

Masivní paralelní sekvenace při volbě terapie v pneumoonkologii - možnosti a limitace

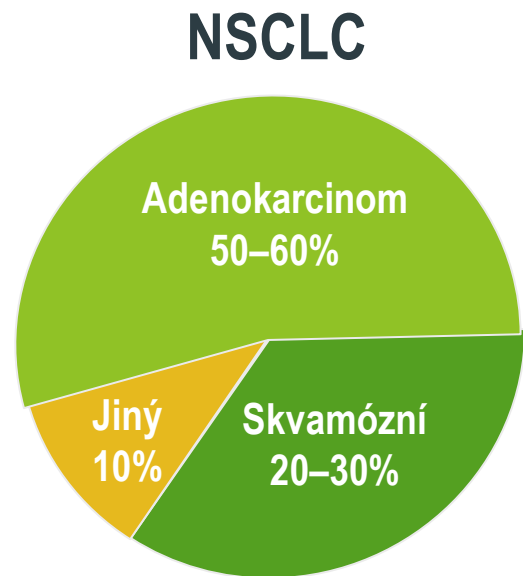
M. Pešek¹, T. Vaněček², P. Mukenšnabl², N. Ptáková²

¹Klinika PNE FN Plzeň, ²Šiklův ústav patologické anatomie FN Plzeň

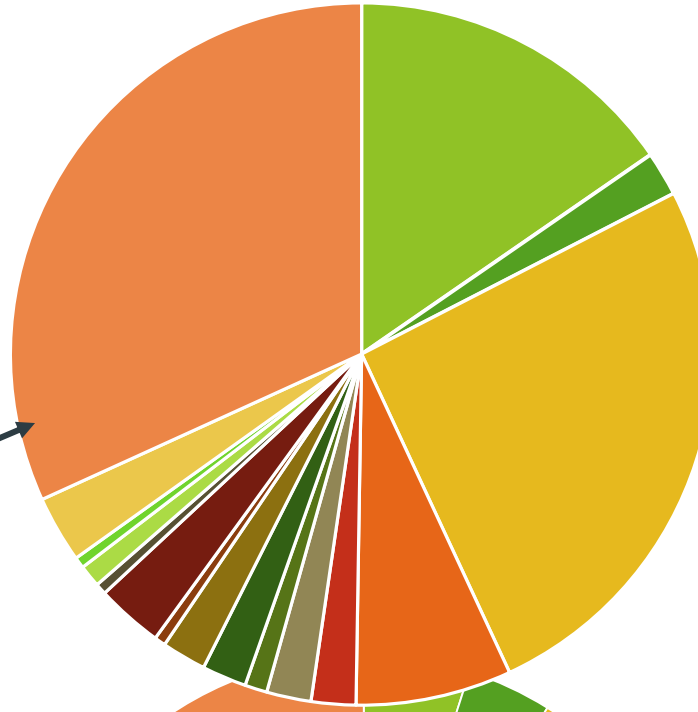
Úvod

Vyšetření nádorového genomu, které již v současné době využíváme, přineslo v posledním desetiletí řadu informací, které vedly ke změně léčebných paradigmat. Výsledky svědčí o tom, že karcinomy plic jsou skupina onemocnění ještě mnohem více heterogenní, než bylo patrné z výsledků histologických a imunohistochemických vyšetření.

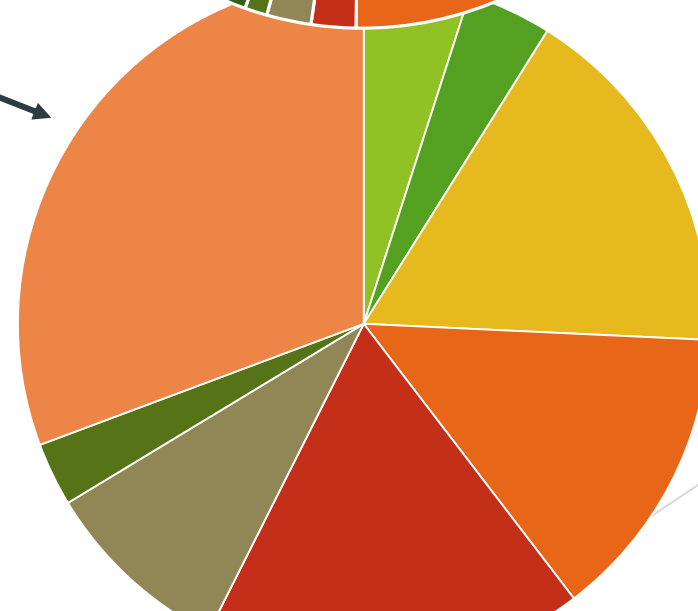
HISTOLOGICKÁ A MOLEKULÁRNÍ HETEROGENITA NSCLC



Adenokarcinom



Skvamózní karcinom



- EGFR-sensitizing (15%)
- EGFR other (2%)
- KRAS (25%)
- ALK (7%)
- HER2 (2%)
- BRAF V600E (2%)
- BRAF other (1%)
- ROS1 (2%)
- RET (2%)
- NTRK1 (0.5%)
- MET (3%)
- MAP2K1 (0.5%)
- PIK3CA (1%)
- NRAS (0.5%)
- EGFR vIII (5%)
- >1 mutation (3%)
- Unknown (31%)
- DDR2 (4%)

FGFR1 (17%)

PIK3CA (14%)

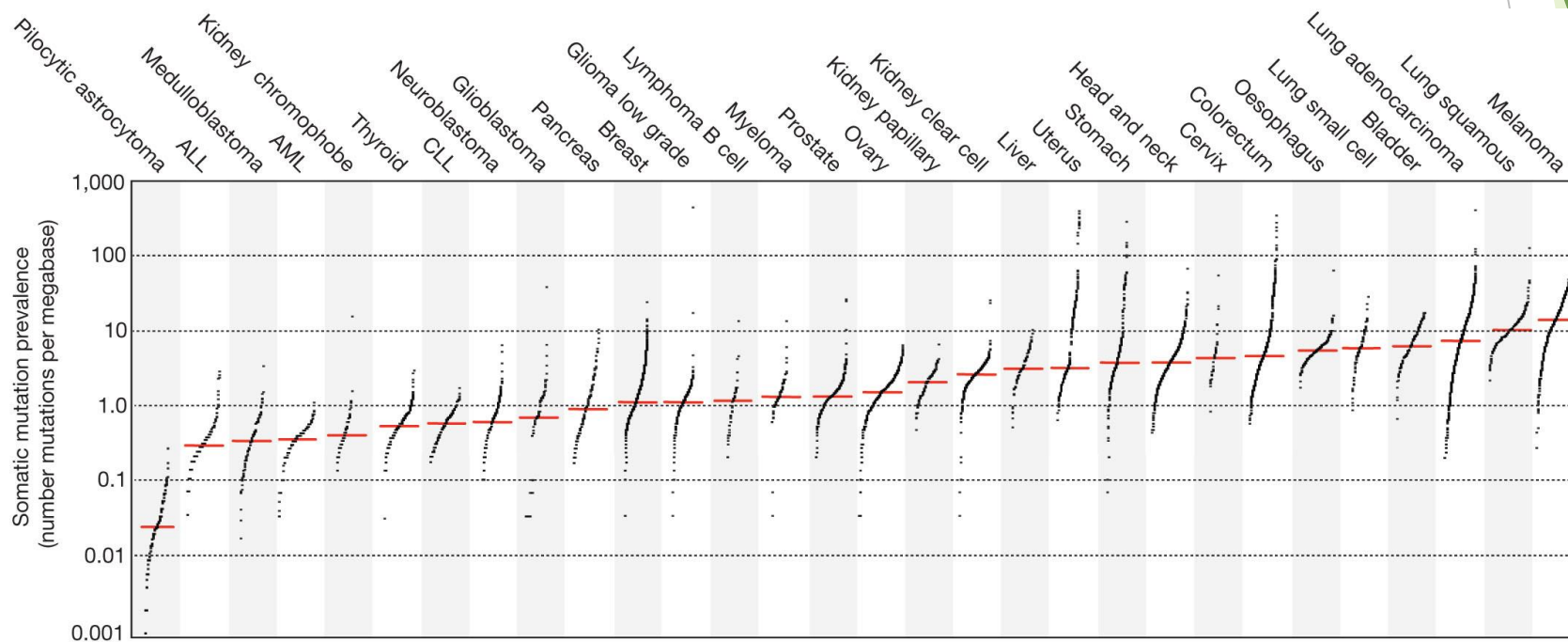
PTEN (18%)

PDGFRA (9%)

FGFR2 (3%)

Inter-nádorová variabilita

Prevalence somatických mutací u různých nádorových onemocnění



Různé typy nádorů jsou charakteristické různou mírou genomové nestability a počtem somatických mutací v nádorovém genomu!

