

•••lungcancer

Molekylärpatologins intåg i lungonkologin

Ny kunskap har ritat om



– *har vi förstått potentialen?*

vardagen för onkologer och lungmedicinare

På mindre än 10 år har utvecklingen inom molekylopatologin ritat om den kliniska vardagen för onkologer och lungmedicinare. Inget tyder på att utvecklingshastigheten kommer att minska och det vi ser är ett viktigt steg mot att på molekylnivå målinrikta behandlingen för allt fler patienter. Det skriver **Martin Sandelin**, specialistläkare vid Akademiska sjukhuset i Uppsala, i en översikt av ett spännande fält där kunskapen ökar i snabb takt.

”Med färre analyserade gener erhåller vi betydligt snabbare svar då informationsmängden att bearbeta minskar avsevärt.”

När vi för knappt 10 år sedan förstod mekanismen bakom EGFR-tyrosinkinashämmarnas (EGFR-TKI) roll för behandling av lungcancer hände något med hela det onkologiska fältet. En diagnos som tidigare ägnats sparsamt intresse och resurser visade på imponerande resultat genom användandet av en modern PCR-analys med mycket högt prediktivt värde¹. Den målinriktade terapin hade slagit igenom och runt om i världen började lungcancerorienterade lungmedicinare och onkologer prata om molekylopatologi som en självklar grund i diagnostiken.

Vid den här tiden (kring 2010) diskuterades fortfarande vilka patienter som skulle komma ifråga för diagnostiken. Metoden var dyr (i jämförelse med befintlig diagnostik) och de EGFR-muterade patienterna förhållandevis få. Initalt selekterades patienterna på kliniska markörer såsom rökstatus, kön, ålder och etnicitet för att öka antalet positiva analyser. Dock dröjde det inte länge förrän rekommendationen blev att testa alla patienter med icke-skvamös lungcancer och avancerad sjukdom oavsett kliniska faktorer. Detta ledde naturligtvis till en minskad andel EGFR-muterade patienter men en ökning av antalet patienter som erhö

ll behandling då ju även äldre, rökande män ibland faller ut som positiva för EGFR-mutation.

REFLEXTESTNING AV EGFR

I Uppsala bestämde vi oss tidigt för att införa reflextestning av EGFR vid icke-skvamös NSCLC. Detta gav oss möjlighet att presentera populationsdata från de första årens testning². Av de patienter som testades mellan 2010 och 2012 hade 10 procent EGFR-mutation, dock sågs ett bortfall av NSCLC-NOS-patienter och anrikning av adenocarcinom där mutationer är något vanligare troligen beroende på kvarvarande klinisk selektion. Detta var betydligt lägre siffror än de som initialt hade presenterats från Asien och södra Europa samtidigt som de stämmer väl överens med data som publicerats på senare år från Norden och norra Europa som kan antas spegla populationen bättre³.

Problemet tornade dock upp sig på himlen. Dels blev det uppenbart att de EGFR-muterade patienterna i samtliga fall till slut utvecklade resistens mot läkemedlet de från början svarat så bra på. Vidare började det komma data på allt fler potentiellt drivande mutationer, men dessa förekom inte så ofta som i 10 procent av patienterna utan endast i enstaka procent eller knappt det. Att in-

föra testning för varje typ av mutation skulle inte bara bli extremt dyrt i relation till antalet positiva utfall, det skulle också vara omöjligt utifrån den begränsade tillgången på tumörvävnad i de ofta små biopsierna från bronkoskopier.

Snart blev vi varse denna problematik då det första målriktade preparatet mot ALK-translokation godkändes av det europeiska läkemedelsverket EMA 2012. Den analys som rekommenderades var FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), också den med en kostnad i paritet med PCR-metoderna för EGFR-mutationsanalys. Problemet med analys av ALK-translokation var att den relativa kostnaden per funnen ALK-positiv patient blev oerhört hög då translokationen endast detekteras i cirka 3-5 procent av patienterna i redan selekterade material⁴.

IMMUNHISTOKEMI BASEN

Valet stod således mellan att testa utifrån kliniska faktorer eller använda en annan metod för analysen. I Uppsala valde vi tidigt att utforma en screening-algoritm där immunhistokemi (IHC) blev basen för ALK-testningen efter att data publicerats som talade för denna möjlighet. Genom detta kunde vi med väsentligen oförändrad kostnad screena våra patienter up-front för två viktiga prediktiva bio-markörer. Positiva ALK-fall verifierades med validerad FISH inför behandling. På senare år har detta blivit den diagnostiska sekvens som används över hela världen, och nyligen togs kravet på verifierande FISH bort i USA där det tidigare var obligatoriskt emedan IHC visade högre sensitivitet än FISH i jämförande studier⁵.

