

Přínos sekvenování nové generace v terapii nemalobuněčného plicního karcinomu – zaměřeno na rezistence u EGFR mutovaného nemalobuněčného plicního karcinomu

MUDr. Petra Zemanová Onkologická klinika VFN a 1. LF UK, TRN VFN a 1. LF UK, Praha

MUDr. Ludmila Křížová | doc. MUDr. Milada Zemanová, Ph.D. | MUDr. Jan Špaček, Ph.D. Onkologická klinika VFN a 1. LF UK, Praha

Souhrn: Nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) tvoří 80–85 % všech karcinomů plic a zaujímá přední příčky mortality na nádorová onemocnění [1]. V posledních dvou dekádách vstoupily do terapie NSCLC cílená léčba a imunoterapie, které změnilly léčebné paradigma tohoto nádorového onemocnění. Obě léčebné modalities vedly k významnému prodloužení celkového přežití pacientů s diagnózou NSCLC. Precizní medicínu v terapii NSCLC umožňuje sekvenování nové generace, jehož klinická aplikace tkví zejména v odhalování potenciálně targetabilních alterací.

Klíčová slova: nemalobuněčný karcinom plic, NSCLC, rezistence u *EGFR* mutovaného NSCLC, sekvenování nové generace, NGS

Sekvenování nové generace

V technologiích sekvenování nukleových kyselin došlo k výraznému pokroku a tzv. sekvenování nové generace (NGS) je již běžně dostupné a v ČR v určitých indikacích i hrazeno z veřejného zdravotního pojištění.

V klinické praxi se nejčastěji používá sekvenování genových panelů, při kterém se sekvenují jen vybrané úseky DNA nebo RNA. Celogenomové nebo celoexomové sekvenování do klinické praxe zatím neproniklo, a to zejména kvůli obtížné a časově náročné interpretaci. NGS funguje na principu masivního paralelního sekvenování, tedy v jednu chvíli se současně sekvenují různé sekvence analyzované DNA/RNA.

Protokol provádění NGS je komplikovaný a přesný popis jednotlivých kroků přesahuje možnosti této publikace. Zjednodušeně můžeme rozdělit celý postup do čtyř na sebe navazujících kroků: příprava knihovny, sekvenování, analýza dat a interpretace [2].

U NSCLC má NGS zcela zásadní roli a je i součástí ESMO doporučení, a to z důvodu přítomnosti řady potenciálně targetabilních alterací, které jsme schopni touto metodou odhalit z relativně malého množství nádorové tkáně [3].

V ČR stále probíhá reflexní testování *EGFR*, *ROS1* a *ALK*, ale vyšetření pomocí NGS je propláceno z veřejného zdravotního pojištění, pokud je indikováno multidisciplinárním týmem KOC.

Aktuálně by měl takový NGS panel obsahovat minimálně 27 genů, které se sekvenují z DNA, a 12 genů, které se sekvenují z RNA [4]. V budoucnu bude jistě hrát velkou roli NGS z liquid biopsie, tedy z cirkulující nádorové DNA, které bude možné provádět opakovaně a v reálném čase odhalovat nově vzniklé klony nádorových buněk rezistentních na podávanou terapii [5].

Příkladem využití NGS v klinické praxi budiž v tomto článku precizní terapie *EGFR* mutovaného NSCLC dle zjištěných rezistencí.

Mutace *EGFR*

Somatické mutace genu *EGFR* (epidermal growth factor receptor) jsou v evropské populaci zachyceny u 10 % NSCLC, zatímco v asijské populaci až u 30 % NSCLC. *EGFR* mutovaný NSCLC se predominantně vyskytuje u nekuřáků, slabých kuřáků, žen a mladších pacientů [6]. Přítomnost aktivační mutace v exonech kódující tyrosinkinázovou doménu *EGFR* receptoru predikuje senzitivitu NSCLC na tyrosinkinázové inhibitory (TKI). Tyto preparáty dosahují objektivní léčebné odpovědi 55–80 % a mediánu přežití bez progresu nádorového onemocnění 9–19 měsíců. Aktivita *EGFR* inhibitorů se liší v závislosti na typu *EGFR* mutace, přičemž delece párů bazí v exonu 19 a bodová mutace v exonu 21 L858R patří mezi genové alterace nejlépe odpovídající na léčbu terapií anti-*EGFR* [7].

