

Персоналізований підхід в діагностиці для оптимізації лікування солідних пухлин

Сьогодні вважається, що в основі всіх онкологічних захворювань лежать зміни в одному або декількох генах. Уже відомі сотні різних мутацій генів, асоційованих із розвитком раку. Визначення тих мутацій, які несе в собі пухлина в кожному конкретному випадку, необхідне для призначення персоналізованого лікування і є ключовим елементом персоналізованої медицини. Новітнім методам молекулярної діагностики, що дозволяють реалізувати цей підхід, був присвячений науковий захід у м. Києві.



Завідувач кафедри онкології Запорізької медичної академії післядипломної освіти, доктор медичних наук, професор Олексій Олексійович Ковальов нагадав слова Гіппократа про те, що найсильніші хвороби потребують найсильнішого лікування, точно призначеного.

Протягом 2500 років ми ігнорували цю рекомендацію: лікування онкологічних пацієнтів було емпіричним, заснованим на клінічному досвіді.

На рубежі XX і XXI століть, у 2000 р., на конгресі Американського товариства клінічної онкології (ASCO) були представлені визначні на той час результати терапії метастатичного недрібноклітинного раку легенів (НДРЛ), а саме досягнення загальної виживаності 7 міс. Лікування на той час не було персоналізованим. Так, не проводилася стратифікація на чоловіків і жінок, не враховувався статус куріння, не було поділу НДРЛ на аденокарциному, плоско- та великоклітинний рак, і лікування всіх пацієнтів здійснювали за одною схемою. Навіть перші таргетні препарати спочатку призначали емпірично, тобто без урахування молекулярного профілю пухлини, що призводило до неочікуваних результатів. Приміром, у дослідженні INTACT 1 (2003) вивчали доцільність додавання інгібітора рецептора епідермального фактора росту (EGFR) гефітинібу до платиновмісної хіміотерапії, незалежно від статусу EGFR пухлини. За медіанами загальної виживаності й виживаності без прогресування групи гефітиніб + хіміотерапія та плацебо + хіміотерапія статистично не відрізнялися, проте у числовому вираженні ці показники були нижчими при лікуванні гефітинібом.

Протягом 2004–2018 р. завдяки вдосконаленню методів молекулярної діагностики були виявлені численні нові мутації, асоційовані зі злоякісними пухлинами, — розпочалась ера персоналізованої медицини. Цю медицину також називають індивідуалізованою, предиктивною, геномною, інтегральною, тераностичною («терапія + діагностика») або тейлорною («під замовника»). Персоналізований підхід в онкології ґрунтується на повному молекулярному профілюванні, тобто виявленні всіх драйверних мутацій у пухлині.

Якщо раніше для встановлення діагнозу було достатньо морфологічного та, у деяких випадках, імуногістологічного дослідження пухлинної тканини, то сьогодні пухлину необхідно вивчати на рівні геному, транскриптому, протеному, метаболізму, ліпідому, епігеному, мікрогеному та рідинної біопсії. Сучасні молекулярні дослідження варіюють від дуже простих до надскладних. Прості дослідження, як-от флуоресцентна (FISH) або хромогенна (CISH) гібридизація *in situ*, розробляють для виявлення одного типу мутацій в одному або двох генах. Натомість складні дослідження, передусім секвенування нового покоління (next generation sequencing, NGS), здатні одночасно виявляти множинні генетичні зміни включно з точковими мутаціями, делеціями, інсерціями, злиттям або зміною кількості копій генів та інші структурні варіанти.

NGS — це одночасне зчитування (секвенування) мільярдів послідовностей коротких молекул ДНК. Повне секвенування геному людини в 2003 р. зайняло 13 років і коштувало 2,7 млрд доларів; сьогодні це дослідження за технологією NGS проводиться за 1 день. Крім високої швидкості виконання, важливими перевагами NGS є високі чутливість і специфічність, можливість мультиплексування, широкий спектр виявлених мутацій.

Перші NGS-дослідження використовували для вивчення за методом hot spots («гарячі точки») обмежених ділянок генів, у яких геномні зміни є більш вірогідними та асоціюються з раком. Недоліком такого дослідження є можливість ідентифікувати лише попередньо відомі мутації в невеликій кількості генів, а не всі типи геномних змін.

