

Význam a přínos vyšetřování cirkulující nádorové DNA pro diagnostiku a terapii nemalobuněčných karcinomů plic

Miloš Pešek

Klinika pneumologie a ftizeologie, Fakultní nemocnice Plzeň

Autor prezentuje v souborném sdělení současný stav a možnosti využití vyšetřování nádorové ctDNA v krvi nemocných s nemalobuněčnými karcinomy plic (NSCLC). Uvádí přehled současných nejčastěji využívaných platforem těchto vyšetření i výsledky některých studií, které tato vyšetření využívají při volbě systémové terapie i při sledování její účinnosti. Hlavní perspektivy využití těchto vyšetření se nabízejí v iniciální diagnostice a volbě léčebného postupu, dále při monitorování průběhu onkologické léčby, kde lze zjišťovat vznik rezistentních mutací a vývoj heterogenity nádorů. Dalšími možnostmi jsou poté diagnostika přítomnosti minimální zbytkové nemoci a včasná detekce recidivy nádorového onemocnění. V úvahu přichází i vyšetřování mutační nálože nádorové ctDNA, která je jedním z prokázaných parametrů účinnosti imuno-onkologické léčby. Kromě nejnovějších vyšetřovacích zobrazovacích metod, které jsou základem diagnostiky a sledování účinnosti terapie NSCLC, se nyní objevuje na scéně nový nástroj k diagnostice a monitoraci vývoje onemocnění, který může dále přispět k poznání biologie a dynamiky vývoje nádorových onemocnění a pravděpodobně i ke změně paradigmat diagnostických i léčebných postupů u nemalobuněčných karcinomů plic.

Klíčová slova: cirkulující nádorová DNA, nemalobuněčné karcinomy plic, nádorová heterogenita, chemoterapie, cílená terapie, imuno-onkologická léčba, hodnocení léčebné odpovědi, prognostické a prediktivní faktory.

Significance and benefit of testing for circulating tumour DNA in diagnosing and treating non-small cell lung cancer

The present paper deals with the current situation and possible use of testing ctDNA in the blood of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). It presents an overview of the current most frequently used platforms for these tests as well as the results of some studies utilized by these tests when choosing systemic treatment and monitoring its efficacy. These tests particularly lend themselves to be used in initial diagnosis and choosing the treatment strategy as well as in monitoring the course of cancer treatment, which allows to determine the emergence of resistant mutations and development of tumour heterogeneity. Other options include diagnosing the presence of minimal residual disease and early detection of cancer recurrence. A further possibility might be the measurement of tumour mutational burden from ctDNA which is an established parameter of the efficacy of cancer immunotherapy. In addition to the latest imaging techniques which are the mainstay of diagnosing and monitoring of the efficacy of NSCLC treatment, a novel tool for diagnosing and monitoring of the disease development has emerged which can further enhance the knowledge of the biology and dynamics of tumour disease development and is likely to contribute to a change in the paradigm of diagnostic and therapeutic approaches in non-small cell lung cancer.