Rezistence z pohledu míry počáteční citlivosti NSCLC na *EGFR* tyrosinkinázové inhibitory (*EGFR*-TKI) klasifikuje na vnitřní (neboli primární) a získané rezistence. Primární rezistence jsou příčinou špatné léčebné odpovědi na *EGFR*-TKI již v up front linii léčby NSCLC. Získané rezistence pak vznikají v důsledku selekčního tlaku navozeného *EGFR*-TKI terapií na nádorové buňky, které se snaží obejít blokádu onkogenních kaskád asociovaných s buněčnou proliferací, migrací a přežíváním buněk. Z hlediska mechanismu vzniku rozlišujeme rezistence dependentní a independentní na *EGFR* receptoru [8, 9].

EGFR dependentní rezistence

EGFR dependentní rezistence jsou podmíněny genetickými alteracemi kódujícími strukturální změny *EGFR* receptoru a zapříčiňujícími sníženou citlivost na *EGFR*-TKI. Nejčastěji se jedná o genetické změny v exonech 18-21 genu *EGFR* kódující tyrosinkinázovou doménu *EGFR* receptoru [8, 9].

Bodová mutace *T790M* v exonu 20 *EGFR* genu je detekována u 50–63% *EGFR* pozitivních NSCLC léčených TKI první a druhé generace. Mutace *T790M* vyvolává zvýšení ATP afinity tyrosinkinázové domény *EGFR* receptoru s následnou autofosforylací a transdukcí signálu. Mutace *T790M* tedy brání v navázání ATP kompetitivního tyrosinkinázového inhibitoru první a druhé generace na *EGFR* receptor [10]. V klinické studii fáze III FLAURA byl pacientům s pokročilým *EGFR* mutovaným NSCLC, kteří měli progresi na terapii erlotinibem nebo gefinitinibem a byla u nich prokázána mutace *T790M*, umožněn crossover do ramene s osimertinibem. Medián celkového přežití (overall survival, mOS) byl 38,6 měsíce (95% CI: 34,5–41,8) v rameni s osimertinibem v první linii versus 31,8 měsíce (95% CI: 26,6–36,0; HR: 0,8) při sekvenci gefitinib/erlotinib – osimertinib [11]. Lze shrnout, že osimertinib je preferovaným TKI v první linii pokročilého NSCLC s prokázanou aktivační mutací genu *EGFR*. Nicméně výše zmíněná posloupnost TKI u nádorů s prokázanou získanou mutací *T790M* poskytuje benefit v prodloužení mediánu celkového přežití na základě nepřímých srovnání s jinými studiemi s *EGFR*-TKI první a druhé generace, kde se medián OS pohybuje v rozmezí 18–28 měsíců [13]. Ztráta mutace *T790M* je v koincidenci s rozvojem na *EGFR* independentních rezistencí [14].

Bodová mutace *C797S* v exonu 20 genu *EGFR* modifikací struktury tyrosinkinázy *EGFR* receptoru vede ke ztrátě schopnosti osimertinibu vytvořit s *EGFR* receptorem kovalentní vazbu [14]. Léčebné možnosti se pak odvíjejí od přítomnosti koexistujících mutací a jejich vzájemného konfiguračního stavu.

BLU-945 je reverzibilní inhibitor *EGFR+T790M* a *EGFR+T790M/C797S*, který vykazuje účinnost i proti aktivačním mutacím, zejména L858R. Výsledky preklinických studií podpořily postup BLU-945 do klinických studií a v současné době probíhá klinická studie fáze I/II SYMPHONY zabývající se účinností BLU-945 v monoterapii nebo v kombinaci s osimertinibem [15].

