

## Medycyna personalizowana w raku płuca

Izabela Łaczmańska<sup>1,2#</sup>, Izabella Dębicka<sup>2#</sup>, Justyna Gil<sup>1</sup>, Dagmara Michałowska<sup>2</sup>,  
Ireneusz Pawlak<sup>2</sup>, Maria M. Sęsiadek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Genetyki, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wrocław

<sup>2</sup>Dolnośląskie Centrum Onkologii we Wrocławiu, Wrocław

#równy udział autorów

Terapia personalizowana jest obiecującą metodą leczenia chorych na nowotwory. Dynamiczny rozwój biologii molekularnej umożliwił identyfikację podtypów molekularnych nowotworów i pozwolił ustalić leczenie optymalne dla pacjenta. Diagnostyka molekularna jest również niezbędna do rozpoznania nowotworu, prognozowania przebiegu choroby oraz rokowania. W przypadku raka płuca, który jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych, głównymi kandydatami do leczenia celowanego są pacjenci z III oraz IV stopniem zaawansowania choroby, u których nie można przeprowadzić radykalnego leczenia miejscowego. W praktyce klinicznej sprawdzają się przede wszystkim inhibitory kinazy tyrozynowej – receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (TKI-EGFR), inhibitory ALK, ROS1, BRAF oraz inne. Pomocna jest także immunoterapia z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych przeciwko punktom kontroli układu immunologicznego – głównie przeciwko receptorowi programowanej śmierci typu 1 PD-1 lub jego ligandowi PD-L1, ale też w wysokim obciążeniu guza nowotworowego mutacjami somatycznymi (*tumor mutational burden* – TMB). Terapia celowana w porównaniu z chemioterapią niewątpliwie poprawia wyniki leczenia zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca. Ze względu na mniejszą toksyczność pozytywnie wpływa także na jakość życia pacjentów. W artykule przedstawiamy charakterystykę badań molekularnych, które stosuje się u chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuca, i które mają znaczenie w kwalifikacji do terapii celowanych. Opisujemy metodykę badań oraz możliwości ich refundacji w Polsce.

**Słowa kluczowe:** rak płuca, NSCLC, FISH, NGS, terapia celowana, TKI

### Wstęp

Terapia personalizowana w onkologii opiera się na ścisłym powiązaniu pomiędzy zmianami molekularnymi w nowotworach a leczeniem. Pacjenci z tym samym rozpoznaniem, ale o różnych profilach molekularnych nowotworu, mogą mieć różny przebieg choroby i różnie reagować na stosowane leki. Najczęściej punktami działania leków celowanych są białka, które biorą udział w kontroli aktywności komórki nowotworowej, w tym w kontroli różnych ścieżek przekazywania sygnałów. Białka te w komórkach nowotworowych wykazują nieprawidłową aktywność lub funkcję, co prowadzi do zdarzeń promujących rozwój nowotworu, m.in. do nad-

miernej proliferacji komórki, nieprawidłowej angiogenezy, zahamowania apoptozy i innych zaburzeń cyklu komórkowego [1, 2]. Celem charakterystyki podtypów molekularnych jest ustalenie optymalnego dla pacjenta postępowania terapeutycznego.

Rak płuca jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych, a pięcioletnie przeżycie dotyczy tylko 10–15% pacjentów [3]. Na świecie na niedrobnokomórkowego raka płuc (*non-small cell lung cancer* – NSCLC), który stanowi 80–85% wszystkich przypadków raka płuca, zapada rocznie ponad 1,5 miliona ludzi. W 2018 roku zdiagnozowano ponad 2 mln nowych przypadków NSCLC i zarejestrowano ponad

#### Jak cytować / How to cite:

Łaczmańska I, Dębicka I, Gil J, Michałowska D, Pawlak I, Sęsiadek MM. *Personalised medicine in lung cancer*. NOWOTWORY J Oncol 2021; 71: 122–128.

1,7 mln zgonów [4]. Obserwuje się dwukrotną przewagę zachorowań wśród mężczyzn w stosunku do kobiet (13 798 vs. 7747 w 2017 roku – w Polsce), jednak przewaga ta z roku na rok maleje. Od 15 lat można zauważyć wśród mężczyzn spadek zachorowalności i umieralności na nowotwory płuca. Natomiast liczba kobiet w Polsce, które w 2017 roku zmarły z powodu tego nowotworu, kolejny raz przekroczyła liczbę chorych, które zmarły na skutek raka piersi (17,4% zgonów vs. 14,8% zgonów). U mężczyzn nowotwory złośliwe płuca są nadal dominującą przyczyną zgonów (około 30%) z powodu chorób nowotworowych [4]. Ryzyko rozwoju NSCLC silnie koreluje z paleniem papierosów: 85–90% przypadków raka płuca jest związanych z tym nałogiem [5].

Według obowiązującej klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization – WHO) z 2015 roku wyróżnia się:

- drobnokomórkowego raka płuca (*small-cell lung cancer* – SCLC), który stanowi 15% pierwotnych nowotworów płuca,
- niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC), który jest rozpoznawany w 85% przypadków [6].

Histopatologicznie NSCLC dzieli się na:

- raka gruczołowego (45% wszystkich rozpoznanych pierwotnych nowotworów płuca),
- raka płaskonabłonkowego (około 30%),
- raka wielkokomórkowego (10%) oraz
- inne, rzadkie typy morfologiczne (<1%) [6].

