

Význam cirkulujúcej nádorovej DNA u pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc s mutáciami receptora pre epidermálny rastový faktor

MUDr. Michal Urda¹, MUDr. Simona Laštková¹, MUDr. Juraj Mazal¹, prof. MUDr. Eva Rozborilová, CSc.².

¹Oddelenie pneumológie a ftizeológie FNŠP F. D. Roosevelta, Banská Bystrica

²Klinika pneumológie a ftizeológie UNM a JLF UK, Martin

Tyrozínkinázové inhibítory (TKI) sú štandardom liečby adenokarcinómu pľúc s potvrdenými aktivujúcimi mutáciami génu pre receptor epidermálneho rastového faktora (EGFR). Detekcia genetických alterácií DNA stojí na molekulárno-genetických vyšetreniach nádorových buniek, prípadne cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA). Najfrekvencnejšie detegované liečebne ovplyvniteľné genetické alterácie sú aktivujúce mutácie génu receptora pre epidermálny rastový faktor (EGFR), z nich najčastejšia delécia na exóne 19 (del 19) je prognosticky najpriaznivejšia. Sekundárna mutácia T790M je hlavným mechanizmom získanej rezistencie pri liečbe prvo- a druhogeneračnými TKI. ctDNA predstavuje minimálne invazívnu možnosť detekcie EGFR mutácií v čase stanovenia diagnózy, ako aj v čase progresie ochorenia s reálnym využitím v klinickej praxi. Implementácia vysokosenzitívnych metodík ako digital droplet PCR (ddPCR) a Beads, Emulsification, Amplification and Magnetics (BEAMing) ešte zvýši jej klinický prínos. ctDNA monitoring EGFR mutácií počas liečby TKI umožňuje hodnotenie liečebnej odpovede, skorú detekciu zmien biológie nádoru, stanovovanie evolúcie rezistencie nádoru v reálnom čase. Perzistencia aktivujúcich EGFR mutácií v plazmatickej ctDNA je nezávislým prediktorom zlého prežívania bez progresie (PFS) a celkového prežívania (OS). ctDNA monitoring perspektívne umožní ešte selektívnejšiu optimalizáciu cielenej liečby, prípadne jej kombináciu s imunoterapiou a chemoterapiou.

Kľúčové slová: ctDNA, adenokarcinóm pľúc, EGFR, TKI, T790M, ddPCR, BEAMing

Circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer patients with epidermal growth factor receptor mutations

TKIs are standard of care of lung adenocarcinoma with driver mutations. The detection of genetic alterations of DNA is based on molecular genetics analysis of tumor cells or circulating tumor DNA (ctDNA). The most frequent targetable genetic alterations are activating mutations of EGFR gene. Deletion 19 has the best prognostic outcome of EGFR mutations with TKI treatment. The most frequent mechanism of acquired resistance to first- and second-generation TKI is resistant mutation T790M. ctDNA is non-invasive EGFR detection option at the time of diagnosis and progression in real clinical practice. Implementation of high-sensitive methods (ddPCR, BEAMing) will increase clinical importance of ctDNA. ctDNA tracking during TKI treatment enables assessment of treatment response, early detection of tumor biology changes, real-time resistance evolution assessment. The persistence of activating EGFR mutations in ctDNA is independent predictor of poor outcome (PFS, OS). ctDNA tracking will enable even more precise optimisation of targeted treatment or its combination with IO or CIT.

Key words: ctDNA, lung adenocarcinoma, EGFR, TKI, T790M, ddPCR, BEAMing

Onkológia (Bratisl.), 2020;15(5):359-366

Úvod

Karcinóm pľúc zostáva celosvetovo najčastejšie diagnostikovanou malignitou u mužov (s výnimkou nemelanómových nádorov kože), u žien je po karcinóme prsníka, kolorekta a krčka maternice na 4. mieste (1). Histomorfologicky pľúcne karcinómy rozdeľujeme na nemalobunkové (NSCLC) a malobunkové (SCLC). Najčastejšie typy NSCLC sú adenokarcinóm, epidermoidný a veľkobunkový karcinóm. Detekcia genetických alterácií adenokarcinómov pľúc (mutácie génu pre receptor epidermálneho rastového faktora – EGFR, prestavby ALK, ROS1, BRAF,

cMET) viedla k etablovaniu cielenej liečby (2). EGFR je transmembránový proteín, ktorý patrí do skupiny tyrozínkinázových receptorov zvanej ErbB. Gén pre EGFR je lokalizovaný na krátkom ramienku chromozómu 7, jeho expresiou vzniká transmembránový receptor pozostávajúci z extracelulárnej, transmembránovej a intracelulárnej časti. Homo-, resp. heterodimerizácia v rámci skupiny ErbB a naviazanie ligandu (EGF, TGF alfa a ďalšie) na doménu extracelulárnej časti receptora vedie k stimulácii intracelulárnej tyrozínkinázovej aktivity. Výsledkom aktivácie signálnych dráh je expresia génov modulujúcich fe-