Mutace *L718Q* a *L792X* jsou další příčinou rezistence na osimertinib. Často jsou detekovány s jinými *EGFR* dependentními rezistencemi. Tyto mutace se jeví senzitivní k TKI první a druhé generace, avšak za podmínky absence mutace *T790M* [16].

Inzerce v exonu 20 nastává s frekvencí 4–10 % *EGFR* mutovaných NSCLC [17]. Je příčinou primární rezistence na většinu *EGFR*-TKI. Inzerce v exonu 20 vede ke strukturálním změnám C helixu *EGFR* receptoru zapříčiňujícím jednak blokaci vazby TKI k *EGFR* receptoru, jednak trvalou aktivační konformaci *EGFR* receptoru nezávislou na přítomnosti ligandu podmiňujícími stimulaci následných signálních kaskád [18].

Amivantamab je humánní bispecifická *MET* a *EGFR* protilátka, která překonává inzerce exonu 20 několika mechanismy:

- ▶ váže se na extracelulární doménu *EGFR* a c-*MET* receptorů, a tím znemožňuje navázání ligandu;
- ▶ vyvolává heterodimerizaci, internalizaci a lyzozomální degradaci *EGFR*-*MET* dimeru, a tím inhibuje následné onkogenní signální dráhy;
- ▶ spouští buněčnou cytotoxicitu, kdy prostřednictvím své Fc oblasti umožňuje efektorovým buňkám imunitní odpovědi (makrofágy, NK buňky) nesoucími Fc receptory rozpoznat a usmrtit cílové buňky pokryté danou protilátkou [19].

Klinická studie fáze I CHRYSALIS je vícekohortová studie zabývající se bezpečností, účinností a farmakokinetikou amivantamabu v monoterapii nebo v kombinaci s chemoterapií (CBDCA s pemetrexedem) nebo **lazertinibem**, *EGFR*-TKI třetí generace, v léčbě pokročilého NSCLC. Pacienti byli stratifikováni dle předchozí terapie a typu rezistence (*C797S+*, *T790M+ / C797S+*, *T790M- / C797S-*, *MET* amplifikace, *MET* exon 14 skipping mutace, *EGFR* exon 20 inzerce).

V kohortě pacientů s NSCLC s inzerce exonu 20 genu *EGFR* po selhání chemoterapie na bázi platinového derivátu zaznamenal amivantamab objektivní léčebnou odpověď (objective response rate, ORR) 40 %, medián přežití bez progresu nádorového onemocnění (progression free survival, mPFS) 8,3 měsíce a mOS 22,8 měsíce [20].

Mobocertinib je perorální ireverzibilní *EGFR* a *HER2* ex20ins inhibitor překonávající jak inzerce exonu 20, tak bodovou mutaci *C797S* genu *EGFR*. Z výsledků klinické studie fáze I/II čítající 114 pacientů s NSCLC s *EGFR* ex20ins předléčených chemoterapií vyplývá dosažení ORR 28 %, mPFS 7,3 měsíce a mOS 24 měsíců pro mobocertinib [21].

Sunvozertinib byl navržen pro léčbu *EGFR/HER2* ex20ins mutantního NSCLC. Vyznačuje se dobrou bezpečností a protinádorovou účinností u pacientů s NSCLC *EGFR* ex20ins, s aktivačními mutacemi *EGFR* a mutací *T790M*. Z celkového počtu 56 pacientů s *EGFR* ex20ins v klinické studii fáze I bylo dosaženo ORR u 21 z nich (ORR: 37,5 %) a kontroly onemocnění (disease control rate, DCR) u 48 pacientů (DCR: 85,7 %). Skupina pacientů užívajících sunvozertinib v dávce 200 mg měla pak nejvyšší míru ORR (45,5 %). Nyní je testován dopad dvou zvolených dávek (200 a 300 mg) sunvozertinibu na přežití pacientů [22].

