

ИЗЧЕРПАТЕЛНО ГЕНОМНО СЕКВЕНИРАНЕ И НОВИ ВЪЗМОЖНОСТИ В ЛЕЧЕНИЕТО НА РАКА

КОНЦЕПЦИЯТА ЗА ПРЕЦИЗНАТА МЕДИЦИНА Е ПОЗНАТА още от 60^{-те} години на миналия век. Напредъкът в генетичните технологии доведоха до бързото ѝ развитие. В онкологичната практика персонализираният подход означава определянето на най-точното и най-ефективно лечение въз основа на индивидуалния геномен профил на тумора на пациента. Провеждането на молекулярно изследване за определяне на наличието на предиктивни биомаркери, е стандарт в грижата за пациентите с онкологични заболявания. С традиционно използваните методи за изследване на предиктивни биомаркери се търсят предварително определени изменения в единични гени или експресия на онкогенни протеини, напр. PD-L1 (Programmed Death Ligand 1).



**проф. д-р Асен
Дугов, гмн**

Медицински директор и началник Клиника по медицинска онкология, Аджигадем Сити Клиник УМБАЛ Младост, гр. София

В последните години секвенирането от следващо поколение (NGS – Next Generation Sequencing) се налага като подход за едновременно изследване на множество геномни промени с използването на една-единствена проба. Геномното профилиране, използващо NGS с хибридно улавяне, което изследва всички известни, свързани с рака гени, се нарича изчерпателно геномно секвениране (CGP – Comprehensive Genomic Profiling).

Работният процес завършва с оформяне на подробен доклад, който разширява и дава нови възможности за лечение на пациента. Геномното профилиране подпомага взимането на клинични решения. Геномното профилиране улеснява прилагането на клиничните ръководства, участието на пациентите в „mechanism-driven“ клинични проучвания,

приложението на т.нар. тумор-агностично лечение и молекулярно насочени терапевтични възможности. Изчерпателното геномно профилиране подпомага постигането на по-добри дългосрочни резултати за пациентите с рак.

Прецизна медицина и персонализиран подход в онкологията

Концепцията за прецизната медицина е позната още от 60^{-те} години на миналия век. Напредъкът в генетичните технологии, на първо място, и развитието на генотипизирането и микрочиповете, като водещи направления, доведоха до по-нататъшното ѝ развитие^[1]. Днес, под прециз-

на или персонализирана медицина се разбира адаптация на цялостния диагностично-терапевтичен подход в това число и лечебните интервенции към индивидуалните характеристики на пациента и неговата болест, което е принципно различно от конвенционалния подход на определяне на лечението въз основа на фенотипни особености. Това обаче води и до редица нови предизвикателства пред трансформирането на грижата за болните; от предклиничното определяне на механизма на действие на таргетните лекарства и разработването на класификации на заболяванията, въз основа на молекулярните им характеристики до използването на все по-прецизната диагностика, разработването и провеждането на принципно нови, като дизайн, клинични проучвания, и внедряването в клиничната практи-

ключови думи:
персонализирана,
биомаркери,
секвениране,
изчерпателно,
профилиране,
възможности,
ползи

ка на голям брой иновации за кратък период от време^[2,3].

В онкологичната практика персонализиранят подход означава определянето на най-точното и най-ефективно лечение въз основа на индивидуалния геномен профил на тумора на пациента в комбинация с онези уникални характеристики, които отличават пациентите един от друг. От друга страна, раковото заболяване еволюира в хода на провежданото лечение с появата на нови геномни характеристики, което налага периодичен мониторинг за адаптиране на прилаганата терапия и постигане на най-добри дългосрочни резултати^[4].

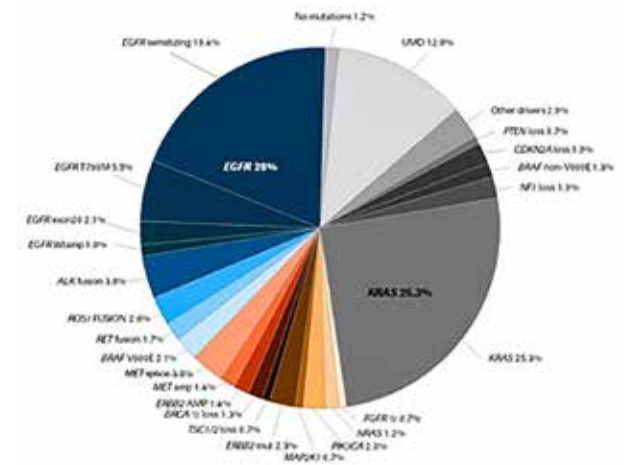
Биомаркери в онкологията, традиционни диагностични методи и секвениране от следващо поколение (NGS)

Има три различни типа биомаркери: прогностични, фармакодинамични и предиктивни. Прогностичните биомаркери подсказват вероятния изход от заболяването и може при определени условия да определят необходимостта от провеждане на допълнителна терапия (напр. адювантна терапия при висок риск от рецидив при рак на гърдата). Фармакодинамичните биомаркери измерват ефекта на прилаганото лекарство върху определени характеристики на заболяването (напр. нивото на пролиферация или апоптоза в туморните клетки). Предиктивните биомаркери от своя страна определят вероятността туморът да отговори на лечение с конкретно лекарство и подпомагат персонализирането на лечение при пациентите с онкологични заболявания^[5].