notyp k proliferácii, oddialeniu apoptózy, zvýšenej mobility a adhezivite buniek vedúcej k metastázovaniu (3, 4, 5, 6). Mutácie EGFR génu sú najfrekvencnejšou genetickou alteráciou prítomnou u pacientov s neskvamóznym NSCLC (NSCC). Celosvetovo sú prítomné u 10 – 30 % pacientov, frekvencia výskytu je vyššia v ázijskej populácii (50 %), v kaukazskej (európskej) populácii ich nachádzame u 10 – 15 % pacientov. Typicky bývajú prítomné u žien, nefajčiarok s adenokarcinómom pľúc. Mutácie EGFR génu sa vyskytujú v exónoch 18-21, táto oblasť kóduje intracelulárnu doménu EGFR recepto-

ra. Delécia 19 (del 19) a bodová mutácia L858R v exóne 21 predstavujú viac ako 90 % z celkového počtu EGFR mutácií, menej časté sú mutácie v exóne 18 (G719X) a exóne 21 (L861Q). Mutovaná forma receptora je konštitutívne zmenená, kontinuálne aktivovaná aj v neprítomnosti ligandu, čo vedie ku karcinogéze. Prítomnosť aktivujúcich mutácií EGFR je prediktorom efektivity tyrozínkinázových inhibítorov (TKI) – prvo- (erlotinib, gefitinib), druho- (afatinib, dakomitinib) a tretogeneračných (osimertinib) (3, 7, 8, 9).

V sérii klinických štúdií EGFR-TKI v prvej línii liečby potvrdili svoju superioritu v komparácii s chemoterapiou na báze platiny – miera odpovedí (RR), prežívanie bez progresie (PFS), tolerabilita liečby a kvalita života (QoL) a sú schválené na liečbu pokročilého NSCLC EGFR M+ (10). Druhogeneračné ireverzibilné blokátory ErbB rodiny (afatinib, dakomitinib) a tretogeneračný ireverzibilný osimertinib preukázali klinickú superioritu nad reverzibilnými prvogeneračnými EGFR-TKI v prvej línii liečby NSCLC s bežnými mutáciami, bez ohľadu na stav T790M (11, 12, 13, 14, 15). Najčastejšia del 19 je spojená s najlepšou terapeutickou odpoveďou na EGFR-TKI a je prognosticky najpriaznivejšia (16).

Molekulárne-genetická analýza je v diagnostike karcinómu pľúc elementárna. Pri detekcii EGFR mutácií je zlatým štandardom vyšetovanie bioptických vzoriek, na Slovensku je bežne používanou detekčnou metódou real-time PCR (Roche Cobas® EGFR Mutation Test v2). Materiál je získavaný bioptizáciou primárneho tumoru a/alebo metastatických ložísk bronchoskopicky, transparenčnou ihlovou biopsiou pod USG/CT kontrolou, bioptizáciou metastatických ložísk, chirurgicky ai. V čase diagnózy, resp. v čase progresie NSCLC nie je možné získať biopsiu vhodnú na vyšetrenie EGFR u 27 – 31% (17, 18). Testovanie EGFR je odporúčané u NSCC pacientov (19), nie je odporúčané u pacientov so skvamocelulárnou histológiou (SCC) s výnimkou nefajčiarov/ľahkých exfajčiarov (< 15 balíčkorokov) (17, 20).

Za zlyhanie liečby prvo-/druhogeneračnými EGFR-TKI býva v 50 – 70 % zodpovedná získaná (sekundárna) rezistentná mutácia T790M (exón 20). Pri

jej potvrdení je indikovaný tretogeneračný EGFR-TKI (osimertinib) (17, 20, 21). Osimertinib je efektívny v liečbe aktivujúcich EGFR mutácií (del 19, L858R) (FLAURA) aj rezistentnej mutácie T790M v druhej línii (AURA3). Pri progresii ochorenia je preto potrebná rebiopsia tumoru, čo vzhľadom na invazivitu výkonu nie je vždy možné. Cirkulujúca nádorová DNA (ctDNA) získaná z periférnej krvi pacientov predstavuje minimálne invazívny, dobre reprodukovateľný diagnostický nástroj (2, 16). Cieľom tohto textu je opísať aktuálne možnosti klinického využitia ctDNA u pacientov s NSCLC.

Cirkulujúca nádorová DNA (ctDNA)

ctDNA je alternatívny zdroj nádorovej DNA pre detekciu EGFR mutácií (22, 23). Širším termínom je cell-free DNA (cfDNA), ktorá zahŕňa v krvnom riečisku voľne cirkulujúcu DNA, ktorá pochádza nielen z nádorových buniek. Niektorí autori však skratky ctDNA a cfDNA voľne zamieňajú. V porovnaní s bioptickou vzorkou je výhodou ctDNA ľahká dostupnosť a minimálna invazivita odberu (periférna krv) (24).

ctDNA pochádza priamo z nádorových buniek alebo z cirkulujúcich nádorových buniek (CTCs). Možné mechanizmy vzniku ctDNA sú apoptóza a nekroza nádorových buniek alebo aktívne uvoľňovanie zo živých nádorových buniek cestou exozómov (17, 25, 26, 27, 28, 29, 30).

V Gerlingerovej štúdií boli odoberané biopsie z primárneho nádoru a metastáz, vzorky preukázali intra- aj internádorovú heterogenitu. Jedna izolovaná biopsia nereprezentuje gény celého nádoru. Naopak, ctDNA obsahuje gény celého nádoru, vytvára lepší obraz o jeho heterogenite a nádorovej diverzite (primárny nádor, resp. metastáza) (17, 31, 32).

ctDNA je výhodná v situáciách, kde je biopsia tkaniva príliš invazívna, resp. získaná vzorka nie je dostatočná ku genetickej analýze. Vzorky môžu byť odoberané opakovane s cieľom monitoringu nádoru a odpovede na liečbu.