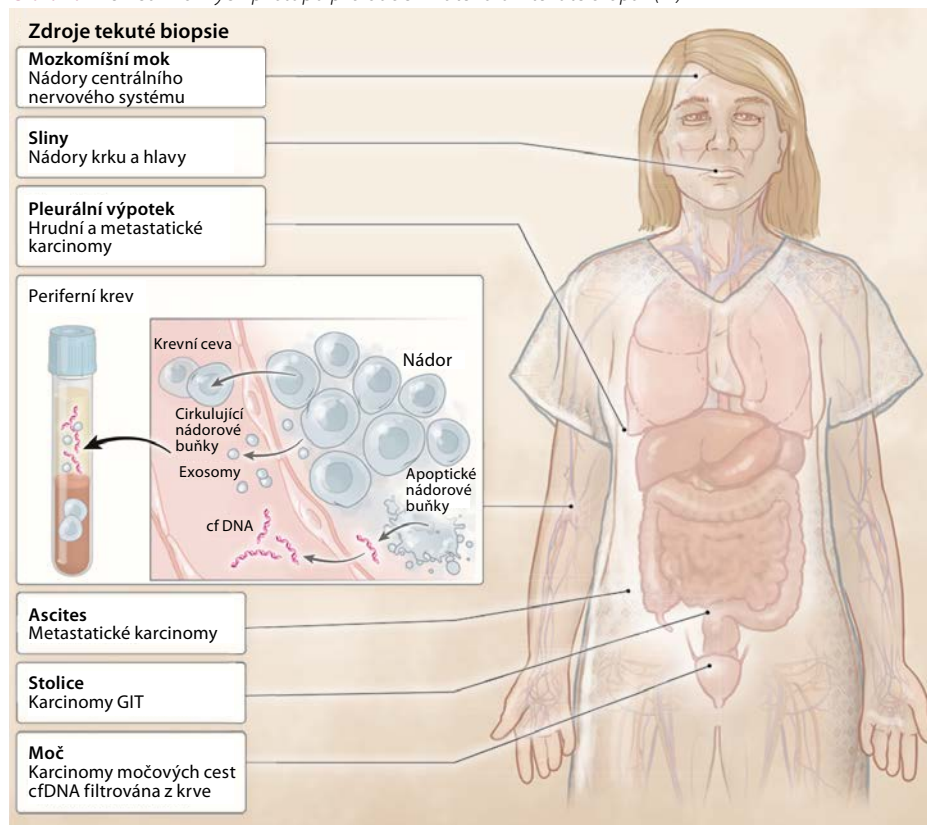
Key words: circulating tumour DNA, non-small cell lung cancer, tumour heterogeneity, chemotherapy, targeted therapy, cancer immunotherapy, treatment response assessment, prognostic and predictive factors.

Úvod

V posledních letech jsme svědky expanze účinných léčebných postupů u nemocných

s pokročilými nemalobuněčnými karcinomy plic (NSCLC) (1, 2). Postupně se rozšiřuje spektrum biologicky cílených léků u některých

geneticky definovaných podskupin NSCLC, přibývají i imuno-onkologické preparáty a jejich kombinace. Byly prokázány i přínosy

Obr. 1. Přehled možných přístupů pro odběr materiálu k tekuté biopsii (11)

kombinací imuno-onkologických preparátů s cytostatiky a s antiangiogenní léčbou, nicméně i při zvažování indikací imuno-onkologické léčby je u některých typů NSCLC znalost jejich genetického vybavení nezbytná. Rozhodování o systémové léčbě NSCLC patří do rukou multidisciplinárního týmu (MDT), na jehož činnosti se podílejí kromě klinických onkologů i radiodiagnostici, radioterapeuti, pneumologové, patologové a odborníci pro molekulární biologii nádorů (3, 4). Tito odborníci indikují společně inovativní systémové léčebné postupy a při sledování efektu léčby hodnotí i řadu parametrů vývoje léčeného onemocnění. Bylo prokázáno, že ve srovnání s léčebnými registry na pracovištích, kde byla léčba řízena MDT, se bez ohledu na podané medikace zvýšila naděje nemocných na pravděpodobnost jednoletého přežití téměř dvojnásobně.

Monitorování účinnosti cílené i imuno-onkologické léčby je založeno na hodnocení vývoje pomocí řady zobrazovacích metod. Novým nástrojem pro diagnostiku i pro monitorování průběhu nádorových onemocnění se v poslední době stává vyšetřování cirkulující nádorové DNA (ctDNA). V periferní krvi nádory postižených pacientů lze nalézt

cirkulující nádorové buňky, exozomy i zmíněnou ctDNA, která tvoří obvykle malou frakci z celkové volné cirkulující DNA (cfDNA). Volná cirkulující DNA z normálních buněk se nachází v krvi zdravých osob v obvyklém množství 10–15 ng/ml, její hladina se může zvýšit v důsledku poškození tkání či v průběhu zánětu (5).

