

Testování biomarkerů u kolorektálního karcinomu.

Milada Matějčková (1), Pavel Fabian (2)

Lenka Dubská (2), Eva Parobková(1), Martin Beránek(3), Monika Drastíková(3), Daniel Tvrdík(4)), Jiří Drábek(6), Monika Sedivcová (5), Tomáš Vaněček (5), Arpád Bóday(7)

1Fakultní Thomayerova nemocnice s poliklinikou v Praze, Oddělení patologie a molekulární medicíny

2Masarykův onkologický ústav, Brno

3Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta Hradec Králové, Ústav klinické biochemie a diagnostiky FN

4Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav patologie VFN

5Bioptická laboratoř s.r.o., Plzeň

6Univerzita Palackého v Olomouci, Ústav molekulární a translační medicíny LF

7P & R LAB a.s., Nový Jičín

CRC

- Vznik kolorektálního karcinomu (CRC) je *vícestupňový dynamický* proces, který zahrnuje genetické změny na různých úrovních:
 - chromozomální přestavby (70-85% CRC)
 - mutace v genech
 - epigenetické změnyDůsledkem těchto dějů je akumulace mutací ve specifických genech, což vede k deregulaci signálních drah, které kontrolují chování buněk.
- Jednotlivé proteinové molekuly - členové signálních drah - jsou vzájemně propojeny do přísně regulované sítě. Proto změna struktury některé molekuly, může vést k dramatické změně těchto interakcí.
- Terapeutická odpověď na léčbu je odpovědí takto změněných nádorových buněk. Proto i odpověď na terapii, která je cílená na určitý molekulární cíl, jako je tomu u terapie anti EGFR monoklonálními protilátkami, není odpověď jednotná.

