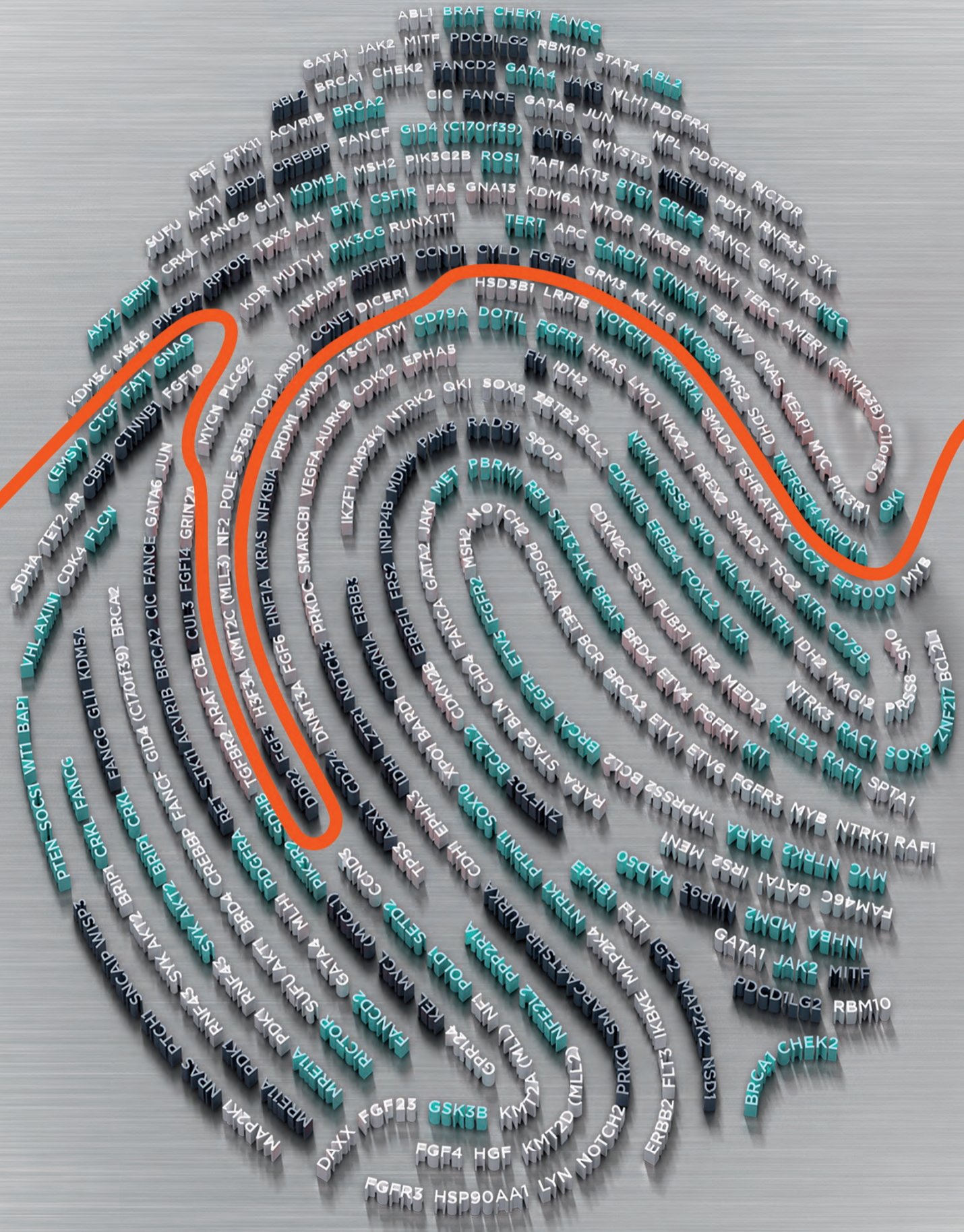




FOUNDATION
MEDICINE

Определение молекулярного профиля опухоли на основе технологии секвенирования нового поколения¹

Каждая
опухоль
уникальна



1. FoundationOne Technical Information and Test Overview. Available at: <https://www.foundationmedicine.com/genomic-testing/foundation-one> (Accessed March 2018).

