

Paweł Krawczyk

Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Amerykańskie zalecenia dotyczące badań genetycznych w kwalifikacji chorych na raka płuca do terapii inhibitorami kinaz tyrozynowych

Molecular testing guidelines in qualification of lung cancer patients for tyrosine kinase inhibitors treatment — based on the CAP, IASCL and AMP recommendations

Adres do korespondencji:

 Prof. dr hab. n. med. Paweł Krawczyk
 Katedra i Klinika Pneumonologii,
 Onkologii i Alergologii Uniwersytetu
 Medycznego w Lublinie
 ul. Jaczewskiego 8, 20–954 Lublin
 Tel. 81 724 42 93
 e-mail: krapa@poczta.onet.pl

STRESZCZENIE

W kwietniu 2018 roku ukazały się zalecenia ekspertów CAP, IASCL i AMP dotyczące wykonywania badań genetycznych w kwalifikacji chorych na raka płuca do terapii inhibitorami kinaz tyrozynowych. Zalecenia te obejmują konieczność wykorzystania nowych technologii, badania niedawno odkrytych nieprawidłowości genetycznych oraz badania szerokiej populacji chorych na raka płuca. Predykcyjne biomarkery muszą być bezwzględnie oznaczone w celu kwalifikacji do leczenia I- i II-linii terapiami ukierunkowanymi u chorych na miejscowo zaawansowanego i zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). U chorych na NDRP o typie innym niż płaskonabłonkowy w pierwszej kolejności wykonuje się badanie mutacji w genie *EGFR* (wszystkie najczęściej występujące mutacje w eksonach 18.-21. genu *EGFR*), następnie badanie ekspresji nieprawidłowego białka ALK metodą IHC i/lub rearanżacji genu *ALK* metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Po wykluczeniu tych nieprawidłowości kolejnymi zalecanymi badaniami jest ocena rearanżacji genu *ROS1* metodą FISH i ekspresji białka PD-L1 metodą IHC. Ponadto po wykluczeniu występowania wyżej wymienionych nieprawidłowości uzasadnione może być przeprowadzenie badania mutacji i rearanżacji w genach *BRAF*, *MET*, *HER2*, *RET*, *KRAS*, jeśli dostępne są nowe terapie ukierunkowane molekularnie, na przykład w ramach badań klinicznych. W przypadku poszerzenia diagnostyki genetycznej uzasadnione jest jednoczesne zbadanie wszystkich nieprawidłowości genetycznych za pomocą techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Opisane nieprawidłowości powinno się badać w materiale pobranym z pierwotnego lub przerzutowego guza nowotworowego. W przypadku braku takiego materiału lub u chorych progresujących w trakcie terapii inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR, dopuszczalne jest badanie nieprawidłowości genetycznych w wolnym krążącym DNA, przy zastrzeżeniu, że metoda ta może nie mieć wystarczającej czułości. Badania genetyczne powinny umożliwić wykrycie omawianych zmian genetycznych w przypadku obecności 20% komórek nowotworowych w badanym materiale. Kryteria te spełniają takie metody, jak allelospecyficzny *real-time* PCR, cyfrowy, kropłowy PCR oraz NGS. Eksperti podsumowują, że rozwój nowych technologii badań genetycznych oraz nowych metod leczenia, w tym immunoterapii jest tak dynamiczny, że należy dążyć do corocznego opracowywania nowych rekomendacji.

Słowa kluczowe: niedrobnokomórkowy rak płuca, inhibitory kinaz tyrozynowych, mutacje genowe, rearanżacje genowe, diagnostyka molekularna

ABSTRACT

In April 2018, the updated CAP, IASCL and AMP recommendations were issued to perform genetic testing in qualification of lung cancer patients for tyrosine kinase inhibitors treatment. These suggested to use new technologies to study recently discovered genetic abnormalities, as well as to expand population of lung cancer patients which should be tested. In patients with locally advanced and advanced non-small cell lung cancer (NSCLC), predictive biomarkers must be absolutely tested for qualification of these patients for I- and II-line targeted therapies. In non-

squamous NSCLC patients, *EGFR* gene mutations (the most frequent mutations in exons 18-21 of *EGFR* gene) should be first tested, followed by abnormal ALK protein expression testing and/or *ALK* gene rearrangement analysis with fluorescent *in situ* hybridization (FISH). After excluding these abnormalities, evaluation of *ROS1* gene rearrangement by FISH should be analysed. Moreover, *BRAF*, *MET*, *HER2*, *RET* and *KRAS* genes abnormalities could be diagnosed if new molecular-targeted therapies are available, e.g. in clinical trials. When molecular diagnosis should be expanded, all genetic abnormalities could be analysed by next generation sequencing (NGS) technique. The described abnormalities should be examined in material taken from the primary or metastatic tumor. Free circulating DNA could be used, but with limited sensitivity, to test resistance mutations in patients progressing during EGFR TKI therapy. The analytical techniques used for molecular analysis shall be sensitive enough to detect all genetic abnormalities in materials containing at least 20% of tumor cells. The techniques such as allele-specific real-time PCR, digital-droplet PCR and NGS meet these criteria. To conclude, the dynamic development of new technologies and new treatment methods including immunotherapy enforces the necessity to write updated recommendations annually.

Key words: non-small cell lung cancer, tyrosine kinase inhibitors, genetic mutations, gene rearrangement, molecular diagnosis

Copyright © 2019 Via Medica

ISSN 2450-1646

Onkol Prakt Klin Edu 2019; 5: 197-206

Wstęp

Miejscowo zaawansowany i uogólniony rak płuca pozostaje nadal śmiertelną chorobą, a mediana przeżycia wielu chorych nie przekracza jednego roku. Jednak u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) z nieprawidłowościami genetycznymi w takich genach, jak *EGFR*, *ALK* lub *ROS1*, wskazane jest zastosowanie terapii ukierunkowanych molekularnie, które wielokrotnie przedłużają czas życia chorych, nawet do 5 lat. Ponieważ nieprawidłowości te występują głównie u chorych na raka gruczołowego, zawężono wskazania do badań genetycznych do tej populacji chorych na NDRP. Obecnie wskazania do wykonania badań genetycznych uległy znaczącym zmianom w związku z pojawieniem się nowych leków ukierunkowanych na nowe cele molekularne oraz immunoterapii, a także w związku z koniecznością wykonania niektórych testów genetycznych u chorych na inne typy patomorfologiczne raka płuca.

W marcu 2018 roku ukazały się w *Archivum of Pathology and Laboratory Medicine* uaktualnione zalecenia dotyczące wskazań do prowadzenia diagnostyki genetycznej u chorych na raka płuca w kwalifikacji do terapii ukierunkowanych molekularnie inhibitorami kinaz tyrozynowych (IKT). Zalecenia stworzyli (podobnie jak pierwsze wydane w 2013 r.) eksperci z *College of American Pathologists* (CAP), *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) oraz *Association for Molecular Pathology* (AMP). W stosunku do poprzedniej wersji, standardy diagnostyki genetycznej uzupełniono o konieczność wykorzystania nowych technologii, badania niedawno odkrytych nieprawidłowości genetycznych odpowiedzialnych za powstanie nowych celów dla terapii ukierunkowanych molekularnie oraz o badania szerszej populacji chorych na raka płuca, która może odnieść korzyść z personalizowanych metod leczenia. W stosunku do 2013 roku powstało 18 nowych

rekomendacji do wykonywania badań genetycznych, a 3 rekomendacje zostały znacząco zmodyfikowane.