NGS = Next generation sequencing

Masivně paralelní sekvenování

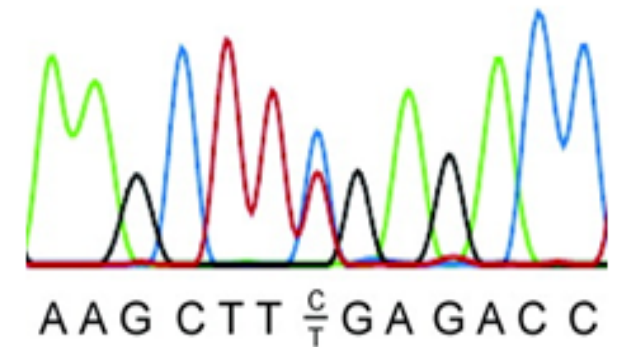
Masivní

► *Miliardy* sekvencí

Paralelní

► Jedno místo přečteno **nezávisle**
mnohokrát za sebou

AAGCTTCGAGACC
AAGCTTTGAGACC
AAGCTTCGAGACC
AAGCTTCGAGACC
AAGCTTTGAGACC
AAGCTTTGAGACC
AAGCTTCGAGACC



Výhody a nevýhody NGS oproti ostatním používaným metodám

► Výhody

- volitelná analytická citlivost, úzus 5 % mutované alely
- neomezené množství vyšetřovaných cílů
- vyžaduje malé množství vzorku
- detekuje všechny sekvenční varianty daného místa
- detekuje i neznámé fúzní varianty známého genu

► Nevýhody

- delší čas analýzy (~týden)
- nároky na kvalitu DNA (RNA výhodou u FFPE)
- Cena je variabilní a klesá s množstvím cílů/vzorků



