

Precizní medicína a testování *NTRK* fúzí u maligních nádorů k cílené léčbě pacientů inhibitory TRK

prof. MUDr. Alena Skálová, CSc. Šiklův ústav patologie LF UK v Plzni a Bioptická laboratoř, s. r. o., Plzeň

Souhrn: Po schválení larotrectinibu, selektivního inhibitoru tyrosinkinázového receptoru (TRK), americkým Úřadem pro potraviny a léčiva (FDA) a Evropskou lékovou agenturou (EMA) by se mělo testování genových fúzí stát rutinní součástí standardního diagnostického procesu. *NTRK1–3* jsou geny kódující tyrosinkinázové receptory pro neurotrofiny TRKA, TRKB a TRKC. Genové fúze *NTRK1–3* jsou onkogenními spouštěči mnoha různých typů nádorů u dospělých i v pediatrické populaci. U pacientů s maligními nádory, které charakterizuje fúze genů *NTRK1–3*, představuje inhibice TRK důležitý terapeutický cíl. Zásadní výzvou je tak najít pacienty vhodné k biologické léčbě, protože malignity s *NTRK* fúzí mají nízkou prevalenci (kolem 0,3 %). K detekci genových fúzí *NTRK* lze použít různé metody, zahrnující imunohistochemickou detekci nebo metody molekulárně genetické, včetně metody masivního paralelního sekvenování (sekvenování nové generace, NGS). Zde je diskutován přehled genových fúzí *NTRK* a zároveň je prezentován optimální testovací algoritmus detekce genových fúzí *NTRK* v klinické praxi při rozhodování o léčbě pacienta. **Klíčová slova:** precizní medicína, *NTRK* genové fúze, selektivní tyrosinkinázový inhibitor, masivní paralelní sekvenování, NGS

Precizní medicína je řízena molekulárně genetickým profilováním maligního nádoru a současně je přizpůsobena konkrétnímu nemocnému. Zatímco v pregenomické éře byla nádorová onemocnění klasifikována na základě primární lokalizace nádoru a histologie, v genomické éře mohou být pacienti léčeni podle molekulárně genetického profilu nádoru, nezávisle na primární lokalizaci a histologické struktuře maligního nádoru [1]. Precizní onkologie je přístup k pacientovi umožňující lékaři vybrat terapii, která bude na základě genového profilu pacientovy nemoci s největší pravděpodobností vhodná. Pacienti s nádory, které mají stejné genetické změny, dostávají cílené léky, a to nezávisle na typu nádoru (agnostická terapie). Výzvou personalizované onkologické léčby je jednak identifikovat správné nemocné s nejlepší odpovědí na léčbu a zároveň minimalizovat nežádoucí účinky. Nutná je také eliminace nemocných, kteří léčbu vůbec nepotřebují nebo pro které vybraná léčba nebude přínosem.

Cílem následujícího sdělení je poskytnout přehled o možnostech testování a algoritmu detekce nádorů s mutacemi v genech *NTRK1–3* (neurotrofinové receptory s tyrosinkinázovou aktivitou), které mohou být selektivně a úspěšně vyléčeni TRK inhibitory (larotrectinib, přípravek Vitrakvi). Masivní paralelní sekvenace (next generation sequencing, NGS) nádorových genů přináší kromě zásadních informací pro léčbu i podrobnější informace o genetické různorodosti karcinomů, které lze dnes rozdělit podle spektra řídicích genových mutací. Tento přehledový článek vychází z našich několikaletých zkušeností se sekvenováním nádorů v Bioptické laboratoři, s. r. o., v Plzni.

TRK – receptory růstových faktorů (neurotrofinů) s tyrosinkinázovou aktivitou: kódované geny *NTRK1*, *NTRK2* a *NTRK3*

Receptory (TRKA, TRKB a TRKC) pro neurotrofinové růstové faktory mají tyrosinkinázovou aktivitu a jejich aktivace vede ke zvýšené

buněčné proliferaci a nádorovému růstu [2]. Nejčastějším mechanismem onkogenní aktivace TRK receptorů jsou fúze jejich kódujících genů *NTRK1*, *NTRK2* a *NTRK3*.

Fúze *NTRK* genů představují aktivační mutace a jsou onkogenním „driverem“ pro řadu nádorových onemocnění u dětí i dospělých [1]. Rodina neurotrofinových receptorových kináz (*NTRK1*, *NTRK2* a *NTRK3*) zahrnuje tři geny kódující tři proteiny/receptory TRKA, TRKB a TRKC. Genové *NTRK* fúze mají aktivační funkci a predikují účinnost inhibitorů TRK, zatímco na bodové mutace v genech *NTRK1–3* inhibitory TRK neúčinkují. Genové fúze zahrnující neurotrofinové a tropomyozinové receptorové kinázy jsou proto novými atraktivními strukturami pro cílenou léčbu [3–5].