Nowotwór złośliwy płuca rzadko jest diagnozowany we wczesnych stopniach zaawansowania. W Polsce diagnoza ta jest stawiana najczęściej w IV stopniu (47–62%, w zależności od województwa) oraz w III stopniu (24–38%) [7]. U pacjentów z zaawansowanym NSCLC leczenie z zastosowaniem chemioterapii daje 25–30% obiektywnych odpowiedzi (*objective response rate* – ORR), natomiast mediana przeżycia całkowitego wynosi 10–12 miesięcy [8]. Tylko około 15% chorych przeżywa 5 lat od momentu rozpoznania choroby [9].

We wczesnych stopniach zaawansowania raka płuca podstawową metodą leczenia jest zabieg chirurgiczny (możliwy u około 15–20% chorych na NSCLC). W III stopniu zaawansowania choroby resekcja guza jest rzadko możliwa, a część pacjentów jest leczona radioterapią, chemioterapią lub w sposób skojarzony za pomocą tych dwóch metod z uwzględnieniem uzupełniającej immunoterapii [10]. Pacjenci z III oraz IV stopniem zaawansowania choroby, przy braku możliwości radykalnego leczenia miejscowego, są kandydatami do leczenia celowanego [6, 11].

Podłoże molekularne NSCLC jest coraz lepiej znane, jednak nadal u około połowy pacjentów cel molekularny pozostaje nieokreślony. Liczne prowadzone badania subpopulacji chorych z różnymi zmianami molekularnymi w tkance nowotworowej pozwalają jednak na coraz lepszą charakterystykę tego nowotworu [5, 12, 13].

## Badania molekularne w diagnostyce NSCLC dla potrzeb terapii personalizowanej

Molekularna diagnostyka tkanki nowotworowej jest niezbędna zarówno do klasyfikacji nowotworu, jak i do prognozowania przebiegu choroby oraz rokowania, a także wyboru optymalnej terapii. W przypadku raka płuca materiał tkankowy uzyskiwany od pacjenta zwykle jest skąpy, co znacznie ogranicza możliwości diagnostyczne i determinuje wybór algorytmu diagnostycznego [5].

Ciągle poszerzanie panelu badanych markerów molekularnych, związane w głównej mierze z wprowadzeniem do diagnostyki techniki sekwencjonowania następnej generacji (*next generation sequencing* – NGS), umożliwia coraz lepszą i szerszą kwalifikację chorych na NSCLC do terapii celowanych [14–16]. Obecnie do standardu diagnostycznego w raku płuca wchodzi badania wielogenowego profilu molekularnego. Pozwalają one wykryć określone mutacje czy też rearanżacje genów mających znaczenie predykcyjne. Identyfikacja tych zmian umożliwia indywidualizację terapii i wpływa na poprawę wyników leczenia przy akceptowalnym stopniu toksyczności. W praktyce klinicznej wykorzystuje się inhibitory kinazy tyrozynowej – receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (TKI-EGFR), inhibitory ALK, ROS1, BRAF, NTRK oraz immunoterapię z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych przeciwko punktom kontroli układu immunologicznego, głównie przeciwko receptorowi programowanej śmierci typu 1 (PD-1) lub jego ligandowi (PD-L1) (tab. I) [17].

Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) należy do trudnych metod diagnostycznych, które wymagają od personelu nie tylko wysokich umiejętności manualnych, ale także analitycznych i interpretacyjnych. NGS umożliwia jednak ana-

**Tabela I.** Zmiany genetyczne istotne w profilowaniu molekularnym niedrobnokomórkowego raka płuca [11, 18]

Nr.	Gen	Zmiana	Odsetek w NSCLC
1	<i>KRAS</i>	mutacje punktowe	15–25
2	<i>EGFR</i>	amplifikacja	20
3	<i>EGFR</i>	mutacje punktowe	10–15
4	<i>PTEN</i>	mutacje punktowe	4–8
5	<i>DDR2</i>	mutacje punktowe	4
6	<i>ALK</i>	rearanżacja	3–7
7	<i>HER2</i>	mutacje punktowe	4
8	<i>MET</i>	amplifikacja	2–4
9	<i>BRAF</i>	mutacje punktowe	1–3
10	<i>PIK3CA</i>	mutacje punktowe	1–3
11	<i>AKT1</i>	mutacje punktowe	1
12	<i>MEK1</i>	mutacje punktowe	1
13	<i>NRAS</i>	mutacje punktowe	1
14	<i>RET</i>	rearanżacja	1
15	<i>ROS1</i>	rearanżacja	1

lizę sekwencji wielu genów i, zależnie od typu stosowanego sprzętu i odczynników, badanie wielu pacjentów w jednym czasie. Sekwencjonowanie następnej generacji to obecnie perspektywiczna oraz najbardziej nowoczesna, precyzyjna i czuła technika pozwalająca na wykrywanie zmian w materiale genetycznym. Dostępne zestawy diagnostyczne dla NGS są zwykle przeznaczone dla poszczególnych nowotworów i pozwalają na pełną charakterystykę molekularną tkanki badanej w jednej reakcji według współczesnej wiedzy. Znacznie skraca to czas badania i pozwala na ograniczenie ilości materiału tkankowego, koniecznego do jego przeprowadzenia [13].

Badania molekularne w NSCLC mogą być przeprowadzone na materiale pooperacyjnym utrwalonym w formalinie (zaledwie 15–20% pierwotnych raków płuca kierowanych do badań molekularnych), w materiale cytologicznym uzyskanym w trakcie biopsji cienkoigłowej lub w materiale z tzw. biopsji płynnej, która opiera się na użyciu do badania pozakomórkowego krążącego DNA (*cell-free circulating tumour DNA* – ctDNA) i RNA uwalnianego z komórek nowotworowych. W ostatnim czasie można zauważyć coraz większe zastosowanie płynnej biopsji do monitorowania terapii [1]. Przed wykonaniem badań z materiału cytologicznego i biopsji cienkoigłowej konieczna jest ocena patomorfologiczna odsetka komórek nowotworowych w preparacie [1]. W Polsce Narodowy Fundusz Zdrowia (NFZ) finansuje diagnostykę genetyczną u chorych na NSCLC.