Uvolňování nádorové DNA do krevního oběhu souvisí jak s biologickými vlastnostmi nádoru, tak s pokročilostí nádorového onemocnění (6). Lam a spol. (7) prokázali, že nezávislým prediktorem zvýšeného uvolňování ctDNA jsou přítomnost mutací TP 53 a mutace EGFR, přítomnost viscerálních metastáz a rozsah nádorové nemoci. Vztahy mezi alelickými frekvencemi ctDNA a měřitelnými parametry nádorů, tedy celkovým a metabolickým objemem nádorů se rovněž liší v závislosti na genetických parametrech nádorů (7, 8). Nejsilnější korelace byly prokázány u Kras mutovaných karcinomů a nejslabší korelace pak u nádorů řízených mutacemi EGFR. V posledně zmíněné skupině pak byly navíc významné rozdíly mezi nádory, které vykazovaly EGFR mutace a zvýšené počty kopií genu EGFR a těmi, které zvýšené počty kopií zmíněného genu neobsahovaly.

Cirkulující nádorová DNA obsahuje genetický materiál a tedy i řadu somatických mutací, které jsou specifické pro buňky daného nádorového onemocnění. Do krevního oběhu se dostává jako následek apoptózy či nekrózy nádorové tkáně, jde o krátké fragmenty DNA o délce mezi 120–200násobky bází (5). Její polčas přítomnosti v krevním oběhu je několik hodin, na rozdíl od většiny běžně užívaných nádorových markerů. Vzestup její hladiny může být doložen krátce po aplikaci účinné onkologické léčby, a následný pokles jejich hladin pak bývá pozorován 1–2 týdny po zahájení léčby. Vzestup hladin ctDNA předchází radiologicky doloženou progresi nádoru o týdny až o měsíce (9, 10, 11, 12).

Senzitivita jejího vyšetření bývá u pokročilých onemocnění kolem 75 %, specifita kolem 95 %. Existuje řada diagnostických platform: Cobas-Roche, Thera-Screen-Qiagen, Target-Selector-Biocett, Trovera-Trovagen, Guardant 300-Guardant Health, Foundation Act-Foundation Medicine a Oncotype SEQ-Genomic Health.

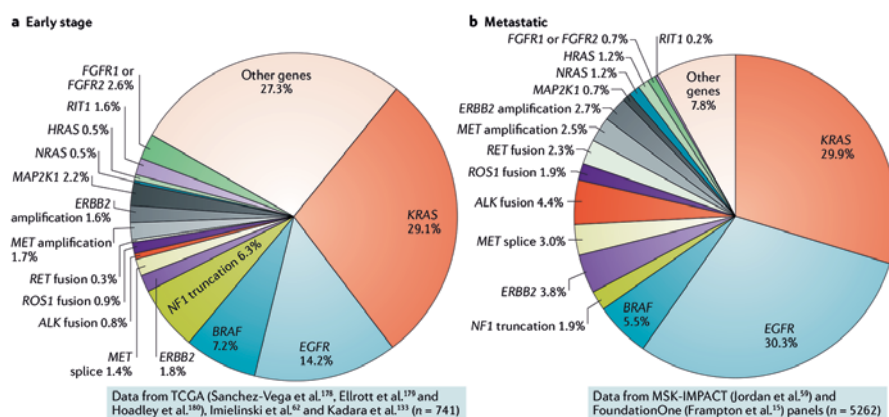
Hladiny ctDNA představují vlastně neinvazivní a reprodukovatelný biomarker v reálném čase, který má důležitý význam pro prognózu i pro predikci účinku léčby na začátku i v průběhu systémové terapie NSCLC. Limitací jejich využití v běžné klinické praxi, mimo rámec klinických studií, může být jejich relativně vysoká cena.