Zmiana zaleceń wynika między innymi z konieczności badania genetycznego materiału cytologicznego uzyskanego w drodze biopsji przezoskrzelowej wykonywanej pod kontrolą USG wewnątrzoskrzelowego (EBUS-TBNA, *endobronchial ultrasound — transbronchial needle aspirations*) podczas zabiegu bronchoskopii u chorych na miejscowo zaawansowanego lub przerzutowego NDRP. Materiał ten zawiera niewielką liczbę komórek nowotworowych, co wymaga zastosowania czułych metod genetycznych do wykrycia wszystkich nieprawidłowości genetycznych, kwalifikujących chorych do terapii pierwszej linii z udziałem inhibitorów kinaz tyrozynowych (IKT) *EGFR*, *ALK* lub *ROS1*. Dotyczy to także metod wykorzystywanych do wykrywania mutacji T790M w genie *EGFR* u chorych z wtórną opornością na działanie IKT *EGFR* pierwszej i drugiej generacji w kwalifikacji do terapii IKT *EGFR* trzeciej generacji. W tym miejscu pojawia się możliwość zastosowania technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS, *next generation sequencing*) do badania nie tylko mutacji i rearanzacji w genach *EGFR*, *ALK* i *ROS1*, ale również nieprawidłowości genetycznych w genach *HER2*, *MET*, *BRAF*, *KRAS* i *RET*. W przypadku braku dostępności do tkanki lub komórek nowotworowych, eksperci dopuszczają możliwość badania wolnego, krążącego, nowotworowego DNA (cfDNA, *cell-free DNA*) we krwi obwodowej w celu wykrycia nieprawidłowości genetycznych i kwalifikacji do terapii ukierunkowanych molekularnie, zwracając jednocześnie uwagę, że metoda ta może nie posiadać wystarczającej czułości. Ponadto eksperci zalecają metodę immunohistochemiczną (IHC, *immunohistochemistry*) jako alternatywną do metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridisation*) do badania nieprawidłowości w genie *ALK*.

Zalecenia wspólne i uaktualnione dla rekomendacji z 2013 roku i 2018 roku

U wszystkich chorych na miejscowo zaawansowanego i uogólnionego raka gruczołowego lub NDRP z komponentą raka gruczołowego należy wykonać badania genetyczne w celu wykrycia mutacji w eksonach od 18. do 21. genu *EGFR*. Zbadane powinny być te mutacje genu *EGFR*, które występują z częstością większą niż 1% wśród znanych mutacji tego genu (substytucje w kodonach 709, 719, 768, 790, 858, 861, delecje w eksonie 19 oraz insercje w eksonie 20). W przypadku zawartości ponad 50% komórek nowotworowych w badanym materiale możliwe jest zastosowanie wszystkich metod genetycznych umożliwiających wykrycie wymienionych mutacji, które zostały odpowiednio zwalidowane dla danego laboratorium i są zgodne z *Clinical Laboratory Improvement Act* z 1988 roku oraz ich wykonanie nie wymaga dłuższego czasu niż 10 dni od daty otrzymania materiału. W 2018 roku obniżono minimalny odsetek komórek nowotworowych, który kwalifikuje do badania mutacji *EGFR* do 20%, co wymusza zastosowanie czulszych technik niż sekwencjonowanie metodą Sangera.

Po wykluczeniu obecności mutacji w genie *EGFR* w tej grupie chorych należy także wykonać badanie rearanżacji genu *ALK*. W 2013 roku do badania rearanżacji genu *ALK* była rekomendowana tylko metoda FISH, co zostało zupełnie zmienione w 2018 roku, kiedy za niemal równorzędną uznano metodę IHC (zostanie to omówione w dalszej części tego opracowania).

W kwalifikacji do badań genetycznych nie mogą być wykorzystane takie czynniki jak ekspozycja na dym tytoniowy, wiek, płeć i pochodzenie etniczne oraz występowanie mutacji w genie *KRAS*. Chociaż występowanie mutacji w genie *KRAS* wyklucza występowanie mutacji w pozostałych genach, to jednak wykonanie dodatkowego testu w celu wykrycia mutacji *KRAS* wydłuża czas prowadzenia diagnostyki (czas do rozpoczęcia leczenia) oraz doprowadza do zużycia cennego materiału diagnostycznego z guza nowotworowego. Eksperci nie zalecają badania mutacji genu *EGFR* u chorych na raka płaskonabłonkowego, jeśli w materiale pooperacyjnym nie stwierdzono żadnej komponenty raka gruczołowego. Metoda FISH nie powinna być wykorzystana w celu badania nieprawidłowości genu *EGFR* (powielenie liczby kopii genu) w kwalifikacji do terapii IKT EGFR. Nadal pozostają otwarte pytania, czy badanie mutacji w genie *EGFR* i rearanżacji genu *ALK* należy wykonywać u chorych we wczesnych stadiach zaawansowania. Przesłanek do wykonania takiego badania dostarcza potencjalny dostęp do badań klinicznych nad terapiami adjuwantowymi z udziałem IKT EGFR i ALK oraz wysokie ryzyko nawrotów po leczeniu chirurgicznym. Nadal dyskusyjne jest wykonanie badań genetycznych u chorych na raka gruczołowo-płaskonabłonkowego z niewielką komponentą raka gruczołowego lub u chorych na raka

płaskonabłonkowego, u których, z uwagi na niską liczbę komórek nowotworowych w materiale z biopsji, nie można wykluczyć komponenty raka gruczołowego.

W 2018 roku powyższe zalecenia uzupełniono. Przede wszystkim stwierdzono, że wszystkie odpowiednie utrwalone preparaty cytologiczne, zawierające odpowiednią liczbę komórek nowotworowych, mogą być badane na obecność nieprawidłowości genetycznych, przy czym w przypadku poszukiwania mutacji w genie *EGFR* wystarczająca jest metoda allelospecyficznego *real-time* PCR, a w przypadku badania rearanżacji w genach *ALK* lub *ROS1* — metoda NGS. Ponadto w związku z wykorzystaniem EBUS-TBNA w diagnostyce chorych na NDRP, wymagane jest wykorzystanie technik genetycznych (allelospecyficznego *real-time* PCR, kropłowy, cyfrowy PCR lub NGS zamiast sekwencjonowania bezpośredniego metodą Sanger), które umożliwiają wykrycie mutacji w genie *EGFR* w preparatach zawierających co najmniej 20% komórek nowotworowych. Podtrzymane zostało stanowisko, że metoda IHC nie może być dłużej wykorzystana w ocenie ekspresji białka EGFR w kwalifikacji do terapii IKT EGFR. Eksperci podkreślają, że jedynie wykrycie mutacji w genie *EGFR* jest czynnikiem predykcyjnym dla terapii IKT EGFR. Ponadto metody IHC, które wykrywają nieprawidłowe białko EGFR (powstałe w skutek delecji w eksonie 19 lub substytucji w eksonie 21) muszą zostać zastąpione metodami genetycznymi. Wynika to z faktu, że przeciwciała przeciwko EGFR wykrywają nieprawidłowy receptor, tylko jeśli powstał on w wyniku mutacji L858R lub niektórych rodzajów delecji w eksonie 19, natomiast nie są specyficzne w stosunku do nieprawidłowego białka powstałego w wyniku rzadkich rodzajów delecji w eksonie 19 i innych rzadkich mutacji w genie *EGFR*.