## Zmiany genetyczne w niedrobnokomórkowym raku płuca istotne w kwalifikacji do terapii celowanej

### EGFR

Mutacje (warianty patogenne) w genie *EGFR* (*ERBB1*) (*epidermal growth factor receptor*), są dla NSCLC tzw. wiodącymi zmianami genetycznymi (*driver mutations*) i występują u około 10% pacjentów rasy kaukaskiej [19]. *EGFR* należy do rodziny genów, które kodują receptorowe kinazy tyrozynowe (*receptor tyrosine kinases* – RTKs). Jego produkt białkowy uczestniczy w ścieżkach PI3K-AKT-mTOR oraz RAS-RAF-MEK-ERK. Najczęściej mutacje w *EGFR* występują w rakach o typie gruczolowym [3].

Większość wariantów patogennych *EGFR* to aktywujące delecje w eksonie 19. niezaburzające ramki odczytu (*in-frame deletions*) – czyli niepowodujące zmiany trójkowego kodu genetycznego, oraz punktowe mutacje typu *hot-spot* w eksonie 21. (np. L858R), a także inktywująca mutacja w eksonie 20. (T790M) [13].

W przypadku wykrycia w tkance guza mutacji aktywującej *EGFR*, jako pierwszą linię leczenia wdraża się leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej *EGFR* (*tyrosine kinase inhibitors* – TKIs). Obecnie dysponujemy inhibitorami kinazy tyrozynowej kolejnych generacji: pierwszej: erlotynib, gefitynib, drugiej: afatynib, dakomitynib i trzeciej: ozymertynib. Ponadto wykazano, że w przypadku rzadziej występujących delecji i mutacji punktowych w *EGFR* w eksonach 18.–21. także z dobrym

skutkiem można zastosować terapię wybranymi inhibitorami TKI [13]. Rzadkie mutacje w genie *EGFR* mogą współwystępować z częstymi mutacjami tego genu. Wówczas możliwe jest uzyskanie odpowiedzi terapeutycznej po zastosowaniu TKI pierwszej linii. Wyjątkową sytuacją stanowi wykrycie mutacji inaktywującej (najczęściej T790M), warunkującej oporność na terapię TKI, współistniejącej z inną, aktywującą, pierwotną mutacją. Oznacza to, że badane komórki nowotworowe są niewrażliwe na terapię TKI pierwszej i drugiej generacji i pacjent nie odniesie korzyści z takiej terapii, ale można uzyskać odpowiedź na leczenie TKI trzeciej generacji [13]. Należy jednak pamiętać, że materiał do badania musi być pobrany w momencie progresji choroby. Obecnie w Polsce, od 1 stycznia 2021 roku, w programie lekowym leczenia raka płuca, refundowane jest w pierwszej linii leczenie ozymertynibem i afatynibem, a w drugiej linii ozymertynibem przy niepowodzeniu wcześniejszego leczenia innymi TKI i przy obecności mutacji T790M w genie *EGFR*. Erlotynib i gefitynib są dostępne w katalogu.

Aby wykryć warianty patogenne *EGFR*, stosuje się qPCR (*Real-Time PCR*, *qPCR* – *quantitative polymerase chain reaction*) lub NGS. Pierwsza z metod umożliwi diagnostykę wybranego zestawu mutacji (zwykle około 30–40 mutacji w eksonach 18.–21.) i spośród metod stosowanych w diagnostyce genetycznej nowotworów jest stosunkowo łatwa – zwykle stosuje się zwalidowane, gotowe zestawy diagnostyczne z certyfikatem CE IVD, a wynik badania wyrażony jest za pomocą wykresu fluorescencji dla poszczególnych mutacji i wartości liczbowych. Technika qPCR umożliwia detekcję mutacji obecnych nawet tylko w 1% komórek w badanej tkance, z użyciem małych ilości DNA (np. o stężeniu 10 ng/μl). PCR w czasie rzeczywistym jest rekomendowaną techniką do oznaczeń mutacji genu *EGFR*. Metoda ta jest obecnie standardem w laboratoriach molekularnych, które wykonują badania genetyczne na materiale nowotworowym. Czułość stosowanej metody powinna zapewniać wiarygodną ocenę materiału tkankowego zawierającego co najmniej 50% komórek nowotworowych [20].

Drugą techniką, która jest używana do detekcji wariantów zarówno w genie *EGFR*, jak i pozostałych istotnych genach, zwykle razem w panelach wielogenowych, jest NGS. Jej zaletą w porównaniu z qPCR jest możliwość wykrycia wszystkich patogennych i potencjalnie patogennych wariantów danego genu. Standardowo dla NGS jako granicę wykrywalności dla mutacji somatycznych przyjmuje się obecność mutacji w ≥5% badanych komórek (*variant allele frequency* – VAF), ale faktycznie możliwa jest detekcja w niższym odsetku [21].