Některé studie již prokázaly významné korelace mezi výsledky zobrazovacích vyšetření a dynamikou hladin ctDNA v průběhu protinádorové léčby, některé studie tuto korelaci neprokázaly, předpokládá se korelace hladin ctDNA spíše s biologickým chováním a agresivitou nádoru než s vlastní nádorovou hmotou (6).

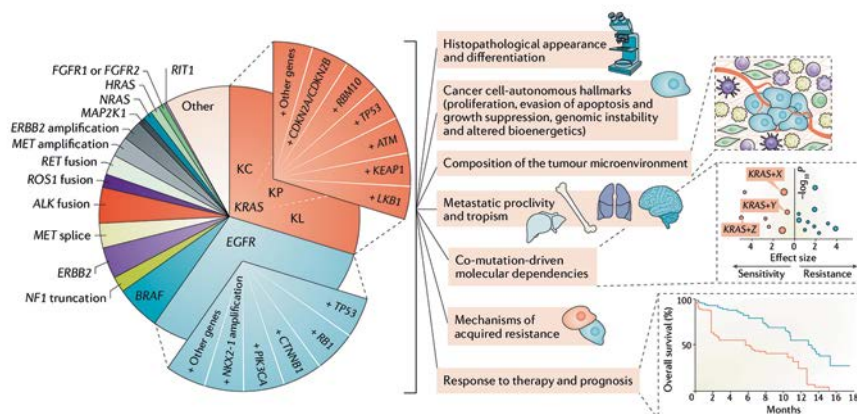
V současné době se nabízí využití vyšetřování ctDNA u nemocných s NSCLC v těchto situacích:

- iniciální diagnostika a volba léčebného postupu,
- monitorování průběhu léčby, průkaz rezistentních mutací a vývoje heterogenity nádorů,
- přítomnost minimální zbytkové nemoci a včasná detekce recidivy nádorových onemocnění,
- vyšetřování mutační nálože nádorové DNA v rámci indikací imuno-onkologické léčby.

Obr. 2. Rozdíly mezi časnými a pokročilými stadii adenokarcinomu plic z hlediska molekulární klasifikace a pravděpodobnosti průkazu jednotlivých řídicích mutací (19)



Obr. 3. Model molekulární stratifikace adenokarcinomu plic příští generace (19)



Ad 1.

NSCLC lze definovat jako komplex onemocnění, kde jsou zahrnuty i nádory, jejichž proliferace je řízena targetabilními řídicími mutacemi. K nim lze v současné době počítat především nádory, kde byla prokázána účinnost biologicky cílených léků, obvykle inhibitorů tyrozinkinázových receptorů, a které jsou již rutinně využívány v běžné klinické praxi. Sem patří nádory se senzitivními mutacemi genu EGFR, s translokacemi genů ALK a ROS1, s mutacemi genů BRAF, MET, RET a NTRK. Ve srovnání se systémovou chemoterapií rutinně užívanou dříve, přináší tato cílená léčba nemocným významné benefity ve kvalitě i v délce života, a proto je třeba u kandidátů této léčby učinit i v oblasti molekulárně-genetické diagnostiky jejich onemocnění maximum možného.

CtDNA v periferní krvi představuje cenný diagnostický materiál zejména, když zjišťujeme, že přibližně 30 % odebraných vzorků nádorové tkáně NSCLC není použitelných pro molekulárně genetickou diagnostiku

