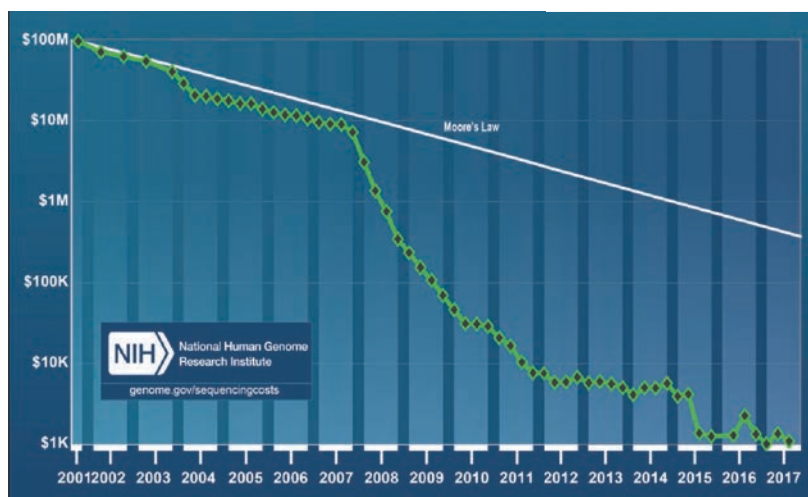


**”Det finns ett stort behov av katalogiserande för att förstå vilka genförändringar som driver cancer och kan vara föremål för riktad behandling.”**

COST PER GENOME





# Så kan tumörsekvensering ge en individanpassad cancersjukvård

Vi lever i en otroligt spännande tid med möjligheter att tillgängliggöra individanpassad cancersjukvård genom tumörsekvensering. Men vad är det som gör att så många talar om NGS, Next Generation Sequencing, just nu?

Det förklarar docent **Johan Hartman** vid Karolinska Institutet och överläkare **Anders Edsjö** vid Skånes universitetssjukhus i en bred och kunskapspäckad översikt av det högaktuella fältet.

De konstaterar dock att det kommer att krävas fortsatta, omfattande investeringar och mycket arbete innan landstingsdriven bred panelsekvensering finns tillgänglig för alla patienter.

## 1. BAKGRUND – VAD ÄR DET SOM GÖR ATT NGS SLÅR IGENOM JUST NU?

Molekylärpatologisk diagnostik för cancersjukdomar genomgår just nu en snabb utveckling – från PCR-baserade tekniker och in situ-hybridiseringar till sekvenseringsbaserad diagnostik. Denna utveckling initierades till stor del av den kapplöpning på 90-talet som syftade till att avkoda det mänskliga genomet, det så kallade HUGO-projektet.<sup>1</sup> På den tiden tog det över 10 år att lyckas sekvensera hela genomet, i dag tar samma analys några dygn. Lika viktigt för klinisk implementering är den samtidigt snabbt sjunkande kostnaden där den tidigare drömgränsen för sekven-

sering av ett genom, 1 000 USD, redan brutits (Fig. 1).

Hur har detta blivit möjligt? Det finns flera anledningar, framförallt teknikutveckling av så kallad parallell sekvensering. Istället för att långa DNA-trådar analyseras bas efter bas analyseras många korta fragment parallellt. Men också utveckling av processorer och mjukvara för att snabbt hantera stora datamängder.

Sekvensering kan ske på både DNA- och RNA-nivå. DNA-sekvensering kan identifiera förändringar i enskilda baspar, så kallade mutationer, DNA-fragment som byter plats inom och mellan kromosomer, så kallade trans-

lokationer och förändringar i antal kopior av en gen eller ett DNA-fragment. Men endast en procent av genomet består av gener som i sin tur ger instruktionerna för att bilda proteiner, det vill säga exoner.<sup>2</sup> Resterande DNA utgörs av icke-kodande sekvenser av till största del okänd betydelse. Med RNA-sekvensering kan uttryck av specifika gener mätas, något som i sin tur kan ge viktig behandlingsprediktiv information. Ett exempel på det är uttrycket av så kallade gensignaturer i bröstcancer (till exempel PAM50). Denna genexpressionsanalys kan dela in bröstcancer i olika undergrupper, med olika prognos och med olika behandlingsal-