1 jádro



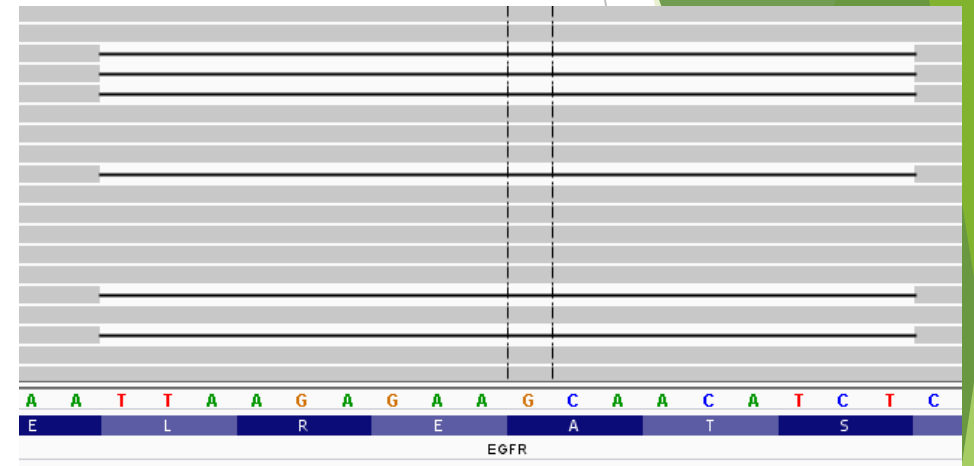
5%

NGS typy detekovaných změn

► Sekvenční mutace

substituce a malé inserce a delece

e19 EGFR c.2239-2256del18, p.Leu747_Ser752del

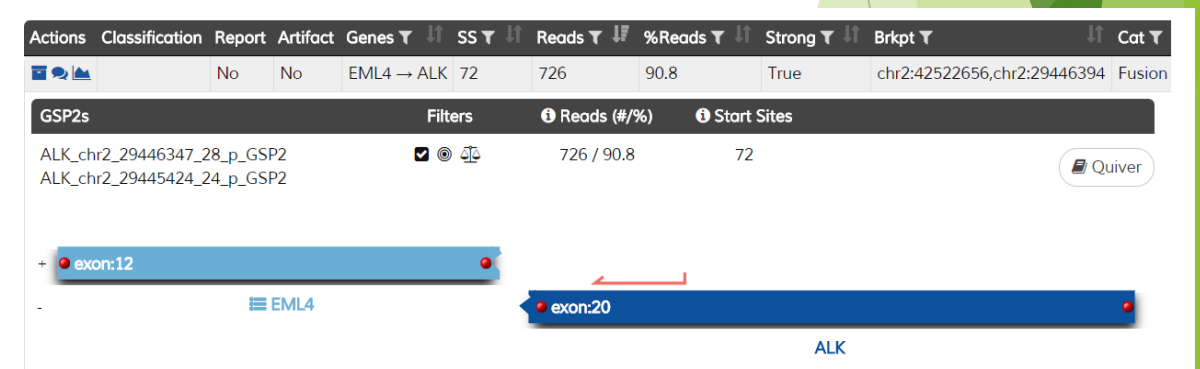


► Strukturní varianty

velké delece a inserce

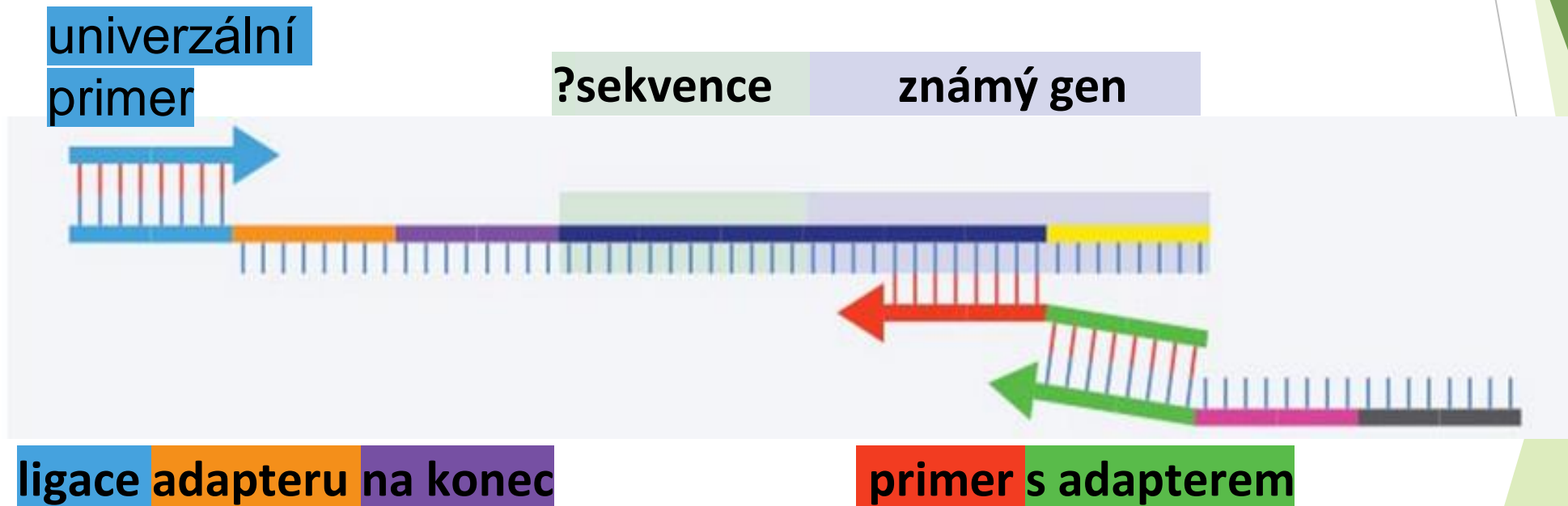
Translokace -> fúzní transkripty

EML4-ALK – spojení exonu 12 EML4 a exonu 20 ALK

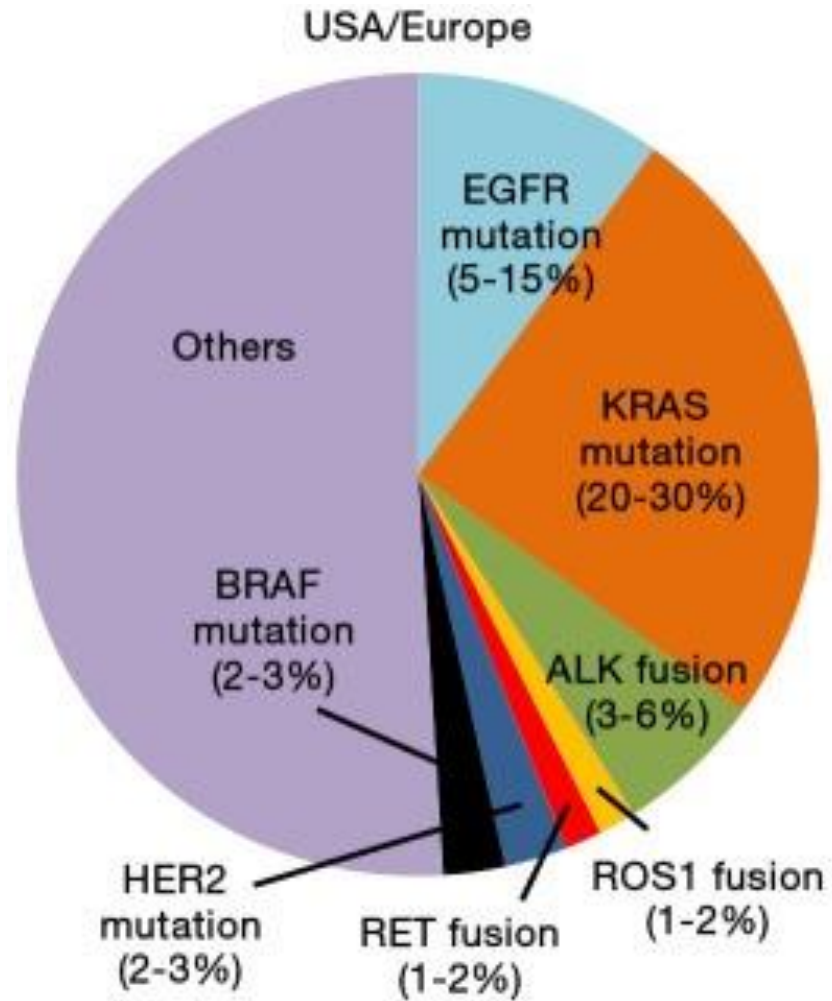


Kit Archer Fusion Plex

1 primerový systém – detekuje jakéhokoli fúzního partnera známého genu



Frekvence alterací nádorů plic - 1



Frekvence alterací nádorů plic - 2

Comprehensive Thyroid and Lung

– detekce **mutací** a fúzí 34 vybraných genů

AKT1, **ALK**, **AXL**, **BRAF**, CALC, CCND1, **CTNNB1**, **DDR2**, **EGFR**, **ERBB2**, FGFR1, FGFR2, FGFR3, **GNAS**, GPI, **HRAS**, CHMP2A, **IDH1**, **IDH2**, **KRAS**, KRT20, KRT7, **MET**, NRG1, NTRK1, NTRK, **MAP2K1**, **NRAS**, NTRK1 - 3, **PIK3CA**, PPARG, PTH, RAB7A, RAF1, **RET**, **ROS1**, SLC5A5, THADA, TTF1, VCP

½ případů má vzácnou aberaci

Statistika nalezených mutací 2017-dosud

| | | |
|--------------------|-----|-------|
| Vyšetřeno pacientů | 199 | |
| mutací nalezeno | 96 | 48,2% |
| NA | 17 | 9,5% |

| | | | populace |
|-----------------|----|-------|----------|
| KRAS | 54 | 27,1% | 20-30 % |
| EGFR | 24 | 12,1% | 5-15 % |
| METex14 | 9 | 4,5% | 3-4% |
| BRAF | 5 | 2,5% | 2-3 % |
| MET p.Thr992Ile | 2 | 1% | ? |
| CTNNB1 | 1 | 0,5% | 1,5 % |
| ERBB2 | 1 | 0,5% | 1-2% |

Statistika nalezených fúzí 2017-dosud

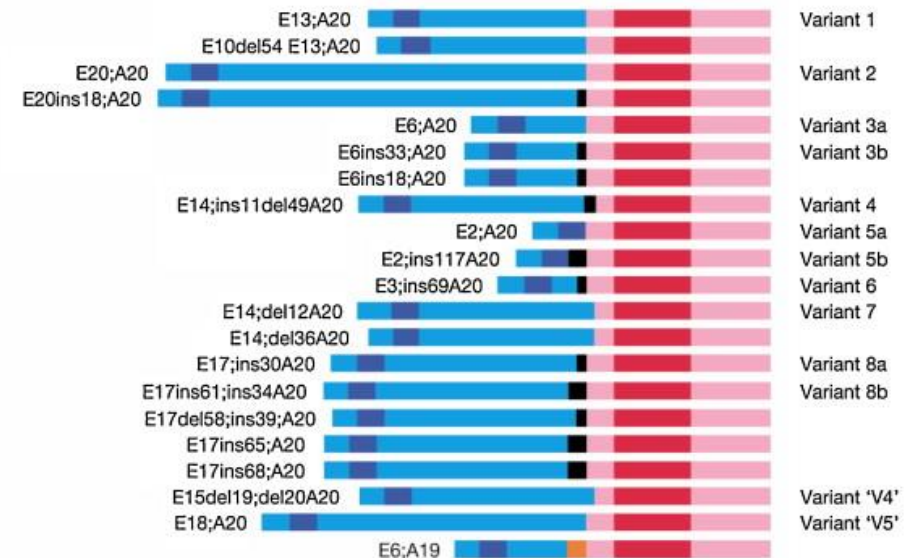
| Wyšetřeno | 199 | | | |
|---------------------|-----|------|------------|-------------------|
| Pozitivních | 21 | 12% | u plic | další alterace |
| EML4-ALK | 12 | 6% | 3-6% | KRAS p.(Gly12Asp) |
| PURA-ALK | 1 | 0,6% | | |
| TTYH3-ALK | 1 | 0,6% | | |
| EZR-ROS1 | 1 | 18% | 1-2% | |
| CD74-ROS1 | 1 | | | |
| CCDC6-ROS1 | 1 | | | |
| KIF5B-RET | 1 | 0,6% | 1-2% | |
| VAMP2-NRG1 | 1 | 0,6% | | |
| CHRNA6-FGFR1 | 1 | 0,6% | | METex14 |
| CDC23-BRAF | 1 | 0,6% | | |
| TPM3-NTRK1 | 1 | 0,6% | 0,23% - 3% | KRAS p.(Gly12Cys) |

Fúzní transkripty ALK

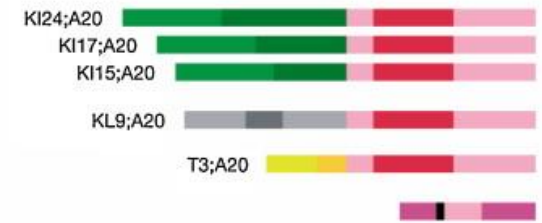
EML4-ALK
 KIF5B-ALK
 KLC1-ALK
 TGF-ALK
 DCTN1-ALK
 CLIP1-ALK
 GCC2-ALK
PURA-ALK
TTYH3-ALK