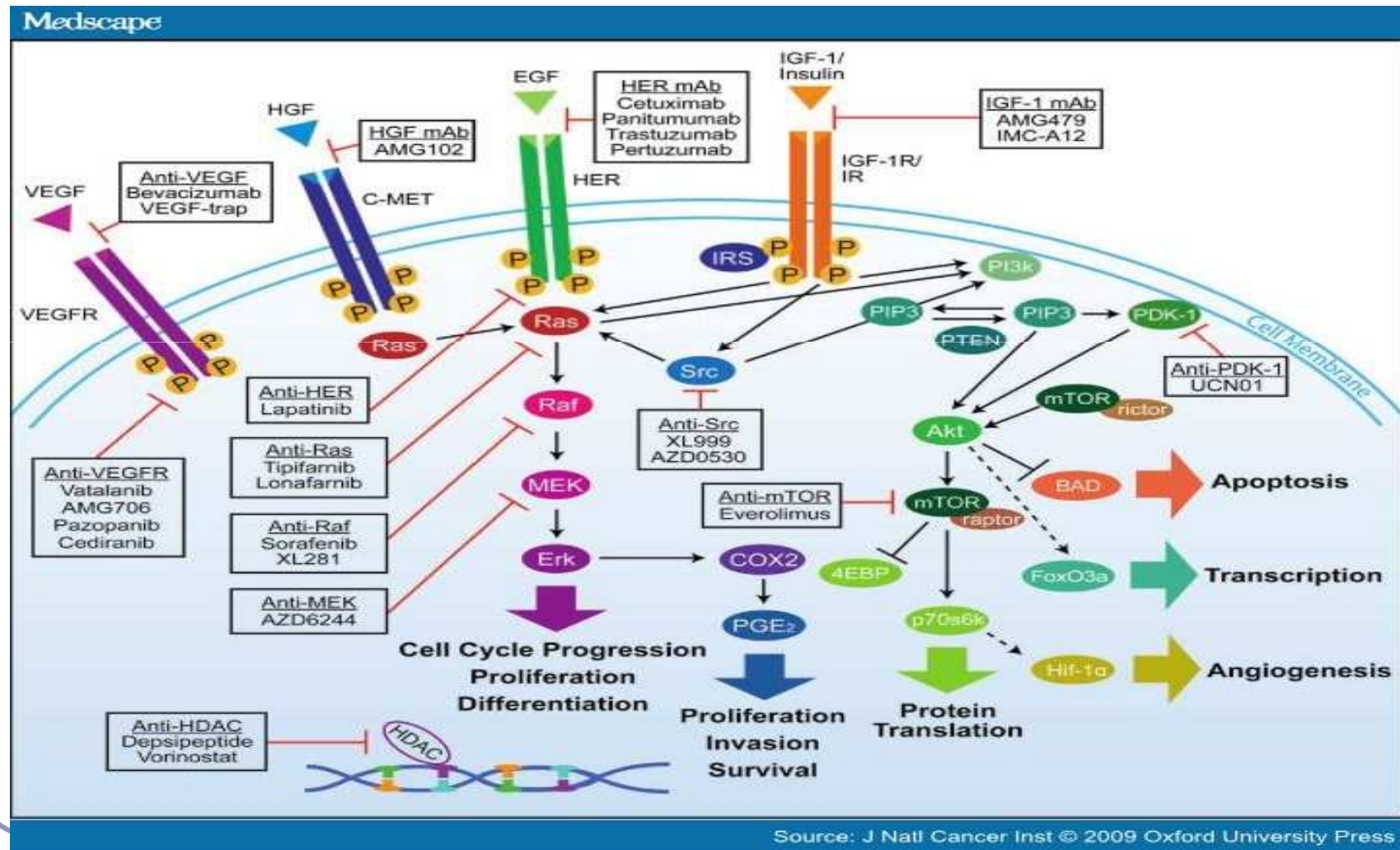
Léčba monoklonálními protilátkami

- cíl: blokovat růst nádorových buněk ovlivněním specifických molekul důležitých v procesu kancerogeneze, metastazování a buněčného růstu

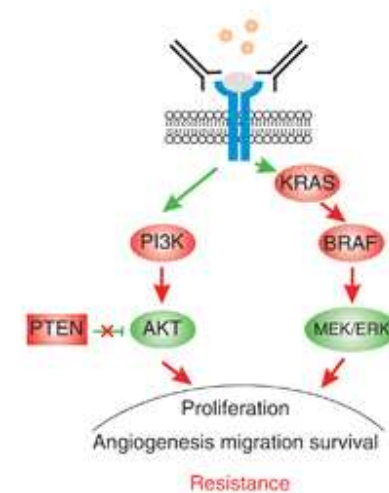
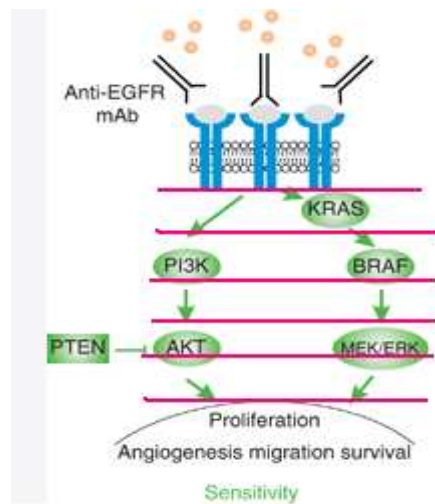
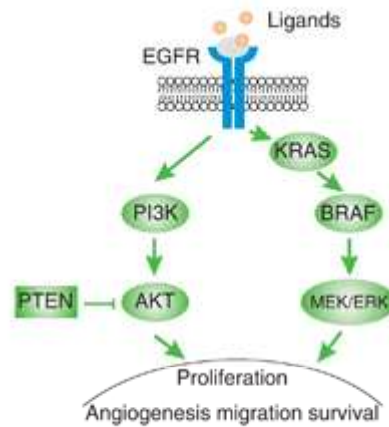
X

- klasická CHT, postihuje všechny rychle se dělící buňky

Celkový pohled na signální dráhy, které jsou zapojeny do proliferace a progrese CRC



