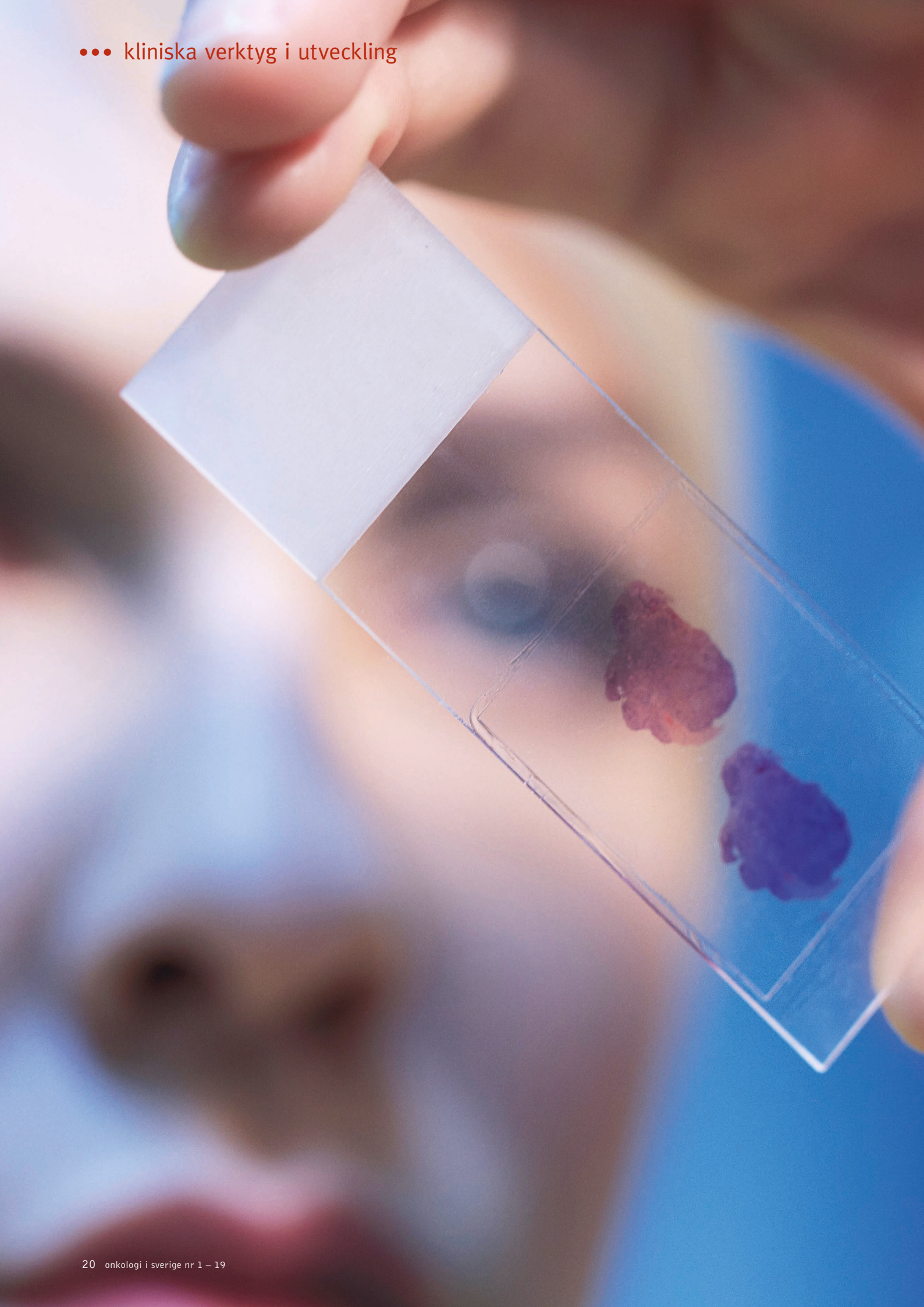






HÖGA FÖRVÄNTNINGAR:

Vad kan analyser av cellfritt tumör-DNA bidra med?