Spracovanie a uskladnenie plazmy, extrakcia DNA

Do plazmy sa z nádoru uvoľňuje iba limitované množstvo kopii DNA, ctDNA je fragmentovaná a prítomná

v nízkych koncentráciách. Aby sa prešlo kontaminácii ctDNA, je potrebné redukovať wild-type DNA z cirkulujúcich leukocytov. Preto je dôležité promptné spracovanie krvnej vzorky alebo použitie stabilizačných odberových setov, ktoré zabráni rozpadu leukocytov a uvoľneniu DNA (33). Pri vyšetovaní ctDNA sa ako antikoagulum používa kyselina etyléndiamintetraoctová (EDTA) a citrát (34), heparín nie je vhodný pre možnú interferenciu s polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) (17, 35). Pri spracovaní vzorky do 4 hodín sú používané odberové sety K2 EDTA (33). Centrifugáciou krvi pri 1200 – 1600 g v trvaní 10 minút sa získava supernatant. Druhou vysokorychlostnou centrifugáciou (3 000 – 16 000 g) v mikrocetifúge sa odstráni reziduálna bunková kontaminácia (36). Sherwood et al. demonštrovali lepšiu detekciu KRAS mutácií v bunky stabilizujúcich odberových setov (EDTA K3, Streck BCT), ktoré oddávajú lýzu bielych krviniek a zmierňujú dilučný efekt ctDNA. Stabilizačné odberové sety sú výhodné, keď krv nemôže byť ihneď spracovaná (17, 37). Objem 2 ml plazmy sa považuje za vhodný na klinické použitie (17, 38).

Metódy detekcie mutácií

Sekvenačné metódy analýzy ctDNA možno rozdeliť do dvoch hlavných skupín.

Necielený prístup (vyšetovanie všetkých génov) – Digital Karyotyping, Personalized analysis of rearranged ends (PARE), DNA Methylation and Hydroxymethylation.

Cielené prístupy (monitorovanie špecifických génov a mutácií) – Digital droplet PCR (ddPCR), Beads, Emulsification, Amplification and Magnetics (BEAMing), CAncer Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq), Tagged AMplicon deep Sequencing (TAM - Seq), Safe-Sequencing (Safe - Seq), Duplex sequencing, Integrated Digital Error Suppression (iDES) – enhanced CAPP - Seq.

V krvi je majoritne prítomná wild-type DNA a v nízkych hladinách ctDNA, preto sú pri detekcii mutácií potrebné metódy schopné detekcie mutantných alel pokrývajúce < 1 % celkovej DNA. Vysokosenzitivné testy sú rizikové pre falošne pozitívne výsledky. Klinicky

môže byť vhodné uprednostniť testy s vysokou špecificitou za cenu nižšej senzitivity (39, 40). Používanie Roche Cobas® EGFR mutation test v2 pre vzorky plazmy bolo schválené FDA v júni 2016. Viaceré metódy preukázali vysokú špecificitu (> 88 %). Senzitivita detekcie mutácií z ctDNA v porovnaní s tumorom bola v priemere 65 % (41). Pozitívny výsledok ctDNA je vysoko pravdepodobne spojený s pozitívnym výsledkom z tumoru (17, 41, 42). Novšie technológie založené na emulznej PCR, ako ddPCR a BEAMing (17, 43) s vyššou senzitivitou môžu poskytnúť redukciu falošne negatívnych výsledkov, ktoré boli pozorované pri metódach založených na qPCR ctDNA.

COBAS

Cobas® EGFR mutation test v2 je real-time PCR (RT-PCR) test určený na kvalitatívnu detekciu a identifikáciu mutácií v exónoch 18, 19, 20 a 21 z DNA izolovanej z nádorového tkaniva fixovaného formalínom a zaliateho do parafínu (FFPET) alebo plazmy pacientov s NSCLC. Test je určený na detekciu substitučných mutácií G719X v exóne 18, delécií v exóne 19, substitučných mutácií T790M a S768I v exóne 20, inzercii v exóne 20 a substitučných mutácií L858R a L861Q v exóne 21. Pri ctDNA je indikovaný aj na semikvantitatívne stanovovanie mutácií v exónoch 18, 19, 20 a 21 génu EGFR v sériových odberov plazmy. Vzorky plazmy sa spracujú s použitím kitu Cobas® cfDNA sample preparation kit. Cobas® EGFR mutation test v2 sa používa spoločne s analyzátorom cobas z 480 na automatickú amplifikáciu a detekciu (44).