Signální dráha EGFR



Testování exprese EGFR

- EGFR inhibitory využívané k léčbě CRC vykazují nízkou populační odpověď. Udávaná klinická odpověď pro léčení kolorektálního karcinomu s cetuximabem je 11% [New England J. Med. 2004; 351:337-45]
- Od počátku testování těchto léčiv byla snaha o nalezení vhodných biomarkerů, které by určily skupinu pacientů, kteří vykazují léčebnou odpověď.
- **Imunohistochemické vyšetření exprese EGFR**
- Počáteční studie, zaměřené na hodnocení léčebné odpovědi pacientů s CRC, testovaly odpověď pacientů, kteří měli zvýšenou expresi receptoru epidermálního růstového faktoru.
- Pozdější klinické studie ukázaly, že zvýšená exprese EGFR detekovaná imunohistochemicky v nádorových buňkách vždy nekoreluje s léčebnou odpovědí. **Téměř 25% pacientů, u kterých nebyla prokázána zvýšená exprese EGFR mají z této léčby prospěch.**

Chung K Y, et al.. J Clin Oncol 2005;23: 1803-10. , Cunningham D, et al. N Engl Med 2004;351: 337-45., Saltz L B, et al. J Clin Oncol 2004;22: 1201-8. Lenz H J, et al. J Clin Oncol (Meeting Abstracts) 2004;22: 3510., Schrag D. N Engl Med 2004;351: 317-9., Siena S, et al.: J Natl Cancer Inst 2009;101: 1308-24.

The Patent Description & Claims, USPTO Patent Application 20100311084, Methods for predicting a patient's response to egfr inhibitors.

-
- Podle doporučení Evropské společnosti patologů (ESP), které je výsledkem dohody Skupiny pro nemoci zažívacího traktu a Skupiny pro molekulární patologii, má být pro léčbu CRC monoklonálními protilátkami proti EGFR vyžadováno vyšetření mutací genu KRAS. Pouze pacienti s nádory, jejichž buňky mají nemutovaný gen KRAS, jsou vhodní kandidáti pro tento druh terapie.
 - Naopak dosud vyžadované prokázání zvýšené exprese EGFR nemá prediktivní význam a nemělo by být součástí diagnostického postupu.

Testování aktivačních mutací genu KRAS

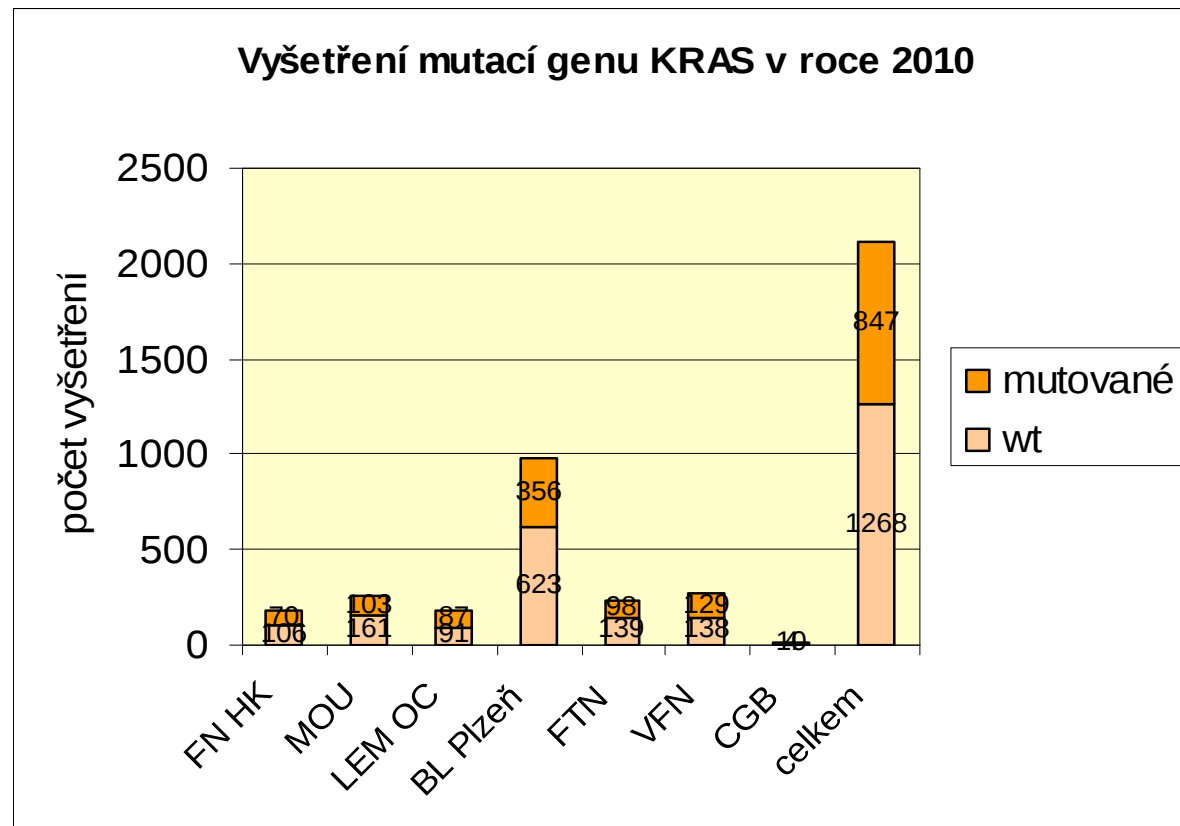
- Rezistence k anti-EGFR terapii vedla k hypotéze, že inhibice cílového receptoru je neúčinná, jestliže v kaskádě která je aktivována tímto receptorem některý člen v důsledku somatické mutace ztrácí schopnost reagovat na řídicí podněty tohoto receptoru a ovlivňuje členy kaskády, kteří od něj přejímají aktivační signál. Tato hypotéza byla v mnoha studiích potvrzena a vedla k stanovení prediktivní hodnoty somatických změn. V kolorektálních nádorech přichází v úvahu (kromě aktivačních mutací KRAS a BRAF) aktivace dráhy PIK3CA. Ta může být důsledkem buď mutační aktivace PIK3CA nebo inaktivace proteinu PTEN.
- V současnosti jsou somatické mutace genu KRAS jediný marker, který je validovaný pro testování MCRC z hlediska předpovědi léčebné odpovědi na anti EGFR mAbs.