Det återstår mycket arbete innan analys av cellfritt tumör-DNA går att använda som ett värdefullt kliniskt verktyg. Däremot är det uppenbart att många av de möjligheter som metoden medför, som en bättre och säkrare patientuppföljning samt möjligheter till en mer individanpassad behandling, är något som kommer att efterfrågas allt mer inom den närmaste framtiden. Det skriver **Christoffer Vannas**, ST-läkare vid Sahlgrenska Universitetssjukhuset och doktorand vid Cancercentrum, Göteborgs universitet, i en aktuell översikt av fältet.

Vid behandling av cancer är det av central betydelse att vi har markörer att följa för att utvärdera behandlingsrespons. För detta har vi ett flertal olika metoder som vi använder oss av i vår kliniska vardag. Några exempel är klinisk utvärdering med inspektion och palpation, radiolo-

gisk utvärdering, eller mätning av tumörspecifika biomarkörer. Några vanliga tumörrelaterade biomarkörer är till exempel PSA för diagnostisk hjälp och behandlingsutvärdering i samband med prostatacancer, eller CA199 vid pankreas- och gallgångscancer. Biomarkörer är ett stort hjälpmedel i vår kliniska vardag, men användningen och tolkningen av dem är inte okomplicerad. Ett vanligt problem med biomarkörer är att de har en låg specificitet, det vill säga uttrycks även i en frisk population och påverkas av andra orsaker som inte har med cancer att göra. PSA kan bland annat stiga vid prostatit eller vid benign prostatahyperplasi (BPH), medan CA199 kan stiga vid alla former av gallstas.

Då en stor andel av alla tumörformer inte har någon tillförlitlig biomarkör för utvärdering av behandlingsrespons, och då många av nuvarande biomarkörer inte är tillräckligt tillförlitliga för att vi ska våga basera våra kliniska beslut på dem, är vi för de flesta patienter beroende av radiologisk utvärdering för bedömning av behandlingsrespons. Detta är ett problem, dels på grund av doserna joniserande strålning patienterna utsätts för vid upprepade DT- och slätröntgenundersökningar, dels på grund av det ökade remissflödet till en redan pressad röntgenverksamhet, då patienter med onkologiska sjukdomar blir allt fler och lever allt längre. Det finns således ett stort behov av att finna nya metoder för mer specifik, säkrare och billigare uppföljning av våra patienter. Frågan är om analys av cellfritt tumör-DNA är en möjlig metod för att lösa detta problem?

KLINISKA APPLIKATIONER

Varje sekund dör och återskapas ungefär en miljon celler i vår kropp. När celler dör skickas fragment av deras DNA ut i blodbanan och bildar så kallat cirkulerande cellfritt DNA. DNA i blodomloppet har en kort halveringstid på under en timme, innan det bryts ned av nukleaser eller avlägsnas via det renala systemet. Förekomsten av cellfritt DNA upptäcktes av två forskare vid namn Mandel och Métais redan 1948 och används idag för ett flertal kliniska applikationer. Den mest kända är san-



Sjuksköterskan Anna Bursell tar prov på en patient på den onkologiska mottagningen vid Sahlgrenska Universitetssjukhuset.

”Det finns ett stort behov av att finna nya metoder för mer specifik, säkrare och billigare uppföljning av våra patienter. Frågan är om analys av cellfritt tumör-DNA är en möjlig metod för att lösa detta problem?”

nolikt ”Non-invasive Prenatal testing” (NIPT) för screening av trisomier vid fosterdiagnostik, via ett blodprov från modern. Analys av cellfritt DNA kan dock användas även för detektion av avstöttningsreaktioner hos immuntransplanterade individer, samt som en prognostisk markör vid trauman och brännskador, där höga nivåer av cellfritt tumör-DNA generellt kopplas till en sämre prognos^{1,2}.