Информация для профессиональной деятельности медицинских и фармацевтических работников.
Для размещения в специализированных изданиях, предназначенных для медицинских учреждений или специалистов в области здравоохранения.
Запрос медицинской информации о продуктах ООО «Рош Украина» вы можете отправить на электронный адрес: ukraine.medinfo@roche.com.

ООО «Рош Украина», г. Киев, 04070, ул. П. Сагайдачного, 33;
тел.: +380 44 354 30 40, факс: +380 44 354 30 41.
ukraine.medinfo@roche.com, www.roche.ua

UA/NONP/1805/0006



Новітні методи діагностики злоякісних пухлин та їх значимість для вибору терапевтичних опцій

Персоналізована онкологія має величезний потенціал зробити лікування раку більш ефективним і безпечним та водночас менш витратним. Напевне, для того, щоб повністю його реалізувати, потрібен час, але вже сьогодні принцип «одні ліки – для всіх» відходить у минуле, оскільки для багатьох типів пухлин розроблено типові препарати, а для пухлин, які несуть певні мутації, існують дуже точні діагностичні тести та інноваційні методики підбору таргетної терапії. Актуальні аспекти новітніх методів діагностики злоякісних пухлин обговорювали на науково-практичному семінарі, який відбувся 12 квітня у Національному інституті раку (м. Київ).



Завідувач науково-дослідної лабораторії експериментальної онкології Національного інституту раку, доктор медичних наук Наталія Миколаївна Храновська розповіла про методи молекулярної діагностики, їх особливості та відмінності, значимість для лікування та прогнозу захворювання.

— У сучасному розумінні рак — це хвороба, яка виникає внаслідок накопичення множинних мутацій у геномі клітини. Ці мутації призводять до активації протоонкогенів (*Ras*, *Raf*, *myc*, *Akt*, *neu*, *c-abl*, *bcl-2* та ін.) та пригнічення генів-супресорів пухлинного росту (*p53*, *PTEN*, *pRb*, *APC* та ін.).

У 2000 р. Hanan та Weinberg визначили 6 основних біологічних ознак злоякісних новоутворень: автономність сигналів росту, ухилення від гальмівних сигналів, пригнічення апоптозу, нелімітований потенціал реплікації, аномальний ангиогенез, здатність до інвазії та метастазування.

Мутація гена змінює структуру та функції білка, що призводить до постійної активації відповідного сигнального шляху. Ріст пухлини забезпечують, зокрема, сигнальні шляхи *Wnt*, *Notch*, *TGFβ*, *FGF*, *NFκB*, *PI3K*, рецепторів *ER* та *AR* та ін.

Мутації, що спричиняють розвиток раку, поділяють на 2 типи. Драйверні мутації виникають на початкових стадіях канцерогенезу, у них залучені гени, які кодують синтез протеїнів, необхідних для росту і виживання ракової клітини. Ці мутації є ініціаторами малигнізації та відіграють роль своєрідного біологічного «вимикача»: вони закріплюють онкогенний фенотип клітини, включаючи її з процесів біологічної регуляції.

Драйверні мутації можна розглядати як надійні біомаркери для відбору пацієнтів — кандидатів для призначення таргетної терапії. Крім того, драйверна мутація — це ідеальна мішень для таргетних препаратів, оскільки виживання ракової клітини безпосередньо залежить від її активності — вона «вимикає» інші механізми біологічної регуляції. Таким чином, драйверна мутація, що забезпечує виживання ракової клітини, водночас є її ахіллесовою п'ятою.

У ракових клітинах ідентифіковано також низку інших мутацій, які не відіграють значної ролі у підтриманні онкогенного фенотипу або роль яких поки що не встановлена. Ці мутації отримали назву вторинних, або мутацій-«пасажирів».