A

EML4-ALK



KIF5B-ALK



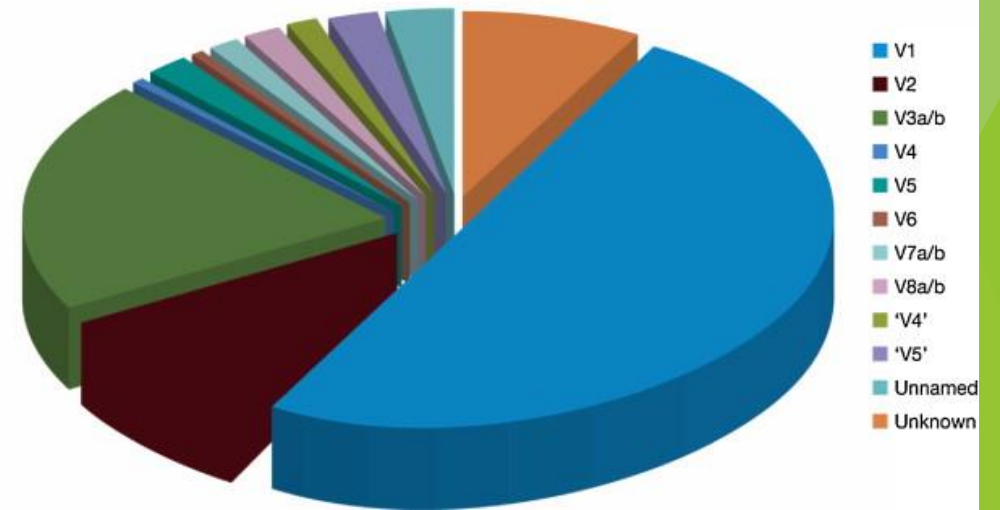
KLC1-ALK

TFG-ALK

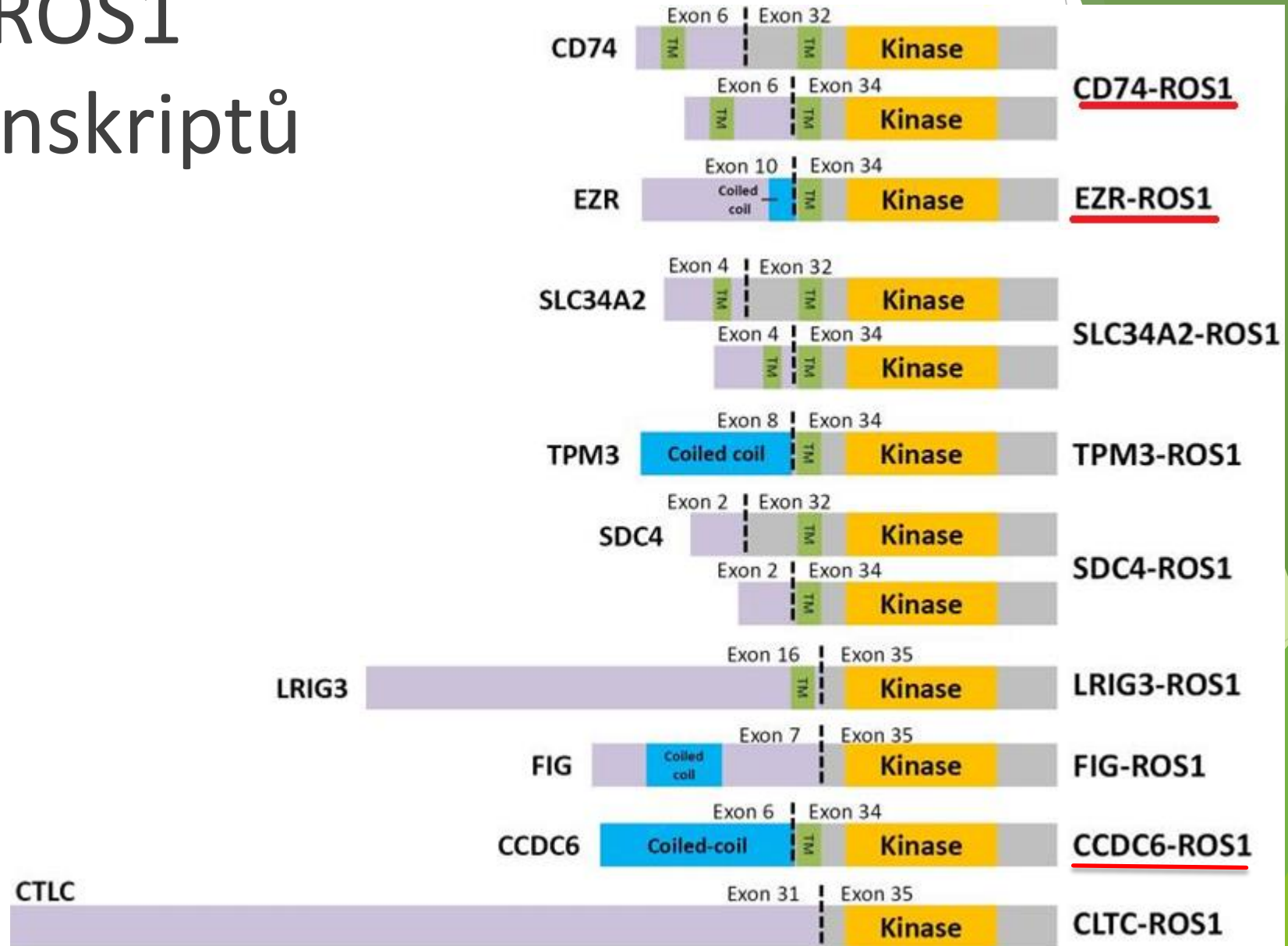
ALK-PTPN3

Legend: Blue, Green, Yellow, Grey, Red. Coiled-coil dimerization domains (Green, Yellow, Grey), ALK kinase domain (Red).