Odmienne postępowanie diagnostyczne stosuje się w przypadku mutacji inaktywującej T790M (stanowiącej 60% wszystkich mutacji *EGFR*). Używa się technik, które umożliwiają monitorowanie pojawienia się tej zmiany u pacjenta – z materiału uzyskanego z płynnej biopsji (*liquid biopsy*), czyli w odpowiednio pobranej krwi żyłnej, z której izoluje się wolnokrążący DNA. W tym przypadku zwykle ocenia się status

mutacyjny przy użyciu qPCR ale także cyfrowego, emulsyjnego PCR (*droplet digital PCR* – ddPCR), przeznaczonego do badania znanych, pojedynczych mutacji w bardzo małej ilości materiału genetycznego [22]. Oznaczanie cEGFR (*circulating tumour EGFR*) w płynnej biopsji możliwe jest także dzięki zautomatyzowanej metodzie opartej na gotowych do użycia kartridżach Idylla™ (Biocartis), w których zarówno proces izolacji, jak i qPCR odbywa się w jednym miejscu [23].

## ALK

Rearanżacje (fuzje) genu *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*) prowadzące do jego trwałej aktywacji, występują u około 3–6% pacjentów z gruczolakorakiem i należą do mutacji wiodących [24, 25]. Najczęściej obserwowana jest fuzja *ALK* z *EML4* (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4*), która jest efektem inwersji w ramieniu krótkim chromosomu 2., gdzie zlokalizowane są oba geny, i prowadzi do ekspresji chimerycznego białka EML4-ALK [25]. Ponadto *ALK* wchodzi także w fuzję z *TFG* (*trafficking from er to golgi regulator*) i *KIF5B* (*kinesin family member 5B*). W przypadku wykrycia w tkance guza rearanżacji *ALK* pacjenci kwalifikowani są do terapii inhibitorami *ALK* pierwszej (kryzotynib), drugiej (alektynib, cerytynib, brygatynib) lub trzeciej generacji (lorlatynib). Pojawienie się kolejnej mutacji w *ALK* lub aktywacja innych ścieżek: EGFR lub PI3K3 powoduje jednak oporność na tę terapię [25]. W NSCLC, w przypadku wystąpienia rearanżacji *ALK*, istnieje zwiększona predyspozycja do wystąpienia u pacjenta przerzutów w mózgu.

W Polsce od stycznia 2021 roku są refundowane terapie kryzotynibem, alektynibem i cerytynibem w pierwszej linii leczenia, ponadto kryzotynibem w drugiej i trzeciej linii po niepowodzeniu wcześniejszej chemioterapii. Poza tym alektynib, cerytynib i brygatynib są refundowane po niepowodzeniu terapii innym inhibitorem *ALK*.

W celu detekcji w komórkach nowotworowych ekspresji białka fuzyjnego EML4-ALK można stosować badanie immunohistochemiczne (IHC), które jest tanią i szybką metodą skryningu. W warunkach fizjologicznych *ALK* pełni ważną funkcję w procesie dojrzewania neuronów i nie ulega ekspresji w zdrowej tkance płuca, więc jego ekspresja w nowotworze oznacza, że uległ on rearanżacji [26]. Wykonywanie tego badania, aby zakwalifikować pacjenta do terapii celowanej, podlega corocznej ocenie zewnątrzlaboratoryjnej w ramach europejskiego programu kontroli jakości. Należy podkreślić, że niejednoznaczny wynik IHC w postaci słabego, heterogennego odczynu cytoplazmatycznego białka *ALK* powinien być potwierdzony badaniem rearanżacji genu *ALK* za pomocą techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*fluorescent in situ hybridization* – FISH) [1]. Ocena rearanżacji genu *ALK* przy pomocy FISH wykonuje się z zastosowaniem dwukolorowych sond fluorescencyjnych – jednej dla 5' końca i drugiej dla 3' końca *ALK*. W przypadku braku rearanżacji obie sondy zlokalizowane są blisko siebie (w badaniu widoczne jako jeden dwukolorowy sygnał), natomiast w przypadku

rearanżacji *ALK* sondy dla co najmniej jednej kopii genu ulegają separacji i w jądrze komórkowym można obserwować odrębne sygnały (tzw. sondy *break-apart*) lub delecję sygnału dla końca 5' genu, co także oznacza obecność rearanżacji [25]. W badaniu tym analizuje się minimum 50 jąder interfazalnych (standardowo 100, ale nie zawsze jest to możliwe ze względu na trudności techniczne i małą ilość materiału tkankowego), a granicą odcięcia dla wyniku pozytywnego jest obecność rearanżacji w >15% analizowanych komórek, stwierdzona przez dwie osoby w niezależnych analizach [25]. Do terapii inhibitorami *ALK* mogą być zakwalifikowani pacjenci z rearanżacją genu *ALK* obecną w co najmniej 15% jąder komórkowych [1].

Aby pacjent mógł zostać zakwalifikowany do programu lekowego, wymagana jest obecność rearanżacji genu *ALK* w komórkach nowotworowych stwierdzona w badaniu IHC, FISH lub NGS z wykorzystaniem walidowanego testu.

Inną metodą badania *ALK* jest qPCR z odwrotną transkrypcją RT-qPCR. Metoda ta pozwala na identyfikację partnerów fuzyjnych i wariantów fuzyjnych tego genu, ale wymaga uzyskania dobrej jakości RNA z tkanki FFPE (*formalin-fixed paraffin-embedded*), co nie zawsze jest możliwe z powodu degradacji materiału genetycznego [27, 28]. Ponadto za pomocą techniki qPCR nie jest możliwa detekcja wszystkich wariantów fuzyjnych *ALK*. Metody tej nie rekomenduje się w Polsce jako testu kwalifikującego pacjentów do terapii i dlatego nie jest powszechnie stosowana.