ternativ.<sup>3</sup> När man sekvenserar DNA måste man först ta ställning till hur mycket DNA som ska sekvenseras och hur många gånger varje gen eller DNA-region ska sekvenseras. I forskningssyfte vill man ofta ha sekvensdata från hela genomet eller åtminstone alla exoner. Men det innebär också med dagens teknik att vissa delar av genomet kommer att bli sekvenserat ytterst få gånger (med så kallat lågt läsdjup) och med större osäkerhet. Med bibehållet läsdjup och bred täckning blir kostnaden mycket hög. För klinisk sekvensering är det fortfarande inte en rimlig metod utan här riktar man sig mot mindre delar av de proteinkodande regionerna, så kallade genpaneler eller panelsekvensering. Dessa metoder är avpassade för att ge högkvalitativ information även från det sparsamma rutinmaterial som genom bland annat genom formalinfixering är svårt att genomföra heltäckande sekvensering på. De mer avgränsade områden som analyseras vid paneldiagnostik ger också mindre datamängder som är mer lätthanterliga ur ett analysperspektiv, vilket medger möjliggörande av de kortare svarstider som krävs inom cancer vården.

## 2. VILKEN NYTTA HAR CANCERPATIENTEN AV BRED SEKVENSERING?

Sekvensering av enskilda gener har utförts en längre tid och har en självklar position i sjukvården. Ett exempel är tumörsuppressorer BRCA1 och 2 där vissa mutationer orsakar ärftlig cancer som kräver särskilt omhändertagande. Men BRCA-mutationer har också ett behandlingsprediktivt värde. I Sverige har spridd BRCA-positiv ovarialcancer sedan 2015 kunnat behandlas med PARP-hämmare. Samma läkemedel godkändes nyligen av FDA även för ärftlig BRCA-positiv bröstcancer.<sup>4</sup> När det gäller icke-ärftliga genförändringar, så kallade somatiska mutationer, finns i dagsläget ett drygt 20-tal cancerassocierade gener som direkt eller indirekt kan angripas med läkemedel. Men antalet ”behandlingsbara gener” ökar varje år tack vare nya riktade cancerläkemedel. I dessa gener finns en mängd olika mutationer och andra avvikelser där inte alla är direkt sjukdomsorsakande. Det finns ett stort be-

hov av katalogiserande för att förstå vilka genförändringar som driver cancer och kan vara föremål för riktad behandling. Sådana DNA-förändringar kan både identifieras genom experiment in vitro, i cellinjer eller djurmodeller och genom datasimuleringar. Slutligen krävs dock kliniska randomiserade studier för att säkerställa att patienten har nytta av en specifik genotypstyrd cancerbehandling.

## ”De mer avgränsade områden som analyseras vid paneldiagnostik ger också mindre datamängder som är mer lätthanterliga ur ett analysperspektiv, vilket medger möjliggörande av de kortare svarstider som krävs inom cancervården.”

### 3. CANCERSEKVENSERING I KLINISK RUTIN

Svensk sjukvård har redan tagit klivet in i NGS-baserad diagnostik och de sekvenseringspaneler som används idag i klinikrutin täcker i storleksordningen 5-60 gener. Det är oftast tillräckligt för att till exempel täcka upp samtliga behandlingsbara mutationer eller translokationer i exempelvis lungcancer. Analyserna finns idag uppsatta vid alla universitetssjukhus och ligger till grund för behandlingsbeslut för runt 10 000 patienter årligen. Utvecklingen av analyserna har tätt följt behovet av allt mer omfattande behandlingsprediktiv information inför ställningstagande till målriktad behandling vid till exempel primär lungcancer, kolorektalcancer och maligna melanom. Det finns även ett stort behov av molekylär karakterisering vid olika typer av metastaserad cancer med okänd primärtumör. Här krävs ofta större genpaneler för att identifiera möjliga behandlingsbara genförändringar. Två system har nyligen fått FDA-godkännande för just bred panelsekvensering för behandlingsprediktiv information och det är Memorial Sloan Ketterings MSK-IMPACT och FoundationOne Cdx från Roche.