Еволюція методів молекулярної діагностики розпочалась 30 років тому з імуногістохімії (ІГХ). При ІГХ-дослідженні використовують антитіла до білків-мішеней, розташованих на поверхні чи всередині клітини, а за допомогою системи візуалізації оцінюють експресію ключових білків, характерних для певної пухлини. Це недорогий та швидкий у виконанні метод, проте він має низку недоліків, зокрема потребує великої кількості матеріалу, інтерпретація його результату є суб'єктивною і залежить від способу підготовки, фарбування та умов зберігання зразка. Крім того, дані, отримані за допомогою цього методу, дозволяють оцінити наявність мутації лише опосередковано — на підставі визначення білка.

Метод флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) ґрунтується на використанні флуоресцентних зондів, комплементарних ДНК або РНК, для виявлення мішеней (генів, ділянок хромосом або цілих хромосом). Порівняно зі звичайним ІГХ-дослідженням FISH є більш точним та більш об'єктивним методом, проте він дороговартісний і також потребує великої кількості матеріалу. Окрім цього, FISH не ідентифікує точкові заміни, малі делеції та деякі хромосомні порушення.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) дозволяє розмножити певну ділянку ДНК, що полегшує дослідження зразка. Різновидами методу є кількісна, цифрова, емульсійна ПЛР, ПЛР зі зворотною транскрипцією. ПЛР швидко виконується, має високу чутливість і специфічність. До недоліків методу можна віднести

необхідність підбору специфічних праймерів, особливі вимоги до робочого місця та ймовірність помилок у роботі полімерази.

Секвенування (від англ. sequence — послідовність) — це визначення первинної структури нерозгалуженого біополімеру. Секвенування ДНК дозволяє визначити точну послідовність нуклеотидів у молекулі ДНК. На сьогодні розроблено декілька способів секвенування ДНК. Секвенування за Сенгером дозволяє зчитувати послідовності до 1000 пар основ і використовується для невеликих фрагментів геному або для валідації результатів секвенування нового покоління — NGS (next-generation sequencing). На відміну від секвенування за Сенгером, методи NGS використовують для глибокого зчитування генетичного матеріалу, якого потребують, наприклад, ресеквенування і складання нових геномів (*de novo*), проведення транскриптомних та епігеномних досліджень. Окрім цього, NGS-секвенування, яке є більш дешевим і значно більш продуктивним методом, дозволяє одночасно зчитувати мільйони коротких фрагментів геному.

В онкології NGS-секвенування спочатку використовували для тестування «гарячих точок» (hot spots) — обмежених ділянок генів, в яких геномні зміни є більш вірогідними та асоціюються з раком. Недоліком такого тестування є можливість ідентифікувати лише попередньо відомі мутації в невеликій кількості генів, а не всі типи геномних змін.

Цих обмежень позбавлене NGS-секвенування методом гібридного захвату — комплексне геномне профілювання (comprehensive genomic sequencing, CGS), яке дозволяє паралельно тестувати сотні генів і визначати всі мутації. На відміну від повногеномного та повноекзомного секвенування, CGS виконується на парафінізованих зразках тканини, не потребує значних витрат часу (до 14 днів проти декількох місяців), характеризується високими чутливістю і специфічністю та економічною ефективністю.

Діагностична платформа FoundationOne, заснована на методі CGS, сфокусована на виявленні клінічно значимих геномних змін у понад 300 відомих генах, залучених у канцерогенез. Крім того, визначаються інші біомаркери, зокрема TMB (загальна кількість мутацій у геномі пухлинної клітини) та MSI (мікросателітна нестабільність), а також раніше не відомі геномні зміни.

Практичне застосування діагностичної платформи FoundationOne включає такі клінічні ситуації (проте не обмежується ними):

- пізні стадії злоякісних новоутворень (місцевопоширений або метастатичний процес);
- рідкісні пухлини;
- високоагресивні пухлини, стійкі до лікування;
- пухлини з невідомою первинною локалізацією;
- у разі вичерпання можливостей стандартного лікування;
- за обмеженого об'єму матеріалу для дослідження.



Завідувач кафедри онкології Запорізької медичної академії післядипломної освіти (ЗМАПО), доктор медичних наук, професор Олексій Олексійович Ковальов розглянув метод генетичного аналізу Foundation Medicine як приклад персоналізованого підходу до вибору терапії.