Провеждането на молекулярно изследване за определяне на наличие-

то на предиктивни биомаркери, е стандарт в грижата за пациентите с онкологични заболявания. При някои тумори, като например рака на белия гроб, са идентифицирани множество изменения (геномни алтерации) в редица гени, които могат да повлияят върху избора на терапия (Фиг. 1). Съвременната клинична практика включва изследване за откриване на терапевтични таргети, т.нар. „driver“ алтерации и тестване за биомаркери, свързани с прилагането на таргетна терапия и имуно-онкологично лечение^[6]. Изследването за наличие на тези биомаркери е важно не само за определяне на най-правилната терапия, но и за избягване на лечение, с липса на клинична полза за пациента^[7] (Фиг. 1).

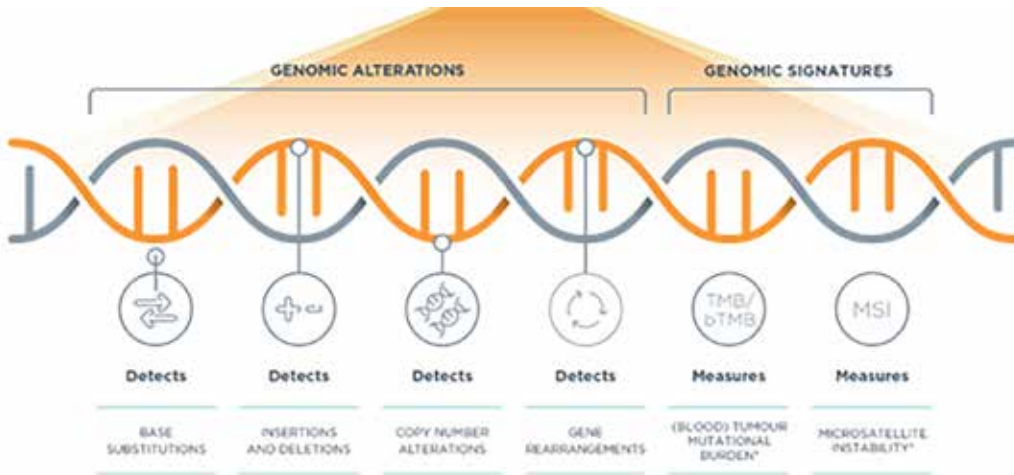
С традиционно използваните методи за изследване на предиктивни биомаркери се търсят предварително определени изменения в единични гени или експресия на онкогенни протеини, напр. PD-L1 (Programmed Death Ligand 1)^[8,9]. Най-често използваните традиционни диагностични методи са: имунохистохимията (ИХ - ImmunoHistoChemistry), флуоресцентната in-situ хибридизация (FISH - Fluorescent In-Situ Hybridization) и полимеразната верижна реакция (PCR - Polymerase Chain Reaction). Много важно от клинична гледна точка е, че при някои видове тумори може да се наложи провеждането на множество единични тестове с някои или всички от посочените методи^[8,10]. Това може да доведе до изчерпване на нерядко оскъдните тъканни проби и невъзможност за покриване на нуждите от биомаркерни изследвания, при тези пациенти. Тук на помощ идва т.нар. течна биопсия или изследване на циркулираща туморна ДНК. Тя се използва и в случаите, когато пациентът



Фигура 1: Спектър на геномни алтерации, при аденокарцином на белия гроб. *860 пациенти с белодробен аденокарцином MSK-IMPACT = Memorial Sloan Kettering Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets

не би могъл да понесе провеждането на нова инвазивна процедура^[11], както и за мониторинг - при поява на резистентност към провежданото лечение^[7]. Друго ограничение на традиционните диагностични методи е, че те не могат да идентифицират едновременно всички класове геномни алтерации: субституции (mutations), инсерции/делеции (insertions/deletions), промяна в броя на копията (copy number alterations) и генни пренареждания (gene rearrangements)^[8,9], както и клинично важни геномни сигнатури, като туморен мутационен товар (TMB - Tumor Mutational Burden), MSI (Microsatellite Instability) и загуба на хетерозиготност (LOH - Loss Of Heterozygosity).