(Lie`vre et al, 2006, 2008; Di Fiore et al, 2007; Frattini et al, 2007; Amado et al, 2008; De Roock et al, 2008; Van Cutsem et al, 2009a).

Testování mutací genu KRAS v ČR

- Mutační status genu KRAS je v ČR systematicky vyšetřován od roku 2008 a podávání léčby anti-EGFR mAbs je omezeno na pacienty, kteří nemají zachycenu somatickou mutaci.
- **Metody:** TheraScreen DxS Diagnostics Innovation, Strip Assay firmy VienaLab, sekvenování
- **Kontrola kvality:** ESP European QA Program for KRAS Testing for Colorectal Cancer

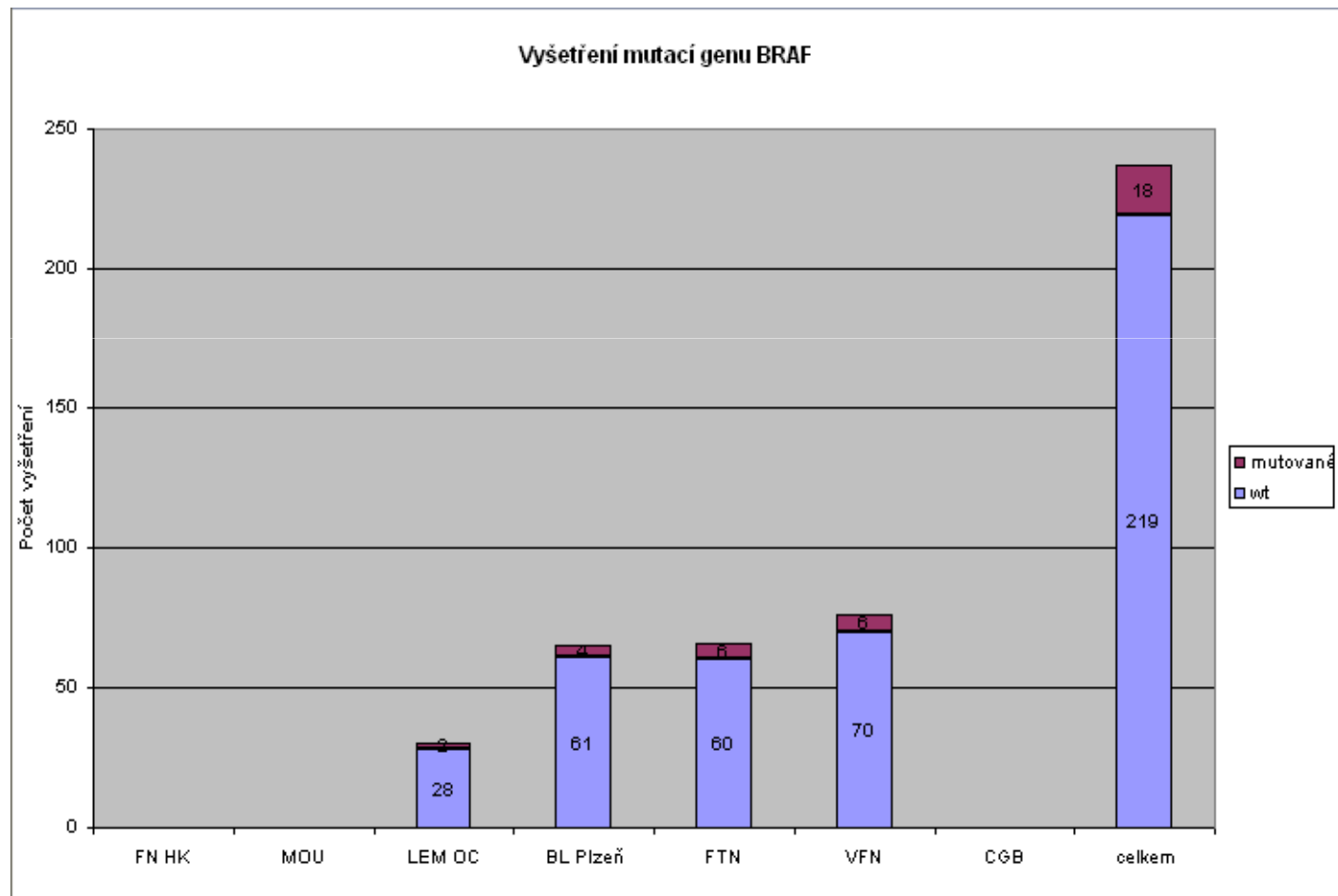
Testování mutací genu KRAS v ČR