Med införd reflextestning för EGFR och ALK var ”de lågt hängande frukterna” avböckade (KRAS ej medräknat då målriktad terapi ännu inte är tillgänglig). Nu återstod endast drivande genetiska abberationer förekommande kring enstaka procent eller knappt det. Samtidigt kom nya data kring resistansmutationer mot den första generationens läkemedel. Rädningen har kommit att bli utvecklingen av Next Generation Sequencing (NGS). Stora amerikanska aktörer som Memorial Sloan Kettering, MD Anderson och Dana Farber Cancer Institute var tidigt ute med enorma genpaneler (hundra-

tals gener) analyserade med NGS. I Sverige har vi valt en annan väg och i huvudsak satsat på mindre paneler på 20-30 kliniskt intressanta gener. Med färre analyserade gener erhåller vi betydligt snabbare svar då informationsmängden att bearbeta minskar avsevärt. Utvecklingen av kliniskt driftsatt NGS har drivits framförallt av lungcancer, GI-tumörer och melanom där analyserna påverkar den givna behandlingen.

”Genom intensivt utvecklingsarbete har det blivit möjligt att preparera fram DNA från snittade formalinfixerade vävnadsblock och därigenom erhålla en förhållandevis hög halt tumörceller.”

FRÅN SNITTADE VÄVNADSBLOCK

Traditionellt har NGS-analyserna utförts på tumörvävnad som erhållits via biopsi eller operation. Utmaningen har i huvudsak varit att från formalinfixerad vävnad kunna analysera DNA som genom formalinets inverkan är kraftigt fragmenterat. Genom intensivt utvecklingsarbete har det blivit möjligt att preparera fram DNA från snittade formalinfixerade vävnadsblock och därigenom erhålla en förhållandevis hög halt tumörceller. Ett problem har dock visat sig vara risken för att biopsimaterial inte varit tillgängligt eller förbrukat vid de traditionella patologiska analyserna. Vidare har det visat sig att tumörer är heterogena och att en liten biopsi kan vara negativ för en mutation som förekommer i andra delar av tumöre⁶.

Ett sätt att bemöta dessa problem har utvecklats genom metoder att analysera circulating tumor DNA (ct-DNA). Metoden kräver inte biopsierat tumörmaterial och genom att DNA kan antas läcka ut från hela tumören kan analys av ct-DNA antas ge en mer representativ bild av heterogena tumörer.

ct-DNA-tekniken ansågs för bara några år sedan vara tämligen spekulativ men har redan idag utvecklats till klinisk rutin inom diagnostik av resistens-

mekanismer uppkomna efter EGFR-TKI-behandling. Tumörheterogenitet blir inte mer tydlig än i dessa situationer då vi ofta har tydlig effekt av läkemedlet i primärtumör och flera metastaser, men där vi efter en tid ser radiologiska tecken på progress i enstaka eller flera synkrona lesioner. Inte sällan är de lesioner som progredierar svåråtkomliga för rebiopsi. I fallet med EGFR-TKI vet vi idag att nästan 60 procent av patienterna utvecklar resistensmekanism genom mutationen T790M⁷.

I samband med studierna som ledde till godkännande av tredje generationens EGFR-TKI med effekt mot T790M-mutationen har ct-DNA-analyserna fått sitt genombrott. Eftersom patientgruppen har stor sannolikhet att utveckla T790M-mutation så utvecklades en riktad analys mot denna resistensmekanism baserat på den tidigare PCR-baserade EGFR-analysen. Fördelarna är uppenbara, med ett (relativt) enkelt blodprov så kan resistensmutation detekteras hos en majoritet av patienterna istället för att utföra ofta komplicerade biopsier på progredierande lesioner. Specificiteten är mycket hög (97 %) men sensitiviteten är lägre (46 %)⁸. I de lägen där svaret blir negativt bör ändå en riktad biopsi göras för att utföra en NGS (andra drivande mutationer kan ha uppkommit men även för att fånga en eventuell T790M-mutation som inte detekterats i plasma).

SNABB ANALYS NÖDVÄNDIG

Ett problem med bred lansering av ct-DNA-analys har hittills varit att DNA är instabilt i plasma och analys av blodprovet måste ske under de närmsta dygnen efter att provet är taget (detta förutsatt att provet centrifugerats direkt efter provtagning). Således har

det krävts en separat logistik för dessa prover, något som ännu inte hunnit byggas ut på mindre sjukhus. På sikt kommer naturligtvis lösningar även på detta problem. En möjlig lösning presenterades på ASCO 2016 där data för ct-DNA från urin visade lovande resultat. Ytterligare data har sedan dess presenterats⁹. Urin visar sig stabilisera DNA och logistiken kan således på sikt bli ytterligare förenklad. Genom enkelheten att erhålla provet öppnas även möjligheten till kontinuerlig behandlingsmonitorering där resistensutveckling kan detekteras tidigare¹⁰.

Nästa naturliga steg i användandet av ct-DNA är att analysera inte bara enstaka resistensmutationer utan att analysera en bredare panel genom att utföra NGS på plasma eller urin. Även detta är naturligtvis beskrivet¹¹ och här ligger svenska institutioner väl till och är i färd med att validera metoden för kliniskt bruk. Med NGS på ct-DNA kan vi således med mycket hög specificitet avgöra om en tumör har en drivande mutation i ett läge där resistensutveckling misstänks eller stora svårigheter finns att erhålla primär biopsi. Alltjämt är dock förstahandsvalet biopsi av tumören vid initial utredning för histologisk bedömning.