Poziotinib je perorální ireverzibilní pan-*ERRB* inhibitor. Ve srovnání s jinými *EGFR*-TKI má výhody ve velikosti a struktuře umožňující překonávat sférické bariéry *EGFR* receptoru. Multikohortová klinická studie fáze II ZENITH20 byla navržena k hodnocení účinnosti a bezpečnosti poziotinibu u pacientů s pokročilým předléčeným NSCLC s *EGFR* nebo *HER2* inzerce exonu 20. Kohorta 1 zahrnovala 115 pacientů, kteří byli léčeni poziotinibem po selhání chemoterapie. ORR a DCR byly 14,8 a 69,0 %, mPFS byl 4,2 měsíce. V kohortě 3 čítající 79 pacientů s NSCLC, kteří byli léčeni poziotinibem v první linii, byly dosaženy ORR 27,8 %, DCR 86,1 % a mPFS 7,2 měsíce. Nicméně ve studii byl u 26 % pacientů zaznamenán průjem a u 49 % pacientů kožní toxicita závažného stupně (≥ 3) [23].

EGFR independentní rezistence

Nadměrná aktivace kolaterálních onkogenních signálních drah (*MET* amplifikace, *HER2* amplifikace nebo *HER2* bodové mutace, *PIK3CA* amplifikace, *KRAS/NRAS* mutace, *BRAF* mutace a další) vyúsťuje k tvorbě klonu nádorových buněk rezistentních vůči *EGFR*-TKI. Přibližně 4–15 % rezistencí je způsobeno transformací z nemalobuněčného do malobuněčného plicního nádoru. *EGFR* independentní rezistence může být dále podmíněna procesem epitelovo-mezenchymální tranzice, kdy epitelové nádorové buňky nabývají mezenchymálního fenotypu [24].

MET amplifikace

MET amplifikace představuje nejčastější EGFR independentní příčinu rezistence na osimertinib [25]. Amivantamab představuje slibný terapeutický cíl (klinická studie CHRYSALIS) [19]. Níže přikládáme přehled selektivních MET inhibitorů.

Účinnost **savolitinibu** v kombinaci s osimertinibem u EGFR+ NSCLC s MET amplifikací po selhání EGFR-TKI se zabývala klinická studie fáze Ib/II TATTON. U pacientů, kteří byli předléčeni EGFR-TKI první nebo druhé generace, dosahuje výše zmíněná kombinace léčiv ORR 64,7–66,7 % a mPFS 9–11 měsíců. V kohortě pacientů, kteří byli léčeni v up front linii EGFR-TKI třetí generace, měla kombinace savolitinibu s osimertinibem horší sledované parametry (ORR: 33,3 %, mPFS: 5,5 měsíce) [26].

Capmatinib v kombinaci s gefinitibem u pacientů s EGFR+ NSCLC s absencí *T790M* a s prokázanou MET amplifikací definovanou GCN (gen copy number) nad 5 vede k ORR 47 % a mPFS 5,49 měsíce [27].

V obdobně koncipované klinické studii fáze II INSIGHT, avšak s dalším selektivním MET inhibitorem **tepotinibem**, byla publikována ORR 66,7 % a mPFS 16,6 měsíce [28].

V současnosti se zkouší zapojení multikinázových inhibitorů crizotinibu a kabozantinibu v terapii EGFR+ NSCLC s MET amplifikací.

HER2 amplifikace a bodové mutace

V terapii HER2 pozitivních NSCLC se uplatňují konjugované protilátky (antibody drug conjugate, ADC) využívající vazby cytotoxické chemoterapie na cílenou protilátku. Příkladem je **trastuzumab deruxtecan**, anti-HER2 protilátka s navázaným inhibitorem topoizomerázy I, jehož efektivita byla hodnocena v klinické studii fáze II DESTINY-LUNG 01 u pacientů s pokročilým HER2 mutovaným NSCLC po selhání standardní terapie.

Trastuzumab deruxtecan dosáhl ORR 55 %, mPFS 8,2 měsíce a mOS 17,8 měsíce. Nutno zmínit výskyt intersticiálního plicního postižení u 26 % pacientů s touto léčbou [29].