Nowe zalecenia dotyczące wykonywania badań genetycznych u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca

Eksperci CAP, *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) i AMP podzielili nowe rekomendacje według problemów diagnostyczno-terapeutycznych u chorych na NDRP, które pojawiły się w ostatnich latach. Przedstawili 5 pytań dotyczących diagnostyki.

Pytanie 1. Jakie nowe geny powinny być badane u chorych na raka płuca?

Wyróżniono dwie kategorie genów:

1. dla których wykonanie badań genetycznych jest niezbędne oraz,
2. dla których wykonanie badań genetycznych ma charakter badawczy i może być wykorzystane w kwalifikacji do terapii w ramach badań klinicznych.

Badanie rearanżacji genu *ROS1* (1. kategoria genów)

Ekspertsi podkreślają, że możliwość zbadania genów *EGFR*, *ALK* i *ROS1* musi istnieć we wszystkich laboratoriach zajmujących się molekularną diagnostyką raka płuca i wykonujących testy jednogenu (*single-gene assays*). W odróżnieniu od poprzednich rekomendacji, obecnie uważa się, że istnieją silne przesłanki do badania rearanżacji genu *ROS1* u chorych na raka gruczołowego w kwalifikacji do terapii I linii za pomocą kryzotybinu. Nieprawidłowość ta występuje u 2–3% chorych na raka gruczołowego, głównie niepalących papierosów. Brak jest mocnych danych dotyczących różnic w częstości występowania rearanżacji genu *ROS1* u chorych z różnych grup etnicznych oraz w zależności od płci i wieku.

Badanie rearanżacji genu *ROS1* wykonuje się częściej za pomocą metod cytogenetycznych (FISH) oraz za pomocą metod molekularnych (NGS i technika *real-time PCR* z zastosowaniem odwrotnej transkrypcji (RT-PCR, *reverse transcription PCR*). Chociaż badanie rearanżacji genu *ROS1* za pomocą metody RT-PCR zostało uznane za wiarygodne w niektórych krajach azjatyckich i europejskich, to jego wyniki mogą być jednak fałszywie ujemne z uwagi na występowanie wielu wariantów rearanżacji genu *ROS1* (partnerami do fuzji dla genu *ROS1* są między innymi geny *SLC34A2*, *CD74*, *TPM3* i inne) niewykrywalnych techniką RT-PCR. Dlatego w Stanach Zjednoczonych częściej do badania rearanżacji genu *ROS1* wykorzystuje się technikę FISH z sondami molekularnymi typu *break-apart*. Natomiast metoda immunohistochemiczna wykrywająca ekspresję nieprawidłowego białka *ROS1* na komórkach nowotworowych może być w USA wykorzystywana jako przesiewowa w kwalifikacji materiału do badań genetycznych. Każdy dodatni wynik badania IHC musi być zawsze potwierdzony metodami genetycznymi, natomiast wynik ujemny badania IHC nie wymaga potwierdzenia. Zalecenie to wynika z faktu, że 1/3 chorych bez rearanżacji genu *ROS1* posiada komórki nowotworowe wybarwiające się przeciwciałem anty-*ROS1* (najczęściej wykorzystuje się klon D4D6) w postaci słabego odczynu IHC, kropkowania i odczynów występujących tylko we fragmentach guza i częściach komórek. Czułość i specyficzność testu IHC w stosunku do metody FISH ocenia się na poziomie 96% i 94%, jeśli jako dodatni odczyn IHC przyjmuje się umiarkowane, silne lub bardzo silne wybarwienie komórek (+2–+4).

Rearanżacja genu *ROS1* nie współistnieje z innymi nieprawidłowościami genetycznymi, dlatego w przypadku sekwencyjnego badania czynników predykcyjnych testami jednogenu należy rozpocząć od oceny mutacji genu *EGFR*, następnie nieprawidłowości genu *ALK* i zakończyć diagnostykę molekularną na badaniu rearanżacji genu *ROS1*. U chorych bez nieprawidłowości w obrębie genów *EGFR*, *ALK*, *KRAS* i *BRAF*

częstość występowania rearanżacji genu *ROS1* wynosi 5–10%.

Rekomendacje dotyczące konieczności badania genu *ROS1* u chorych na raka gruczołowego zostały postawione na podstawie 9 badań. W najważniejszym z nich 50 chorych z rearanżacją genu *ROS1* potwierdzoną metodą FISH lub RT-PCR otrzymało kryzotybin, co umożliwiło uzyskanie odpowiedzi na leczenie u 72% chorych oraz mediany czasu wolnego od progresji (PFS, *progression free survival*) — 19,2 miesiąca. Na tej podstawie kryzotybin uzyskał w 2016 roku rejestrację w USA do leczenia chorych na raka gruczołowego z rearanżacją genu *ROS1*. Europejskie badanie oceniające skuteczność kryzotybinu u 32 chorych z rearanżacją genu *ROS1* udowodniło wystąpienie odpowiedzi u 80% chorych i oceniło medianę PFS na poziomie 9,1 miesiąca, co również umożliwiło stosowanie tego leku w Unii Europejskiej.

Badanie nieprawidłowości w genach z kategorii 2.

Nieprawidłowości w genach *BRAF*, *MET*, *RET*, *ERBB2 (HER2)* i *KRAS* mogą być badane w ramach pojedynczych testów (*single-gene assays*: techniki PCR lub FISH) w drugiej kolejności, po wykluczeniu nieprawidłowości w genach *EGFR*, *ALK* i *ROS1*, u chorych na NDRP o typie innym niż płaskonabłonkowy, jeśli materiał jest wystarczający do badań genetycznych, a chorzy mają szansę zakwalifikować się do nowych metod leczenia. Innymi słowy, badanie tych genów za pomocą testów jednogenu nie jest rekomendowane przez ekspertów CAP, IASLC i AMP do rutynowej diagnostyki genetycznej u chorych na NDRP prowadzonej przed rozpoczęciem leczenia. Natomiast może być wskazane jednoczesne badanie wszystkich genów z kategorii 1. (geny *EGFR*, *ALK* i *ROS1*) i 2. (geny *BRAF*, *MET*, *RET*, *HER2*, *KRAS*), jeśli laboratorium wykorzystuje w diagnostyce technikę NGS (paneje genetyczne). Jeśli wykorzystuje testy jednogenu, to po wykluczeniu nieprawidłowości w obrębie genów *EGFR*, *ALK* i *ROS1* można zawęzić populację chorych, u których należy wykonać badanie genów z kategorii 2., dzięki badaniu najpierw mutacji w genie *KRAS* (stosunkowo najczęstsza mutacja u chorych na NDRP nie współistniejąca z innymi mutacjami, 20–30% chorych na raka gruczołowego posiada tę mutację), a w przypadku jej wykluczenia — badania genów *BRAF*, *MET*, *RET*, *HER2* (dobór testu do możliwości terapeutycznych). Jednak u chorych bez nieprawidłowości w genach *EGFR*, *ALK* i *ROS1* zbadanych technikami jednogenu najbardziej właściwe jest wykorzystanie paneli genetycznych NGS i jednoczesne zbadanie wszystkich genów kategorii 2., jeśli istnieją ku temu przesłanki kliniczne (możliwość kwalifikacji do leczenia). Dane demograficzne (wiek, płeć, status palenia) nie są czynnikami, które mogą być wykorzystane w kwalifikacji do badania genów kategorii 2.