В последните години секвенирането от следващо поколение (NGS - Next Generation Sequencing) се налага като подход за едновременно изследване на множество геномни промени с използването на една единствена проба^[12]. NGS е процес с висока производителност, който определя ДНК последователността и може да се приложи в различни мащаби - от изследване на група клинично важни гени (панелно секвениране) до описание на целия гене-



Фигура 2:
Обхват на изчерпателното геномно профилиране

тичен код на клетката (цялостно геномно секвениране). Термините второ и трето поколение секвениране или секвениране от следващо поколение (NGS) се използват синонимно за описание на еволюцията на технологията за секвениране от първо поколение – "Sanger" секвениране^[13]. Принциплът обаче остава същият – ДНК полимеризацията катализирана включването на флуоресцентно белязани нуклеотиди във верига на ДНК шаблон по време на последователни цикли на синтеза. По време на всеки цикъл нуклеотидите се идентифицират чрез флуорофорни етикети и така се описва таргетната ДНК последователност. Основната разлика е, че вместо секвениране на един ДНК фрагмент при NGS този процес протича в милиони фрагменти паралелно. Този подход намалява времето за получаване на резултат, предоставяйки по-икономично решение и намалявайки риска от изчерпване на ценни биологични проби.

Изчерпателно геномно секвениране (CGP)

– Comprehensive Genomic Profiling)

Геномното профилиране, използващо NGS с хибридно улавяне, което изследва всички известни, свързани с рака гени, се нарича изчерпателно геномно секвениране (CGP). CGP идентифицира и четирите класа геномни алтерации в изследваните гени; в допълнение определя комплексни геномни сигнатури – TMB и MSI (Фиг. 2).

Туморният мутационен товар е количествена мярка за броя на соматичните несинонимни мутации за кодиращ регион и се измерва в брой мутации на мегабаза (mut/Mb)^[13]. Микросателитната нестабилност (MSI) се характеризира с висока честота на алтерации в повтарящи се ДНК последователности, причинени от нарушение в Mismatch Repair (MMR) на ДН^[14].

CGP (Comprehensive Genomic Profiling)

Изчерпателното геномно профилиране дава информация за загуба на хетерозиготност (LOH – Loss Of

Heterozygosity) и свързаната с това HRD (Homologous Recombination Deficiency), нов и обещаващ биомаркер за идентифицирането на пациенти с рак (напр. овариален карцином), които биха имали полза от лечение с PARP инхибитори и други лекарства, таргетиращи възстановяването на ДНК. Базираното на течна биопсия профилиране определя и туморната фракция (tumor fraction) или процента на свободна циркулираща туморна ДНК от общата безклетъчна ДНК в пробата.

Това е определящо за чувствителността на изследването за установяване на геномни алтерации в течната биопсия. Важно е отново да се подчертае, че изчерпателното геномно профилиране предоставя подробна информация за геномния профил на тумора на пациента при еднократно изследване, което позволява избягване на изчерпването на наличния материал от повтарящи се изследвания и нови биопсични процедури^[15].

Работният процес завършва с оформяне на подробен доклад, който разширява и дава нови възможности за лечение на пациента. В него се посочват установените клинично-значими алтерации, препоръчителни терапии с данни за клинична полза за съответната алтерация, терапии с очаквана резистентност, резултати с прогностично значение, липса на важни очаквани алтерации и информация за налични клинични проучвания, за които е подходящ пациент с такива геномни характеристики на раковото заболяване (Фиг. 3).

Нови възможности в лечението на

рака

Геномното профилиране подпомага взимането на клинични решения за персонализиране на грижата за пациентите с рак. Биомаркерното изследване с профилиране улеснява реализирането на препоръките, залегнали в международните и национални ръководства при пациенти с рак. Резултатите от профилирането на 6832 проби на пациенти с авансирал НДРБД показват, че 71% (4876) имат поне една геномна алтерация в EGFR (20%), ALK (4.1%), BRAF (5.7%), ERBB2 (6.0%), MET (5.6%), ROS1 (1.5%), RET (2.4%) и KRAS (32%) гените. Допълнителен анализ на включените аденокарциноми (5380) открива алтерации в още 273, свързани с рака гени, с честота поне 0.1% от случаите като: PIK3CA (5.4%), CDK4 (4.3%), BRCA2 (2.5%), NRAS (2.3%), BRCA1 (1.7%), MAP2K1 (1.2%), NTRK1 (0.7%), NTRK3 (0.2%) и др. В допълнение геномното профилиране идентифицира множество допълнителни, потенциално таргетируеми геномни алтерации, включващи едни и същи грайверни онкогени, включително 401 случая (5.9%) с EGFR амплификация, 203 случая (3.0%) с BRAF пов- V600E точкови мутации, 12 случая (0.2%) с пренареждане на BRAF и 208 случая (3.0%) с ERBB2 амплификация. Мутации на резистентност на EGFR T790M са идентифицирани в 221 случая (3.2%), а ALK резистентни мутации са идентифицирани в 9 случая (0.1%)^[16].