Beads, Emulsification, Amplification and Magnetics

BEAMing je vysokosenzitívna metóda kombinujúca digitálnu PCR, magnetické guľôčky (magnetic beads) a prietokovú cytometriu. Purifikovaná DNA izolovaná z plazmy pacienta vstupuje do pre-amplifikačného procesu konvenčnou PCR za použitia amplifikačných primerov známych sekvencií požadovaných genetických oblastí. DNA templáty sú opäť amplifikované emulznou PCR, vzniká emulzia miliónov kvapiek, kde každá obsahuje jeden cieľový fragment DNA a jednu magnetickú guľôčku. Každý

jednotlivý fragment DNA sa amplifikuje pomocou primerov kovalentne naviazaných na povrch guľôčok, vznikajú guľôčky pokryté DNA. Následne sa guľôčky magneticky prečistia, k fragmentom DNA sa pripoja (hybridizujú) fluorescenčné sondy, aby bolo možné rozlíšiť fragmenty wild-type DNA a mutantnej DNA. Jedna fluorescenčná sonda sa špecificky viaže na wild-type a druhá na mutantnú DNA. V poslednom kroku sa prietokovou cytometriou analyzujú a separujú fluorescenčne označené guľôčky nesúce wild-type a mutovanú DNA, stanoví sa ich pomer, ktorý presne reflektuje ich pomer vo vzorke krvi pacienta. BEAMing bol predmetom početných štúdií genetických alterácií pri malígnom melanóme, kolorektálnom karcinóme a NSCLC (45).

Digital droplet PCR

ddPCR využíva kombináciu mikrofluidiky a patentovaných chemikálií povrchovo aktívnych látok na rozdelenie vzoriek na emulzné kvapôčky (46). Kvapôčky oddeľujú molekuly templátovej DNA, pričom PCR amplifikácia prebieha izolovane v rámci každej kvapôčky. Používa reagenty a pracovné postupy podobné väčšine štandardných testov založených na sondách TaqMan (47). Po PCR sa každá kvapka analyzuje alebo odčíta, aby sa stanovila frakcia kvapiek obsahujúcich mutovanú DNA, umožňuje merať tisíce nezávislých amplifikačných udalostí v rámci jednej vzorky. Získané údaje sa analyzujú pomocou Poissonovej štatistiky, stanovuje sa cieľová koncentrácia templátovej DNA v pôvodnej vzorke. ddPCR je v porovnaní s konvenčnou PCR presnejšia, s menšou chybovosťou, umožňuje absolútnu kvantifikáciu, pomer signálu k šumu je v porovnaní s konvenčnou PCR vyšší (48).

ctDNA ako prognostický biomarker

Použitie ctDNA ako prognostického biomarkera bolo popisované pri melanóme, karcinóme krčka maternice, kolorektálnom a pankreatickom karcinóme (49). V štúdií mutácií KRAS2 a metylácie promotéra génu p16 u pacientov s kolorektálnym karcinómom bolo dvojročné prežívanie u pacientov s hladinou ctDNA pod detekčným limi-

tom 100 % (50). Neprítomnosť detegovateľnej ctDNA po resekcii pokročilého kolorektálneho karcinómu identifikovala jedincov s predĺženou periódou bez známok recidívy ochorenia (51).

ctDNA v monitoringu onkologických ochorení

Zobrazovacie metodiky a onkemarkery sú štandardom pri monitoringu solidných nádorov. ctDNA môže slúžiť na sledovanie dynamiky nádoru v reálnom čase. Opakované vzorky môžu prinášať obraz o efektívnosti liečby, ovplyvňovať terapeutické stratégie. ctDNA je alternatívna forma detekcie genetických alterácií vedúcich k rezistencii na liečbu.

Mutácie KRAS/BRAF boli monitorované vo vzorkách plazmy u 108 pacientov s metastatickým kolorektálnym karcinómom pred chemoterapiou a po nej (irinotekan, cetuximab). Plazmatické koncentrácie ctDNA KRAS sa znížili pri úspešnej liečbe a strata ich detegovateľnosti bola spojená s liečebným benefitom. Bol pozorovaný výskyt nových mutácií, ktoré môžu súvisieť so získanou rezistenciou (17, 52).

Dôkaz ochorenia zobrazovacími metódami môže chýbať po resekcii tumoru. ctDNA môže slúžiť na detekciu minimálneho reziduálneho ochorenia (MRD) (17).