Badanie mutacji genu *BRAF*

Mutacje aktywujące w genie *BRAF* występują u 0,5–4,9% chorych na raka gruczołowego. W komórkach NDRP obserwuje się najczęściej substytucję V600E, która występuje też często w komórkach czerniaka, raka brodawkowego tarczycy i raka jelita grubego. U chorych na NDRP pojawia się także mutacja V600K oraz mutacje w eksonach 11 (kodony 466 i 469) oraz 15. Dlatego w badaniach klinicznych wykorzystuje się techniki NGS, które pozwalają na wykrycie wszystkich tych nieprawidłowości. Z tego też względu i z powodu nieustalonej specyficzności i czułości nie ma rekomendacji do wykorzystania techniki IHC z przeciwciałem specyficznym do nieprawidłowego białka *BRAF* (VE1) do diagnostyki nieprawidłowości *BRAF*. W większości badań wykazano, że mutacje w genie *BRAF* występują częściej u chorych niepalących oraz u kobiet. Mutacja V600E nie współlistnieje z nieprawidłowościami w genach *KRAS*, *EGFR* i *ALK*, ale pozostałe mutacje genu *BRAF* mogą współwystępować z mutacjami kierującymi w innych genach.

Rekomendacje dotyczące konieczności badania genu *BRAF* eksperci oparli na analizie wyników 9 badań. W badaniu II fazy wykazano, że monoterapia dabrafenibem (inhibitor *BRAF*) u chorych w IV stopniu zaawansowania raka gruczołowego płuca z substytucją V600E umożliwia uzyskanie odpowiedzi na leczenie u 33% chorych. Terapia z wykorzystaniem dabrafenibu i trametyny (inhibitor *MEK*) podnosi ten odsetek do 63%. W badaniu tym nie wykorzystywano innych standardowych metod leczenia jako komparatora skuteczności dla dabrafenibu i trametyny. Dlatego eksperci CAP, IASLC i AMP uzależniają swoją opinię o konieczności wykonania badania mutacji genu *BRAF* podczas pierwszorazowej diagnostyki od ewentualnych wyników prospektywnego badania klinicznego z udziałem chorych z mutacją genu *BRAF* leczonych dabrafenibem w połączeniu z trametyny lub chemioterapią.

Pamiętać jednak należy, że w Stanach Zjednoczonych i Unii Europejskiej dabrafenib i trametyny są zarejestrowane do leczenia chorych na NDRP z mutacją V600 genu *BRAF*, więc najnowsze rekomendacje *European Society for Medical Oncology* (ESMO) zalecają badanie mutacji genu *BRAF* (kodon 600) w trakcie kwalifikacji do terapii I linii u chorych na zaawansowanego NDRP. W związku z tym badanie mutacji genu *BRAF* (jako pojedyncze badanie technikami PCR lub w ramach paneli genetycznych NGS) powinno stać się badaniem niezbędnym na początku diagnostyki u chorych na zaawansowanego raka gruczołowego.

Badanie nieprawidłowości genu *MET*

Gen *MET* koduje receptor dla czynnika wzrostu hepatocytów (HGFR, *hepatocyte growth factor receptor*). HGFR jest nadmiernie aktywowany u chorych na NDRP w wyniku wysokiej jego ekspresji (20–70% chorych) spo-

wodowanej amplifikacją genu *MET* (ok. 2–4% chorych nieleczonych i 5–20% chorych leczonych wcześniej IKT EGFR), mutacjami w domenie dla kinazy tyrozynowej genu *MET* lub mutacjami miejsca *splicingowego* w intronach 13–14 lub w eksonie 14 genu *MET*. Mutacje miejsca *splicingowego* powodują pominięcie eksonu 14 (*exon 14 skipping mutation*, ok. 3–4% chorych na raka gruczołowego) podczas składania mRNA dla genu *MET*. Najpoważniejsza w skutkach i najtrudniejsza do wykrycia jest mutacja *splicingowa*. Jej powstanie skutkuje utratą w HGFR miejsca wiązania protonogenu CBL (*Casitas B-lineage lymphoma*) niezbędnego do degradacji białek zależnej od ich ubikwitynizacji. Innymi słowy, HGFR nie jest degradowany na powierzchni komórek i wykazuje nadekspresję. Trudności w opracowaniu testu badającego mutacje *splicingowe* wiążą się ze zmiennym rejonem ich występowania. Mutacje te (najczęściej delecje lub insercje, ale możliwe są też substytucje) mogą występować zarówno w intronie 13 (*splice donor*) i 14 (*splice acceptor*), jak również w samym eksonie 14 genu *MET*. Dotychczas opisano ponad 100 różnych nieprawidłowości tego rodzaju. Wszystkie wymienione nieprawidłowości występują przede wszystkim u chorych na raka gruczołowego.

Do badania ekspresji HGFR i fosforylowanej formy HGRF na powierzchni komórek nowotworowych wykorzystuje się technikę IHC. Jednym z najczęściej wykorzystywanych przeciwciał anty-*MET* jest klon SP44. Nie ma dowodów na to, że wysoka ekspresja HGFR na komórkach nowotworowych ma jakąkolwiek rolę onkogeną, a jej badanie może być użyteczne w terapii anty-HGFR.

Badanie różnych nieprawidłowości w genie *MET* wymaga zastosowania różnych metod genetycznych. Metoda FISH stosowana jest do badania amplifikacji genu *MET*. W tym przypadku stosuje się dwie sondy molekularne specyficzne do fragmentu genu *MET* i centromeru chromosomu 7. O pośredniej amplifikacji genu *MET* świadczy stosunek liczby sygnałów z sondy specyficznej do *MET* do liczby sygnałów z sondy specyficznej do centromeru o wartości 2,2–5, a o wysokiej — powyżej 5. O wysokiej amplifikacji genu *MET* można także mówić w przypadku liczby sygnałów z sondy specyficznej do genu *MET* wynoszącej powyżej 5 (bez konieczności obliczania powyżej wspomnianego wskaźnika). Pośrednia amplifikacja genu *MET* może współlistnieć z innymi mutacjami i rearanżacjami genowymi, ale takiego współwystępowania nie stwierdza się u chorych z wysoką amplifikacją omawianego genu, co świadczy, że taka amplifikacja odgrywa wiodącą rolę w onkogenezie raka gruczołowego płuca.

W związku z dużym zróżnicowaniem mutacji w regionie eksonu 14 genu *MET* do ich badania używa się wyłącznie technik NGS, które pozwalają na kompleksowe zbadanie intronu 13 i 14 oraz eksonu 14.

W niektórych przypadkach niezbędne jest badanie mRNA w celu potwierdzenia czy mutacje te miały wpływ na *splicing* mRNA. U 20% chorych z mutacjami w regionie eksonu 14 genu *MET* występuje także amplifikacja tego genu.