Цих обмежень позбавлене NGS-секвенування методом гібридного захоплення — комплексне геномне профілювання (comprehensive genomic sequencing), яке дозволяє паралельно досліджувати сотні генів і визначати всі мутації. Діагностична платформа FoundationOne, заснована на цьому методі, розроблена для виявлення клінічно значимих геномних змін у понад 300 відомих генах, залучених у канцерогенез. Крім того, визначаються інші біомаркери, зокрема загальна кількість мутацій у геномі пухлинної клітини (TMB) та мікросателітна нестабільність (MSI), а також раніше не відомі геномні зміни.

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

- пізні стадії злоякісних новоутворень, зокрема НДРЛ IV стадії;
- рідкісні пухлини;
- високоагресивні пухлини, стійкі до лікування;
- пухлини з невідомою первинною локалізацією;
- вичерпання можливостей стандартного лікування;
- обмежений об'єм матеріалу для дослідження.



Керівник науково-дослідної лабораторії експериментальної онкології та лабораторії молекулярно-генетичної діагностики Національного інституту раку (м. Київ), доктор біологічних наук Наталія Миколаївна Храновська зазначила, що у сучасному розумінні рак — це хвороба, яка виникає внаслідок накопичення

множинних мутацій у геномі клітини. Ці мутації призводять до активації протоонкогенів і пригнічення генів-супресорів пухлинного росту. 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.

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 пухлинної клітини. Ці мутації є ініціаторами малігнізації та відіграють роль своєрідного біологічного

«вимикача»: вони закріплюють онкогенний фенотип клітини, виключаючи 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 пухлинної клітини безпосередньо залежить від її активності — вона «вимикає» інші механізми біологічної регуляції. Таким чином, драйверна мутація, що забезпечує виживання пухлинної клітини, водночас є її ахіллесовою п'ятою.

У пухлинних 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 і швидкий у виконанні метод, проте він має низку недоліків, зокрема потребує великої кількості матеріалу, інтерпретація його результатів 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 FISH ґрунтується на використанні флуоресцентних зондів, комплементарних до 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. Недоліками методу є 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. 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 дешевшим і значно продуктивнішим методом, дозволяє одночасно зчитувати мільйони коротких фрагментів геному.

Дослідження FoundationOne — це комплексне геномне профілювання на основі технології NGS із гібридним захопленням, яке дозволяє ідентифікувати 4 класи геномних змін у понад 300 генах, залучених у ріст пухлини, із чутливістю та специфічністю >90%. Дослідження проводять на парафінізованих блоках тканини, результати можна отримати вже за 14 днів.

У дослідженні за участю 2 тис. пацієнтів було продемонстровано, що 69% можливих змін, ідентифікованих за допомогою FoundationOne, не виявляли шляхом NGS-дослідження hot spots. Крім геномних змін FoundationOne дозволяє оцінити TMB та MSI, які асоціюються з відповіддю на імунотерапію. При цьому всі зміни визначаються в одному зразку, що важливо у разі дефіциту пухлинної тканини.



Керівник онкологічної клініки Медичного центру ім. Едіт Вольфсон (м. Холон, Ізраїль), професор Ронен Бреннер зазначив, що протягом останніх років повне молекулярне профілювання пухлин широко вивчали при різних типах раку, і це дозволило створити новий напрям — персоналізовану медицину.

Сьогодні молекулярне профілювання є стандартною практикою для більшості пацієнтів з пізніми стадіями і поступово витісняє історичну парадигму лікування — хіміотерапію (ХТ) — залежно від локалізації, гістології та стадії пухлини.

При багатьох пухлинах молекулярне профілювання вже є обов'язковим етапом встановлення діагнозу. Приміром, згідно з останніми рекомендаціями з ведення НДРЛ Національної онкологічної мережі США (NCCN, 2019), залежно від гістологічного підтипу (плоскоклітина карцинома vs інші підтипи) за допомогою молекулярного дослідження у зразках пухлини необхідно визначати експресію PD-L1, наявність мутацій *EGFR*, змін *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *NTRK*, *HER2*. При цьому дослідження рекомендується проводити як компонент широкого молекулярного профілювання. Отримані результати можуть істотно впливати на вибір лікування та його ефективність.