Fúze *NTRK* genů v nádorech

Fúze *NTRK1–3* byly popsány v řadě lidských nádorových onemocnění [6–11]. *NTRK* fúze jsou typické pro různé nádory, např. *ETV6-NTRK3* fúzní gen se vyskytuje v sekrečním karcinomu slinných žláz mamárního typu [6], v sekrečním karcinomu prsu, vzácných případech gastrointestinálního stromálního tumoru [12], ale také v různých mezenchymálních nádorech dětského věku, jako jsou infantilní fibrosarkom a kongenitální mezoblastický nefrom [7]. Dalšími příklady *NTRK* fúzních malignit mohou být papilokarcinom štítné žlázy [8–9], maligní melanom [10], glioblastomy mozku [11], stromální sarkomy dělohy [13–14], adultní fibrosarkomy kostí i měkkých tkání [15, 16] karcinomy kolorekta [17], pankreatu, plic a mnoha dalších typů malignit. V některých vzácných nádorech, jako jsou sekreční karcinomy slinných žláz a prsu nebo infantilní fibrosarkom, se *NTRK* fúze vyskytují až v 90–95 % případů [6, 7], ale celkově jsou *NTRK* genové fúze velmi vzácné s průměrnou incidencí méně než 1 % solidních maligních nádorů, a je proto velmi obtížné najít pacienty s nádory vhodnými pro terapii TRK inhibitory. Dle četnosti výskytu genů *NTRK* lze rozdělit malignity do dvou hlavních kategorií (tab. 1):

Tabulka 1 *NTRK* genové fúze v maligních nádorech dle četnosti výskytu.

Nádor	Fúzní gen <i>NTRK1</i>	Fúzní gen <i>NTRK2</i>	Fúzní gen <i>NTRK3</i>
Vysoká frekvence fúzí (> 90 %)			
Sekreční karcinom slinných žláz (SC) (90–95 %)			<i>ETV6</i>
Sekreční karcinom prsu (> 90 %)			<i>ETV6</i>
Infantilní fibrosarkom (91–100 %)	<i>SQSTM1, TPM3, LMNA</i>		<i>ETV6, EML4</i>
Celulární a smíšený kongenitální mezoblastický nefrom	<i>LMNA, TPR</i>		<i>ETV6, EML4</i>
Střední frekvence fúzí (5–25 %)			
Papilární karcinom štítné žlázy	<i>TFGSSBP2, SQSTM1, TPR, PPL</i>		<i>ETV6, RBPMS</i>
Spitzoidní tumory kůže	<i>TP53, LMNA</i>		<i>ETV6, MYH9, MYO5A</i>
Pediatrické gliomy mozku	<i>TPM3</i>	<i>AGBL4, VCL</i>	<i>ETV6, BTB1</i>
Nízká frekvence fúzí (< 5 % nebo < 1 %)			
Gliom, glioblastom mozku	<i>ARHGEF2, BCAN, CHTOP, NFASC</i>	<i>BCR, AFAP1, SQSTM1</i>	<i>AFAP1, ZNF710, EML4</i>
GIST (gastrointestinální stromální tumor)			<i>ETV6</i>
Skvamocelulární karcinom hlavy a krku		<i>PAN3</i>	<i>LYN</i>
Karcinom plic	<i>CD74, GRPAP1, IRF2BP2, MPRIP, P2RY8, SQSTM1, TPM3</i>	<i>TRIM24</i>	
Astrocytom			
Maligní melanom	<i>DDR2, GON4L, TRIM63</i>	<i>TRAF2</i>	<i>ETV6</i>
Karcinom pankreatu	<i>CTRC</i>		
Sarkom dělohy	<i>LMNA, TPM3, TPR</i>		<i>RBPMS, STRN</i>
Hematologické malignity			<i>ETV6</i>
Kolorektální karcinom	<i>LMNA, TPM3, SCYL3</i>		<i>ETV6</i>
Karcinom prsu duktální	<i>CGN, GATAD2B, LMNA, MDM4, PEAR1, TPM3</i>		<i>ETV6</i>

- ▶ **Vzácné nádory s vysokou frekvencí *NTRK* fúzí (> 90 %):** sekreční karcinom slinných žláz (SC) (90–95 %) [6], sekreční karcinom prsu (> 90 %), kongenitální mezoblastický nefrom a infantilní fibrosarkom (< 90 %) [7].
- ▶ **Častější nádory s vzácným výskytem *NTRK* fúzí (5–25 %):** papilární karcinom štítné žlázy (14–26 %) [8, 9], některé gastrointestinální stromální tumory a dětské gliomy, kolorektální karcinom a melanom.