Vyšetření genu BRAF

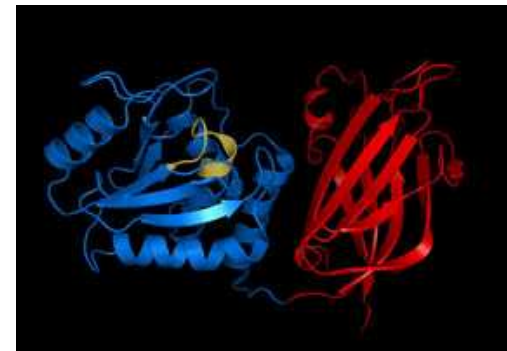
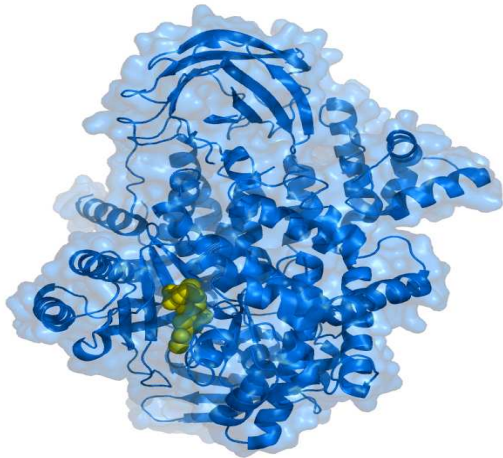
- V kolorektálních nádorech přicházejí jako další markery v úvahu vyšetření mutačního stavu genu BRAF a aktivace dráhy PIK3CA. Ta může být důsledkem buď mutační aktivace PIK3CA nebo inaktivace proteinu PTEN.
- V nádorech bylo prokázáno více než 30 mutací genu BRAF.
V 90% případů je v nádorech přítomna substituce V600E v aktivační doméně proteinu.
Mutace V600E stimuluje fosforylaci na T599 a/nebo S602. Díky tomu zůstává protein BRAF permanentně v aktivním stavu, bez ohledu na signalizaci RAS.