Rearanżacje genu *ALK* można także badać techniką NGS, przy czym na rynku dostępne są zarówno zestawy tylko do badania *ALK* lub zestawy do badania kilku różnych genów w jednej próbce. Znacząco skraca to czas analizy, a także pozwala uzyskać większą liczbę danych, w tym nie tylko informacje o rearanżacji, ale także o innych wariantach patogennych, np. bardzo istotnych dla pacjenta mutacjach punktowych warunkujących niewrażliwość na terapię. Zastosowanie NGS jest ekonomiczne przy większej liczbie próbek i nieopłacalne dla pojedynczych oznaczeń [13–15]. Wykonywanie tego badania w celu kwalifikacji do terapii celowanej, podobnie jak badań IHC i FISH, podlega corocznej ocenie zewnątrzlaboratoryjnej w europejskim programie kontroli jakości.

## ROS1

Rearanżacje genu *ROS1* (*ROS protooncogene-1, receptor tyrosine kinase*) występują u 1–2% pacjentów z NSCLC i warunkują odpowiedź na terapię inhibitorami *ROS1* (np. kryzotynibem). Podobnie jak w przypadku *ALK*, w genie *ROS1* pojawiają się mutacje punktowe, które powodują niewrażliwość na tę terapię mimo obecnych rearanżacji [13]. Diagnostykę, analogicznie jak w przypadku genu *ALK*, można prowadzić metodami FISH i NGS, a kwalifikacja do leczenia jest możliwa na podstawie wyników uzyskanych w laboratorium z pozytywnym wynikiem corocznego sprawdzianu w europejskim programie kontroli jakości.

## PD-1 i PD-L1

PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) to ligand na powierzchni komórek, a jego nadekspresja w komórkach nowotworowych warunkowana jest utratą genu *PTEN* i indukcją ścieżki PI3K-AKT. Z kolei PD-1 (*programmed cell death protein 1*) jest receptorem na powierzchni limfocytów T CD81+, którego ekspresja wzrasta przy naciekaniu komórek guza (29). Zmniejsza to zdolność limfocytów do produkcji cytokin i proliferacji, co zaburza pracę układu odpornościowego. Obecność ekspresji PD-L1 w 50% lub większym odsetku komórek nowotworowych potwierdzona w badaniu IHC z użyciem koncentratu przeciwciała DAKO PD-L1 IHC 22C3 lub przeciwciała Ventana PD-L1 SP263 pozwala zakwalifikować pacjenta do leczenia przeciwciałami skierowanymi przeciwko PD-1 w monoterapii (pembrolizumab), przywracając aktywność cytotoksyczną limfocytów. Natomiast przy obecności ekspresji PD-L1 poniżej 50%, pacjenci odnoszą korzyść z leczenia za pomocą immunoterapii w skojarzeniu z chemioterapią (obecnie refundowane w programie lekowym w Polsce od stycznia 2021 roku).

Należy pamiętać, że ekspresja PD-L1 w komórkach nowotworowych nie jest niezbędna do uzyskania korzyści z leczenia immunoterapią. Tak jest w przypadku niwolumabu, atezolizumabu – w Polsce refundowanych w ramach programu lekowego w drugiej linii leczenia, po niepowodzeniu chemioterapii. Nie jest niezbędna także do zastosowania durwalumabu – jako leczenia konsolidującego po radykalnej radiochemioterapii. Na świecie zastosowanie kliniczne immunoterapii w NSCLC pojawiło się już w 2015 roku – na podstawie badania CheckMate 017 [30]. Jednak immunoterapia wykazuje skuteczność tylko u niewielkiego odsetka pacjentów, co jest prawdopodobnie związane z bardzo złożonym mikrośrodowiskiem immunologicznym guza.

Badania kliniczne wykazują rozbieżne wyniki co do roli ekspresji PD-L1 jako czynnika predykcyjnego do leczenia immunoterapią. Wynika to prawdopodobnie z różnic w ocenie ekspresji i sposobu badania metodami immunohistochemicznymi. Na zmianę ekspresji może też mieć wpływ wcześniejsze leczenie (np. chemioterapia). Ponadto nowotwory charakteryzują się heterogennością ekspresji PD-L1 w obrębie guza, a także różną ekspresją pomiędzy guzem pierwotnym a węzłami chłonnymi. [31–33].

## Inne geny

Sekwencjonowanie następnej generacji umożliwia analizę całych sekwencji wielu genów w jednym oznaczeniu, jednakże liczba uzyskiwanych z takiego badania danych niesie też ze sobą ryzyko ich błędnej interpretacji i trudności w interpretacji ich znaczenia w odniesieniu do danych klinicznych. Dlatego, według najnowszych rekomendacji, u pacjentów z NSCLC badanie tkanki nowotworowej **w celach diagnostycznych** powinno obejmować określony panel genów, których warianty patogenne mają znaczenie predykcyjne lub prognostyczne [13]. Według rekomendacji Europejskiego Towarzystwa On-

kologii Klinicznej (European Society for Medical Oncology – ESMO) oraz Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets (ESCAT) do takich genów u pacjentów z zaawansowanym niepłaskonabłonkowym NSCLC, oprócz opisanych wyżej zmian, należą:

- *MET*, który koduje receptor dla czynnika wzrostu hepatocytów (*hepatocyte growth factor receptor* – HGFR). Najczęściej (u około 3% pacjentów) występuje delecja eksonu 14. (*exon 14 skipping*) związana ze złym rokowaniem lub amplifikacja genu (także u około 3% pacjentów) wywołująca oporność na inhibitory EGFR – zwykle efekt selekcji klonalnej komórek u pacjentów po tej terapii. W próbie przełamania tej oporności stosowany był kapmatynib. U chorych z wysoką amplifikacją genu *MET* wykazano skuteczność kryzotyribu.
- *BRAF* – najczęściej mutacja V600E występująca u około 2% pacjentów. Leki zarejestrowane w pierwszej linii leczenia przy obecności tej mutacji to dabrafenib i trametynib.
- *NTRK* – u 0,23–3% pacjentów występują fuzje genów *NTRK1/2/3*, które warunkują powstanie onkoprotein. U 0,1–1% NSCLC nie współistnieją z innymi zaburzeniami genetycznymi. Lekami zarejestrowanymi do terapii w przypadku tych mutacji są entrektynib i larotrektynib.
- *RET* – fuzje występują u 0,6–0,9% pacjentów z NSCLC, u 1–2% pacjentów z rakiem gruczołowym. Rearanżacja tego genu zwykle nie współistnieje z innymi zmianami genetycznymi w komórkach NSCLC. Od 10 grudnia 2020 roku Europejska Agencja Leków (European Medicines Agency – EMA) zarejestrowała selperkatynib w monoterapii w leczeniu RET-dodatniego niedrobnokomórkowego raka płuca po wcześniejszej immunoterapii lub/i chemioterapii opartej na związkach platyny.
- *KRAS* – u 12% pacjentów występują mutacje, w tym 97% w eksonach 2. i 3. (głównie w kodonach G12, G13 i Q61).
- *HER2 (ERBB2)* – u 2–5% pacjentów amplifikacja genu i mutacje punktowe typu *hot-spot*. U pacjentów z tymi mutacjami zaobserwowano efekt terapeutyczny leków afatynib i dakomitynib.
- *BRCA1/2* – mutacje punktowe zaobserwowano u 1,2% pacjentów.
- *PIK3CA* – głównie mutacje typu *hot-spot*, ale także amplifikacje obecne u 1,2–7% pacjentów, często współistniejące z mutacjami innych genów.
- *NRG1* – fuzje genu występują u 1,7% pacjentów.

U pacjentów z zaawansowanym płaskonabłonkowym NSCLC według ESCAT istotne diagnostycznie i klinicznie są fuzje genu *NTRK* (obecne u 0,23–3% chorych), mutacje *PIK3CA* (16% chorych) i *BRCA1/2* (1,2% chorych) [13].

## Obciążenie mutacyjne guza (TMB)

W ostatnim czasie coraz większe zainteresowanie, jako czynnik predykcyjny w immunoterapii, zdobywa ilościowy biomarker TMB (*tumour mutational burden*) definiowany jako obciążenie

mutacyjne guza. Badanie TMB wykonywane jest z wykorzystaniem techniki NGS, a wartość TMB określana jest przez liczbę mutacji na milion par zasad w DNA izolowanym z guza [34]. Wynik TMB raportowany jest jako: wysoki (*TMB-high*), średni (*TMB-intermediate*), niski (*TMB-low*) lub niezdefiniowany (*TMB-undetermined*), w zależności od liczby wykrytych mutacji w guzie [35]. Wykazano, że pacjenci z NSCLC z wysokim TMB odnosili korzyści kliniczne po zastosowaniu immunoterapii skierowanej na punkty kontrolne układu odpornościowego (*immune checkpoint inhibitors* – ICIs) [16]. Efekt ten wiąże się ze zwiększoną ekspresją neoantygenów indukowanych przez obecność mutacji, która mobilizuje układ immunologiczny do rozpoznawania i niszczenia komórek nowotworowych [36]. Wysoki TMB koreluje z wydłużeniem czasu wolnego od progresji oraz zwiększeniem odsetka odpowiedzi po zastosowaniu immunoterapii u pacjentów [37].

## Perspektywy

U wybranych pacjentów terapia celowana w porównaniu z chemioterapią niewątpliwie poprawia wyniki leczenia i kontroli zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca. Poprawia się też jakość życia chorych leczonych w ten sposób, ponieważ toksyczność tej terapii jest mniejsza. Zastosowanie TKI pierwszej generacji ukierunkowanych na EGFR, poprawia też PFS (*progression free survival*) w porównaniu z chemioterapią [38]. Jednak z czasem u pacjentów nieuchronnie rozwija się lekooporność. Do najczęstszych mechanizmów oporności należą pojawienie się mutacji T790M *EGFR*, mutacje genu *RAS* czy amplifikacja *MET*. Wykazano, że oporność na inhibitory pierwszej i drugiej generacji występuje średnio po około 10–14 miesiącach leczenia [39]. W ostatnich latach pojawiła się trzecia generacja EGFR-TKI – lek, który jest aktywny zarówno w pierwszej linii przy obecności mutacji w genie *EGFR*, jak i w drugiej linii leczenia po innych inhibitorach TKI, przy obecności mutacji oporności T790M w genie *EGFR*. Badania wykazały, że występuje lekooporność na EGFR-TKI trzeciej generacji pod postacią mutacji *EGFR*, *PIK3CA*, *KRAS*, *BRAF* i *MET*. Inhibitor *MET* może zwiększyć wrażliwość na EGFR-TKI pierwszej generacji [40]. Na ogół niezależnie od mutacji *EGFR* i *KRAS* u około 5% pacjentów z NSCLC występuje rearanżacja (fuzja) genu *ALK*. Obserwuje się wówczas większe ryzyko przerzutów do mózgu [41]. Okazało się także, że inhibitor *ALK* drugiej generacji ma wysoką skuteczność wewnątrzczaszkową w porównaniu z inhibitorem *ALK* pierwszej generacji [42], ale z czasem pojawiają się kolejne mutacje, warunkujące oporność na stosowane leczenie.