U chorych z wysoką amplifikacją genu *MET* wykazano skuteczność kryzotyningu (inhibitor ALK, ROS1 i *MET*). Ponadto w niewielkich badaniach klinicznych wczesnych faz u chorych z mutacjami w regionie eksonu 14 genu *MET* badano skuteczność kryzotyningu, sawolityningu, tepotyningu, glesatyningu oraz kapmatyningu. Amplifikację genu *MET* opisano po raz pierwszy jako jeden z mechanizmów oporności na terapię IKT EGFR. Dlatego też podjęto próby przełamania tej oporności za pomocą onartuzumabu (przeciwciała anty-HGFR) i tiwantyningu (IKT HGFR). Badania te zakończyły się jednak niepowodzeniem, mimo że w podgrupie z amplifikacją genu *MET*, wykazano wyższą skuteczność tych leków. Natomiast w badaniu II fazy u 40% chorych z opornością na IKT EGFR i wysoką amplifikacją genu *MET* stwierdzono odpowiedź na terapię z udziałem gefityningu i kapmatyningu. Dotychczas nie zarejestrowano żadnej terapii u chorych z nieprawidłowościami genu *MET*.

Badanie pozostałych genów kategorii 2.

Rearanżacja genu *RET* występuje u 0,6–0,9% chorych na NDRP i u 1,2–2% chorych na raka gruczołowego. Nie stwierdza się jej u chorych na raka płaskonabłonkowego, ale może wystąpić w raku gruczołowo-płaskonabłonkowym. Zmianę tą obserwuje się częściej u młodych chorych nigdy niepalących papierosów. Partnerami do fuzji dla genu *RET* są *KIF5B* (najczęstszy wariant rearanżacji występujący u 90% chorych z nieprawidłowościami genu *RET*), *CCDC6*, *NCOA4* i *TRIM33*. Rearanżacja genu *RET* nie współistnieje z innymi nieprawidłowościami genetycznymi w komórkach NDRP. W dwóch badaniach klinicznych II fazy wykazano skuteczność wandetanibu lub kabozantyningu u chorych z rearanżacją genu *RET*, ale leki te stosowano w małych grupach chorych. Do badania genu *RET* wykorzystuje się technikę FISH z sondami typu *break-apart*, technikę IHC, RT-PCR lub NGS (w ramach paneli genetycznych). Najczęściej do diagnostyki rearanżacji tego genu wykorzystuje się technikę FISH, chociaż występują trudności w interpretacji wyników (rozdzielenie sygnałów z sond molekularnych może być nieczytelne). Wynik 15% (rzadziej 20%) jąder z rearanżacją genu *RET* uznaje się za pozytywny (podobnie jak w przypadku badania rearanżacji genu *ALK*). W jednym badaniu oceniono przydatność techniki IHC do badania obecności nieprawidłowego białka RET (klon przeciwciała ab134100), stwierdzając czułość i specyficzność tej metody na poziomie 100%

i 88% w stosunku do badania FISH. Technika RT-PCR może być wykorzystywana do wykrywania najczęstszych genów fuzyjnych, ale rzadkie warianty rearanżacji genu *RET* mogą zostać przeoczone. Dlatego techniki NGS wydają się alternatywą do badania FISH w diagnostyce nieprawidłowości genu *RET*.

Powielenie liczby kopii lub amplifikacja genu *ERBB2* (*HER2*) występuje u 2–5% chorych na NDRP. Tę nieprawidłowość genetyczną bada się technikami IHC i FISH. Natomiast insercja w eksonie 20 (duplikacja 12 par zasad w kodonach 775–778) lub substytucja w kodonie 310 genu *HER2* występują u 1–2% chorych na raka gruczołowego i nie współistnieją z innymi mutacjami kierującymi. Mutacje te mogą współistnieć z amplifikacją genu *HER2*. Mutacje genu *HER2* występują u młodych chorych niepalących papierosów. Mutacje genu *HER2* można badać technikami PCR lub w ramach paneli genetycznych NGS. U chorych z mutacjami genu *HER2* obserwowano efekt terapeutyczny stosowania daktomityningu i afatyningu, a u chorych z amplifikacją genu *HER2* — trastuzumabu w małych badaniach klinicznych i w seriach opisów przypadków.

Mutacje w genie *KRAS* występują u 20–30% chorych na raka gruczołowego zwłaszcza u palaczy tytoniu (5% chorych niepalących także może posiadać mutacje w genie *KRAS*). Mutacje te występują częściej u mężczyzn i u chorych rasy kaukaskiej niż u kobiet i Azjatów. Najczęstsze mutacje dotyczą kodonów 12. i 13., rzadziej kodonu 61. i bardzo rzadko kodonu 146. genu *KRAS* i mogą być wykrywane różnymi odmianami technik PCR (allelospecyficzny *real-time* PCR, czy kroplowy, cyfrowy PCR) oraz technikami sekwencjonowania (pirosekwencjonowanie, NGS). Nie istnieją terapie, których skuteczność zostałaby udowodniona u chorych na NDRP z mutacjami w genie *KRAS*. W badaniu III fazy SELECT-1 selumetyning (inhibitor MEK1) był stosowany łącznie z chemioterapią II linii z użyciem docetakselu u chorych z mutacjami w genie *KRAS*. Odsetek odpowiedzi na terapię wyniósł 37%, ale nie udało się zwiększyć mediany czasu przeżycia całkowitego i czasu wolnego od progresji. Ponieważ mutacje w genie *KRAS* wykluczają występowanie innych omawianych nieprawidłowości genetycznych, to badanie genu *KRAS* może mieć pewną wartość w kwalifikacji do pozostałych badań genetycznych, co zostało omówione powyżej.

W wybranych przypadkach i w sytuacji dostępności do terapii w badaniach klinicznych wskazane jest także badanie rearanżacji i amplifikacji genów *NTRK* i z rodziny *FGFR*. Do innych genów, w których wykrycie nieprawidłowości może w przyszłości posłużyć do kwalifikacji do terapii ukierunkowanych molekularnie należą: *MEK1*, *NRG1*, *RIT1*, *NF1*, *PIK3CA*, *AKT1*, *NRAS*, *MTOR*, *TSC1*, *TSC2*, *KIT*, *PDGFRA*, *DDR2*.

Pytanie 2: Jakie metody powinny być wykorzystywane w diagnostyce genetycznej czynników predykcyjnych do terapii inhibitorami kinaz tyrozynowych?

Badanie immunohistochemiczne w celu wykrycia ekspresji białka ALK

Ekspert CAP, IASLC i AMP uważają, że badanie IHC ekspresji nieprawidłowego białka ALK dostarcza równie wiarygodnych wyników jak badanie rearanżacji genu *ALK* metodą FISH. Rekomendacja ta została oparta o analizę 20 prospektywnych i retrospektywnych badań dotyczących zarówno metodologii oznaczeń nieprawidłowości ALK, jak i skuteczności inhibitorów ALK u chorych, u których zdiagnozowano nieprawidłowości ALK metodą IHC i FISH. W poprzednich zaleceniach z roku 2013 w kwalifikacji do terapii kryzotynibem rekomendowano badanie rearanżacji genu *ALK* w komórkach nowotworowych metodą FISH za pomocą sond typu *break-apart* (utrata sygnału z jednej sondy lub rozdzielenie sygnałów z obu sond, świadczące o inwersji w obrębie chromosomu 2). Kryzotynibem mogli być leczeni chorzy, u których stwierdzono co najmniej 15% jąder komórkowych z rearanżacją genu *ALK*. Jednak badanie FISH ma wiele ograniczeń, do których zalicza się trudności w interpretacji wyników granicznych (15% jąder z rearanżacją genu *ALK*), wysoki koszt i długi czas wykonania badania. Z drugiej strony metoda IHC w diagnostyce ekspresji ALK, chociaż tańsza i prostsza, wykazywała duże rozbieżności wyników w zależności od klonu przeciwciała anti-ALK i protokołu badania oraz sposobu interpretacji wyników (charakter odczynu IHC).