a že u 2/3 z tohoto počtu není opakování biopsie z různých důvodů možné či vhodné. Dle některých studií preferuje řada nemocných i jejich lékařů nejprve vyšetření ctDNA, jindy je toto vyšetření indikováno v případě nepoužitelnosti vzorků z tkáňové biopsie. Přibližně 40 % souboru publikovaného Aggarwal a spol. (9) byli nemocní s pozitivními genetickými vyšetřeními biopsií nádorové tkáně. Studie NILE prokázala vyšší podíl identifikovaných mutací s využitím vyšetření ctDNA než při samotných vyšetřeních vzorků nádorových tkání, ale i nejvyšší diagnostickou výtežnost při kombinaci využití genetického vyšetření nádorové tkáně i ctDNA. Výsledky léčby inhibitory tyrozinkináz u nemocných, kde byla řídicí mutace prokázána pouze z ctDNA, jsou prakticky totožné se studiemi, ve kterých byla podmínkou podání léčby řídicí mutace prokázána z biopsie nádoru.

Vyšetření ctDNA poskytuje navíc více informací o molekulární heterogenitě nádoru. Je známo, že spektrum genetických změn

může být rozdílné mezi primárními nádory a metastázami, vyšetření ctDNA tedy má potenciál poskytnout podrobnější informace o nádorech pokročilých stadií. Pozitivní průkaz ctDNA na začátku onkologické léčby je navíc nepříznivým prognostickým faktorem (13, 14, 15, 16).

Ad 2.

Snížení hladin či vymizení ctDNA v průběhu chemoterapie, cílené léčby či léčby imuno-onkologické je pokládáno za citlivější parametr pravděpodobného prodloužení remise choroby a přežití nemocného než remise doložená výsledky vyšetření zobrazovacími metodami, a je citlivějším ukazatelem vývoje onemocnění než vyšetření nádorových markerů. V případech relapsu nádorových onemocnění, kdy dochází k selhání původně účinné cílené léčby, nabízí podrobné vyšetření ctDNA informace, které mohou být podkladem pro indikace cílené léčby vyšší generace (17, 18, 19, 20, 21).

Ad 3.