В Ізраїлі проводиться дослідження за участю 102 пацієнтів із раком легень IV стадії, яким було виконано дослідження за технологією NGS із гібридним захопленням (FoundationOne). На момент включення середній вік хворих становив 63 роки, 45% пацієнтів ніколи не курили, 85% мали аденокарциному. Приблизно у половини пацієнтів дослідження за новою методикою проводили перед призначенням 1-ї лінії терапії, у решти — після неефективності

попереднього лікування. Дослідження FoundationOne ідентифікував клінічно значимі геномні зміни у 50% пацієнтів, найчастіше у *EGFR* (18%), *RET* (9%), *ALK* (8%), *MET* (6%) та *ERBB2* (5%). У 19% пацієнтів були ідентифіковані зміни *EGFR/ALK*, які раніше не виявляли стандартними методами. На підставі отриманих результатів лікування було змінено у 43% пацієнтів. Загальна частота відповіді у цих хворих становила 65% (повна відповідь досягнута у 15%, часткова відповідь — у 50%). Імунотерапію призначили 33 хворим (у більшості — без драйверних мутацій, на які можна впливати наявними препаратами); частота контролю хвороби склала 33%, при цьому вірогідність досягнення контролю корелювала із TMB. Таким чином, дослідження за технологією NGS із гібридним захопленням вплинуло на рішення щодо лікування у майже половини хворих на рак легень і забезпечило загальну частоту відповіді 65%, що може реалізуватися у подовженні виживаності. Медіана загальної виживаності поки не досягнута, спостереження за пацієнтами триває.



Як зазначив **професор Фатіх Кьосе (кафедра медичної онкології Башкентського університету, м. Адана, Туреччина)**, ще 25 років тому лікування раку базувалося переважно на гістології локалізації та розмірах пухлини, достовірних біомаркерів практично не існувало. Варіантів лікування було приблизно на 250 менше, ніж сьогодні, і застосовували лише три основні методи терапії: хірургічне втручання, променеву терапію та ХТ.

Протягом останніх 60 років онкологія здобула низку визначних досягнень. Так, 1965 р. завдяки ХТ ми отримали можливість виліковувати ходжкінську лімфому, 1977 р. — рак яєчка пізніх стадій; 1991 р. з'явилися потужні протипухлинні препарати, які дозволяли контролювати тяжкі побічні ефекти ХТ; 2001 р. таргетна терапія кардинально змінила лікування гастроінтестинальних стромальних пухлин, а 2006 р. була введена вакцина для профілактики розвитку раку шийки матки. Але найбільшим досягненням слід вважати створення персоналізованої медицини — абсолютно

нового підходу до діагностики й лікування злоякісних пухлин. Цей єдиний шлях до майбутнього удосконалення вже не зміниться і лише буде поглиблюватися у своїй біології.

Раніше арсенал методів для отримання інформації, яку можна використати для призначення лікування раку, обмежувався ІГХ-дослідженням (наприклад, оцінка експресії естрогенових рецепторів для призначення тамоксифену), ПЛР (визначення делеції в екзоні 19 *EGFR*, чутливої до ерлотинібу) та FISH (ідентифікація реаранжування *Ros-1* як показання до призначення кризотонібу). З появою секвенування нового покоління з'явилася можливість визначати величезну кількість мутацій у пухлинних клітинах, хоча більшість з них все ще потребують інтерпретації.

Впровадження широкого молекулярного профілювання у клінічну практику засвідчило необхідність створення мультидисциплінарних комітетів з молекулярних досліджень пухлин (Molecular Tumor Board, MTB). До складу такого комітету входять генетик з експертизою в онкології, клінічний онколог, патолог, фармаколог та інші спеціалісти. MTB розглядає доцільність проведення молекулярного профілювання у конкретного пацієнта і залежно від результатів дослідження може рекомендувати призначення препарату із незареєстрованим показанням (off-label), стандартної (нетаргетної) терапії або участь у клінічному дослідженні. Проблемою, яку необхідно вирішувати, є відсутність стандартизації MTB у різних країнах щодо складу комітету, тривалості дискусії, методів дослідження та процесу інтерпретації.

У Башкентському університеті комітет з молекулярних досліджень пухлин був створений у квітні 2018 р. Пацієнтам зі складними формами раку спершу проводять локальне NGS-дослідження hot spots, потім за наявності показань — повне молекулярне профілювання (FoundationOne), після чого MTB розглядає отримані результати та визначає подальшу тактику ведення. Досвід роботи MTB у Туреччині свідчить про високу ефективність цього інноваційного методу діагностики, який дозволяє з високою точністю визначити відомі та невідомі геномні порушення у пухлині та у багатьох випадках призначити персоналізоване лікування.