Освен за оптимален избор на лечение в първа или последващи линии при прогресия, профилирането би помогнало за идентифицирането на пациенти, които биха имали полза от участие в т.нар. „mechanism-driven“ клинични проучвания. Понастоящем са налични стотици клинични проуч-



вания, които изследват и оценяват таргетни терапии, насочени срещу геномни алтерации в над 150, свързани с рака гени^[16].

Секвенирането от следващо поколение доведе до разработката и одобрението на тъканно-агностични имунотерапии и таргетни терапии в онкологията^[17]. Първата от които, е одобрението от FDA (US Food and Drug Administration) на pembrolizumab за лечение на пациенти с метастатични тумори с MSI-H, а през 2020 г. и за пациенти с авансирани TMB-H (TMB ≥ 10 mut/Mb) тумори^[18,19]. Геномното профилиране може да подпомогне прилагането и на друга тумор-агностична терапия, тази насочена към алтерации в NTRK гена (Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase) при пациенти с авансирани солидни тумори, носители на тази геномна промяна^[20].

Профилирането има потенциал да ускори достъпа до иновативни медицинашки технологии при заболявания с малко или липсващи одобрени лечения, когато откритата геномна алтерация може да се таргетира с лекарства, за които има доказателства за клинична полза, но при тумори с хистология, различна от тази на пациента^[21].

Заклучение

Изчерпателното геномно профилиране е голяма и важна крачка напред с развитието на персонализирания подход в грижата за пациенти в онкологията, предоставяйки информация за геномния профил на тумора и позволявайки вземането на ефективни клинични решения, основани на доказателства. Това безспорно ще доведе до нови възможности и подобряване на дългосрочните резултати за пациентите с рак^[22]. ■

фигура 3:
Изчерпателно геномно профилиране – работен процес

Книгопис:

1. Agyeman A and Ofori-Asenso R J Pharm Bioallied Sci. 2015 Jul-Sep; 7(3): 239–244.
2. Ciardiello F, Arnold D, Casali PG et al. Ann Oncol 2014;25(9):1673–1678.
3. Yates LR, et al. Annals of Oncology 2017;0:1–6.
4. Bode, A. M., and Dong, Z., 2018 npjPrecision Onc2:11.
5. La Thangue, N., Kerr, D. Nat Rev Clin Oncol 2011 8, 587–596.
6. Planchard D, et al Ann Oncol 2018 29 (suppl 4): iv192–iv237 updated Sept 2019.
7. NCCN Clinical practice guideline NSCLC v1.2022–Dec 7, 2021.
8. Naidoo, J. and Drilon, A. Am J Hematol Oncol 2014;10(4):4-11.
9. Frampton, G.M., et al. Nature Biotechnol 2013;31:1023-31.
10. Drilon, A., et al. Clin Cancer Res 2015;21(16):3631-9.
11. Jordan EJ et al. Cancer Discov. 2017;7:596-609.
12. Pennell NA, et al. DOI: 10.1200/PO.18.00356 JCO Precision Oncology – published online May 16, 2019.
13. Meléndez, B., et al. Transl Lung Cancer Res 2018; 7:661-7.
14. Boland, C.R. and Goel, A. Gastroenterology 2010; 138:2073-87.
15. ФТР (Фармако-терапевтично ръководство) по медицинска онкология, Наредба № 11 от 17 октомври 2019 г. за приемане на фармако-терапевтично ръководство по медицинска онкология, обн. в ДВ, брой 85 от 29.10.2019 г.
16. Suh, J. H., et al. The Oncologist 2016;21:684-691.
17. Adashek JJ et al. Trends in Cancer 2021;7:1: 15-28.
18. Yan, L., and Zhang, W. Cancer Commun 2018;38:6.
19. <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-adults-and-children-tmb-h-solid-tumors> (accessed 28 Feb 2022)
20. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/121725Orig1s000,%20212726Orig1s000TOC.cfm (accessed 28 Feb 2022)
21. Saulnier Scoller GL, et al. Cancer Medicine 2015, 4(6):871–886.
22. El-Deiry WS, Goldberg RM, Lenz HJ, et al. The current state of molecular testing in the treatment of patients with solid tumors, 2019. CA: a cancer journal for clinicians. 2019;69(4):305-343.