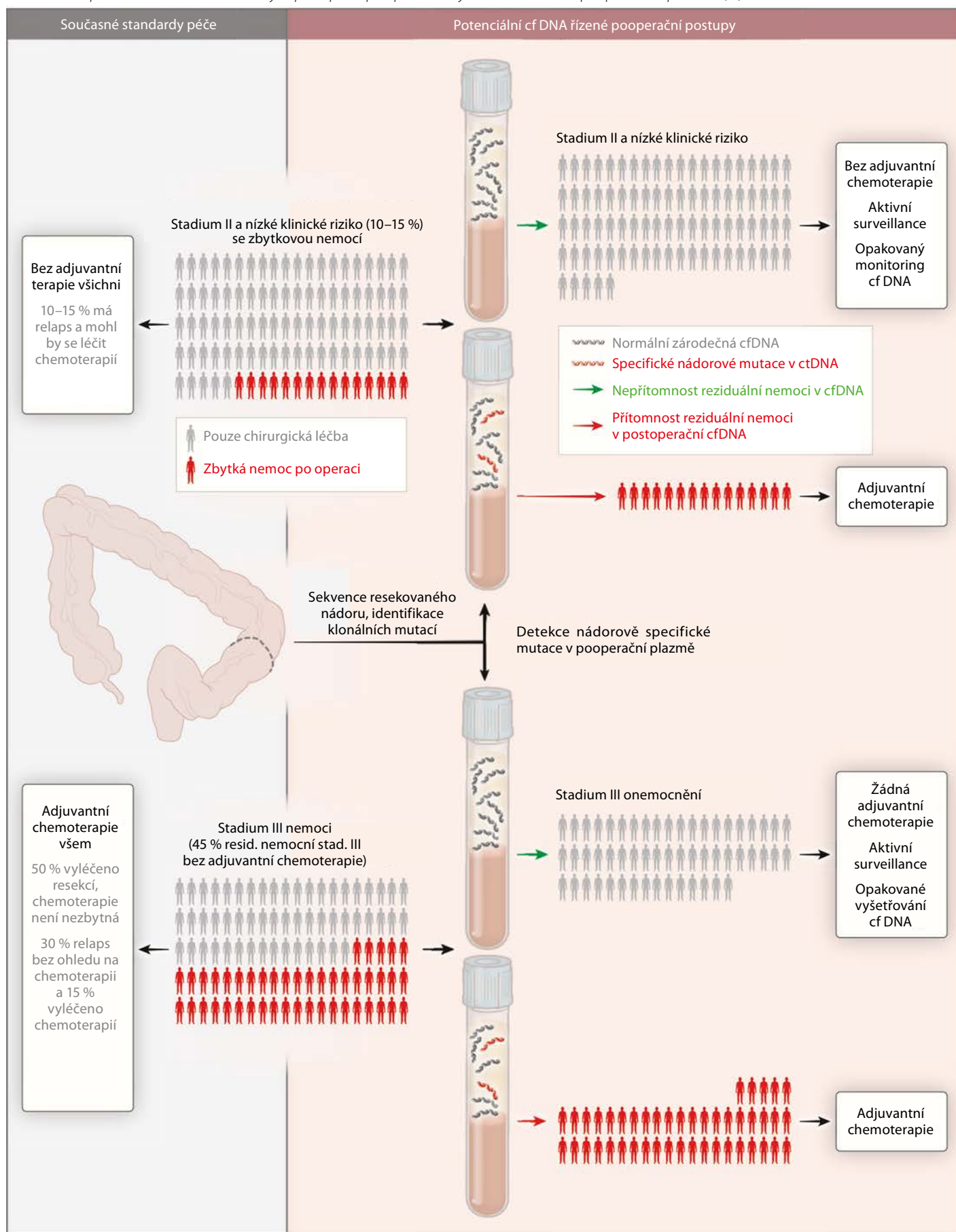
Vzestup hladiny ctDNA předchází radiologickou progresí o týdny až měsíce, nicméně, samo o sobě není zatím podkladem pro indikaci systémové onkologické léčby (10, 22). Corcoran a spol. (4) předkládá koncept, dle kterého by nemocní po operaci NSCLC stadií II–III byli dle hladin ctDNA rozlišováni na pacienty s nízkým a s vysokým rizikem recidivy onemocnění a pouze nemocní s vysokým rizikem by dostávali pooperačně systémovou onkologickou léčbu.

Nemocní, u kterých by se v průběhu sledování objevil vzestup hladin ctDNA, by měli být častěji a podrobněji vyšetřováni s ohledem na pátrání po místě recidivy onemocnění.

Sledování vývoje dynamiky hladin ctDNA má perspektivu i při sledování účinnosti léčby imuno-onkologickými preparáty, kdy se radiologicky doložitelná remise nemoci zjišťuje v rámci více měsíců a někdy bývá problematické odlišení progresu od pseudoprogrese onemocnění. Ricciutti a spol. (18) prokázali statisticky významné změny v alelických frekvencích ctDNA již po třech týdnech po podání chemoterapie s pembrolizumabem. Tyto změny v ctDNA umožnily odlišit nemocné s regresí nádorů, které byly později doložené výsledky zobrazova-

INZERCE

Obr. 4. Předpokládaná stratifikace léčebných postupů za předpokladu vyšetřování ctDNA v pooperačním průběhu (11)



cích vyšetření od nemocných se stabilizací nemoci a obě tyto skupiny od souboru nemocných s progresí nádorů.

U nemocných, kteří byli léčeni inhibitory ALK pro ALK řízené karcinomy plic, je pak důležitá i znalost přítomnosti či nepřítomnosti některých komutací, například komutace TP 53 genu a velikosti mutační nálože nádorové DNA. Sledování hladin ctDNA umožní nejen předpovědět relaps onemocnění, ale i identifikaci sekundárních mutací ALK či jiných, na ALK nezávislých mechanismů rezistence, které jsou příčinou progresu nádorového onemocnění (20).