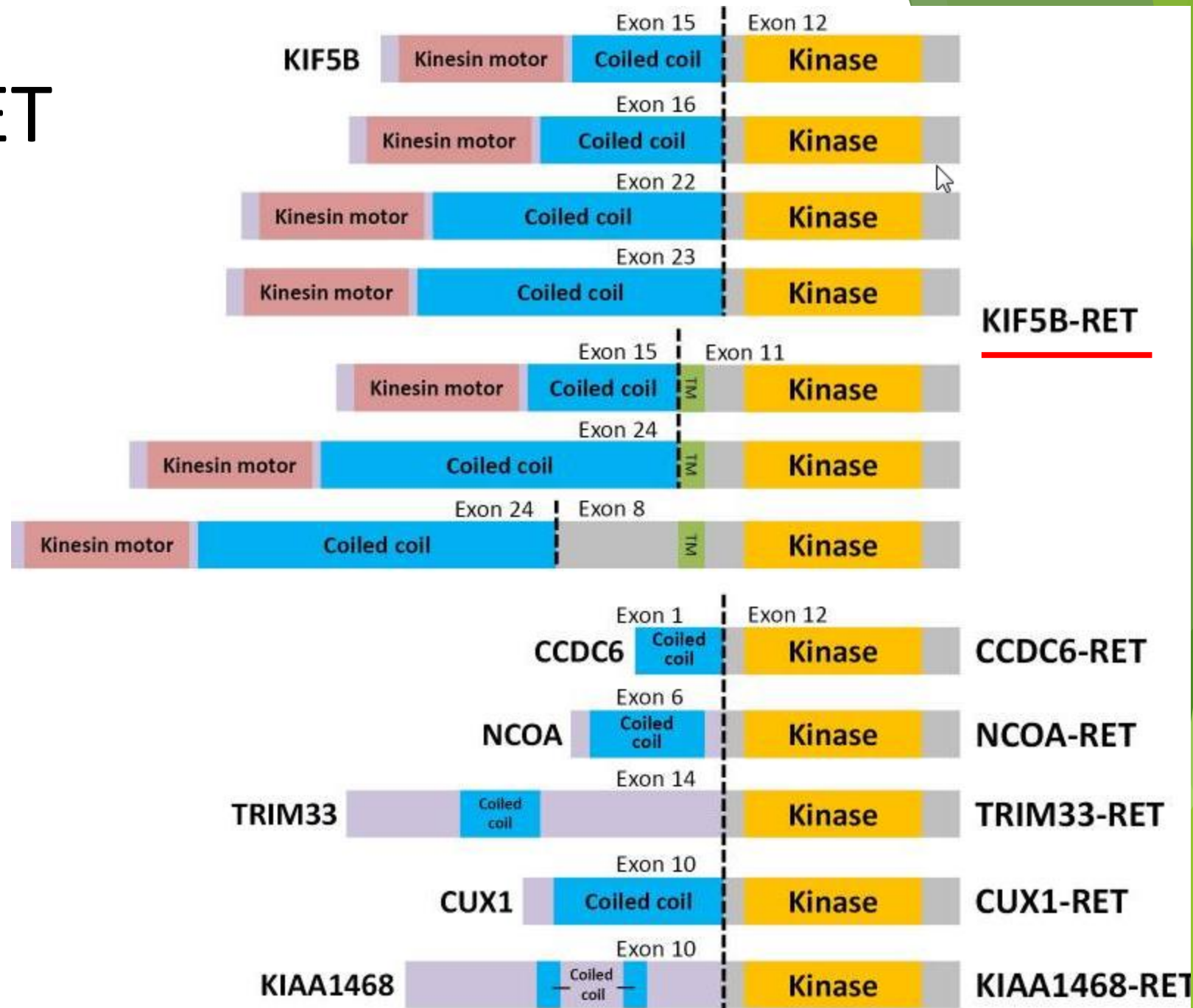
B



Spektrum ROS1 fúzních transkriptů



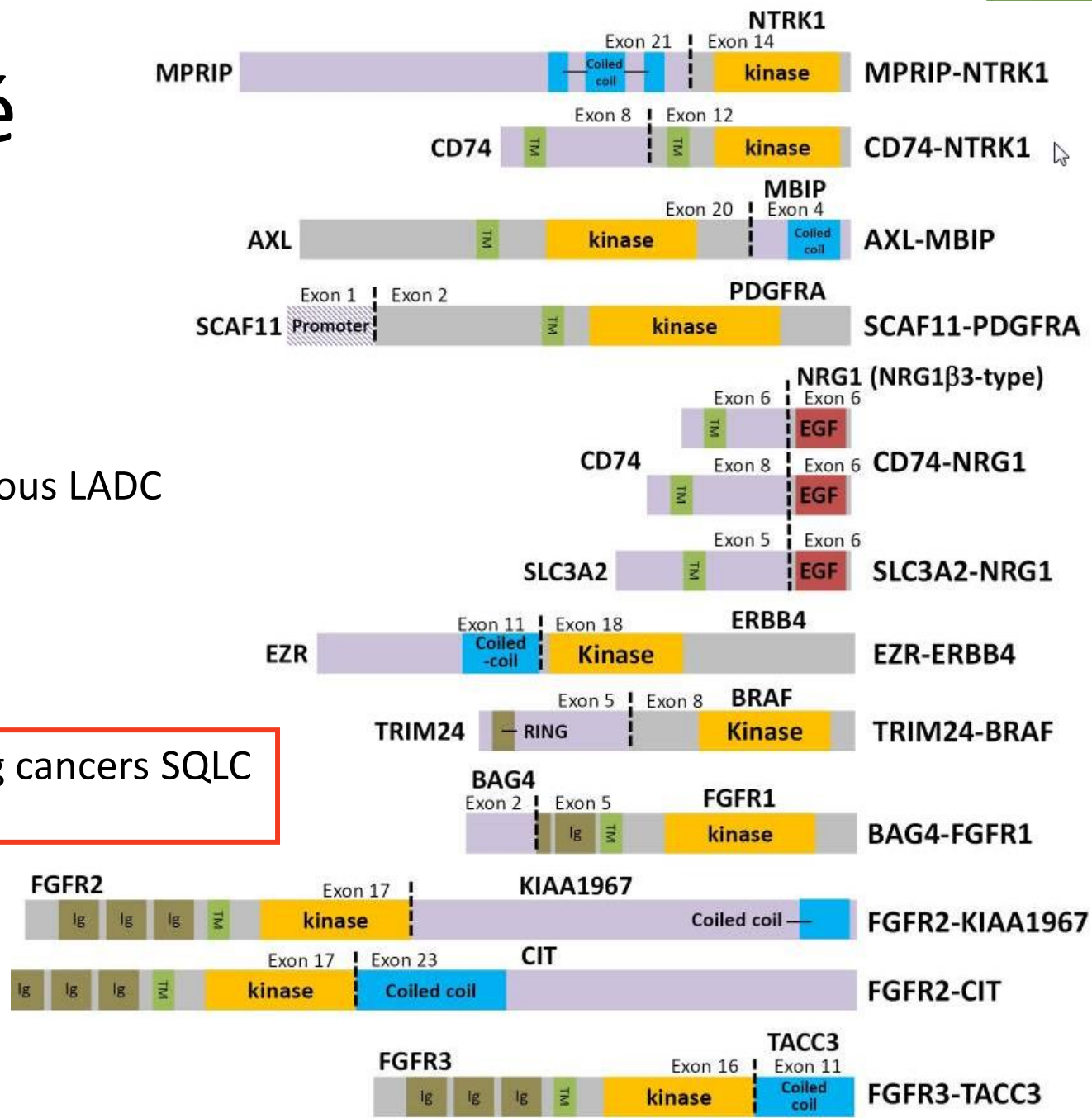
Spektrum RET fúzných transkriptů



Další popsané fúze

invasive mucinous LADC
VAMP2-NRG1

squamous lung cancers SQLC
CHRNA6-FGFR1



detekce fúzního transkriptu TTYH3-ALK



Mutace *CTNNB1* u low grade fetálního plicního adenokarcinomu



CTNNB1, mutace c.110C>T, p.Ser37Phe (označovaná S37F), alelická frekvence 42%

EGFR mutace – 20 pacientů

| exon | Počet pacientů |
|-------|----------------|
| 18/19 | 1 |
| 18/21 | 1 |
| 19 | 9 |
| 20 | 3 |
| 21 | 6 |

KRAS mutace – 30 pacientů

| Mutace | Počet pacientů |
|----------|----------------|
| Gly12Cys | 15 |
| Gly12Asp | 4 |
| Gly12Val | 3 |
| Gln61Leu | 2 |
| Gly12Ala | 2 |
| Gln12Phe | 1 |
| Gln12Ser | 1 |
| Gly13Asp | 1 |
| Gly13Cys | 1 |

Potřeba multiplexních vyšetření

National Comprehensive Cancer Network (2018)

The NCCN panel strongly endorses **broader molecular profiling** to identify rare driver mutations to ensure that patients receive the most appropriate treatment

CAP/ International Association for the Study of Lung Cancer / Association of Molecular Pathology (2018)

Consensus: **Multiplexed genetic sequencing panels are preferred** over multiple single-gene tests to identify other treatment options beyond *EGFR*, *ALK*, and *ROS1* for lung cancer patients

American Society of Clinical Oncology Expert Panel (2018)

Determined that the recommendations from the CAP/IASLC/AMP molecular testing guideline are clear, thorough, and based upon the most relevant scientific evidence. ASCO endorsed the guideline. New for 2018 are recommendations for stand-alone *ROS1* testing with additional confirmation testing in all patients with advanced lung adenocarcinoma, and *RET*, *ERBB2 (HER2)*, *KRAS*, and *MET* **testing as part of larger panels**.

European Society for Medical Oncology (2018)

Metastatic NSCLC: ESMO Clinical Practice Guidelines **Multiplex platforms (NGS) for molecular testing strongly recommended.**

Literární odkaz s komentářem

Aktuálně se v doporučených vyšetřeních genetiky nádorové tkáně setkáváme i se současným vyšetřováním mutační nálože nádorového genomu:

- ▶ Laura J. Tafe, MD †: Non-Small Cell Lung Cancer as a Precision Oncology Paradigm: Emerging Targets and Tumor Mutational Burden (TMB). *Adv Anat Pathol*, 2020; 27,1:3-10

Diskuse - 1

Rozlišení mutací:

- ▶ somatické mutace v primárních nádorech jsou zahrnuté v biologických procesech související s proliferací a růstem. Na některé lze použít cílenou léčbou.
- ▶ zárodečné mutace s klinickým významem - rizikové faktory.