ctDNA pri NSCLC

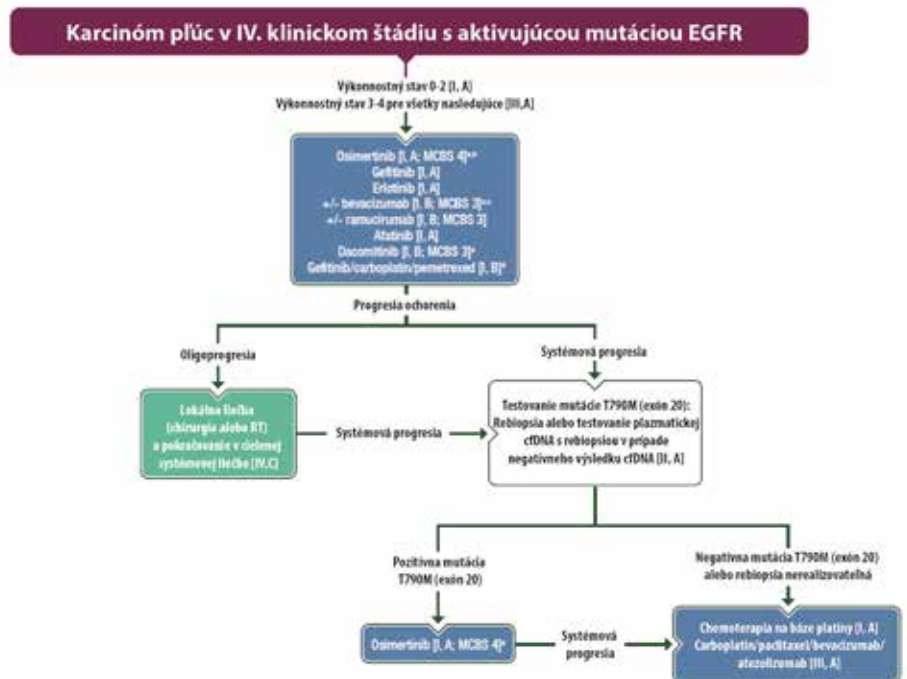
Mutácie DNA v sére pacientov s NSCLC boli prvýkrát pozorované v roku 1998 (53). V roku 2006 boli v malej retrospektívnej štúdií detegované mutácie EGFR v sére pacientov odpovedajúcich na liečbu gefitinibom (54). Senzitivita vyšetrenia ctDNA je 60 – 70 %, preto neprítomnosť mutácie v ctDNA nevyklučuje jej reálnu prítomnosť v nádore (55). Mutácie EGFR detegované z ctDNA predikovali odpoveď na liečbu TKI (erlotinib, gefitinib) v prvej línii (56, 57). V štúdií IFUM boli dáta z analýzy ctDNA za použitia QIAamp® kit pre cirkulujúce nukleové kyseliny asociované s odpoveďou na gefitinib (58). ORR a PFS boli podobné u pacientov, u ktorých bola EGFR mutácia detegovaná z ctDNA a z biopsie tumoru (17, 58). Metaanalýzy preukazujú, že ctDNA je efektívna pri detekcii EGFR mutácií (17, 59, 60, 61).

Najčastejšou príčinou zlyhania liečby EGFR-TKI (prvo- a druhogeneračných) je rezistentná mutácia T790M, ktorá vzniká ako mis-sense mutácia v exóne 20 (62, 63). Prevalencia výskytu získanej T790M pri liečbe prvogeneračnými EGFR-TKI je 49 – 73 % (62, 63, 64, 65, 66). V ázijskej populácii pri liečbe druhogeneračným afatinibom je prevalencia T790M 43 – 68 % (66, 67, 68). Rebiopsia nádorového tkaniva v intencii detekcie T790M u pacientov progredujúcich počas iniciálnej liečby TKI môže byť problematická – pacient môže rebiopsiu odmietnuť, celkový stav pacienta môže byť prekážkou rebiopsie, prípadne môže k progresii dôjsť v problematickej/nedostupnej lokalizácii. V T790M analýze 24 pacientov, ktorí progredovali na afatinibe, iba 14 pacientov (58 %) podstúpilo rebiopsiu v čase progresie ochorenia, pričom iba 11 vzoriek bolo adekvátnych pre molekulárnu analýzu (69). Výsledky štúdie AURA 3, kde osimertinib predĺžil PFS pacientov s pokročilým EGFR M+ NSCLC so získanou T790M v porovnaní s chemoterapiou na báze platiny, viedli k schváleniu osimertinibu pre druhú líniu liečby po verifikácii T790M z bioptického tkaniva alebo ctDNA. Aj preto je vyšetrenie plazmatickej ctDNA v čase progresie ochorenia bežne používanou metódou (64,70). V prípade negatívneho výsledku T790M z plazmatickej ctDNA je odporúčaná rebiopsia nádorového tkaniva. Vyšetrenie ctDNA zvyšuje počet pacientov, u ktorých môže byť T790M status stanovený. ctDNA môže identifikovať T790M-pozitívnych pacientov s T790M falošnou negativitou bioptických vzoriek spôsobenou bioptizáciou nemutovanej oblasti nádoru (70).

Za nevýhody vyšetrenia ctDNA možno považovať absenciu laboratorných štandardov pre analytický výkon vyšetrenia, senzitivitu vyšetrenia, kde miera falošnej negativity môže dosahovať 30 % (odber nemusí zachytiť DNA z bunkovej populácie, ktorá je predmetom záujmu; získaná mutácia T790M je typicky subklonálna a môže uniknúť analýze), čo je dôvodom potreby rebiopsie pri negatívnom výsledku (55).

V Hochmairovej retrospektívnej analýze bola stanovovaná prevalencia T790M v kaukazskej populácii u pacien-

Schéma. Algoritmus liečby EGFR M+ NSCLC ESMO 2020 (78)



tov s NSCLC EGFR M+ v IV. klinickom štádiu, ktorí progredovali na afatinibe a zisťovaná odpoveď na osimertinib. T790M bola stanovovaná z plazmatickej ctDNA (ddPCR) a tkanivovej biopsie. 67 pacientov bolo liečených afatinibom v prvej, druhej a tretej linii (80,6 %, 14,9 % a 4,5 %). Po zlyhaní afatinibu bola T790M zachytená u 49 pacientov (73,1 %). ctDNA a tkanivová rebiopsia boli konkordantné v 79,4 % prípadov. Všetci T790M-pozitívni pacienti boli následne liečení osimertinibom (73,5 % po afatinibe v prvej linii); 37 (75,5 %) pacientov odpovedalo na liečbu (CR: 22,4 %; PR: 53,1 %). Miera odpovedí (RR) bola nezávislá od počtu kópií T790M. RR na osimertinib je u T790M-pozitívnych pacientov po zlyhaní afatinibu vysoká a sekvencia afatinib-osimertinib predlžuje liečebný interval bez potreby chemoterapie (71).

ctDNA monitoring EGFR mutácií môže byť prínosný pri hodnotení liečebnej odpovede, pri skorej detekcii zmien biológie nádoru, stanovovaní evolúcie rezistencie nádoru v reálnom čase (72, 73). V štúdiu FASTACT-2 pacienti bez zachytu EGFR mutácií v plazmatickej ctDNA pri 3. cykle liečby mali dlhšie PFS a OS ako pacienti, ktorých vzorky boli pozitívne (72). V štúdiu FLAURA bola perzistencia aktivujúcich EGFR mutácií v plazmatickej ctDNA po 3 a 6 týždňoch

po začatí liečby osimertinibom spojená s kratším PFS (73).