W 2015 roku stwierdzono, że klon przeciwciała ALK1 wykorzystywany w diagnostyce ekspresji nieprawidłowego białka ALK u chorych na chłoniaka anaplastycznego nie powinien być wykorzystywany u chorych na NDRP. Komórki NDRP charakteryzowały się bowiem niższą ekspresją ALK niż komórki chłoniaka. Mimo zmiany w systemie detekcji ekspresji ALK za pomocą przeciwciała ALK1 (polimer przeciwciał) czułość badania pozostawała niska (67–100%) przy wysokiej swoistości tego testu IHC (91–99%) w stosunku do badania FISH u chorych na NDRP. Dlatego dwa nowe przeciwciała zostały wykorzystane w diagnostyce ekspresji nieprawidłowego białka ALK u chorych na NDRP: klony 5A4 oraz D5F3. Oba testy IHC uzyskały czułość i swoistość na poziomie 97–99% w porównaniu do badania FISH (łączna analiza 9 badań). W USA w 2015 roku test IHC z klonem przeciwciała D5F3 został zarejestrowany do diagnostyki ekspresji białka fuzyjnego ALK na komórkach nowotworowych w kwalifikacji do terapii kryzotynibem. W Unii Europejskiej badanie ekspresji ALK za pomocą testu IHC z klonem przeciwciała D5F3 jako pojedynczy test (bez koniecz-

ności potwierdzenia rearanżacji *ALK* metodą FISH) jest także dopuszczone do wykorzystania w kwalifikacji do terapii inhibitorami ALK. Jednak istnieją pewne zastrzeżenia dotyczące interpretacji wyniku badania IHC. Badanie IHC nieprawidłowego białka ALK jest pozytywne, jeśli obserwowany jest silny, gruboziarnisty odczyn cytoplazmatyczny (któremu najczęściej towarzyszy odczyn błonowy) w większości komórek nowotworowych. Jednak drobnoziarnista i słaba cytoplazmatyczna i heterogenna ekspresja nieprawidłowego białka ALK wykryta techniką IHC musi być zawsze potwierdzona badaniem rearanżacji *ALK* metodą FISH, RT-PCR lub NGS. Metody RT-PCR i NGS nie mają rejestracji w USA do badania nieprawidłowości genu *ALK* w kwalifikacji do terapii inhibitorami ALK, a metoda RT-PCR wykorzystywana jest tylko w krajach azjatyckich z uwagi na brak zdolności tej metody do wykrycia wszystkich wariantów fuzyjnych genu *ALK*. Pamiętać też należy, że obecność rearanżacji genu *ALK* w granicznym odsetku jąder komórkowych (15–20% jąder) oraz utrata sygnału z jednej sondy (pojedyncze sygnały, a nie rozdzielenie sygnałów) wykryte techniką FISH mogą skutkować ujemnymi wynikami badania ekspresji nieprawidłowego białka ALK metodą IHC.

Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)

Ekspert CAP, IASLC i AMP zalecają wykorzystanie technik NGS w celu kwalifikacji chorych na NDRP do terapii w badaniach klinicznych po wykluczeniu u nich nieprawidłowości w genach *EGFR*, *ALK* i *ROS1* testami jednogenomowymi. Metody NGS są w stanie wykryć większość wariantów fuzyjnych genów *ALK* i *ROS1* (badanie DNA), a chorzy z pozytywnym wynikiem badania NGS powinni być w takich przypadkach leczeni inhibitorami ALK i ROS1. Jednak ujemne wyniki badania NGS powinny być potwierdzone za pomocą bardziej czułych metod genetycznych, takich jak badanie FISH. Z uwagi na czas prowadzenia tego rodzaju diagnostyki, wykonanie NGS nie zawsze powinno być rekomendowane w rutynowej diagnostyce, służącej kwalifikacji chorych na NDRP w stadium IIIB lub IV do terapii I linii.

Mimo tych zastrzeżeń eksperci są zgodni, że wprowadzenie technik NGS na trwałe zmieniło możliwości prowadzenia diagnostyki genetycznej w kwalifikacji do terapii w chorobach nowotworowych. Techniki NGS umożliwiają jednoczesowe poznanie zaburzeń genetycznych w wymienionych wcześniej genach oraz w setkach czy tysiącach innych genów. Co więcej możliwe jest w jednej reakcji NGS nie tylko badanie mutacji, ale także ocena rearanżacji genowych i liczby kopii poszczególnych genów. W większości badań potwierdzono wysoką czułość technik NGS w porównaniu z testami jednogenomowymi, zwłaszcza w odniesieniu do mutacji punktowych. Z uwagi na jednoczesowe wykonanie badania wielu genów, techniki NGS nie wymagają tak

dużej ilości DNA i zawartości komórek nowotworowych jak w przypadku zastosowania technik jednogenowych (np. allelospecyficzny *real-time* PCR). Jednak do przeprowadzenia badań techniką NGS wymagany jest kosztowny sprzęt, bardzo doświadczony personel oraz czas na wykonanie i bioinformatyczną interpretację wyników. Sekwencjonowanie poprzedza tworzenie bibliotek jednoniciowego DNA. W następnym etapie przeprowadza się amplifikację fragmentów DNA z wykorzystaniem metody PCR. W ostatnim etapie odbywa się sekwencjonowanie z zastosowaniem fluorescencyjnie znakowanych nukleotydów (sekwencjonowanie przez syntezę) lub ligacji znakowanych fluorescencyjnie fragmentów oligoneukleotydowych (sekwencjonowanie przez ligację). Pierwsza z metod jest stosunkowo łatwa, szybka i umożliwia wykrycie nieprawidłowości genetycznych przy niewielkiej zawartości zmienionego DNA, ale może nie radzić sobie w diagnostyce rearanżacji genowych i w analizie większych fragmentów DNA. Druga metoda jest bardziej złożona i wymaga zastosowania wieloetapowych protokołów oraz posiada niższą czułość w przypadku materiałów zawierających niewielką ilość nowotworowego DNA, jednak umożliwia lepsze poznanie zaburzeń genetycznych w długich fragmentach DNA.

Wprowadzenie do laboratorium metody NGS jako techniki diagnostycznej w analizie czynników predykcyjnych w kwalifikacji do terapii przeciwnowotworowych wymaga dokładnej walidacji. Wszystkie wyniki uzyskane w metodzie NGS, które są niespodziewane, dwuznaczne lub niezgodne z danymi klinicznymi wymagają weryfikacji innymi metodami genetycznymi o uznanej wartości diagnostycznej.

Pytanie 3: Czy badania genetyczne czynników predykcyjnych do terapii inhibitorami kinaz tyrozynowych powinny być wykonywane u chorych na NDRP o typie innym niż gruczolowym?

Zlecenie badań genetycznych u chorych na raka płuca o typie innym niż gruczolowy jest uzasadnione, jeśli dane kliniczne (młody wiek zachorowania, brak wywiadu palenia papierosów) wskazują na możliwość wystąpienia onkogennych nieprawidłowości genetycznych. Dotyczy to przede wszystkim chorych na raka płaskonabłonkowego, drobnokomórkowego i neuroendokrynnego bez jakiegokolwiek komponenty gruczolowej. Wyniki nielicznych badań, w których wykryto mutację genu *EGFR* u chorych na raka płaskonabłonkowego mogą być niemiernodajne, gdyż nie da się wykluczyć obecności komponenty gruczolowej w przypadku braku możliwości przebadania całego guza nowotworowego. W sytuacji braku możliwości określenia typu NDRP (NOS, *not otherwise specified*), badania genetyczne należy przeprowadzić tak, jak u chorych na raka gruczolowego (nie można wykluczyć, że materiał zawiera komórki raka gruczolowego).