År 1977 kom en studie som visade att cancerpatienter har högre nivåer av cellfritt DNA i sitt blodomlopp. Dessutom noterades det att patienter med metastaser och större tumörbörda hade större mängd cellfritt DNA i sitt blod. 12 år senare kom man fram till att detta beror på att cancerpatienter har yt-

terligare en källa av cellfritt DNA i sin blodbana, vilket är det DNA som utsöndras från tumörceller som genomgår apoptos eller nekros, så kallat cirkulerande cellfritt tumör-DNA (ct-DNA)¹. Det som särskiljer ct-DNA från friska cellers cellfria DNA är att ct-DNA innehåller de tumörspecifika mutationer som driver tumörutvecklingen. Dessa mutationer går med olika metoder att detektera och kvantifiera, vilket är det som är bakgrunden till att analys av ct-DNA idag är en kliniskt användbar applikation. Analys av ct-DNA är dock inte helt oproblematiskt. Det största problemet är att mängden ct-DNA i blodplasman ofta är mycket låg i förhållande till den som kommer från friska celler. Exakt hur stor mängd

ct-DNA utgör av den totala mängden cellfritt DNA varierar i olika studier beroende på tumörform och mätmetod. En studie på 30 kvinnor med metastaserad bröstcancer som publicerades 2013 visade till exempel att fraktionen ct-DNA låg på medianvärdet fyra procent, medan andra studier har visat både högre och lägre resultat^{1,3}.

”En fråga som kvarstår är dock om man kan förbättra överlevnaden för dessa patienter genom att komma in med tidigare behandling, något som ter sig rimligt, men som ännu inte kunnat visas i studier som fokuserar på analys av ct-DNA.”

NY TEKNIK HAR ÖKAT INTRESSET

Vedertaget är att lokaliserad sjukdom, samt tumörformer som skiljs från blodbanan genom anatomiska barriärer, som till exempel hjärntumörer, ofta har påtagligt lägre nivåer av ct-DNA⁴. Trots att två olika forskningsgrupper redan 1994 lyckades med att detektera en specifik NRAS-mutation i ct-DNA hos en patient med metastaserad pankreascancer respektive en patient med AML¹, är det inte förrän de senaste åren som analys av ct-DNA fått ett ökat intresse, till följd av en snabb teknikutveckling, som möjliggör allt bättre detektion av låguttryckta subpopulationer av celler. Idag finns det ett flertal olika metoder och strategier för analys av ct-DNA. En sökning på clinicaltrials.gov visar att det pågår över 100 studier för primär analys av ct-DNA på olika tumörformer och ytterligare ett hundratal studier som använder analys av ct-DNA som ett sekundärt utfallsmått. En pubmedsökning visar dessutom att det de senaste åren publicerats cirka 1 000 artiklar årligen som handlar om ct-DNA.

Det finns ett flertal applikationer som ct-DNA kan användas för. Några av de mest lovande applikationerna är primär diagnostik av tumörer som är svåra att biopsiera, monitorering av behandlingsrespons hos patienter som er-

håller kirurgisk och onkologisk behandling, screening av högrisktumörer med kända drivande mutationer, samt prognostisk bedömning efter avslutad behandling². Användning av ct-DNA för prognostiska bedömningar har visat mycket spännande resultat. I en studie från 2016, på 230 patienter som opererats för stadium 2 kolorektalcancer

erhöll 178 adjuvant kemoterapi. Av dessa patienter hade 14 detekterbart ct-DNA postoperativt. Efter att patienterna hade följts upp i mediantid 27 månader hade 11 av dessa 14 patienter (79 %) fått ett återfall i sin sjukdom, jämfört med enbart 16 av de 164 patienter (9,8 %) som inte hade mätbart ct-DNA postoperativt⁵. Studier har visat att ct-DNA i många tumörformer går att detektera 7,9-11 månader innan patienterna utvecklar ett lokalt recidiv, eller insjuknar med metastaserad sjukdom². En fråga som kvarstår är dock om man kan förbättra överlevnaden för dessa patienter genom att komma in med tidigare behandling, något som ter sig rimligt, men som ännu inte kunnat visas i studier som fokuserar på analys av ct-DNA.