Aby zoptymalizować terapię celowaną, proponowane jest stosowanie jej z innymi lekami celowanymi, w tym z immunoterapią. Trwają również poszukiwania innych – poza PD-1/PD-L1 – immunologicznych punktów kontrolnych, aby zwiększyć grupę pacjentów mogących skorzystać z tej formy leczenia. Innym kierunkiem jest stosowanie terapii w sposób skojarzony, np. chemioterapii z inhibitorami punktów kontrolnych (takie

połączenie leków jest już zarejestrowane i dostępne w Polsce w ramach programu lekowego – od 1 stycznia 2021 roku).

Obecnie trwa wiele badań klinicznych nad terapiami celowanymi w NSCLC, zarówno nad lekami stosowanymi samodzielnie, jak i w skojarzeniu, oraz ich sekwencyjnym podawaniem. Ponadto trwają badania z zastosowaniem leków ukierunkowanych molekularnie i immunoterapię w leczeniu neoadjuwantowym i adjuwantowym, a także w leczeniu podtrzymującym. Chemioterapia nie jest już najlepszą dostępną metodą leczenia systemowego dla wszystkich pacjentów z NSCLC. Decyzje terapeutyczne powinny być podejmowane w oparciu o badanie cech molekularnych guza.

Oczekiwane korzyści dla pacjentów, takie jak m.in. wydłużenie czasu całkowitego przeżycia, uzyskanie jak najdłuższej remisji w przyszłości, wynikną prawdopodobnie ze znalezienia optymalnych sposobów łączenia leczenia celowanego, immunoterapii i chemioterapii.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

**Izabela Łaczmńska**

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Katedra i Zakład Genetyki

ul. Marcinkowskiego 1

50-368 Wrocław

e-mail: [izabela.laczmanska@umed.wroc.pl](mailto:izabela.laczmanska@umed.wroc.pl)

Otrzymano: 21 stycznia 2021

Zaakceptowano: 22 stycznia 2021

## 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, indexed in Pubmed: 29355391.
2. Kutkowska J, Porębska I, Rapak A. Non-small cell lung cancer – mutations, targeted and combination therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017; 71(0): 431–445, doi: 10.5604/01.3001.0010.3826, indexed in Pubmed: 28513466.
3. Yuan M, Huang LL, Chen JH, et al. The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2019; 4: 61, doi: 10.1038/s41392-019-0099-9, indexed in Pubmed: 31871778.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(6): 394–424, doi: 10.3322/caac.21492, indexed in Pubmed: 30207593.
5. Pinto JA, Vallejos CS, Raez LE, et al. Gender and outcomes in non-small cell lung cancer: an old prognostic variable comes back for targeted therapy and immunotherapy? *ESMO Open*. 2018; 3(3): e000344, doi: 10.1136/esmoopen-2018-000344, indexed in Pubmed: 29682332.
6. Travis W, Brambilla E, Nicholson A, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J Thorac Oncol*. 2015; 10(9): 1243–1260, doi: 10.1097/jto.0000000000000630.
7. Didkowska J, Wojciechowska U, Śliwczyński A. Raport dotyczący stopni zaawansowania, leczenia oraz przeżyć pacjentów chorych na raka płuca zgłoszonych do KRN w latach 2014–2016. 2020.
8. Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol*. 2007; 25(12): 1545–1552, doi: 10.1200/JCO.2005.05.1474, indexed in Pubmed: 17442998.