Stwierdzenie, że badania genetyczne u chorych na NDRP o typie innym niż gruczolowy należy wykonać u młodych chorych niepalących papierosów, nie ma silnej podbudowy w opublikowanych wynikach badań. Rzeczywiście mutacje w genie *EGFR* u chorych na raka płuca bez komponenty gruczolowej stwierdzano jedynie u pacjentów niepalących lub z wywiadem palenia papierosów nie przekraczającym 10 paczolat. Natomiast wiek zachorowania u chorych na raka gruczolowego z mutacją w genie *EGFR* jest tylko nieznacznie niższy niż u chorych bez mutacji w tym genie, ale nie stwierdza się różnic w wieku zachorowania u chorych na raka gruczolowego z rearanżacjami w genach *ALK* i *ROS1* oraz bez tych nieprawidłowości. Przekładając te informacje na chorych na NDRP o typie innym niż gruczolowy, eksperci doszli do wniosku, że wykonanie testów genetycznych może być uzasadnione u chorych na raka płaskonabłonkowego i neuroendokrynnego poniżej 50 roku życia. Jednak ostateczną decyzję o podjęciu badań genetycznych w tej grupie chorych eksperci pozostawiają wielodyscyplinarnemu zespołowi w poszczególnych ośrodkach onkologicznych. Jednocześnie zauważają, że panele genetyczne NGS w przyszłości będzie można dostosować do profilu molekularnego komórek nowotworowych o typie innym niż gruczolowy w przypadku dostępu do nowych terapii w badaniach klinicznych.

Pytanie 4: Jakie badania genetyczne powinny być wykonywane u chorych z nawrotem choroby w trakcie terapii inhibitorami kinaz tyrozynowych?

Silne dowody przemawiają za koniecznością badania mutacji T790M w genie *EGFR* u chorych z aktywnymi mutacjami genu *EGFR* z progresją choroby w trakcie terapii IKT *EGFR* pierwszej i drugiej generacji. Materiał do takiego badania musi być pobrany w momencie progresji choroby (nie jest możliwe wykorzystanie w tym celu materiału, który służył do diagnostyki w kwalifikacji do I linii leczenia). Wykrycie mutacji T790M jest kluczowe dla możliwości kwalifikacji chorych do IKT *EGFR* trzeciej generacji, takich jak ozymertynib. Laboratoria prowadzące diagnostykę mutacji T790M muszą dysponować wysoko czułymi technikami umożliwiającymi wykrycie jej w przypadku obecności $\geq 5\%$ komórek nowotworowych z tą mutacją w badanym materiale. Czułość technik allelospecyficznego *real-time* PCR (wykazana w badaniach klinicznych z wykorzystaniem IKT *EGFR* III generacji) umożliwia zazwyczaj przeprowadzenie takiej diagnostyki, ale techniki sekwencjonowania starszej generacji nie spełniają takich wymogów. Obecność 5% klonu komórek nowotworowych z mutacją T790M zazwyczaj wystarcza do dalszej ekspansji tych komórek mimo stałej ekspozycji na IKT *EGFR* I lub II generacji, co, oprócz progresji klinicznej, przemawia za koniecznością zmiany sposobu leczenia. Ponadto materiał z powtórnej biopsji może zawierać duży odsetek

komórek nienowotworowych, co dodatkowo wymusza użycie technik allelospecyficznego *real-time* PCR w diagnostyce takiego materiału. Dopuszczalne jest także wykorzystanie w tym celu kropłowego, cyfrowego PCR i technik NGS.

Pojawienie się klonów komórek nowotworowych z mutacją T790M jest najczęstszą przyczyną oporności na terapię IKT EGFR I i II generacji (50% chorych). Jednak przyczyny oporności mogą być także inne, na przykład amplifikacja genów *MET* i *HER2*. Możliwe jest znalezienie terapii ukierunkowanych molekularnie dla takich chorych w ramach badań klinicznych. Dlatego po wykluczeniu obecności mutacji T790M w genie *EGFR* w uzasadnionych przypadkach (dostęp do terapii) wskazane jest zbadanie innych genów w ramach paneli genetycznych NGS. Ponadto trwają badania nad przyczynami oporności na terapię IKT EGFR trzeciej generacji. Jedną z takich przyczyn może być selekcja klonu komórek z mutacją C797S genu *EGFR*, jednak z uwagi na słabe poznanie roli tej mutacji w rozwoju oporności oraz braku terapii dla takich chorych (w badaniach wczesnych faz znajduje się m. in. brygatynib) eksperci nie rekomendują konieczności jej badania w rutynowej diagnostyce genetycznej.

Nie ma również rekomendacji do badania aktywujących mutacji w genie *ALK*, które mogą być przyczyną oporności na inhibitory ALK u chorych na raka gruczołowego z rearanżacjami genu *ALK*. Istnieją jednak doniesienia, w których jako przyczyny oporności na kryzotynib określono pojawienie się komórek nowotworowych z mutacjami L1152R, C1156Y, F1174L, L1196M, L1198P, D1203N lub G1269A w genie *ALK*. Oporność na terapię inhibitorami ALK nowych generacji obserwuje się u chorych z mutacjami G1202R, G1202del, V1180L, S1206Y lub E1201K w komórkach nowotworowych. Badania te jednak w opinii ekspertów nie dostarczają silnych dowodów na znaczenie tych mutacji w rozwoju oporności na inhibitory ALK (zbyt mała liczba chorych, heterogenne grupy badane, różna metodologia badań). Ich ocena nie może warunkować wyboru rodzaju terapii różnymi inhibitorami ALK. Każdy z inhibitorów ALK drugiej generacji (certynib, brygatynib, lorlatynib lub alektynib) może być zastosowany u chorych, którzy przestali odpowiadać na kryzotynib niezależnie od statusu mutacji w genie *ALK*.

Pytanie 5: Jaka jest rola badania wolnego krążącego DNA w diagnostyce chorych na raka płuca?

Wiele prac naukowych udowodniło, że DNA uwolnione z rozpadających się komórek nowotworowych do krwi obwodowej (cfDNA, *circulating-free DNA*) może zostać wykryte i zbadane przy wykorzystaniu czułych technik genetycznych, takich jak kropłowy, cyfrowy PCR,

allelospecyficzny *real-time* PCR i NGS. Istnieje zatem możliwość badania nieprawidłowości genetycznych w cfDNA w kwalifikacji do terapii zarówno w początkowym procesie diagnostycznym, jak i w przypadku progresji w trakcie terapii IKT, jako alternatywa w stosunku do badania materiału pobranego bezpośrednio z guza. cfDNA może dobrze reprezentować wszystkie zmiany genetyczne, jakie zaszły w komórkach nowotworowych (pochodzi z komórek rozpadających się w różnych fragmentach guza), co jest szczególnie istotne u chorych z opornością na IKT z powodu powstawania u nich różnych klonów komórek nowotworowych. U chorych na raka gruczołowego badanie cfDNA prowadzone w celu wykrycia mutacji genu *EGFR* ma wysoką specyficzność (95%) z niskim odsetkiem wyników fałszywie pozytywnych, ale także niską czułość (60–70%). Wynik negatywny badania mutacji genu *EGFR* w cfDNA nie wyklucza obecności tej mutacji w guzie (dotyczy to także mutacji T790M diagnozowanej u chorych z opornością na IKT EGFR I lub II generacji). Ponadto ilość nowotworowego cfDNA zależy od zaawansowania choroby (wielkość guza, obecność przerzutów), biologii komórek nowotworowych oraz dynamiki eliminacji cfDNA z krwi obwodowej. Jeszcze większe ograniczenia posiada badanie wolnych krążących komórek nowotworowych oraz egzosomów zawierających nowotworowe DNA z uwagi na skomplikowane techniki ich pozyskiwania i ich unikalność we krwi obwodowej. Badanie wolnych krążących komórek nowotworowych w diagnostyce genetycznej u chorych na NDRP nie jest rekomendowane.