Протягом тривалого часу лікування онкологічних пацієнтів було емпіричним, заснованим на клінічному досвіді. На початку XXI ст. в онкологію увійшла таргетна терапія, яка ґрунтується на виявленні експресії білків у пухлинній клітині за допомогою таких методів, як імуногістохімія, ПЛР, FISH та CISH. Із розвитком таргетної терапії упроваджено так званий диференційований підхід, заснований на визначенні мутацій чи ампліфікацій певного гена або групи генів, переважно методом секвенування за Сенгером. Підставою для

схвалення таргетної та диференційованої терапії були результати клінічних досліджень, які відповідали принципам доказової медицини.

Найбільш сучасне, персоналізоване лікування раку відходить від цих принципів, оскільки для того, щоб продемонструвати його переваги, не потрібно проводити масштабні рандомізовані контрольовані дослідження. Персоналізовану медицину також називають індивідуалізованою, предиктивною, геномною, інтегральною, терапією («терапія + діагностика») або тейлорною («під замовника»). Персоналізований підхід ґрунтується на повному молекулярному профілюванні — виявленні всіх драйверних мутацій за допомогою NGS-секвенування. При цьому генетичний профіль включає всі відомі клінічно значимі гени та всі варіанти їх мутацій.

Можливості платформи FoundationOne, заснованої на NGS-секвенуванні методом гібридного захвату, продемонстровані у дослідженні A. Dilon та співавт. (2016). У нього включили 31 пацієнта з раком легень, які за даними традиційного тестування мали пухлини, негативні за змінами 11 генів (мутаціями *EGFR*, *ERBB2*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *MAP2K1*, *PIK3CA* та *AKT1*, злиттям *ALK*, *ROS1* та *RET*). За допомогою FoundationOne геномні порушення, для яких існує рекомендоване Національною онкологічною мережею США (NCCN) лікування, виявлено у 8 (26%) пацієнтів, 6 із них призначена таргетна терапія кризотинібом, кабозантинібом або ерлотинібом та отримано у них задовільні результати. Ще у 12 (39%) хворих були ідентифіковані мутації, на які можна впливати таргетними препаратами. Можливість такого впливу на той час вивчали у клінічних дослідженнях.

При карциномах із невідомою первинною локалізацією (КНПЛ) встановлення первинного вогнища може бути неінформативним і часто не покращує результатів лікування. J.S. Ross та співавт. (2015) за допомогою FoundationOne намагались знайти терапевтичні можливості для пацієнтів із КНПЛ. У дослідження включили 200 хворих із КНПЛ: 125 з аденокарциномами та 75 з пухлинами без ознак аденокарциноми. Принаймні одне геномне порушення було виявлено у 192 (96%) пацієнтів, у середньому 4,2 на 1 парафіновий блок. Найчастішими геномними порушеннями були зміни *TP53* (55%), *KRAS* (20%), *CDKN2A* (19%), *MYC* (12%), *ARID1A* (11%), *MCL1* (10%), *PIK3CA* (9%), *ERBB2* (8%), *PTEN* (7%), *EGFR* (6%), *SMAD4* (7%), *STK11* (7%), *SMARCA4* (6%), *RBI* (6%), *RICTOR* (6%), *MLL2* (6%), *BRAF* (6%) та *BRCA2* (6%). У 85% пацієнтів ідентифіковано принаймні одну геномну аномалію, на яку можна впливати таргетними препаратами.

Професор О.О. Ковальов навіть приклад із власної практики, коли геномне тестування дозволило кардинально змінити прогноз захворювання. На базі ЗМАПО в рамках клінічного дослідження під спостереженням перебував пацієнт із нерезектабельним перстнеподібним раком шлунка стадії pT4N2M1 з множинними метастазами в очеревині та низьким функціональним статусом (ECOG >2). Геномне тестування виявило рідкісну онкогенну мутацію, яка наявна лише у 1-2% випадках метастатичного раку шлунка і тому не входить до стандартних діагностичних панелей. Хворому призначили препарат моноклональних антитіл, який блокує цю мутацію. Після 2,5 років лікування у пацієнта досягнуто повної регресії захворювання, він працює і має добре самопочуття.