- ▶ **Nádory s výjimečným výskytem fúze (< 5 % nebo < 1 %):** adenokarcinom plic a pankreatu, dlaždicobuněčné nádory hlavy a krku, karcinom žlučových cest, ledvin, primární mozkové nádory dospělých, sarkomy a některé hematologické malignity.

Algoritmus testování *NTRK* fúzí u maligních nádorů

Ačkoli lze *NTRK* fúze obecně označit jako vzácnou aberaci (celkově méně než 1 % pacientů se solidními nádory), existují vzácné typy

Tabulka 2 Přehled metod k testování fúze *NTRK* genů.

Metoda	Výhody metody	Nevýhody metody
IHC	<ul style="list-style-type: none"> • Levná a dostupná ve většině patologických laboratořích • Detekuje TRKA, TRKB, TRKC • Rychlá, výsledek za 1–2 dny 	<ul style="list-style-type: none"> • Není specifická • Může být falešně pozitivní • Může být falešně negativní, hlavně pro <i>NTRK2</i> a <i>NTRK3</i> • Není standardizovaný algoritmus vyhodnocování • Různé protilátky mají různou specifitu a některé jsou špatně hodnotitelné
FISH	<ul style="list-style-type: none"> • Relativně dostupná ve většině laboratořích • Vhodná u nádorů s vysokou frekvencí fúzí, např. sekreční karcinom slinných žláz a prsu • Break-apart probe detekuje <i>NTRK</i> fúzi s neznámým partnerem 	<ul style="list-style-type: none"> • Jsou nutné tři odlišné proby pro <i>NTRK1</i>, <i>NTRK2</i> a <i>NTRK3</i> • Falešná negativita i falešná pozitivita
RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Vysoká specifita a senzitivita • Celkem nízká cena 	<ul style="list-style-type: none"> • Musíme znát celou fúzi, nelze použít pro detekci nových fúzních partnerů
NGS	<ul style="list-style-type: none"> • V současnosti nejčastěji užívaná metoda k detekci <i>NTRK</i> fúzí • Velmi přesná a senzitivní • Může detekovat nové fúzní geny 	<ul style="list-style-type: none"> • Relativně vysoká cena • Použití, především RNA-based NGS, je limitováno kvalitou RNA • Delší doba nutná k analýze (10–14 dní)

nádorů, u kterých je frekvence této fúze velice vysoká (> 90 %) (MASC, sekreční karcinom prsu, infantilní fibrosarkom). *NTRK* genové fúze byly detekovány u více než 20 typů solidních nádorů. Selektivní inhibitory tyrosinkinázových receptorů (larotrectinib/Vitakvi a entrectinib/Rozlytrek) nabízejí možnost cílené léčby pacientů s nádory asociovanými s *NTRK* fúzními geny [3–5].

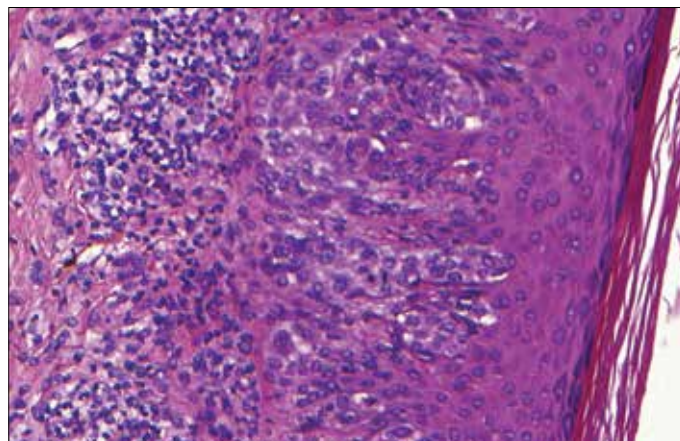
Pro optimální klinický efekt cílené terapie nádorů TRK inhibitory je nutná pečlivá selekce pacientů vhodných k terapii. Jak bylo uvedeno, u většiny malignit se *NTRK* fúze vyskytují jen vzácně a jejich přítomnost není možné predikovat na základě histomorfologie nádoru. Fúze genů *NTRK* je možné detekovat řadou metod, jejich přehled uvádím v tab. 2. Lze využít fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) nebo různé techniky polymerázové řetězové reakce (PCR), NGS na bázi DNA a RNA a imunohistochemické metody s využitím pan-*TRK* protilátky, neboť fúze genů *NTRK* je provázena jejich zvýšenou expresí [18, 19].