Diskuse - 2

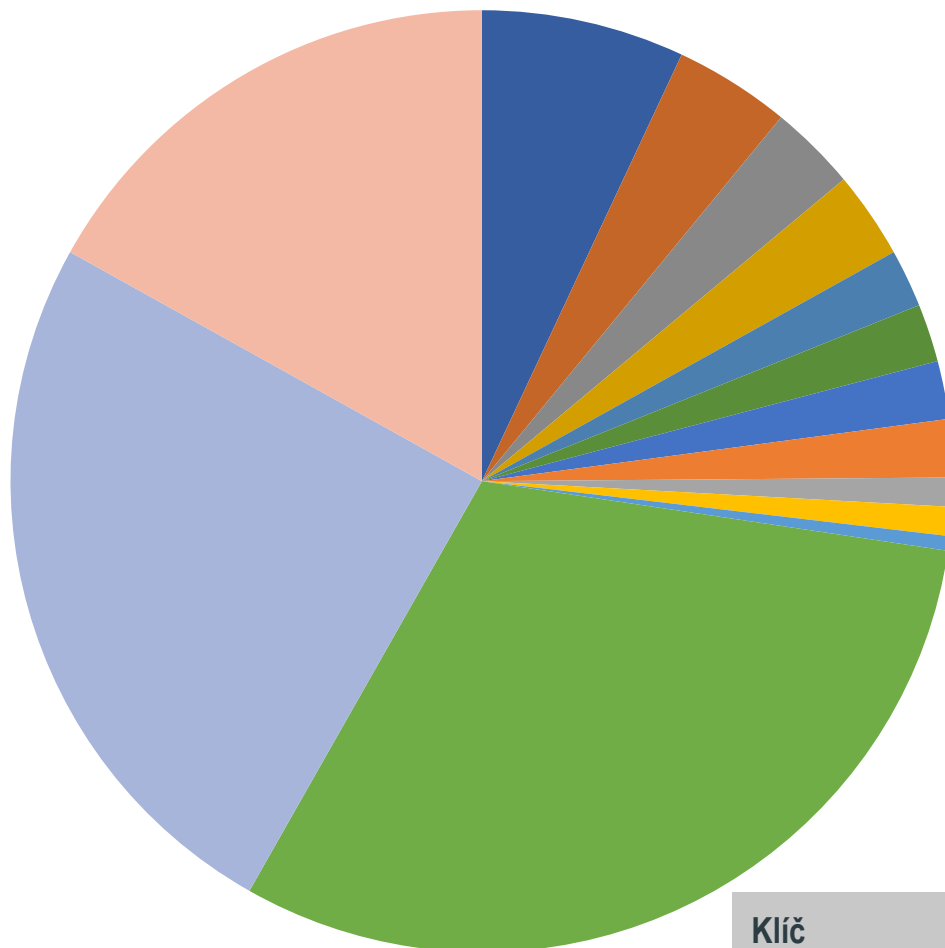
- ▶ NGS vyšetření umožňují poznání mutačního terénu nádoru v aktuálním čase, současný výskyt více potenciálních řídicích mutací s možnostmi aktivace dalších signálních drah.
- ▶ U skupiny mutací je již známý klinický význam a lze u nich predikovat odpověď na léčbu

Diskuse - 3

- ▶ V našem souboru je významný počet nemocných s targetabilními genetickými změnami (mutace EGFR, fúze ALK a ROS1, ojediněle pak targetabilní mutace další).
- ▶ Pro tyto nemocné je rychlá diagnostika pomocí NGS velmi důležitá.
- ▶ Současná strategie léčby je založena na podání nejúčinnějších inhibitorů (u mutací EGFR to bude v blízké budoucnosti i u nás osimertinib, u ALK translokací je to alectinib, u fúzí genu ROS1 pak krizotinib).
- ▶ V případě selhání cílené léčby přichází v úvahu inhibitor vyšší generace, chemoterapie, u EGFR mutovaných nádorů pak kombinace chemoterapie s antiangiogenní léčbou a s léčbou imuno-onkologickou.

PROPOJENÍ MOLEKULÁRNÍCH TERČŮ S CÍLENOU TERAPIÍ NSCLC

- ALK (7%)
- EGFR other (4%)
- MET (3%)
- >1 mutation (3%)
- HER2 (2%)
- ROS1 (2%)
- BRAF (2%)
- RET (2%)
- NTRK1 (1%)
- PIK3CA (1%)
- MEK1 (<1%)
- Unknown oncogenic driver detected (31%)



Klíč
 1 – fáze I
 2 – fáze II
 3 – fáze III
 4 – schváleno

EGFR sensitizing

Gefitinib;⁴ Erlotinib;⁴ Afatinib;⁴ Osimertinib;⁴ Dacomitinib³

ALK

Crizotinib;⁴ Alectinib;⁴ Ceritinib;⁴ Lorlatinib;² Brigatinib⁴

ROS1

Crizotinib;⁴ Cabozantinib;² Ceritinib;² Lorlatinib;² DS-6051b¹

BRAF

Vemurafenib;² Dabrafenib;⁴ Dabrafenib + Trametinib⁴

MET

Crizotinib;² Cabozantinib;² Capmatinib;² Savolitinib²

HER2

Trastuzumab emtansine;² Afatinib;² Dacomitinib²

RET

Cabozantinib;² Alectinib;² Apatinib;² Vandetanib;² Ponatinib;² Lenvatinib²

NTRK1

Entrectinib;² LOXO-101;² Cabozantinib;²; DS-6051b¹

PIK3CA

LY3023414;² PQR 309¹

MEK1

Trametinib;² Selumetinib;³ Cobimetinib¹

Diskuse - 4

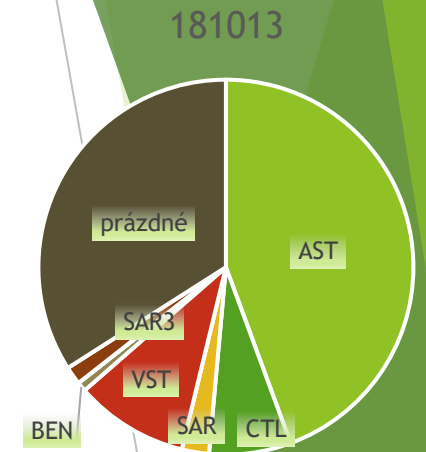
- ▶ V našem souboru je významný počet nemocných s toho času cílenou léčbou neovlivnitelnými mutacemi genu KRAS a mutacemi genu C-MET.
- ▶ Nicméně u podskupiny KRAS mutací (G12C) se klinicky zkouší preparát AMG 510, u C-MET mutací preparát bozitinib, zatím s nadějnými výsledky.

Diskuse - 5

- ▶ Četnost výskytu mutací genů EGFR a KRAS a fúzí genů ALK a ROS1 je v našem souboru podobná jako v souborech jiných autorů. Další nejčastější mutace vyskytující se u nemalobuněčných karcinomů plic (TP53, STK11) toho času standardně nevyšetřujeme. Znalost jejich statusu může výhledově přispět k odhadům účinnosti cílené léčby nebo léčby imuno-onkologické.

NGS v praxi

- ▶ Výsledky do 10ti dnů = sekvenační běh 1x týdně
- ▶ Všechny kompatibilní analýzy najednou
- ▶ Hrazení kódem vs. cena NGS
- ▶ Úspěšnost / procento neanalyzovatelných vzorků



Diskuse - 6

- ▶ Pro NGS vyšetření je dostačující materiál obsahující 10 ng DNA (cca 3500 fixovaných nádorových buněk).
- ▶ NGS lze provést z materiálu z tenkojehlové biopsie, CORE biopsie však umožní lépe posoudit architekturu tkání a vztahy mezi nádorem a imunitními buňkami.
- ▶ Vyšetření lze provést i z cytologického nátěru