Testování mutace V600E v genu BRAF v roce 2010



PI3K a PTEN

- Phosphatidylinositol 3-kinasa
PI3K je složena z 85 kDa regulační podjednotky a 110 kDa katalytické podjednotky. Tento gen kóduje protein, který využívá ATP k fosforylaci fosfatidylinositolů.
- Phosphatase and Tensin homolog-**PTEN**
- *PTEN* působí jako tumor supresorový gen prostřednictvím svého proteinového produktu. Tato fosfatáza se účastní regulace buněčného cyklu. Inhibuje růst a dělení buněk. Je jedním z cílů miRNA21.



PIK3CA mutace

Ztráta exprese PTEN

- **PIK3CA** – vyšetřovány mutace exonech 9 a 20. Výsledky nejednoznačné.
- Hypotéza, že mutační status má prediktivní hodnotu je podporována výsledky experimentů in vitro a poznatky u jiných typů nádorů.
- Efekt mutací v exonu 9 a 20 je rozdílný
- Není exkluzivita mutací s mutacemi KRAS a BRAF
- **PTEN** – vyšetřována ztráta exprese
problém testování: nestandardizované hodnocení IHC PTEN exprese
Ztráta exprese proteinu PTEN, je v mnoha studiích spojena s resistencí k léčbě antiEGFR mAbs
Ztráta funkce proteinu PTEN vede k zvýšení koncentrace PIP-3 a v důsledku toho k aktivaci PIK3CA dráhy.