Лікар-патологоанатом клініки «Борис» Олександр Вікторович Григориук розповів про роль клінічних онкологів на преаналітичному етапі діагностики.

— Преаналітичний етап діагностики — це комплекс заходів, через які проходить біологічний матеріал до власне тестування і від якого безпосередньо залежать точність і достовірність результату (діагнозу). Якщо пацієнт отримує таргетну терапію, зразок для аналізу за можливості має бути отриманий після завершення лікування. У пацієнтів, яким таргетна терапія не призначена, можна використовувати матеріал, отриманий після первинної резекції, або зразок рецидивного вогнища (перевага надається нещодавно отриманому матеріалу). Для аналізу дозволяється використовувати

Продовження на стор. 12.

Новітні методи діагностики злоякісних пухлин та їх значимість для вибору терапевтичних опцій

Продовження. Початок на стор. 11.

біоптат метастазу або первинної пухлини, проте рекомендовано відбирати зразки з найбільшою часткою пухлини (мінімально – 20%).

Для того, щоб отримати парафіновий блок високої якості, холодна ішемія (часовий інтервал між видаленням біологічної тканини з організму та заливкою у формалін) має тривати якомога менше: у разі великих хірургічних втручань – не більше 1 год, при біопсії з малою кількістю матеріалу – до 30 с.

Сучасні молекулярні методи діагностики, зокрема FoundationOne, передбачають використання для фіксації нейтрального буферизованого формаліну, при цьому тривалість фіксації має становити 6-72 год (з досвіду доповідача – 2-48 год). У разі надмірної фіксації, якщо, наприклад, матеріал залишають у формаліні на вихідні дні, якість препарату буде гіршою, ніж у разі недостатньої фіксації.

О.В. Григорук навів клінічний приклад, коли перевищення часу експозиції зразка карциноми грудної залози призвело до неправильного визначення експресії ER, HER2 та індексу Ki67. Після повторного аналізу матеріалу, який був належним чином обробленим, статус пухлини змінився на такий, що піддається лікуванню.



Свою доповідь, присвячену молекулярному профілюванню з позицій фармакоеконіміки на прикладі раку грудної залози (РГЗ), завідувач відділення хірургії Київського міського клінічного онкологічного центру Микола Федорович Анікушко розпочав з історії, яка сталася 11 років тому. У ході спланованого експерименту 12 січня 2007 року всесвітньо відомий скрипаль Джошуа Белл, одягнений як пересічний мешканець американської столиці (джинси, светр, бейсболка), мав дати імпровізований концерт тривалістю від півгодини до години в ранкову годину пік на станції L'Enfant Plaza. Джошуа Белл виконував твори Крейслера, Шуберта, Массне і Баха на скрипці Страдіварі. За поведінкою перехожих, які поспішали на роботу, спостерігав кореспондент газети з прихованою камерою, а тих небагатьох, хто зупинився і кинув гроші у футляр музиканта, на виході опитував ще один журналіст. Джошуа Белла найбільше вразило те, що більшість перехожих навіть не повертали голови в його бік, ніби не помічали його присутності. Автори проекту очікували, що у Вашингтоні – одному з найбільших осередків музичної культури у США – видатний скрипаль збере такий натовп слухачів у переході, що може знадобитися допомога поліції. Однак його впізнала лише одна жінка вже під час фінальної частини «концерту». Вона поклатла у футляр музиканта 20 доларів, які не були зараховані. Підсумковий «рахунок» Джошуа Белла склав лише 32 долари і 17 центів. Один із висновків цього експерименту полягає в тому, що навіть видатна людина, у більш широкому розумінні – найбільш визначний у світі «продукт», який здатний революційним чином змінити хід речей, може виявитися неуспішним, якщо опиниться не в той час і не в тому місці. Те саме стосується й інноваційних методів діагностики та лікування раку.