Diskuse - 7

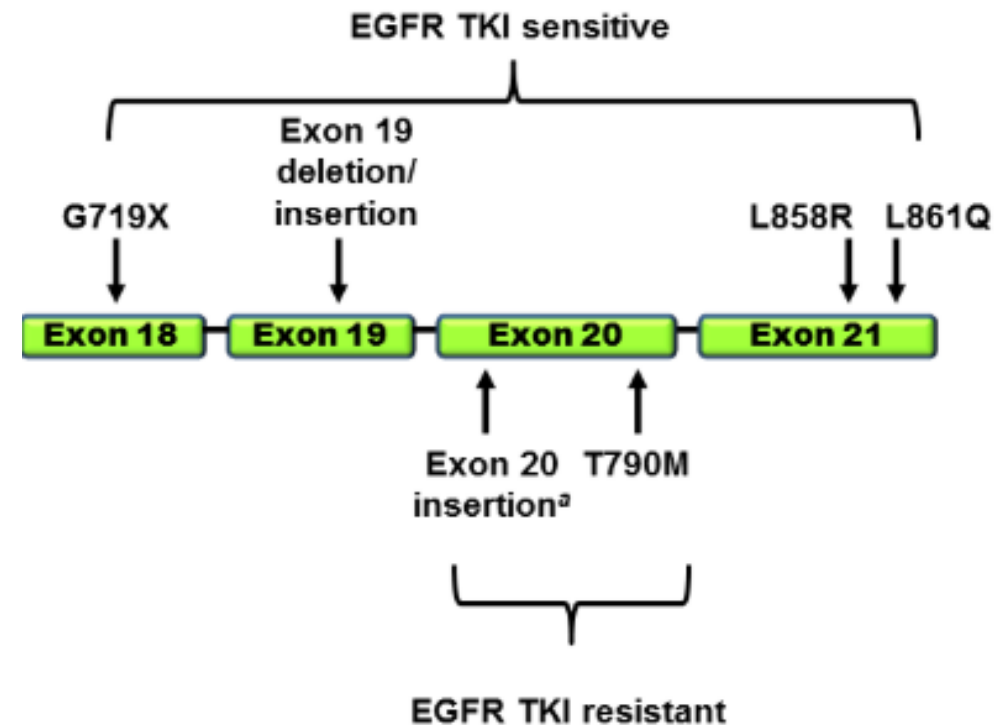
Negativní výsledky

- ▶ Negativní vzorek pravděpodobně obsahuje jiné řídicí mutace, než byly vyšetřeny v cílených panelech.
- ▶ Metoda může mít i falešně negativní výsledky, příčinou může být heterogenita nádoru, malé množství nádorových buněk apod.
- ▶ Ojediněle jsme viděli i rozdíly mezi výsledky vyšetření FISH a NGS.

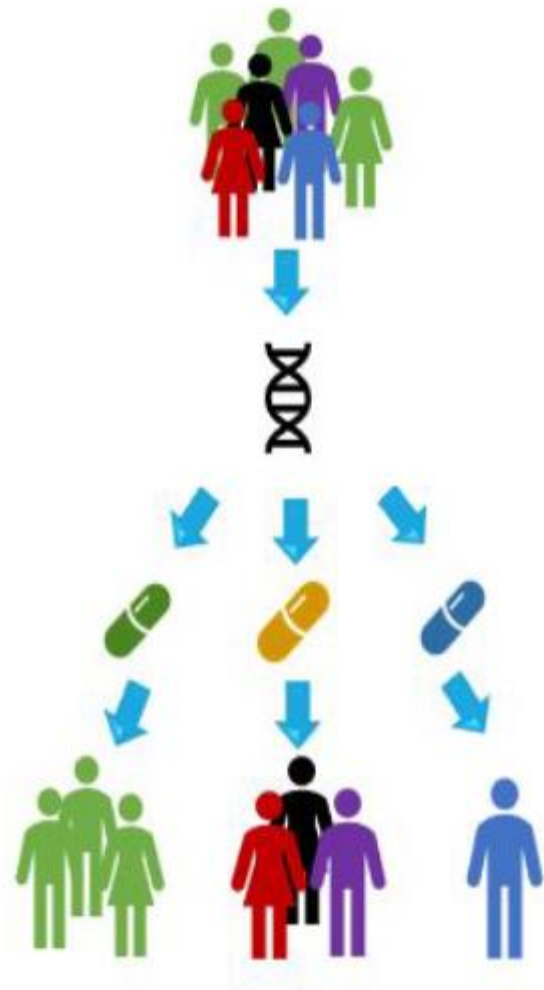
NSCLC – prediktivní diagnostika

- ▶ *EGFR* – mutace senzitivní/rezistentní/neznámého účinku – v závislosti na použitém TKI
- ▶ *ALK* - fúzní transkripty
- ▶ *ROS1* – fúzní transkripty – crizotinib, atd.

- ▶ *MET* – delece exonu 14 – crizotinib atd.
- ▶ *RET*, *NTRK1*, *NRG1* a *FGFR1/2/3*



Využití NGS v prediktivní diagnostice



80+

cílených biologických léčiv
schváleno FDA

230+

v závěrečných fázích vývoje

NSCLC (*EGFR, ALK, ROS1, MET*)

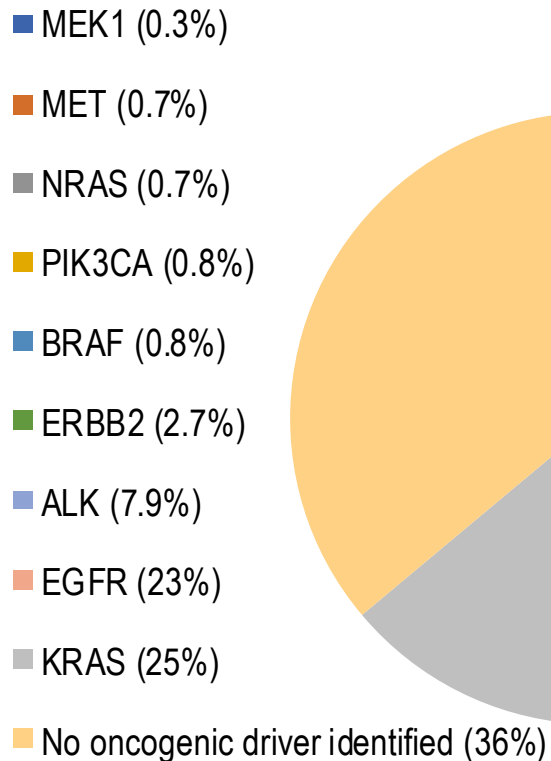
mCRC (*KRAS, NRAS, BRAF*)

Melanom (*BRAF*)

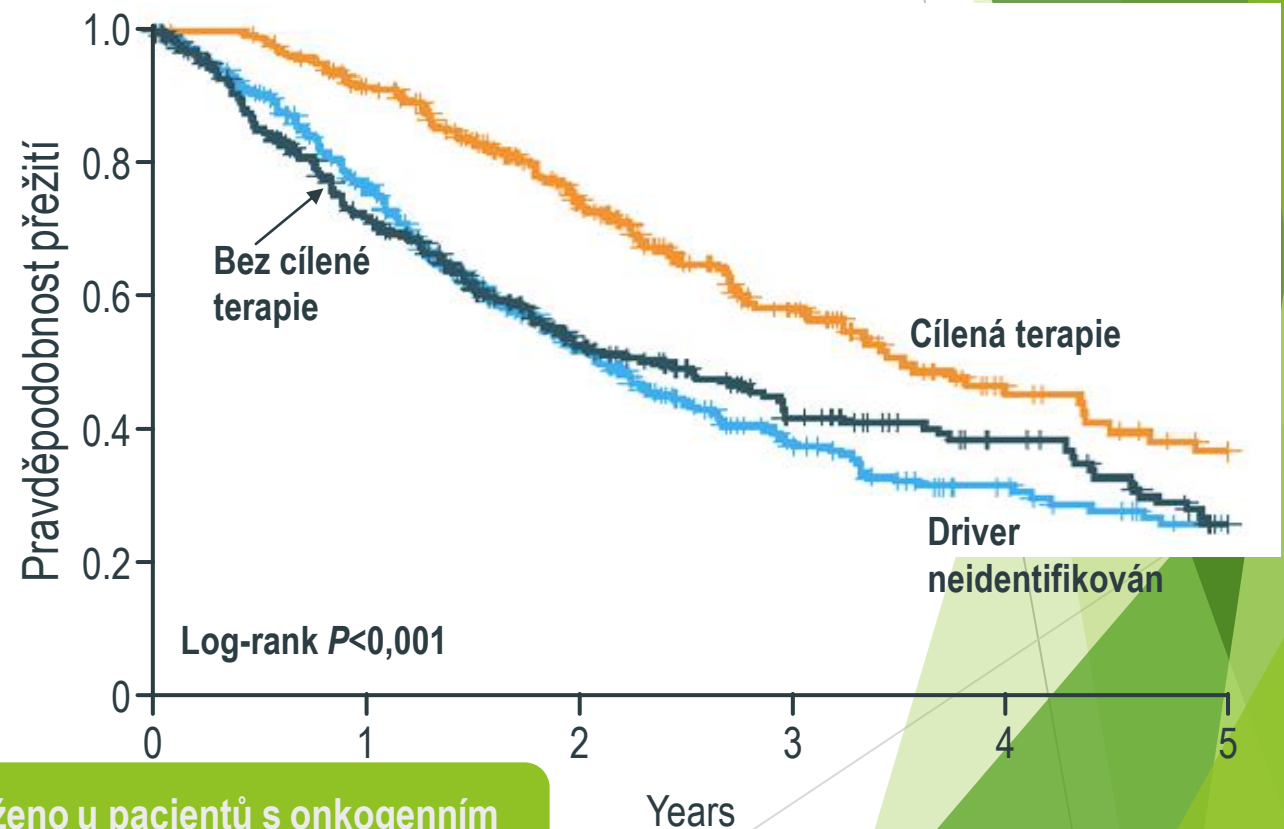
Ovariální karcinom (*BRCA1, BRCA2*)