Imunohistochemické vyšetření nádorové tkáně slouží jako screeningová metoda, která je rychlá, relativně levná a dostupná, ale nespecifická. Imunohistochemie (IHC) s využitím koktejlů monoklonálních pan-*TRK* protilátek je zástupným markerem *NTRK* fúzí, ale interpretace IHC reakce je zatížena řadou problémů [18, 19]. Falešně negativní IHC může být důsledkem narušení antigenity tkáně v preanalytické fázi a podle jedné recentní studie až 45 % tumorů s *NTRK* fúzí vykazovalo IHC negativní profil [19]. Naopak pan-*TRK* imunohistochemicky pozitivní nádory (obr. 1, 2) ne vždy skutečně obsahují fúzní transkript, proto musí být před zahájením léčby TRK inhibitory přítomnost genové fúze potvrzována některou molekulárněgenetickou metodou (tab. 2), nejlépe metodou NGS (obr. 3).

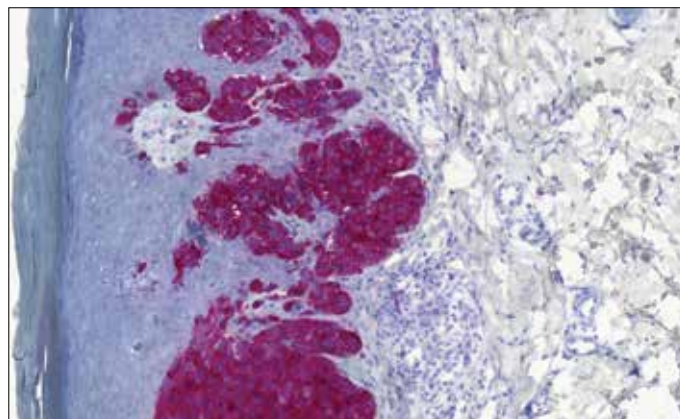
Na základě dat z několika klinických studií (Studie 1, SCOUT a NAVIGATE) dostal larotrectinib v listopadu 2018 jako první *TRK* inhibitor FDA schválení v USA, a to k léčbě nádorů s fúzí genu *NTRK*, a brzy poté bylo schváleno i jeho užívání v rámci EMA. Larotrectinib demonstroval v předložených studiích robustní protinádorovou aktivitu, která byla prokázána bez ohledu na typ nádoru a věk léčeného pacienta. U pacientů se solidními nádory všech histologických typů je proto v průběhu rozhodování o léčebných možnostech doporučeno provést zhodnocení genomického profilu metodou, která je schopna specificky identifikovat fúze genů *NTRK*. Vhodnost testování fúze *NTRK* se liší podle typu nádoru. Standardní léčbou kurabilní nádory nevyžadují testování *NTRK* fúze, ta je naopak vhodná po selhání standardní léčby, při vysokém riziku toxicity a při komorbiditách. Testování je možné zvážit i před chirurgickou intervencí (neoadjuvantní léčba).

Diskutabilní je také volba metody detekce *NTRK* fúzních malignit. Testování genových fúzí *NTRK* představuje pro mnoho patologů složitou oblast, jelikož bývá postižena široká škála tkání, jedná se o fúze s nízkou celkovou prevalencí a variabilita fúzních partnerů je široká. Odpovídající testování je navíc pro precizní medicínu klíčovým faktorem. Při zvážení výhod a nevýhod výše zmíněných metod detekce *NTRK* fúzních malignit převažuje v současnosti

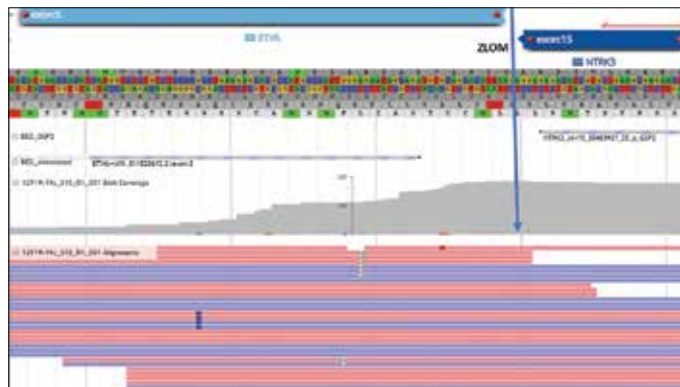
Obrázek 1 Maligní melanom kůže u 30leté ženy s *SQSTM1-NTRK2* fúzí (hematoxylin a eozin).



