2019; 11: 1758835919856494.
- Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, Perret GY, et al. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer*, 2009; 45(10): 1890–1896.
- Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019; 16(6): 361–375.

- Siena S, Sartore-Bianchi A, Marsoni S, Hurwitz, et al. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) oncogene in colorectal cancer. *Ann Oncol*, 2018; 29(5): 1108–1119.
- Oppelt P J, Hirbe AC, Van Tine BA. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): point mutations matter in management, a review. *J Gastrointest Oncol*, 2017; 8(3): 466–473.
- Zhu H, Wei M, Xu J, Hua J, et al. PARP inhibitors in pancreatic cancer: molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Cancer*, 2020; 19(1): 49.
- Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018; 15(12): 731–747.
- Pham TV, Boichard A, Goodman A, Riviere P, et al. Role of ultraviolet mutational signature versus tumor mutation burden in predicting response to immunotherapy. *Mol Oncol*, 2020; 14(8): 1680–1694.
- Cardoso F, Van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med*, 2016; 375(8): 717–729.
- Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*, 2018; 379(2): 111–121.
- Soukupova J, Zemankova P, Lhotova K, Janatova M, et al. Validation of CZECA (CZEch Cancer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS One*, 2018; 13(4): e0195761.
- Laduca H, Stuenkel AJ, Dolinsky JS, Keiles S, et al. Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients. *Genet Med*, 2014; 16(11): 830–837.
- Dhir M, Choudry HA, Holtzman MP, Pingpank JF, et al. Impact of genomic profiling on the treatment and outcomes of patients with advanced gastrointestinal malignancies. *Cancer Med*, 2017; 6(1): 195–206.

- Cheng DT, Prasad M, Chekaluk Y, Benayed R, et al. Comprehensive detection of germline variants by MSK-IMPACT, a clinical diagnostic platform for solid tumor molecular oncology and concurrent cancer predisposition testing. *BMC Med Genomics*, 2017; 10(1): 33.
- Kurnit KC, Dumbrava EE, Litzenburger B, Khotskaya YB, et al. Precision Oncology Decision Support: Current Approaches and Strategies for the Future. *Clin Cancer Res*, 2018; 24(12): 2719–2731.
- Modrá kniha České onkologické společnosti. Edition ed.: Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, www.mou.cz, 2020. ISBN 978–80–86793–49–8.
- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*, 2010; 376(9742): 687–697.
- Cardoso F, Van't veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med*, 2016; 375(8): 717–729.
- Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018; 15(12): 731–747.
- Cruz E, Kayser V. Monoclonal antibody therapy of solid tumors: clinical limitations and novel strategies to enhance treatment efficacy. *Biologics*, 2019; 13: 33–51.
- Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, Perret GY, et al. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer*, 2009; 45(10): 1890–1896.
- Dhir M, Choudry HA, Holtzman MP, Pingpank JF, et al. Impact of genomic profiling on the treatment and outcomes of patients with advanced gastrointestinal malignancies. *Cancer Med*, 2017; 6(1): 195–206.

28. Ducreux M, Chamseddine A, Laurent-Puig P, Smolenski C, et al. Molecular targeted therapy of BRAF-mutant colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol*, 2019; 11: 1758835919856494.
29. Fountzilas G, Dafni U, Bobos M, Kotoula V, et al. Evaluation of the prognostic role of centromere 17 gain and HER2/topoisomerase II alpha gene status and protein expression in patients with breast cancer treated with anthracycline-containing adjuvant chemotherapy: pooled analysis of two Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) phase III trials. *BMC Cancer*, 2013; 13: 163.
30. Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019; 16(6): 361–375.
31. Cheng DT, Prasad M, Chekaluk Y, Benayed R, et al. Comprehensive detection of germline variants by MSK-IMPACT, a clinical diagnostic platform for solid tumor molecular oncology and concurrent cancer predisposition testing. *BMC Med Genomics*, 2017; 10(1): 33.
32. Kurnit KC, Dumbrava EEI, Litzenburger B, Khotskaya YB, et al. Precision Oncology Decision Support: Current Approaches and Strategies for the Future. *Clin Cancer Res*, 2018; 24(12): 2719–2731.
33. Laduca H, Stuenkel AJ, Dolinsky JS, Keiles S, et al. Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients. *Genet Med*, 2014; 16(11): 830–837.
34. Mills JN, Rutkovsky AC, Giordano A. Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*, 2018; 41: 59–65.
35. Oppelt PJ, Hirbe AC, Van Tine BA. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): point mutations matter in management, a review. *J Gastrointest Oncol*, 2017; 8(3): 466–473.
36. Pham TV, Boichard A, Goodman A, Riviere P, et al. Role of ultraviolet mutational signature versus tumor mutation burden in predicting response to immunotherapy. *Mol Oncol*, 2020; 14(8): 1680–1694.
37. Siena S, Sartore-Bianchi A, Marsoni S, Hurwitz HI, et al. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) oncogene in colorectal cancer. *Ann Oncol*, 2018; 29(5): 1108–1119.
38. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 2001; 344(11): 783–792.
39. Soukupova J, Zemankova P, Lhotova K, Janatova M, et al. Validation of CZECA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS One*, 2018; 13(4): e0195761.
40. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med*, 2018; 379(2): 111–121.
41. Zhu H, Wei M, Xu J, Hua J, et al. PARP inhibitors in pancreatic cancer: molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Cancer*, 2020; 19(1): 49.