PŘEŽITÍ PACIENTŮ S ONKOGENNÍM DRIVEREM V DATABÁZI LUNG CANCER MUTATIONAL CONSORTIUM: CÍLENÁ VS NECÍLENÁ LÉČBA

Frekvence výskytu mutací identifikovaných u 733 pacientů v databázi LCMC¹



Pravděpodobnost přežití pacientů s/bez cílené terapie²

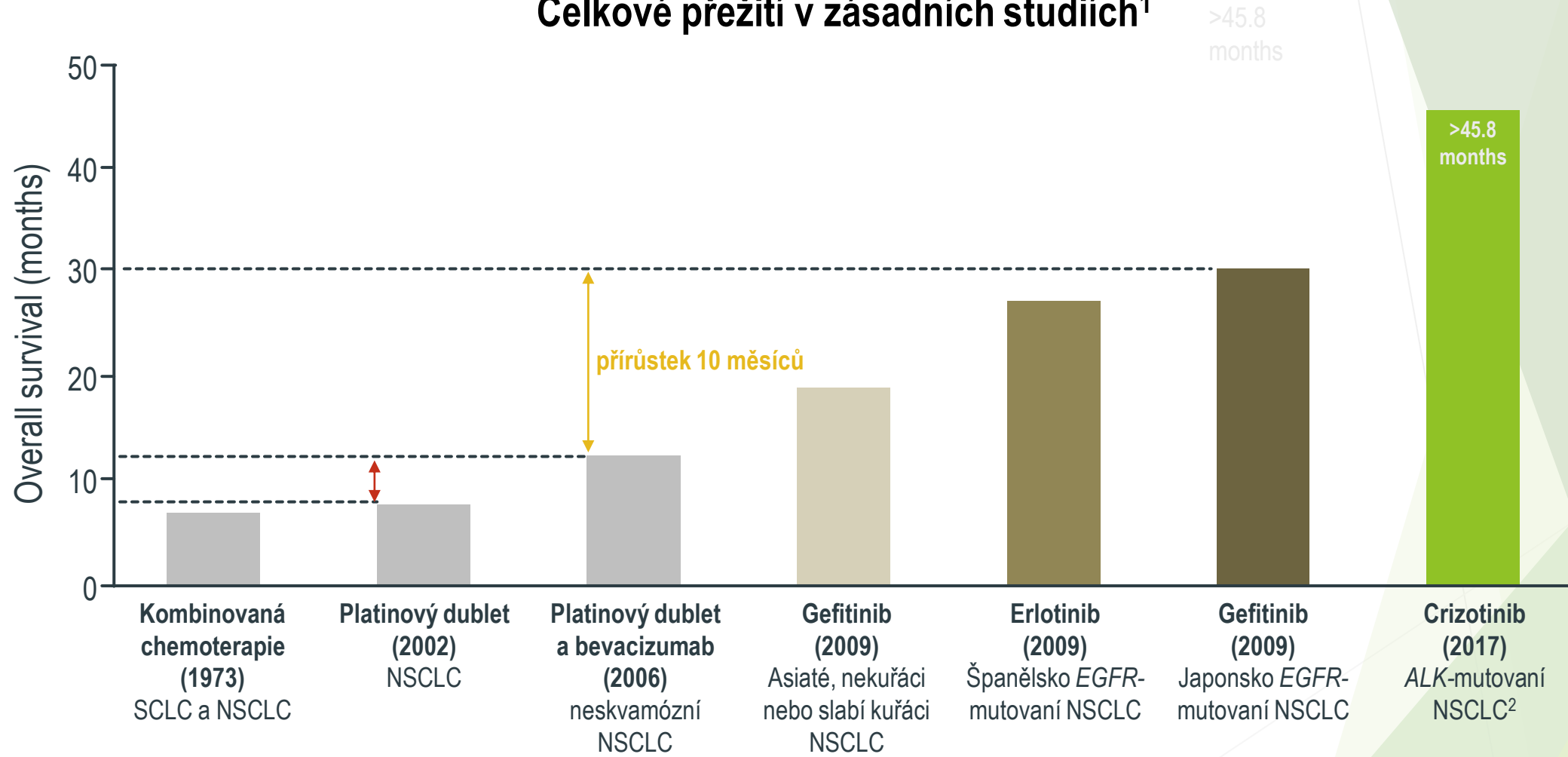


Nejllepších výsledků dosaženo u pacientů s onkogenním driverem léčených cílenou terapií: medián přežití 3,5 roku

1. *J Thorac Oncol*, Vol 10, Sholl L *et al*, Multi-institutional oncogenic driver mutation analysis in lung adenocarcinoma: The Lung Cancer Mutation Consortium Experience, pp 768–777 2. *JAMA* 2014. Vol 311 (issue 19): pp. 1998–2006.

CÍLENÁ TERAPIE OVLIVŇUJE PRŮBĚH ONEMOCNĚNÍ NSCLC

Celkové přežití v zásadních studiích¹



1. *J Nat Rev Cancer*. Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer 10:760–774

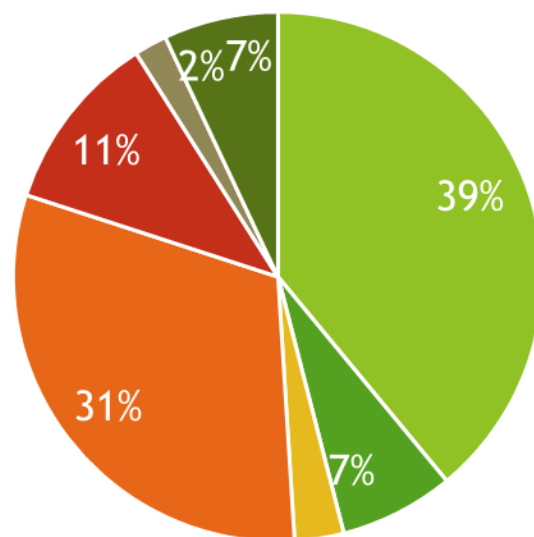
2. Mok T *et al*. Presented at ESMO 2017:LBA50

Závěr

- ▶ Genetická problematika nádorových onemocnění je složitá, je zde značná interindividuální genomická variabilita, která se navíc může měnit s rozvojem nádoru a pod vlivy protinádorové léčby. Dalším krokem na cestě pochopení této problematiky bude patrně celoexomová/celogenomová sekvenace, využívaná již na některých pracovištích dětské onkologie. Tato metoda není zatím zaváděna v běžné praxi především pro svoji značnou, metodickou i finanční náročnost.
- ▶ Nemocní s méně obvyklými potenciálně targetabilními mutacemi a fúzemi v genomech nádorů mohou být léčeni cíleně s úhradou léků na § 16, nebo v rámci klinických studií, jejichž aktuální přehled lze najít na stránkách www.clinicaltrials.gov.

| | | |
|------------------|-----|-----|
| Celkem komplet | 447 | |
| POZ | 228 | |
| NEG | 175 | 39% |
| ALK fúze | 31 | 7% |
| ost. fúze | 13 | 3% |
| KRAS varianty | 139 | 31% |
| EGFR varianty | 51 | 11% |
| MET delece ex.14 | 10 | 2% |
| ost. Varianty | 28 | 7% |

NGS analýza pacientů s NSCLC 2017-2019 komplet



■ NEG
 ■ ALK fúze
 ■ ost. fúze
 ■ KRAS varianty
 ■ EGFR varianty
 ■ MET delece ex.14
 ■ ost. varianty

Děkuji vám za pozornost.