9. Allemani C, Weir HK, Carreira H, et al. CONCORD Working Group. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2015; 385(9972): 977–1010, doi: 10.1016/S0140-6736(14)62038-9, indexed in Pubmed: 25467588.
10. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. PACIFIC Investigators. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017; 377(20): 1919–1929, doi: 10.1056/NEJMoa1709937, indexed in Pubmed: 28885881.
11. Forsythe ML, Alwithenani A, Bethune D, et al. Molecular profiling of non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2020; 15(8): e0236580, doi: 10.1371/journal.pone.0236580, indexed in Pubmed: 32756609.
12. Tsoukalas N, Aravantinou-Fatorou E, Baxevanos P, et al. Advanced small cell lung cancer (SCLC): new challenges and new expectations. *Ann Transl Med*. 2018; 6(8): 145, doi: 10.21037/atm.2018.03.31, indexed in Pubmed: 29862234.
13. Mosele F, Remon J, Mateo J, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2020; 31(11): 1491–1505, doi: 10.1016/j.annonc.2020.07.014, indexed in Pubmed: 32853681.
14. Harlé A, Dietmaier W, Vogl I, et al. Detection of ALK, RET, ROS1, NTRK1 and MET rearrangements and actionable mutations using next generation sequencing in patients with non-small cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2018; 29: vi12, doi: 10.1093/annonc/mdy318.017.
15. Clavé S, Rodon N, Pijuan L, et al. Next-generation Sequencing for ALK and ROS1 Rearrangement Detection in Patients With Non-small-cell Lung Cancer: Implications of FISH-positive Patterns. *Clin Lung Cancer*. 2019; 20(4): e421–e429, doi: 10.1016/j.clcc.2019.02.008, indexed in Pubmed: 30898567.
16. Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K, et al. Molecular Determinants of Response to Anti-Programmed Cell Death (PD)-1 and Anti-Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Profiled With Targeted Next-Generation Sequencing. *J Clin Oncol*. 2018; 36(7): 633–641, doi: 10.1200/JCO.2017.75.3384, indexed in Pubmed: 29337640.
17. Qian J, Massion P. Next-generation molecular therapy in lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*. 2018; 7(S1): S31–S34, doi: 10.21037/tlcr.2018.01.03.
18. Non-Small Cell Lung Carcinoma - My Cancer Genome [Internet]. <https://www.mycancergenome.org/content/disease/non-small-cell-lung-carcinoma/> (30.12.2020).
19. Ruiz-Cordero R, Devine W. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy in Lung Cancer. *Surgical Pathology Clinics*. 2020; 13(1): 17–33, doi: 10.1016/j.path.2019.11.002.
20. Krawczyk P, Chorostowska-Wynimko J, Dziadziuszko R, et al. Zalecenia metodyczne dotyczące oceny mutacji genu EGFR oraz rearanzacji genu ALK w kwalifikacji chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca do terapii ukierunkowanych molekularnie. *Nowotwory. Journal of Oncology*. 2014; 64(4): 336–342, doi: 10.5603/njo.2014.0056.
21. Strom SP, Strom SP. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biology & Medicine*. 2016; 13(1): 3–11, doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0004.
22. Hochmair MJ, Buder A, Schwab S, et al. Liquid-Biopsy-Based Identification of EGFR T790M Mutation-Mediated Resistance to Afatinib Treatment in Patients with Advanced EGFR Mutation-Positive NSCLC, and Subsequent Response to Osimertinib. *Target Oncol*. 2019; 14(1): 75–83, doi: 10.1007/s11523-018-0612-z, indexed in Pubmed: 30539501.
23. Evrard SM, Taranchon-Clermont E, Rouquette I, et al. Multicenter Evaluation of the Fully Automated PCR-Based Idylla EGFR Mutation Assay on Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue of Human Lung Cancer. *J Mol Diagn*. 2019; 21(6): 1010–1024, doi: 10.1016/j.jmoldx.2019.06.010, indexed in Pubmed: 31445213.
24. Du X, Shao Y, Qin HF, et al. ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer*. 2018; 9(4): 423–430, doi: 10.1111/1759-7714.12613, indexed in Pubmed: 29488330.
25. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch*. 2012; 461(3): 245–257, doi: 10.1007/s00428-012-1281-4, indexed in Pubmed: 22825000.
26. Sholl LM, Weremowicz S, Gray SW, et al. Combined use of ALK immunohistochemistry and FISH for optimal detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol*. 2013; 8(3): 322–328, doi: 10.1097/JTO.0b013e31827db604, indexed in Pubmed: 23407557.
27. Wang R, Pan Y, Li C, et al. The use of quantitative real-time reverse transcriptase PCR for 5' and 3' portions of ALK transcripts to detect ALK rearrangements in lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2012; 18(17): 4725–4732, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0677, indexed in Pubmed: 22791881.
28. Zhang X, Zhou JG, Wu HL, et al. Diagnostic accuracy of PCR for detecting ALK gene rearrangement in NSCLC patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8(43): 75400–75410, doi: 10.18632/oncotarget.17914, indexed in Pubmed: 29088875.
29. Santini FC, Hellmann MD. PD-1/PD-L1 Axis in Lung Cancer. *Cancer J*. 2018; 24(1): 15–19, doi: 10.1097/PPO.0000000000000300, indexed in Pubmed: 29360723.
30. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015; 373(2): 123–135, doi: 10.1056/NEJMoa1504627, indexed in Pubmed: 26028407.
31. Potempa M, Jonczyk P, Zalewska-Ziob M. Molekularne uwarunkowania raka płuca. *Onkol w Prakt Klin Medica*. 2014; 10(4): 199–211.
32. Schulze AB, Schmidt LH. PD-1 targeted Immunotherapy as first-line therapy for advanced non-small-cell lung cancer atients. *Journal of Thoracic Disease*. 2017; 9: E384–E386.
33. LECZENIE NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO RAKA PŁUCA (od 09-2020). Ministerstwo Zdrowia.
34. Greillier L, Tomasini P, Barlesi F. The clinical utility of tumor mutational burden in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2018; 7(6): 639–646, doi: 10.21037/tlcr.2018.10.08, indexed in Pubmed: 30505708.
35. Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, et al. Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol Cancer Ther*. 2017; 16(11): 2598–2608, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0386, indexed in Pubmed: 28835386.
36. McGranahan N, Furness AJS, Rosenthal R, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science*. 2016; 351(6280): 1463–1469, doi: 10.1126/science.aaf1490, indexed in Pubmed: 26940869.
37. Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, et al. CheckMate 026 Investigators. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017; 376(25): 2415–2426, doi: 10.1056/NEJMoa1613493, indexed in Pubmed: 28636851.
38. Gu Li, Deng ZJ, Roy S, et al. A Combination RNAi-Chemotherapy Layer-by-Layer Nanoparticle for Systemic Targeting of KRAS/P53 with Cisplatin to Treat Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017; 23(23): 7312–7323, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2186, indexed in Pubmed: 28912139.
39. Xie Q, Yu Z, Lu Y, et al. microRNA-148a-3p inhibited the proliferation and epithelial-mesenchymal transition progression of non-small-cell lung cancer via modulating Ras/MAPK/Erk signaling. *J Cell Physiol*. 2019; 234(8): 12786–12799, doi: 10.1002/jcp.27899, indexed in Pubmed: 30536836.
40. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007; 316(5827): 1039–1043, doi: 10.1126/science.1141478, indexed in Pubmed: 17463250.
41. Lazzari C, Sitaleri G, Catania C, et al. Targeting ALK in atients with advanced Non Small Cell Lung Cancer: Biology, diagnostic and therapeutic options. *Critical Reviews in Oncology/Hematology. Crit Rev Oncol Hematol*. 2014; 89: 358–365.
42. Lockney NA, Wu AJ. Alectinib for the management of ALK-positive non-small cell lung cancer brain metastases. *J Thorac Dis*. 2017; 9(2): E152–E154, doi: 10.21037/jtd.2017.02.05, indexed in Pubmed: 28275502.