Recentné dáta z centrálnej Európy prezentovali prínos monitoringu EGFR mutácií pomocou ctDNA u pacientov liečených osimertinibom po zlyhaní prvej línie liečby (NSCLC, IV. klin. št., EGFR M+, T790M+). Vzorky plazmy 141 pacientov s progresiou ochorenia liečených prvo- alebo druhogeneračnými TKI boli testované na aktivujúce mutácie EGFR (exón 19 delécie, L858R, L861Q, S768I) a T790M za použitia ddPCR. ctDNA bola označená za pozitívnu v prípade detekcie akejkoľvek EGFR mutácie. Pri začatí liečby osimertinibom boli všetci pacienti T790M pozitívni a 122 zo 141 (87 %) mali tiež pozitívnu príslušnú aktivujúcu mutáciu. ctDNA monitoring EGFR mutácií bol realizovaný u 108 pacientov. Plazmatická ctDNA bola detegovaná u 58 z 108 (54 %) pacientov po začatí liečby osimertinibom a bola spojená so zlým PFS (HR 4,26, 95 % CI: 2,55 – 7,10, P < 0,0001) a OS (HR 3,23, 95 % CI: 1,80 – 5,78, P < 0,0001). Pacienti s perzistenciou EGFR mutácií počas 8 týždňov mali kratšie PFS (HR 6,17, 95 % CI: 3,03 – 12,56, P < 0,0001) a OS (HR 4,83, 95 % CI: 2,25 – 10,36, P < 0,0001) ako pacienti s úplným klírens aktivujúcich EGFR mutácií (74). U pacientov s perzistujúcimi aktivujúcimi EGFR mutáciami v plazmatickej ctDNA je na zváženie

zmena liečby, podporená výsledkami štúdie fázy III, kde kombinácia gefitinibu a chemoterapie v prvej línii liečby zlepšila PFS a OS v porovnaní so sólo gefitinibom (75, 76). Ďalšia potenciálna možnosť je kombinácia imunoterapie a CHT. V analýze IMpower150 pridanie atezolizumabu k CHT a bevacizumabu predĺžilo OS u pacientov s pokročilým EGFR M+ NSCC NSCLC (77).

Zhrnutie

ctDNA je minimálne invazívna metóda detekcie EGFR mutácií. Umožňuje vyšetrenie EGFR mutácií z krvnej vzorky v čase stanovenia diagnózy v prípade nedostupnosti vhodnej biopsie. Liečba TKI môže začať na podklade ctDNA. V čase progresie ochorenia (zlyhanie prvej línii TKI) ctDNA umožňuje detekciu sekundárnej rezistentnej T790M, rebiopsia je vhodná (v kontexte vyššej invazivity) až v prípade negativity ctDNA. Pacienti s ctDNA potvrdenou T790M môžu byť liečení osimertinibom (pozri aktuálny algoritmus liečby EGFR M+ NSCLC ESMO 2020) (78). Uvedené dáta potvrdzujú prínos ctDNA monitoringu EGFR mutácií počas liečby TKI s možnosťou predikcie efektivity a zvažovania alternatívnych postupov liečby. Pri ctDNA monitoringu za vhodnejšiu detekčnú formu možno považovať senzitivnejšie metodiky ako ddPCR a BEAMing. V slovenských podmienkach je limitom finančná náročnosť opakovaných vyšetrení, ktoré nie sú hrazené zdravotnými poisťovňami. Aj preto je aktuálne ctDNA monitoring NSCLC na Slovensku výsadou grantových úloh.

Literatúra

- Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, et al. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 2001;92(6):1525-1530.
- Rijavec E, Coco S, Genova C, et al. Liquid Biopsy in Non-Small Cell Lung Cancer: Highlights and Challenges. *Cancers* [online]. 2020, 12(1) [cit. 2020-08-01]. DOI: 10.3390/cancers12010017. ISSN 2072-6694.
- Molina JR, Yang P, Cassivi SD, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(5):584-94.
- Ondrušová M, Pšenková M, Suchanský M. Vybrané epidemiologické aspekty zhubného nádoru priedušiek a pľúc. Bratislava: Pharm-In, 2017. Vydané ako elektronická publikácia č. 0204201752, www.pharmin.sk, 2017, 52 s. ISBN 978-80-89815-08-1.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-386.

- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th edition. Lyon, France: IARC Press 2015.
- Fraig MM. Diagnosis of Small Lung Biopsy, An Integrated Approach. 1st Ed., 2015. Springer. ISBN 978-1-4939-2574-2.
- Weissferdt A, et al. Diagnostic Pathology of Pleuropulmonary Neoplasia. 1st Ed., 2013. Springer. ISBN 978-1-4419-0786-8.
- Zander DS, et al. Pulmonary Pathology. A Volume in the Series Foundations in Diagnostic Pathology. 2nd Ed., Elsevier. 2018. ISBN 978-0-323-39308-9.
- Lee JK, Hahn S, Kim DW, et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors vs conventional chemotherapy in non-small cell lung cancer harboring wild-type epidermal growth factor receptor: a meta-analysis. *JAMA*. 2014;311(14):1430-1437.
- Park K, Tan EH, O'Byrne K, et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(5):577-589.
- Wu YL, Cheng Y, Zhou X, et al. Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(11):1454-1466.
- Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2017;378(2):113-125.
- Girard N. Optimizing outcomes in EGFR mutation-positive NSCLC: which tyrosine kinase inhibitor and when? *Future Oncol*. 2018;14(11):1117-1132.
- Hirsh V. Turning EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer into a chronic disease: optimal sequential therapy with EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Ther Adv Med Oncol*. 2018;10:1758834017753338.
- DAL Maso A, Lorenzi M, ROCA E, et al. Clinical Features and Progression Pattern of Acquired T790M-positive Compared With T790M-negative EGFR Mutant Non-small-cell Lung Cancer: Catching Tumor and Clinical Heterogeneity Over Time Through Liquid Biopsy. *Clinical Lung Cancer* [online]. 2020;21(1):1-14.e3 [cit. 2020-08-01]. DOI: 10.1016/j.clcc.2019.07.009. ISSN 15257304. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S152573041930213X>
- Royal Collage of Physicians. National Lung Cancer Audit annual report 2015 (for the audit period 2014). <https://www.rcplondon.ac.uk/projects/outputs/nlca-annual-report-2015>.
- Sun W, Yuan X, Tian Y, et al. Non-invasive approaches to monitor EGFR-TKI treatment in non-small-cell lung cancer. *J Hematol Oncol*. 2015;8:95.
- Rekhtman N, Paik PK, Arcila ME, et al. Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clin Cancer Res* 2012;18(4):1167-1176.
- Huang WL, Wei F, Wong DT, et al. The emergent landscape of detecting EGFR mutations using circulating tumor DNA in lung cancer. *Boomed Res Int*. 2015;2015:340732.
- Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med*. 2011;3:75ra26.
- Perkins G, Yap TA, Pope L, et al. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. *PLoS One*, 2012;7(11):e47020.
- Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(45):16368-16373.
- Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014;20(5):548-554.
- Diaz Jr LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32(6):579-586.
- Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, et al. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patient with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*. 1998;17(1):89-97.
- Bettgeowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sri Transl Med*. 2014;6:224ra24.
- Krug AK, Karlovich C, Koestler T, et al. Plasma EGFR mutation detection using a combined exosomal RNA and circulating tumor DNA approach in patients with acquired resistance to first-generation EGFR-TKIs. Poster presented at the AACR - NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston, MA, USA, 5-9 November, 2015.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England Journal of Medicine*. 2012;366(10):883-92.
- Murtaza M, Dawson SJ, Pogrebnik K, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nature Communications*, 2015;6(1):8760.
- Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(26):4270-6.
- Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clinical Chemistry*. 2006;52(6):1062-9.
- Lam NY, Rainer TH, Chiu RW, et al. EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis. *Clin Chem*. 2004;50(1):256-257.
- Xue X, Teare MD, Holen I, et al. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clinica Chimica Acta*. 2009;404(2):100-4.
- Norton SE, Lechner JM, Williams T, et al. A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during blood sample storage and shipping as determined by digital PCR. *Clinical Biochemistry*. 2013;46(15):1561-5.
- Sozzi G, Roz L, Conte D, et al. Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(24):1848-1850.
- Reck M, Hagiwara K, Han B, et al. Investigating the utility of circulating-free tumour-derived DNA (ctDNA) in plasma for the detection of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation status in European and Japanese patients (pts) with advanced non-small-cell lung cancer (aNSCLC). *Ann Oncol*. 2015;26(Suppl 1):i58-i59.
- Beutler E, Gelbart T, Kuhl W. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques*. 1990;9(2):166.
- Liu Y, Liu B, Li XY, et al. A comparison of ARMS and direct sequencing for EGFR mutation analysis and tyrosine kinase inhibitors treatment prediction in body fluid samples of non-small-cell lung cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:111.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) *Nucleic Acids Res*. 1989;17(7):2503-2516.
- Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(3):239-246.
- Sorensen BS, Wu L, Wei W, et al. Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib. *Cancer*. 2014;120(24):3896-3901.
- https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf12/P120019S007c.pdf
- Lee JK, Hahn S, Kim DW, et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors vs conventional chemotherapy in non-small cell lung cancer harboring wild-type