En kritiskt viktig faktor för cancersekvensering är materialtillgången. Vid

sjukdomsrecidiv bör i första hand den nya metastaslokalen biopsieras och analyseras. Anledningen är den tumörheterogenitet som gör att genförändringar kan ändras under sjukdomsförloppet. Men för att möjliggöra detta krävs avancerad ultraljudsledd eller röntgenledd biopsiering, vilket inte finns att tillgå på alla sjukhus. En teknik som har goda förutsättningar att komplettera eller ersätta rebiopsiering är så kall-

ad liquid biopsy där cirkulerande DNA från primärtumör och metastaser analyseras från blodprov. Dessa tekniker kan förväntas få en viktig roll för att över tid följa malign sjukdom men fältet är ännu i sin linda och analyserna används idag rutinmässigt enbart för behandlingsprediktiv information vid resistensutveckling efter målstyrd behandling.<sup>5</sup>

### 4. UTVECKLINGSLINJER

De senaste årens introduktion av immunmodulerande cancerbehandlingar har revolutionerat stora delar av onkologin. Inom flera tumörområden finns mindre grupper av patienter som svarar mycket bra även långsiktigt på till exempel checkpointhämmare. Men dagens biomarkörer i form av immunhistokemisk analys av PD1/PDL1 är otillräcklig för att identifiera dessa patienter. Förväntningarna är höga på att man med bredare cancersekvensering ska hitta genförändringar som förklarar behandlingsresistens. Så kallad mikrosatellitinstabilitet (MSI) är ett tillstånd i genomet som kännetecknas av ett stort antal mutationer och i sin tur orsakas av mutationer i cellens DNA-reparerande system (framförallt i de så kallade MMR-proteinerna). Tumörer med MSI har visat sig svara

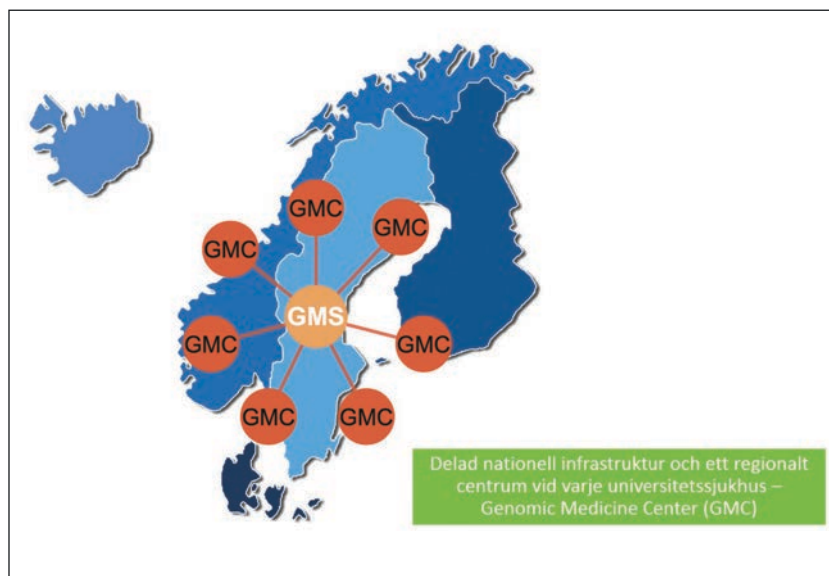
mycket bra på checkpointhämmare oavsett tumörtyp vilket 2017 ledde till att FDA godkände checkpointhämmare för dessa cancrar oavsett PDL1/PD1 status och tumörtyp.<sup>6</sup> Nya data tyder även på att antal mutationer, ofta kallat tumor mutational burden (TMB) eller tumor mutational load (TML), korrelerar starkt till behandlingssvar på checkpointhämmare.