LITERATURA

1. Krejčí D, Třebický F, Fanta J, Opálka P, Pauk N. Nové možnosti léčby časného a lokálně pokročilého nemalobuněčného karcinomu plic. *Klinická onkologie* 2021; 34(Suppl. 1): S43–S47.
2. Svatoň M. Cílená terapie nemalobuněčného plicního karcinomu. *Klinická onkologie* 2021; 34 (Suppl. 1): S48–S53.
3. Dundr P, Matěj R, Němejcová K, Bártů M, Stružinská I. Prediktivní tetování u nemalobuněčného karcinomu plic. *Klinická onkologie* 2021; 34(Suppl. 1): S29–S34.
4. Grell P, Bořilová S, Bílek O, Kiss I. Role multidisciplinárního týmu a molekulárního tumor boardu v léčbě pacienta s karcinomem plic. *Klinická onkologie* 2021; 34(Suppl. 1): S20–S28.
5. Abdayem P, Planchar D. Update on molecular pathology and role of liquid biopsy in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir Rev* 2021; 30: 200294. Doi: 10.1183/16000617.0294–2020.
6. Morbelli S, Alama A, Ferrarazzo G, Coco S, Genova C, et al. Circulating Tumor DNA Reflects Tumor Metabolism Rather Than Tumor Burden in Chemotherapy-Naive Patients with Advanced Non–Small Cell Lung Cancer: 18F-FDG PET/CT Study. *J Nucl Med* 2017; 58(11): 1764–1769. Doi: 10.2967/jnuclmed.117.193201.
7. Lam VK, Zhang J, Wu CC, Tran HT, Li L, et al. Genotype-Specific Differences in Circulating Tumor DNA Levels in Advanced NSCLC. *J Thoracic Oncology* 2021; 4(Vol. 16): 601–609.
8. Liu Z, Xie Z, Zhao S, Ye D, Cai X, et al. Cheng B, Li C, Xiong S, Li J, Liang H, Chen Z, Liang P, Liu J, He J, Liang W. Presence of allele frequency heterogeneity defined by ctDNA profiling predicts unfavorable overall survival of NSCLC. *Transl Lung Cancer Res* 2019; 8(6): 1045–1050. <http://dx.doi.org/10.21037/tlcr.2019.12.10>.
9. Aggarwal Ch, Thompson JC, Black TA, Katz SI, Fan R, et al. Clinical Implications of Plasma-Based Genotyping With the Delivery of Personalized Therapy in Metastatic Non–Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2019; 5(2): 173–180. Doi: 10.1001/jamaoncol.2018.4305.
10. Aggarwal Ch, Thompson JC, Chien AL, Quinn KJ, Hwang W-T, et al. Baseline Plasma Tumor Mutation Burden Predicts

Ad 4.

TMB – mutační nálož nádorové ctDNA – lze použít k indikaci imuno-onkologické léčby samotné nebo v kombinaci s chemoterapií. TMB vyšší než 16 mutací na 1 megabázi DNA je pro indikaci imuno-onkologické léčby příznivým parametrem, nicméně, současná přítomnost některých řídicích mutací pravděpodobnost příznivé odpovědi na tuto léčbu snižují (10).

Závěr

Studium významu ctDNA u onkologických pacientů probíhá již více než 40 let. Třebaže ru-

tininní využití této metody v běžné klinické praxi je zatím omezeno na zjišťování rezistentních mutací u nemocných s nádory řízenými některými z časových mutací (EGFR, EML4-ALK), je možné v blízké době očekávat její expanzi ve více indikacích, která bezesporu povede k lepšímu poznání genetické heterogenity nádorů, zlepšení možností hodnocení vývoje onemocnění a pravděpodobně i ke změnám léčebných paradigmat, a v konečném důsledku i k dalšímu zlepšení vyhlídek nemocných nejen NSCLC, ale jistě i mnoha dalších zhoubných nádorových onemocnění.