Після представлення доповідей відбулася дискусія, під час якої спікери відповіли на запитання учасників семінару.

? **Кому ви у першу чергу рекомендуєте NGS-дослідження? На яких етапах лікування дослідження є найбільш доцільним?**

Р. Бреннер:

— На початку ми застосовували ці дослідження на пізніх етапах лікування, після того, як пацієнт вже отримав декілька ліній терапії. Сьогодні використовуємо NGS-дослідження зазвичай у пацієнтів з метастазами, як правило, коли більш доступні дослідження [які можна виконати локально] не надали потрібної інформації.

Ф. Кьосе:

— У кожному випадку рішення щодо NGS-дослідження слід приймати після обговорення з пацієнтом потенційних переваг, які він може отримати від результатів такого дослідження. Як онкогінеколог я використовую NGS зазвичай у пацієнок з раком яєчника або ендометрію, при раку шийки матки NGS-дослідження не проводиться. Крім того, це дослідження може бути корисним при раку сечового міхура через можливість застосування інгібіторів *EGFR* у 2-й лінії терапії.

О.О. Ковальов:

— На мою думку, молекулярне профілювання за технологією NGS не обмежується лише пацієнта-

ми з пізніми стадіями хвороби та/або рецидивом, резистентністю до лікування або відсутністю терапевтичних опцій. Зокрема у випадках, коли важко отримати достатній об'єм тканини для дослідження (наприклад, у пацієнтів із раком легень), NGS-дослідження дозволяє обрати оптимальну тактику лікування і уникнути повторних біопсій. Крім того, цей метод є дуже перспективним в онкогематології (при злоякісних пухлинах крові застосовують дослідження FoundationOne Heme, поки що не доступний в Україні — прим. ред.) для визначення змін у мікрооточенні пухлини, підтвердження патологічної повної відповіді (pCR).

? **Як має діяти лікар, якщо після отримання результатів молекулярного профілювання пацієнту показані препарати, не зареєстровані в Україні або такі, які серед показань не містять потрібну нозологію?**

Р. Бреннер:

— У таких випадках я звертаюсь до мультидисциплінарного етичного комітету (зазвичай локального), який всебічно розглядає наявну інформацію і приймає рішення, беручи відповідальність на себе. Придбання незареєстрованого препарату переважно не є проблемою, у цьому пацієнтові можуть допомогти лікарі або фармацевтична компанія. Якщо після 3 місяців лікування є позитивний результат, пацієнт може звернутися до державних органів охорони здоров'я за реімбурсацією на подальшу терапію.

Ф. Кьосе:

— Після консультації з юристом клініки ми подаємо запит у Міністерство охорони здоров'я. У разі позитивного рішення пацієнт підписує інформовану згоду, що убезпечує лікаря від судових позовів. При цьому лікування має здійснюватися за кошти пацієнта.

? **Чи входять генетики у мультидисциплінарну команду, яка приймає рішення щодо лікувально-діагностичного процесу пацієнтів із раком в Україні?**

О.О. Ковальов:

— Мова йде не про [медичного] генетика, а радше про молекулярного патолога, який, безумовно, має входити до складу консиліумів. На жаль, ця спеціальність в Україні поки не зареєстрована.

? **Якщо повне молекулярне профілювання не виявило мутацій, на які можна діяти таргетними препаратами, якою є ваша тактика?**