Підходи до лікування РГЗ еволюціонували протягом кількох десятиліть. Видатний американський хірург Бернард Фішер, який невдовзі святкуватиме 100-річний ювілей, вперше припустив, що РГЗ від самого початку є системним захворюванням. Його дослідження, опубліковане 1976 року, показало, що при РГЗ ранніх стадій органозберігаюче втручання (лампектомія) у поєднанні з променевою, хіміо- та/або гормональною терапією може бути більш ефективним, ніж радикальна мастектомія. Сьогодні деескалація локорегіонарної терапії РГЗ триває. За результатами 15-ї конференції, присвяченої РГЗ, (St. Gallen, 2017 р.) радикальна мастектомія та дисекція аксиллярних лімфатичних вузлів більше не вважаються рутинними втручаннями.

Протилежні тенденції спостерігаються щодо системного лікування РГЗ. Завдяки досягненням ХТ, гормональної й таргетної терапії ефективність лікування пацієнток із РГЗ, за даними Американського товариства клінічних онкологів (ASCO, 2017), у 2015 р. зросла на 36-42% порівняно з відповідним показником у жінок, які отримували терапію у 1990-х рр.

Спочатку стандартизація ведення пацієнток із РГЗ ґрунтувалась лише на анатомічних даних, тобто стадії TNM. Сьогодні ведення таких хворих враховує дані імуногістохімічних, генетичних та геномних досліджень.

ІГХ-дослідження показане всім пацієнткам із РГЗ незалежно від віку, стадії захворювання та гістологічного варіанту пухлини. Показники, отримані за допомогою імуногістохімічного методу (ER/PR, HER2, Ki67), визначають агресивність перебігу та прогноз захворювання, а також вид і тривалість лікування.

У 5-10% випадків РГЗ має місце генетична схильність. Із РГЗ асоційовані мутації *TP53*, *BRCA1/2*, *PALB2*, *ATM*, *CHEK2*, *P16*, *PTEN* та інших генів. З фармакоеконімічного погляду генетичне тестування є доцільним у випадках, коли існує висока ймовірність позитивного тесту і коли його результат може вплинути на подальшу тактику ведення пацієнта. Факторами, які свідчать про необхідність генетичного дослідження, є обтяжений сімейний анамнез, а також певні характеристики захворювання за необтяженого або невідомого сімейного анамнезу (РГЗ у віці до 38 років; потрібний негативний РГЗ, білатеральний РГЗ або рак яєчників у віці до 45 років; поєднання РГЗ і раку яєчників у будь-якому віці; РГЗ у чоловіків у віці до 45 років). Пацієнтам із позитивними результатами тесту показані ранне активне спостереження та більш агресивне лікування.

Оцінку фармакоеконімічної доцільності геномного тестування при РГЗ здійснили Magino та співавт. (2011). Для порівняльного аналізу двох стратегій – АТ (стандартна ХТ антрацикліном і таксаном) та GEN (лікування на підставі результатів геномного тестування) – використали ретроспективні дані пацієнток, які узяли участь у дослідженні PACS01. Незважаючи на досить високу вартість проведеного геномного дослідження OncotypeDX (2800 євро), стратегія GEN дала змогу зекономити близько 2500 євро на одну пацієнтку завдяки зменшенню витрат на госпіталізації та лікування ускладнень.

Сучасні методи геномного тестування, такі як FoundationOne, є економічно ефективними завдяки можливості одночасного дослідження великої кількості генів в одному зразку біологічного матеріалу, менш тривалому періоду очікування результату та високому рівню виявлення мутацій. Отриманий результат є підставою для вибору потенційно найбільш ефективного лікування або ухвалення рішення про доцільність включення пацієнта у відповідне клінічне дослідження. При цьому вартість тестування не перевищує вартості одного курсу пембролізумабу або аналогічних препаратів.

* * *

Після того, як спікери представили доповіді, відбулася дискусія, під час якої вони відповіли на запитання учасників семінару.

? Які важливі для клінічних онкологів переваги має діагностична платформа FoundationOne?

Н.М. Храновська: Від інших тестів FoundationOne принципово відрізняється тим, що дозволяє визначати всі можливі типи мутацій «в одній пробірці». FoundationOne не потребує великого об'єму матеріалу для аналізу, економить час пацієнта та лікаря. Крім того, платформа є корисною у разі невідомої локалізації первинної пухлини, а також допомагає підібрати персоналізоване лікування на різних етапах хвороби, зокрема після прогресування. Вказані переваги FoundationOne забезпечує використання найсучаснішої технології NGS-секвенування методом гібридного захвату.