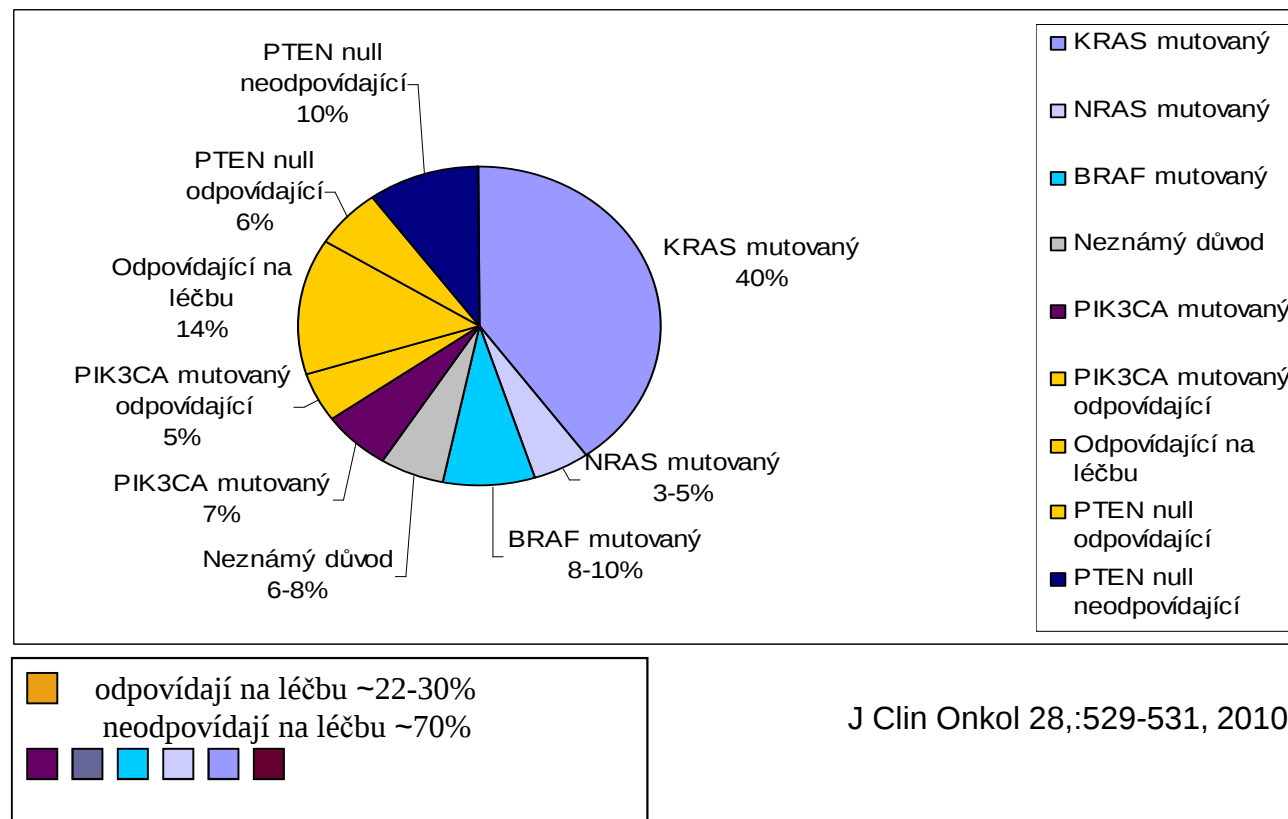
Ligandy EGFR – AREG a EREG

- Nedávno nalezené biomarkery jsou velmi nadějně vzhledem k předpovědi odezvy na terapii anti-EGFR mAbs
Khambata-Ford S, (2007), J clin Oncol 25,3230-3237
- U KRAS wt pacientů je statisticky signifikantní korelace AREG a EREG mRNA overexprese a odpovědí na léčbu.
- Tumory, které vykazují nízkou expresi ligandů, se při léčení anti EGFR mAbs chovají jako KRAS mut

Mutační status primárního kolorektálního nádoru a odvozených metastáz

- Jedna z důležitých otázek při genotypizaci nádorů je výběr testovaného materiálu. Většina studií hodnotí účinnost léčby na základě analýz, které využívají genetický materiál získaný z primárních nádorů. Terapie anti EGFR mAbs je přitom většinou využívána k léčení metastatického onemocnění.
- Naše zkušenosti i publikované práce dokazují, že shoda mutačního statusu KRAS v primárním nádoru a metastázách není absolutní. Shoda je v různých studiích udávána na 92-97%.
- V některých případech je vhodné testovat materiál i z metastázy.
- Perspektivní se do budoucna jeví možnost testovat cirkulující nádorové buňky, které by představovaly materiál pro analýzu, který odráží aktuální stav.

Vztah mezi biomarkery a léčebnou odpovědí na EGFR mAbs



J Clin Onkol 28,;529-531, 2010

Komplexnost testování

- Pro získání komplexní předpovědi jak z hlediska odpovědi na léčbu, tak z hlediska prognózy průběhu onemocnění, je potřeba hodnotit více markerů.
- Testování jednotlivých mutací v genech zachycuje vždy pouze větší či menší část změn (mutací), které jsou přítomné. Vždy zůstává část netestovaná a tím i nezachycená část pacientů, kteří nevykazují predikovanou léčebnou odpověď z důvodu, že „jejich“ mutace nebyla testována.

Prediktory anti-EGFR terapie

Prediktory rezistence

- KRAS aktivační mutace
- BRAF mutace

Prediktory rezistence velmi pravděpodobné

- PIK3CA mutace
- ztráta exprese tumor supresorového genu PTEN

Prediktory sensitivity

- amplifikace EGFR genu

(vyšší počet kopií genu predikuje pozitivní odpověď na terapii – vyskytuje se vzácně)

- aktivující mutace EGFR jsou v CRC (na rozdíl od NSCLC) vzácné.
- overexprese ligandů receptoru amphiregulinu a epiregulinu
(Prokázáno metodou „gene expresion profiling“ a potvrzeno studiemi s využitím kvantitativní RT-PCR)

Děkuji za pozornost