FLERA OLIKA ANALYSMETODER

Idag finns det ett flertal olika metoder för analys av ct-DNA. Generellt kan metoderna delas in i de targetspecifika metoderna, som framförallt är PCR-baserade, samt de target-ospecifika metoderna, som använder sig av sekvensering. Förenklat kan man säga att PCR-specifika metoder med hög sensitivitet kan finna en i förvald känd mutation på en specifik nukleotid, men är dåligt lämpade för screening av bredare genpaneler eller för detektion av

okända mutationer. I en studie som publicerades i *Nature medicine* 2014 visade man till exempel att digital PCR för detektion av mutationer i ct-DNA hos 95 patienter med metastaserad koloncancer med kända KRAS- eller BRAF-mutationer, uppvisade en sensitivitet på 92 % och en specificitet på 98 %⁶. Sekvenserings specifika metoder är i sin tur bättre när man screenar efter okända mutationer, eller för analys av förbestämda, bredare genpaneler. Dessa metoder har dock en lägre sensitivitet och behöver en större mängd DNA för att kunna ge tillförlitligt resultat. Om man söker muterade alleler som utgör <1 % av den totala allelpoolen är det nästan omöjligt att med klassiska sekvenseringsmetoder få tillförlitligt resultat². Till följd av detta har det utvecklats ett flertal olika sekvenseringsmetoder, som på olika sätt försöker att höja sensitiviteten i analyserna.

En ny metod för sekvensering av cellfritt tumör-DNA, som för närvarande används i ett flertal olika projekt på Sahlgrenska Universitetssjukhuset i Göteborg är SimSen-seq (Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA enables sensitive mutation detection in liquid biopsies using sequencing). SimSen-seq är en sekvenseringsmetod, där bland annat specialkonstruerade hairpin-primers används för barcode-inmärkning av targetgener, för att höja sensitiviteten av sekvenseringen (fig 1). Metoden, som utvecklats av Anders Ståhlberg (docent på Cancercentrum, Göteborgs universitet) i samarbete med kollegor på Boston Universitet, är snabb, billig och sensitiv, och möjliggör parallell detektion av multipla muterade alleler som utgör <0,1 % av den totala allelpoolen⁷. Med Anders Ståhlberg som ansvarig provare pågår just nu ett flertal projekt som syftar till att analysera ct-DNA hos patienter med olika tumörsjukdomar. För närvarande pågår provinsamling hos patienter med bröstcancer, kolorektalcancer, prostatacancer, lungcancer, melanom, sarkom och pediatrika maligniteter.

ÄVEN VID LOKALISERAD SJUKDOM

En av de stora styrkorna med SimSen-seq är möjligheten att monitorera patienter med relativt liten tumörbörda, vilket möjliggör monitorering av pa-

"Ett exempel på hur man kan tillämpa metoden är att utgå från patientspecifika mutationer, som framtagits genom sekvensering av patientens primärtumör, och följa dem i ct-DNA före, under och efter behandling."