? Яким є «портрет» типового пацієнта, якому доцільно призначити тестування FoundationOne?

О.О. Ковальов: Для мене це питання, на жаль, залишається відкритим. Передусім необхідно з'ясувати, чи є тест FoundationOne ще одним новим методом молекулярної діагностики, чи він принципово змінює

підхід до лікування? Чи будемо ми застосовувати цей метод у всіх пацієнтів до призначення терапії або обмежимося хворими із резистентними і рідкісними пухлинами, для яких лікування не розроблене? NGS-секвенування методом гібридного захвату використовують й інші діагностичні платформи, зокрема Caris, проте Caris, крім NGS, також передбачає імуногістохімію, FISH та ПЛР. Чи зможе FoundationOne кардинально змінити лікування раку, ще належить встановити.

М.Ф. Анікушко: Що стосується FoundationOne, мова не йде про «стандартних» хворих, які отримують лікування відповідно до встановлених протоколів (NCCN, NICE та ін.). Йдеться про достатньо складних для ведення пацієнтів із кількома поєднаними факторами. Зокрема, це раніше ліковані пацієнти з прогресуванням хвороби та пацієнти, яких із тих чи інших причин виключили з клінічного дослідження. FoundationOne також може бути корисним для обґрунтування доцільності призначення високоартісних таргетних препаратів. Загалом, що більше ми маємо інструментів для визначення типу пухлини, то краще.

? При застосуванні FoundationOne якої якості мають бути парафінові блоки, щоб пацієнти протягом двох тижнів даремно не очікували достовірних результатів дослідження?

О.В. Григорук: Якість парафінових блоків є принципово важливою, але проблема полягає в тому, що всі події на преаналітичному етапі діагностики не можна реверсувати. Це означає, якщо блок виготовлений з неякісного матеріалу або неправильно фіксований, залишається лише повторно отримати біологічний матеріал. Це проблема взаємодії між клінічним онкологом і патологістологом, і вона є дуже актуальною в Україні.

? З якої ділянки пухлини найкраще відбирати матеріал для тестування FoundationOne?

О.В. Григорук: Не слід брати матеріал із ділянки некрозу, оскільки він буде повністю неінформативним. Що стосується інших ділянок пухлини, якість матеріалу певною мірою залежить від збігу обставин, особливо у разі трепанобіопсії. Для тестування FoundationOne необхідною вимогою є те, щоб частка пухлинних клітин у матеріалі складала щонайменше 20% від загальної кількості клітин.

? На підставі отриманих результатів FoundationOne складають звіт із 3 частин. У 1-й вказують препарати, показані для конкретного пацієнта та схвалені Управлінням з контролю якості харчових продуктів і лікарських препаратів (FDA) США, у 2-й – препарати, які проходять процедуру схвалення, і в 3-й – потенційно корисні препарати, які перебувають на етапі клінічних досліджень. Отже, у рекомендаціях із лікування будуть зазначені препарати, не зареєстровані в Україні. Як у цій ситуації правильно провести співбесіду з пацієнтом і яким чином рекомендувати йому не зареєстровані в Україні препарати?

М.Ф. Анікушко: У таких ситуаціях пацієнти можуть скористатися медичним туризмом, до того ж у деяких випадках лікування за кордоном може бути навіть дешевшим, ніж в Україні. Іноді препарати призначають off label (поза офіційно схваленими показаннями), проте пацієнт має бути поінформований про потенційну користь і ризики такого лікування.

О.О. Ковальов: Я погоджуюсь, що лікування необхідно призначати з урахуванням повної інформації. У будь-якому випадку рішення слід ухвалювати спільно з пацієнтом. Зокрема, пацієнту потрібно повідомити, що на підставі результатів повного молекулярного профілювання йому можуть бути показані відсутні в Україні препарати.

Підготувала **Наталія Терещенко**