Eksperti CAP, IASLC i AMP nie rekomendują wykorzystywania cfDNA z osocza krwi obwodowej do badania nieprawidłowości genetycznych w kwalifikacji do leczenia I linii u chorych na raka gruczołowego. U takich chorych podstawowym materiałem do badań pozostają komórki nowotworowe pobrane z pierwotnego lub przerzutowego guza. Jednak w wyjątkowych sytuacjach, gdy materiał z guza jest niemożliwy do pobrania z uwagi na jego lokalizację i został zużyty w toku rutynowej diagnostyki, wykrycie mutacji aktywującej genu *EGFR* w cfDNA może kwalifikować do terapii IKT EGFR pierwszej linii. Jeszcze silniejsze przesłanki istnieją za możliwością wykorzystania badania mutacji T790M genu *EGFR* w cfDNA u chorych z wtórną opornością na IKT EGFR I lub II generacji. Jednak w tych przypadkach, jeśli w cfDNA nie udało się wykryć mutacji T790M, rekomendowane jest powtórne pobranie materiału z guza i badanie tej mutacji w komórkach nowotworowych. Ma to szczególne znaczenie u chorych, u których nie udało się w cfDNA wykryć zarówno mutacji T790M, jak i pierwotnej mutacji aktywującej genu *EGFR* (np. substytucji L858R lub delecji w eksonie 19). W takich przypadkach cfDNA najprawdopodobniej nie zawierało nowotworowego DNA, a wynik może być fałszywie ujemny. Z drugiej

jednak strony wykrycie mutacji T790M w cfDNA jest wystarczającym czynnikiem predykcyjnym do rozpoczęcia terapii opymertynibem.

Podsumowanie

Ekspertci stwierdzają, że rozwój nowych terapii ukierunkowanych molekularnie jest tak szybki, że nowe rekomendacje dotyczące badań genetycznych są konieczne niemal co roku. Jednak eksperci zwracają także uwagę, że poszerzanie rekomendacji o nowe badania genetyczne jest niezwykle trudne, gdyż powinno opierać się na wynikach dużych, prospektywnych badań klinicznych przeprowadzonych w jednorodnych grupach chorych (*evidence-based medicine*). Tymczasem niektóre nieprawidłowości genetyczne są tak rzadkie, że stworzenie odpowiednich badań klinicznych z nowymi lekami prowadzonych na dużych populacjach jest praktycznie niemożliwe. Jednocześnie opracowanie ogólnych zaleceń dotyczących badań genetycznych na podstawie opisów przypadków, w których uzyskano spektakularne efekty terapii u chorych z unikalnymi zmianami genetycznymi, nie jest właściwe.

W stosunku do zaleceń z roku 2013 powstały dwie nowe rekomendacje dotyczące konieczności badania mutacji T790M genu *EGFR* u chorych z opornością na IKT *EGFR* oraz rearanżacji genu *ROS1*. Ponadto eksperci zwracają uwagę na obiecujące efekty terapii u chorych z nieprawidłowościami w genach *BRAF*, *MET*, *HER2* i *RET* oraz uważają, że już wkrótce badania te wejdą do rutynowej diagnostyki u chorych na raka gruczołowego płuca dzięki zastosowaniu najnowszych technologii sekwencjonowania nowej generacji.

W ostatniej części rekomendacji duży nacisk położono na konieczność archiwizacji materiału pobranego z guza NDRP po wykonaniu badań genetycznych w celu przeprowadzenia badania czynników predykcyjnych dla immunoterapii. Ekspertci zwracają uwagę, że immunoterapia u chorych na NDRP przeżywa gigantyczny rozwój i konieczne będzie opracowanie odrębnych zaleceń w celu usystematyzowania wiedzy na temat immunologicznych i genetycznych czynników pozwalających właściwie kwalifikować chorych do immunoterapii. Współczesne metody immunoterapii ukierunkowane są na zniesienie immunotolerancji limfocytów T wobec komórek nowotworowych w mikrośrodowisku guza.

Obecnie standardem w terapii I linii u chorych bez nieprawidłowości w genach *EGFR*, *ALK* i *ROS1* stało się stosowanie przeciwciał przeciwko immunologicznym punktom kontrolnym anty-PD1 (*programmed death 1*) lub anty-PD-L1 (*programmed death ligand 1*). Immunoterapię I linii stosuje się w pewnych wybranych grupach chorych na NDRP najczęściej z ekspresją PD-L1 na komórkach nowotworowych. Istnieją jednak duże rozbieżności na temat przydatności i metodologii oceny ekspresji PD-L1 na komórkach nowotworowych i immunologicznych (metoda IHC najczęściej wykonywana w kwalifikacji do immunoterapii), obecności nacieków z limfocytów T w obrębie i na obwodzie guza, obecności neoantygenów powstałych w wyniku licznych mutacji somatycznych w komórkach nowotworowych (obciążenie guza mutacjami, TMB, *tumor mutation burden*). Ponadto materiał przekazywany do badań genetycznych w kwalifikacji do terapii IKT być może powinien być inny niż materiał do badania czynników predykcyjnych dla immunoterapii. W pierwszym badaniu najistotniejsza jest jak największa liczba i odsetek komórek nowotworowych, w drugim istotna jest architektura całego guza i jego podścieliska (np. obecność nacieków z limfocytów na obwodzie guza). Ekspertci zwracają uwagę, że odpowiedź na immunoterapię II linii występuje u 20–30% chorych, a na immunoterapię I linii po przeprowadzeniu odpowiedniej kwalifikacji do leczenia — u 50% chorych, co jest znacznie gorszym wynikiem niż 80% odpowiedzi na terapię ukierunkowane molekularnie u chorych z odpowiednimi predyspozycjami genetycznymi. W związku z tym pozostaje do wykonania wiele badań nad opracowaniem wiarygodnych czynników predykcyjnych dla immunoterapii.

Fakty te pozwalają przypuszczać, że nowych rekomendacji ekspertów CAP, IASLC i AMP należy spodziewać się już wkrótce.

Piśmiennictwo

1. 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, doi: [10.5858/arpa.2017-0388-CP](https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0388-CP), indexed in Pubmed: [29355391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29355391/).
2. Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. ESMO Guidelines Committee. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018; 29(Supplement_4): iv192–iv237, doi: [10.1093/annonc/mdy275](https://doi.org/10.1093/annonc/mdy275), indexed in Pubmed: [30285222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30285222/).