tienter även med lokaliserad sjukdom. Ett exempel på hur man kan tillämpa metoden är att utgå från patientspecifika mutationer, som framtagits genom sekvensering av patientens primärtumör, och följa dem i ct-DNA före, under och efter behandling. Ett annat alternativ är att analysera patienter utifrån tumorspecifika genpaneler. Maligna melanom har till exempel ofta drivande MAPK- eller PI3K-mutationer (BRAF, NRAS, PTEN, MEK1 etc.). Genom att analysera en genpanel med gener som ofta är muterade i melanom, kan man få värdefull information om tumörcellsheterogenitet, då en biopsi, eller en bortopererad tumör, inte alltid är representativ för hela tumörbördan. Tumörer kan ha olika subpopulationer både mellan och inom olika tumörnedslag, där värdefull information om lämplig målriktad behandling kan tillföras genom analys av ct-DNA. Genom analys av tumorspecifika genpaneler kan SimSen-seq även visa tecken till resistensmekanismer mot målriktad terapi. Vid kombinerad BRAF/MEK-inhibition av BRAF-muterade melanom är några vanliga resistensmekanismer uppströms mutation av NRAS, amplifiering av muterat BRAF eller MEK, eller nytillkomna mutationer av PTEN eller AKT[®]. De här genetiska förändringarna kan fångas upp och hjälpa till att styra fortsatt terapi. Genpanelerna man analyserar metoden med kan i princip göras hur stora som helst, begränsande faktor är att sekven-

seringskostnaderna går upp ju större genpaneler man väljer att analysera.

Innan analys av cellfritt tumör-DNA kommer att kunna införas i klinisk praxis finns det även en del praktiska problem att lösa, framförallt i samspelet mellan labb och klinik. För att kunna få tillförlitligt sekvenseringsresultat från patientens primärtumör finns det ett stort värde av färskfrusen biopsivävnad eller operationspreparat. Formalinfixering av vävnad, som ofta görs i klinisk rutin, korslinkar DNA, vilket påtagligt försvårar sekvensering av primärtumörer. Provhanteringen är också ett kritiskt steg där mycket kan gå fel. Det är till exempel viktigt att använda heparinfria rör vid provtagning, då heparin negativt påverkar senare analyser, samt att man centrifugerar fram plasma snabbt, då hemolys av vita blodkroppar ökar på den totala mängden cellfritt DNA, och späder ut mängden ct-DNA ytterligare. Det är även viktigt att ha en i förväg genomtänkt provtagningsstrategi, provtagningsrutin, samt att tajma provtagningen väl under behandling, då ct-DNA har kort halveringstid i blodomloppet.

Mycket arbete återstår innan analys av ct-DNA går att använda som ett värdefullt kliniskt verktyg. Däremot är det uppenbart att många av de möjligheter som metoden medför, som en bättre och säkrare patientuppföljning samt möjligheter till en mer individanpassad behandling, är något som kommer att efterfrågas allt mer inom den närmaste

framtiden. Förväntningarna på vad analys av ct-DNA kan bidra med är höga, och det kommer att bli spännande att se om analyserna kan leva upp till förväntningarna.

REFERENSER

1. Volik, S., et al., Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Mol Cancer Res*, 2016. 14(10): p. 898-908.
2. Stewart, C.M. and D.W.Y. Tsui, Circulating cell-free DNA for non-invasive cancer management. *Cancer Genet*, 2018.
3. Dawson, S.J., N. Rosenfeld, and C. Caldas, Circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 2013. 369(1): p. 93-4.
4. Bettgowda, C., et al., Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*, 2014. 6(224): p. 224ra24.
5. Tie, J., et al., Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*, 2016. 8(346): p. 346ra92.
6. Thierry, A.R., et al., Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med*, 2014. 20(4): p. 430-5.
7. Stahlberg, A., et al., Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA enables sensitive mutation detection in liquid biopsies using sequencing. *Nucleic Acids Res*, 2016. 44(11): p. e105.
8. Spagnolo, F., P. Ghorzo, and P. Queirolo, Overcoming resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutated metastatic melanoma. *Oncotarget*, 2014. 5(21): p. 10206-21.

CHRISTOFFER VANNAS, ST-LÄKARE, ONKOLOGISKA KLINIKEN, SAHLGRENSKA UNIVERSITETSSJUKHUSET OCH DOKTORAND VID CANCERCENTRUM, GÖTEBORGS UNIVERSITET, CHRISTOFFER.VANNAS@VGREGION.SE