Obrázek 2 Maligní melanom kůže u 30leté ženy s *SQSTM1-NTRK2* fúzí. Pozitivní imunohistochemická reakce na průkaz pan-*TRK* (Trk (pan), clone A7H6R, 1:25, Cell Signaling).



Obrázek 3 Vizualizace nálezu fúzního transkriptu *ETV6-NTRK3* metodou Archer Dx. Horní část: schematické znázornění místa zlomu a následné fúze; dolní část: kvantitativní zhodnocení pročtení zlomu, tzv. hloubka sekvenace.



příklon k vysoce senzitivní a specifické metodě masivního paralelního sekvenování (NGS). Pro optimální výsledky je nezbytná spolupráce mezi onkology a patologi.

Literatura na www.actamedicinae.cz/literatura

- 1 Pulciani, S. – Santos, E. – Lauver, A. V., et al.: Oncogenes in solid human tumours. *Nature*, 1982, 300, s. 539–542.
- 2 Amatu, A. – Sartore-Bianchi, A. – Siena, S.: NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open*, 2016, 1, s. e000023.
- 3 Drlon, A. – Laetsch, W. T. – Kummar, S., et al.: Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. *NEJM*, 2018, 378, s. 731–739.
- 4 Scott, L. J.: Larotrectinib: first global approval. *Drugs*, 2019, 79, s. 201–206.
- 5 Kummar, S. – Lassen, U. N.: TRK inhibition: a new tumor-agnostic treatment strategy. *Targeted Oncology*, 2018, 13, s. 545–556.
- 6 Skálová, A. – Vaněček, T. – Šíma, R., et al.: Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the ETV6-NTRK3 fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity. *Am J Surg Pathol*, 2010, 34, s. 599–608.
- 7 Church, A. J. – Calicchio, M. L. – Nardi, V., et al.: Recurrent EML4-NTRK3 fusions in infantile fibrosarcoma and congenital mesoblastic nephroma suggest a revised testing strategy. *Mod Pathol*, 2018, 31, s. 463–473.
- 8 Leeman-Neill, R. J. – Kelly, L. M. – Liu, P., et al.: ETV6-NTRK3 is a common chromosomal rearrangement in radiation-associated thyroid cancer. *Cancer*, 2014, 120, s. 799–807.
- 9 Prasad, M. L. – Vyas, M. – Horne, M. J., et al.: NTRK fusion oncogenes in pediatric papillary thyroid carcinoma in northeast United States. *Cancer*, 2016, 122, s. 1097–1107.
- 10 Wiesner, T. – He, J. – Yelensky, R., et al.: Kinase fusions are frequent in Spitz tumours and spitzoid melanomas. *Nat Commun*, 2014, 5, s. 3116.
- 11 Kim, J. – Lee, Y. – Cho, H. J., et al.: NTRK1 fusion in glioblastoma multiforme. *PLoS One*, 2014, 9, s. e91940.
- 12 Shi, E. – Chmielecki, J. – Tang, C. M., et al.: FGFR1 and NTRK3 actionable alterations in „Wild-Type“ gastrointestinal stromal tumors. *J Transl Med*, 2016, 14, s. 339.
- 13 Chiang, S. – Cotzia, P. – Hyman, D. M., et al.: NTRK fusions define a novel uterine sarcoma subtype with features of fibrosarcoma. *Am J Surg Pathol*, 2018, 42, s. 791–798.
- 14 Michal, M. – Hájková, V. – Skálová, A., et al.: STRN-NTRK3-rearranged mesenchymal tumor of the uterus: expanding the morphologic spectrum of tumors with NTRK fusions. *Am J Surg Pathol*, 2019, 43, s. 1152–1154.
- 15 Suurmeijer, A. J. – Dickson, B. C. – Swanson, D., et al.: The histologic spectrum of soft tissue spindle cell tumors with NTRK3 gene rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019, 58, s. 739–746.
- 16 Yamazaki, F. – Nakatani, F. – Asano, N., et al.: Novel NTRK3 fusions in fibrosarcomas of adults. *Am J Surg Pathol*, 2019, 43, s. 523–530.
- 17 Lasota, J. – Chlopek, M. – Lamoureaux, J., et al.: Colonic adenocarcinomas harboring NTRK fusion genes: a clinicopathologic and molecular genetic study of 16 cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol*, 2020, 44, s. 163–173.
- 18 Solomon, J. P. – Linkov, I. – Rosado, A., et al.: NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol*, 2020, 33, s. 38–46.
- 19 Gatalica, Z. – Xiu, J. – Swensen, J., et al.: Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol*, 2019, 32, s. 147–153.