- epidermal growth factor receptor: a meta – analysis. *JAMA*. 2014;311(14):1430-1437.
45. Chen M, Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Human Genomics* [online]. 2019;13(1) [cit. 2020-08-02]. DOI: 10.1186/s40246-019-0220-8. ISSN 1479-7364. Dostupné z: <https://humgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40246-019-0220-8>
46. Hindson BJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*. 2011;83(22):8604-8610.
47. <https://www.bio-rad.com/de-at/applications-technologies/droplet-digital-pcr-ddpcr-technology?ID=MDV31M4VY>
48. Scheler O, Pacocha N, Debski PR, et al. Optimized droplet digital CFU assay (ddCFU) provides precise quantification of bacteria over a dynamic range of 6 logs and beyond. *Lab on a Chip* [online]. 2017;17(11):1980-1987 [cit. 2020-08-02]. DOI: 10.1039/C7LC00206H. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7LC00206H>
49. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine*. 2008;14(9):985-990.
50. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoué F, et al. Detection of free-circulating tumor - associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *International Journal of Cancer*. 2002;100(5):542-8.
51. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine*. 2008;14(9):985-990.
52. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoué F, et al. Detection of free-circulating tumor - associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *International Journal of Cancer*. 2002;100(5):542-548.
53. Rossel R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first - line treatment for European patients with advanced EGFR mutation - positive non - small - cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open - label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(3):239-246.
54. Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, et al. First - line gefitinib in Caucasian EGFR mutation - positive NSCLC patients: a phase - IV, open label, single arm study. *Br J Cancer*. 2014;110:55-62.
55. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(3):321-346.
56. Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating - free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *J Thorac Oncol*. 2014;9(9):1345-1353.
57. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR - mutant lung cancer using quantitative next - generation genotyping of cell - free plasma DNA. *Clin Cancer Res*. 2014;20(6):1698-1705.
58. Sorensen BS, Wu L, Wei W, et al. Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor - sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib. *Cancer*. 2014;120:3896-3901.
59. Luo J, Shen L, Zheng D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2014;4:6269.
60. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, et al. Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*. 2013;424:222-230.
61. Vallée A, Marq M, Bizieux A, et al. Plasma is a better source of tumor - derived circulating cell - free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer*. 2013;82(2):373-374.
62. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2013;19(8):2240-2247.
63. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med*. 2011;3(75):75ra26.
64. Buder A, Hochmair MJ, Schwab S, et al. Cell-free plasma DNA-guided treatment with osimertinib in patients with advanced EGFR-mutated NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2018;13(6):821-830.
65. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2017;376(7):629-640.
66. Yang JC, Ahn MJ, Kim DW, et al. Osimertinib in pretreated T790M-positive advanced non-small-cell lung cancer: AURA study phase II extension component. *J Clin Oncol*. 2017;35(12):1288-1296.
67. Yang JC, Ahn MJ, Kim DW, et al. Osimertinib in pretreated T790M-positive advanced non-small-cell lung cancer: AURA study phase II extension component. *J Clin Oncol*. 2017;35(12):1288-1296.
68. Anaka K, Nosaki K, Otsubo K, et al. Acquisition of the T790M resistance mutation during afatinib treatment in EGFR tyrosine kinase inhibitor-naïve patients with non-small cell lung cancer harboring EGFR mutations. *Oncotarget*. 2017;8(40):68123-68130.
69. Campo M, Gerber D, Gainor JF, et al. Acquired resistance to first-line afatinib and the challenges of prearranged progression biopsies. *J Thorac Oncol*. 2016;11(11):2022-2026.
70. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, et al. Prospective validation of rapid plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer. *JAMA Oncol*. 2016;2(8):1014-1022.
71. Hochmair MJ, Buder A, Schwab S, et al. Liquid-Biopsy-Based Identification of EGFR T790M Mutation-Mediated Resistance to Afatinib Treatment in Patients with Advanced EGFR Mutation-Positive NSCLC, and Subsequent Response to Osimertinib. *Targeted Oncology* [online]. 2019;14(1):75-83 [cit. 2020-08-01].
72. Mok T, Wu YL, Lee JS, et al. Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2015;21:3196-203.
73. Zhou C, Imamura F, Cheng Y, et al. Early clearance of plasma EGFR mutations as a predictor of response to osimertinib and comparator EGFR-TKIs in the FLAURA trial. *J Clin Oncol*. 2019;37:abstr 9020.
74. Buder A, Hochmair MJ, Setinek U, et al. EGFR mutation tracking predicts survival in advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer patients treated with osimertinib. *Translational Lung Cancer Research* [online]. 2020;9(2):239-245 [cit. 2020-08-01]. DOI: 10.21037/tlcr.2020.03.02. ISSN 22186751. Dostupné z: <http://tlcr.amegroups.com/article/view/37395/html>
75. Nakamura A, Inoue A, Morita S, et al. Phase III study comparing gefitinib monotherapy (G) to combination therapy with gefitinib, carboplatin, and pemetrexed (GCP) for untreated patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with EGFR mutations (NEJ009). *J Clin Oncol*. 2018;36:abstr 9005.
76. Noronha V, Patil VM, Joshi A, et al. Gefitinib Versus Gefitinib Plus Pemetrexed and Carboplatin Chemotherapy in EGFR-Mutated Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2020;38(2):124-36.
77. Reck M, Mok TSK, Nishio M, et al. Atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in non-small-cell lung cancer (IMpower150): key subgroup analyses of patients with EGFR mutations or baseline liver metastases in a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Respir Med*. 2019;7(5):387-401.
78. Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. On behalf of the ESMO Guidelines Committee. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, 2020.

MUDr. Michal Urda

Oddelenie pneumológie a ftizeológie
FNsP FDR Banská Bystrica
Námestie L. Svobodu 1, 975 17 Banská Bystrica
murda@nspbb.sk