För att på ett tillförlitligt sätt mäta mutationsbörda krävs betydligt mer sekvens än den som idag tas fram i rutinmässig klinisk sekvensering, publicerade studier antyder att en design bör täcka uppemot 1,5 miljoner baser för att tillräckligt väl överensstämma med data från all kodande sekvens. På samma sätt verkar mutationssignaturer, mönster av mutationer specifika för någon av de olika uppkomstmekanismer som ligger bakom de många mutationer som kan ses i en och samma tumör, kunna komma att utvecklas till värdefulla kliniskt, och samtidigt kräva en bred molekylär karakterisering. Metoden har utvecklats genom helgenomsekvensering och behov av sekvens vid olika mutationsbörda är ännu ej klarlagd. Samtidigt verkar flera av de nya förändringar för vilka målstyrda behandlingar lanseras finnas i en låg andel av flertalet vanliga maligniteter. Exempel på dessa är till exempel fusioner i generna NTRK1-3 och FGFR1-4. För att hitta de sammantaget många patienterna som uppvisar dessa förändringar räcker det alltså inte att bara tumörer från patienter med utvalda cancersjukdomar undersöks, ett mer generellt system för bred molekylär karakterisering krävs.

### BIOINFORMATIK

Generellt kan man säga att själva sekvenseringen av DNA eller RNA är det minsta problemet vid storskalig sekvensering. En välfungerande logistik före själva sekvenseringen med avpassad vävnadshandling, standardiserad extraktion av DNA/RNA och så kallad bibliotekspreparering är avgörande för slutprodukten. Även själva bearbetandet av den stora mängden sekvenseringsdata är resurskrävande och ibland tekniskt utmanande. De genpaneler som nu är aktuella i behandlingsprediktivt syfte täcker totalt sett endast

### GENOMIC MEDICINE SWEDEN (GMS)



några promille av genomet men varje sekvens måste sekvenseras hundratals gånger för att ge tillförlitliga resultat. När det gäller klinisk sekvensering finns både en tidsaspekt och en patientsäkerhetsaspekt. Det behövs en strömlinjeformad process som kan hantera stora mängder data dagligen och garantera att processen blir färdig inom en begränsad tid. En stor del av den bioinformatiska processen kan automatiseras men det krävs både bioinformatiker och kliniker för att tolka genvarianter och ställa dessa i en klinisk kontext. I slutändan bör fynden diskuteras vid en multidisciplinär rond, så kallad "molecular tumor board". Här kan olika professioner tillsammans besluta om behandlingsrekommendationer på basen av både sekvensdata och patologisk diagnostik. Sammantaget kan en "in-house", bred genpanelsekvensering ge värdefull behandlingsgrundande information men är samtidigt ett mycket krävande företag. Det är i dagsläget varken samhällsekonomiskt eller medicinskt försvarbart att alla sjukhus ska hålla sig med egen storskalig sekvenseringskapacitet. Samtidigt ska man inte glömma de redan etablerade kommersiella system som finns tillgängliga för panelsekvensering. Dessa har en styrka framförallt i insamlade data från analyserade patienter men även i ett väl genomarbetat beslutsstöd. Det är samtidigt inte alltid självklart att data och algoritmer rakt

av kan lyftas över till svensk sjukvård och det finns ett stort värde i att bygga upp kompetens i svensk sjukvård för att få provtagning, molekylär karakterisering och övrig diagnostik till en patientsäker helhet.