Podpořeno z grantu AZV 17-307 481.

Response to Pembrolizumab-based Therapy in Patients with Metastatic Non–Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2020; 26: 2354–61. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3663.

11. Corcoran RB, Chabner BA. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. *N Engl J Med* 2018; 379: 1754–65. Doi: 10.1056/NEJMr1706174.
12. Dumbrava EE, Call SG, Huang HJ, Stuckett AL, Madwani K, Adat A, et al. PIK3CA mutations in plasma circulating tumor DNA predict survival and treatment outcomes in patients with advanced cancers. *ESMO* 2021; 6(5). <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100230>.
13. ESMO oncology news – Final FLAURA results demonstrate overall survival benefit with osimertinib over TKIS in advanced NSCLC. Exploratory analysis of FLAURA data demonstrates that longitudinal ctDNA monitoring can provide early detection of disease progression and/or resistance in advanced NSCLC. 29 Sep 2019.
14. Gray JE, Okamoto I, Sriuranpong V, Vansteenkiste J, Imamura F, et al. Tissue and Plasma EGFR Mutation Analysis in the FLAURA Trial: Osimertinib versus Comparator EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor as First-Line Treatment in Patients with EGFR-Mutated Advanced Non–Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research* 2019; Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1126.
15. Mok T, Wu Y-L, Soo Lee S, Yu Ch-J, Sriuranpong V, et al. Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2015 AACR; 21(14): 3196–3203 / Published OnlineFirst March 31, 2015; Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2594.
16. Papadimitrakopoulou VA, Ji-Youn Han J-Y, Ahn M-J, Ramalingam SS, Delmonte A, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Analysis in Tissue and Plasma From the AURA3 Trial: Osimertinib Versus Platinum-Pemetrexed for

T790M Mutation-Positive Advanced Non–Small Cell Lung Cancer. *Cancer* 2020; 126: 373–380.

17. Provencio M, Majem M, Guirado M, Massuti B, Peñas R, et al. Phase II clinical trial with metronomic oral vinorelbine and tri-weekly cisplatin as induction therapy, subsequently concomitant with radiotherapy (RT) in patients with locally advanced, unresectable, non-small cell lung cancer (NSCLC). Analysis of survival and value of ctDNA for patient selection. *Lung Cancer* 2021; 153: 25–34.
18. Ricciuti B, Jones G, Severgnini M, Alessi JV, Recondo G, et al. Early plasma circulating tumor DNA (ctDNA) changes predict response to first-line pembrolizumab-based therapy in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Immunother Cancer* 2021; 9: e001504, doi: 10.1136/jits-2020-001504.
19. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Cancer. Nature Reviews* 2019; 19: 495–509.
20. Yang Y, Huang J, Wang T, Zhou J, Zheng J, et al. Decoding the Evolutionary Response to Ensartinib in Patients With ALK-Positive NSCLC by Dynamic Circulating Tumor DNA Sequencing. *J Thorac Oncology*, 2021; 16(5): 827–839.
21. Yeung KT, More S, Woodward B, Velculescu V, Husain H. Circulating Tumor DNA for Mutation Detection and Identification of Mechanisms of Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Mol Diagn Ther*, 2017; Adis, CrossMark, DOI: 10.1007/s40291-017-0260-5, Springer International Publishing Switzerland 2017.
22. Chaudhuri AA, Chabon JJ, Lovejoy AF, Newman AM, Stehr H, et al. Early Detection of Molecular Residual Disease in Localized Lung Cancer by Circulating Tumor DNA Profiling. Research Brief, Published OnlineFirst September 24, 2017; DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0716.
23. Jakobsen A, Andersen RF, Hansen TF, Jensen LH, Faaborg L, et al. Early ctDNA response to chemotherapy. A potential surrogate marker for overall survival. *European Journal of Cancer* 2021; 149: 128e133.