Další slibnou ADC protilátkou je **patritumab deruxtecan**, jenž je zacílen na tyrosinkinázovou doménu HER3 receptoru. Tato ADC překonává širší spektrum EGFR-TKI rezistencí – jmenovitě bodové mutace *EGFR C797S*, *EGFR T790M*, *HER2* a *CDK4* amplifikace. Klinická studie fáze I hodnotila efektivitu a bezpečnost patritumab deruxtecanu u metastatického EGFR+ NSCLC po selhání EGFR-TKI s dosažením ORR 39 %, mPFS 8,2 měsíce, mOS nebylo dosaženo. Nejčastějším NÚ stupně 3 a vyššího byla hematotoxicita [30].

Další skupinou léčiv testovaných u HER2 mutovaných NSCLC jsou panHER inhibitory – neratinib, dacomitinib, pyrotinib, poziotinib, lapatinib.

V léčbě NSCLC s *HER2* exon20ins se zkoušejí také kombinace trastuzumabu, pertuzumabu a docetaxelu (ORR: 29 %, mPFS:

6,8 měsíce) nebo již výše zmíněný poziotinib ve studii ZENITH20 (ORR: 27,8 %, mPFS: 5,5 měsíce) [31, 32].

Další terapeutické cíle

Genetické změny dráhy *RAS*–*MAPK* vedou k rezistenci na osimertinib. Mutace genu *BRAF*^{V600E} je identifikována asi u 3 % rezistencí na osimertinib. V terapii se pak uplatňují BRAF inhibitory (dabrafenib, encorafenib) eventuálně s MEK inhibitorem trametinibem [33].

Aberace v genech řídící buněčný cyklus jsou zodpovědné přibližně za 10 % získaných rezistencí na osimertinib. Komplexy kináz CDK4/6 a cyklinu D podmiňují fosforylaci retinoblastomového proteinu, který reguluje buněčné dělení. Ve fosforylovaném stavu je retinoblastomový protein inhibován a dochází ke stimulaci buněčného dělení.

Nedávná preklinická data podporují, že fosforylace retinoblastomového proteinu je zachována ve většině buněčných linií NSCLC s primární nebo získanou rezistencí na osimertinib, a proto CDK4/6 inhibitory představují novou terapeutickou možnost.

Podle preklinických studií bylo prokázáno, že kombinace osimertinibu s abemaciclibem nebo palbociclibem snižuje fosforylaci Rb a zastavuje rezistentní buňky ve G1 fázi buněčného cyklu [34, 35].

Imunomodulačního efektu VEGFR protilátky bevacizumabu, potencujícího efekt imunoterapie, využívá klinické studie fáze III IMPower 150, která hodnotila účinnost kvadrupletu (atezolizumab, bevacizumab, karboplatina, paklitaxel) ve srovnání s tripletem (bevacizumab, karboplatina, paklitaxel nebo atezolizumab, karboplatina, paklitaxel) u neskvamózního metastatického NSCLC. Do studie byli zařazeni i pacienti s mutací *EGFR* po selhání příslušné cílené léčby. I v této subpopulaci pacientů dosáhla chemo-imunoterapie signifikantně lepších výsledků (mOS: 26,1 měsíce při kvadrupletu vs. 21,4 měsíce při chemo-imunoterapii vs. 20,3 měsíce při chemo-bioterapii) [39].

REGN7075 v kombinaci s imunoterapií jsou v současné době ve fázi klinického hodnocení. REGN7075 je T-buněčná bispecifická protilátka, která se váže na EGFR receptor a prostřednictvím vazby na CD28 aktivuje T buňky [37].

Závěr

Zavedení EGFR-TKI do léčebného algoritmu *EGFR* mutovaného NSCLC významně zlepšilo přežití pacientů. Nicméně rezistence na EGFR-TKI představují narůstající problém. NGS prostřednictvím detekce genetických aberací podmiňujících vznik rezistence na EGFR-TKI napomáhá stanovit optimální terapeutickou strategii. ADC, bispecifické protilátky, pan-HER inhibitory, alosterické EGFR inhibitory nedávno obohatily léčebný arzenál tohoto nádorového onemocnění.

Literatura na www.actamedicinae.cz/literatura