### 5. GENOMIC MEDICINE SWEDEN (GMS) NU OCH I FRAMTIDEN – HUR SKA STORSKALIGA SEKVENSDATA KUNNA ANALYSERAS?

För att möta de kommande behoven av att hitta allt fler förändringar, hitta olika typer av mönster och samtidigt kunna vidga analyserna till fler tumörformer krävs en rejäl ökning av sjukvårdens kapacitet för att generera och analysera sekvensinformation. Detta arbete är sedan en tid igång inom ramen för det nationella initiativet Genomic Medicine Sweden (GMS). De första diskussioner som ledde till dagens GMS tog sin början under 2016 inom delar av en annan satsning på bland annat storskalig sekvensering, SciLifeLab. Grundtanken var att ta avstamp i de strukturer som byggts upp på forskningssidan och avpassa dessa för kliniska behov. Projektet har nu finansiering från Vinnova, till att börja med till och med år 2020, för att både bygga upp en nationell struktur för informatik och samtidigt etablera centra för medicinsk genomik vid de sju universitetssjukhusen (Fig. 2). Tanken med den nationella strukturen är att kunna göra det möjligt att utveckla och bioinformatiskt stödja analyser som de en-



skilda laboratorierna skulle få svårt att med rimlig resursåtgång sätta upp själva och att kunna samla och dela genomiska data av stort värde både för löpande diagnostik och utveckling av kommande analyser. Informationen kan samtidigt förväntas kunna bli utomordentligt värdefull för såväl forskning som industri. Nuvarande medel kommer att möjliggöra en uppbyggnad av en basal nationell struktur, uppstart av regionala centra samt validering och implementering av en första generation bred diagnostik för bland annat solida tumörer och hematologiska maligniteter. Några medel för utvidgad testning har samtidigt inte erhållits och den långsiktiga finansieringen för samarbetet är en central fråga att lösa.

#### 6. PÅGÅENDE SVENSKA SEKVENSERINGSSTUDIER

ALASCCA är en nationell randomiserad placebokontrollerad studie som undersöker nyttan av acetylsalicylsyra till patienter med kolorektalcancer och mutationer i PI3K. Här används en multigenpanel i screening av alla tumörer. Paneldesign och logistik är ett samarbete mellan Karolinska Institutet, Science for Life Laboratory, avdelningen för klinisk patologi samt klinisk genetik vid Karolinska Universitetssjuk-

huset. Vid Karolinska Universitetssjukhuset utförs samtidigt en prospektiv sekvenseringsstudie med samma multigenpanel där målsättningen är att sekvensera 100 bröstcancrar och 100 lungcancrar och generera behandlingsrekommendationer baserat på genprofiler.

På nationell nivå är Megalix (Molecularly Guided Anti-Cancer Drug Off-Label Trial), ett samarbete mellan Uppsala, Skåne och Västra Götalandsregionen, under uppstart. Multicenterstudien är en prospektiv, fas 2-studie som på ett strukturerat sätt följer upp målstyrd behandling off-label av hematologiska maligniteter och solida tumörer vald utifrån molekylär karakterisering.

I förlängningen är förhoppningen att erfarenheterna från dessa större studier ska kunna tas till vara av GMS och på så sätt kunna utnyttjas av hela den svenska sjukvården.

Sammanfattningsvis är det en otroligt spännande tid med möjligheter att tillgängliggöra individanpassad cancer-sjukvård genom tumörsekvensering. Det kommer dock krävas fortsatta, omfattande investeringar och mycket arbete innan landstingsdriven bred panelsekvensering finns tillgänglig för alla patienter.

#### REFERENSER

1. Lander ES et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860–921.
2. Ng SB et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*. 2009 Sep 10;461(7261):272–6.
3. Perou CM et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
4. Robson M et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med*. 2017 Aug 10;377(6):523–533.
5. Merker JD et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol*. 2018 Jun 1;36(16):1631–1641.
6. FDA grants accelerated approval to pembrolizumab for first tissue/site agnostic indication. (<https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm560040.htm>)

JOHAN HARTMAN, DOCENT, SPECIALISTLÄKARE, KLINISK PATOLOGI OCH CYTOLOGI, KAROLINSKA UNIVERSITETSLABORATORIET OCH KAROLINSKA INSTITUTET, STOCKHOLM, JOHAN.HARTMAN@KI.SE



ANDERS EDSJÖ, ÖVERLÄKARE, SEKTIONSCHEF FÖR KLINISK PATOLOGI VID SKÅNES UNIVERSITETSSJUKHUS I LUND, ANDERS.EDSJO@SKANE.SE