På mindre än 10 år har utvecklingen inom molekylärpatologin ritat om den kliniska vardagen för onkologer och lungmedicinare. Inget tyder på att utvecklingshastigheten kommer att minska. Flaskhalsarna idag är framförallt bioinformatiken som kräver stora humana resurser. Ju fler gener vi önskar analysera, desto större blir tidsåtgången vid analys av datamängderna som genereras. Det pågår simultant med metodutvecklingen uppbyggnad av kommersiella databaser som på sikt kommer bli ett viktigt instrument för att bedöma relevansen av de mutationer som återfinns i tumörproverna. Automatisering på laboratorier är trolig när antalet analyserade prover ökar i takt med att fler diagnoser använder sig av NGS-teknologin vilket ytterligare minskar kostnaden per analyserat prov. Det vi ser är ett viktigt steg mot att på molekylär nivå målinrikta behandlingen för allt fler patienter vilket med stor sannolikhet kommer att leda till ökad överlevnad. Sannolikt kan vi idag inte

NEXT GENERATION SEQUENCING – SÅ GÅR DET TILL

NGS utförs genom att DNA-fragment från tumörceller prepareras och märks in med patientunik "bar-code" (CTAG-baserad) kopplad till varje DNA-fragment. Preparerat DNA från flera patienter blandas och analyseras synkront i en sekvenseringsmaskin. Analyserna riktas mot förbestämda gener som sekvenseras multipla gånger för att få ökad kvalitet i analysen. Sekvenseringen sker ofta över natt och en stor datamängd (5-10 GB) skall sedan analyseras av bioinformatiker och medicinskt tolkas av läkare. Det mest personalkrävande arbetet är således preparation av sekvenseringsreaktionerna och informationsbearbetning.

SNABB NEDBRYTNING AV CT-DNA

Ct-DNA (circulating tumor DNA) läcker ut i blodbanan från tumören när celler faller sönder. I blodet blandas ct-DNA med övrigt cirkulerande DNA (från sönderfall av friska celler). Mängden ct-DNA är beroende av graden av cellsönderfall i tumören vilket påverkas av proliferationshastighet, tumörstorlek, metastasering och behandlingseffekt. ct-DNA är fragmenterat i blodet och bryts ned snabbt i rumstemperatur. För att optimera kvaliteten på analysen bör provet centrifugeras omgående efter provtagning och plasmakomponenten (i vilket ct-DNA återfinns) frysas om analys inte sker inom närmsta dygnet.

överblicka potentialen av den utveckling som just tagit fart.

REFERENSER

1. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361(10):947-57.
2. Sandelin M, Berglund A, Sundstrom M, Micke P, Ekman S, Bergqvist M, et al. Patients with Non-small Cell Lung Cancer Analyzed for EGFR: Adherence to Guidelines, Prevalence and Outcome. *Anticancer Res* 2015;35(7):3979-85.
3. Berg J, Fjellbirkeland L, Suhrke P, Jeben P, Lund-Iversen M, Kleinberg L, et al. EGFR mutation testing of lung cancer patients - Experiences from Vestfold Hospital Trust. *Acta Oncol* 2016;55(2):149-55.
4. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol* 2012;13(10):1011-9.
5. Pekar-Zlotin M, Hirsch FR, Soussan-Gutman L, Ilouze M, Dvir A, Boyle T, et al. Fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, and next-generation sequencing for detection of EML4-ALK rearrangement in lung cancer. *Oncologist* 2015;20(3):316-22.
6. Dietz S, Schirmer U, Merce C, von Bubnoff N, Dahl E, Meister M, et al. Low Input Whole-Exome Sequencing to Determine the Representation of the Tumor Exome in Circulating DNA of Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *PLoS One* 2016;11(8):e0161012.
7. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, Kumagai T, Okuyama T, Okami J, et al. Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011;17(24):7808-15.
8. Reck M, Hagiwara K, Han B, Tjulandin S, Grohe C, Yokoi T, et al. ctDNA Determination of EGFR Mutation Status in European and Japanese Patients with Advanced NSCLC: The ASSESS Study. *J Thorac Oncol* 2016.
9. Chen S, Zhao J, Cui L, Liu Y. Urinary circulating DNA detection for dynamic tracking of EGFR mutations for NSCLC patients treated with EGFR-TKIs. *Clin Transl Oncol* 2016.
10. Reckamp KL, Melnikova VO, Karlovich C, Sequist LV, Camidge DR, Wakelee H, et al. A Highly Sensitive and Quantitative Test Platform for Detection of NSCLC EGFR Mutations in Urine and Plasma. *J Thorac Oncol* 2016.
11. Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, Savitch SL, Fan R, Balli D, et al. Detection of therapeutically targetable driver and resistance mutations in lung cancer patients by next generation sequencing of cell-free circulating tumor DNA. *Clin Cancer Res* 2016.

MARTIN SANDELIN, DISPUTERAD SPECIALISTLÄKARE,
AKADEMISKA SJUKHuset, UPPSALA,
MARTIN.SANDELIN@MEDSCI.UU.SE