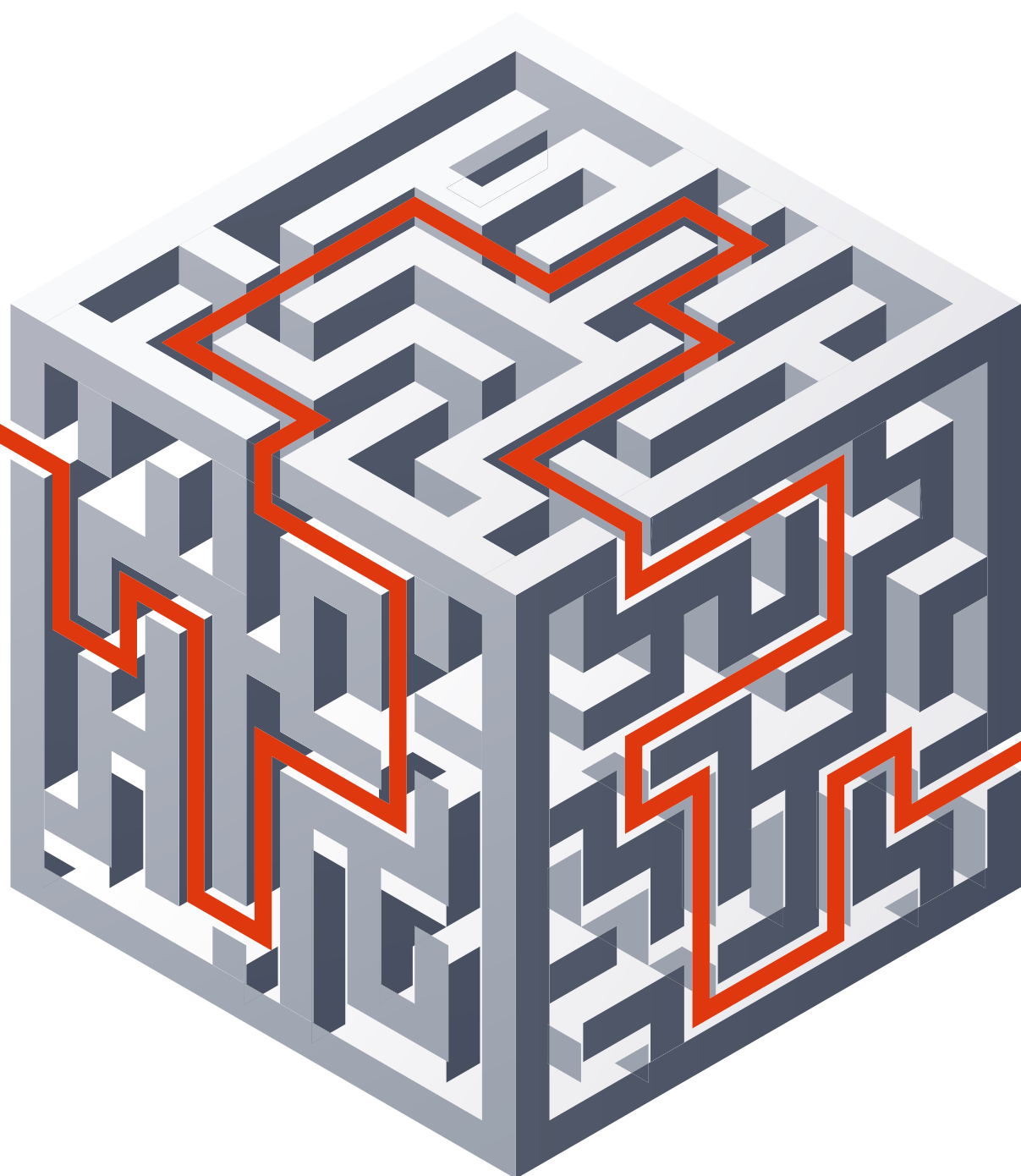
О.О. Ковальов:

— Такі пацієнти можуть отримувати хіміо- або імунотерапію. Зокрема при метастатичному НДРЛ атезоліумаб (на відміну від пембролізумабу) можна застосовувати незалежно від експресії PD-L1.

Підготувала **Анастасія Шевченко**



FOUNDATIONONE®CDx



КОЖНА ПУХЛИНА УНІКАЛЬНА

FoundationOne CDx надає можливість вибору
індивідуальної схеми лікування відповідно
до молекулярного "портрету" пухлини¹⁻³

1. FoundationOne®CDx FDA Approval, 2017. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf17/P170019a.pdf (Accessed November 2018);
2. FoundationOne®CDx FDA Approval Press Release, 2017. Available at: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm587273.htm> (Accessed November 2018);
3. FoundationOne®CDx Technical Specifications 2018. Available at: www.roche.foundationmedicine.com/flcdxtech (Accessed November 2018).

Інформація для професійної діяльності медичних та фармацевтичних працівників.

Для розміщення у спеціалізованих виданнях, призначених для медичних закладів та спеціалістів у сфері охорони здоров'я.

Запит медичної інформації про продукти ТОВ "Рош Україна" Ви можете надіслати за електронною адресою: ukraine.medinfo@roche.com.

ТОВ "Рош Україна", 04070, м. Київ, вул. П. Сагайдачного 33, тел. +380 44 354 30 40, факс +380 44 354 30 41, ukraine.medinfo@roche.com, www.roche.ua.



FOUNDATION
MEDICINE®

