

Stadium-IV-NSCLC: Welche molekularen Tests sollen durchgeführt werden?

Herausforderungen der prädiktiven molekularen Diagnostik

Die systemische Therapie des metastasierten nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) hat sich in den letzten Jahren durch die Einführung von zielgerichteten Medikamenten und Immuntherapien rasant verändert. Diese rasche Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten erfordert eine entsprechende Anpassung der diagnostischen Vorgehensweisen, um histologisch und molekular definierte Patientensubgruppen zuverlässig zu identifizieren und adäquat zu behandeln.

KIRSTEN D. MERTZ¹, SPASENIJA SAVIC PRINCE², LUKAS BUBENDORF²

SZO 2018; 1: 6-10.



Kirsten D. Mertz



Spasenija Savic Prince



Lukas Bubendorf

Dieser Artikel gibt einen Überblick über die aktuellen Entwicklungen und Herausforderungen der prädiktiven molekularen Diagnostik beim fortgeschrittenen NSCLC.

Patienten mit metastasiertem NSCLC haben heute dank zielgerichteter Medikamente und Immuntherapien, welche kürzlich zur Behandlung des NSCLC zugelassen wurden, deutlich bessere Aussichten auf ein längeres Gesamtüberleben als noch vor wenigen Jahren. Eine grosse Herausforderung angesichts des zunehmenden Wissens um therapierelevante molekulare Veränderungen im NSCLC ist die Entwicklung einer qualitativ hochwertigen und umfassenden molekularen prädiktiven Diagnostik, die schnell und präzise alle relevanten Veränderungen auch in kleinsten Tumorproben erfasst. Im Folgenden soll die komplementäre molekulare Diagnostik für einige dieser neuen Therapien erläutert werden.

Nach wie vor sind der histologische Tumortyp und prädiktive molekulare Veränderungen, aber auch der immunhistochemisch ermittelte PD-L1-Status entscheidend für die Wahl der Therapie (1). In naher

Zukunft wird es zu einer weiteren Zunahme von zugelassenen Substanzen und neuen Therapiekombinationen kommen, was eine immer detailliertere molekulare Zusatzdiagnostik notwendig machen wird.

Subtypisierung und Management von Tumorproben für prädiktive Markeranalysen

Für die prädiktive molekulare Testung eignen sich Operationspräparate (Resektate), Biopsien und Zytologien mit quantitativ und qualitativ ausreichendem Tumormaterial, abhängig von der analytischen Sensitivität des gewählten Analyseverfahrens. Bei der diagnostischen Aufarbeitung sollte so sparsam wie möglich mit den Proben umgegangen werden, um ein Maximum an molekularer Diagnostik zu ermöglichen, zumal sich die meisten Lungenkarzinompatienten erst in einem fortgeschrittenen Stadium präsentieren und meist nur kleine Biopsien und/oder Zytologien zur Verfügung stehen. Dies erfordert ein adäquates Management des vorhandenen Tumormaterials in der Pathologie.

Die histologische Typisierung eines Lungenkarzinoms ist der erste Schritt und beeinflusst das therapeutische Prozedere und die weitere molekulare Diagnostik (2). Wenn eine eindeutige histo- respektive zytomorphologische Einteilung eines NSCLC nicht möglich ist, können immunhistochemische Zusatzuntersuchungen die Typisierung ermöglichen. Allerdings sollte die Immunhistochemie nicht unnötig eingesetzt und damit wertvolles Tumorgewebe ver-

ABSTRACT

NSCLC: What kind of molecular diagnostics is required?

Systemic therapy of advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC) has changed rapidly within the last years, mainly due to the introduction of targeted therapies and immunotherapeutics. These novel therapeutic options require adequate high-quality companion diagnostics to reliably identify histologically and molecularly defined patient subgroups that can be targeted by the appropriate treatments. This article gives an overview of current developments and challenges in predictive molecular diagnosis of NSCLC.

Keywords: Non-small cell lung cancer, predictive molecular testing, personalized therapy, immunotherapy, PD-L1.

¹ Institut für Pathologie Liestal, Kantonsspital Baselland.

² Institut für Medizinische Genetik und Pathologie, Universitätsspital Basel.

schwendet werden, das später dringend für molekulare Zusatzuntersuchungen benötigt wird. Empfohlen wird, alle fortgeschrittenen nicht-plattenepithelialen NSCLC, unabhängig von Herkunft und Raucherstatus, einer umfassenden molekularen prädiktiven Testung, insbesondere einer genetischen Subtypisierung mittels Gensequenzierung, zuzuführen (Abbildung, <http://sgpath.ch/qualitaets-sicherung/>). Genauso sollten Plattenepithelkarzinome bei jungen Patienten und Nichtrauchern molekular getestet werden. Diese Tests sind eine Voraussetzung für zielgerichtete Therapieansätze. Zusätzlich sollte bei allen NSCLC unabhängig vom histologischen Subtyp der immunhistochemische PD-L1-Status wegen der Möglichkeit einer gegen PD1/PD-L1 gerichteten Immuntherapie untersucht werden.

Analyse prädiktiver onkogener Treibermutationen mittels Gensequenzierungen

Der Nachweis von sogenannten onkogenen Treibermutationen eröffnet die Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie und wurde durch die Etablierung neuer, hochempfindlicher diagnostischer Verfahren in der Routinediagnostik wie beispielsweise das Next-Generation-Sequencing (NGS) deutlich vereinfacht. Für den Nachweis von Genmutationen ist jedes validierte Sequenzierungsverfahren mit ausreichender Sensitivität und einer Turn-Around-Zeit von maximal 10 Arbeitstagen akzeptabel. Der Einsatz von NGS in Kombination mit prädiktiven Gen-Panels bietet den Vorteil einer besonders hohen Sensitivität und die Möglichkeit, eine grosse Anzahl von Genen gleichzeitig zu untersuchen. Daher ist NGS gegenüber konventionellen Verfahren prinzipiell sowohl kostengünstiger als auch schneller und zumindest an grossen Zentren mit einem hohen Durchsatz von Proben für eine umfassende molekulare Analyse zu bevorzugen. Mittels eines NGS-basierten Multiplex-Verfahrens werden sämtliche therapie-relevanten genomischen Veränderungen auch in kleinsten Tumorproben zuverlässig detektiert. Die Analyse prädiktiver molekularer Marker sollte bei fortgeschrittenen nicht-plattenepithelialen NSCLC eine Untersuchung der EGFR- (Exone 18–21), BRAF- (p.V600E), ALK- und ROS1-Gene umfassen, da entsprechende zielgerichtete Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) bei Patienten mit einer EGFR- und BRAF-Mutation beziehungsweise einem ALK- oder ROS1-Rearrangement zugelassen sind (Abbildung) (3). Diese Untersuchungen sollten bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorleiden (z.B. maligner Pleuraerguss, Fernmetastase) möglichst rasch erfolgen, um den Beginn einer adäquaten Therapie nicht zu verzögern («Reflex Testing»). Etwa 3–5% aller NSCLC weisen ein ALK-Gen- und etwa 1–2% ein ROS1-Gen-Rearrangement auf. Diese Rearrangements führen zu einer pathologischen

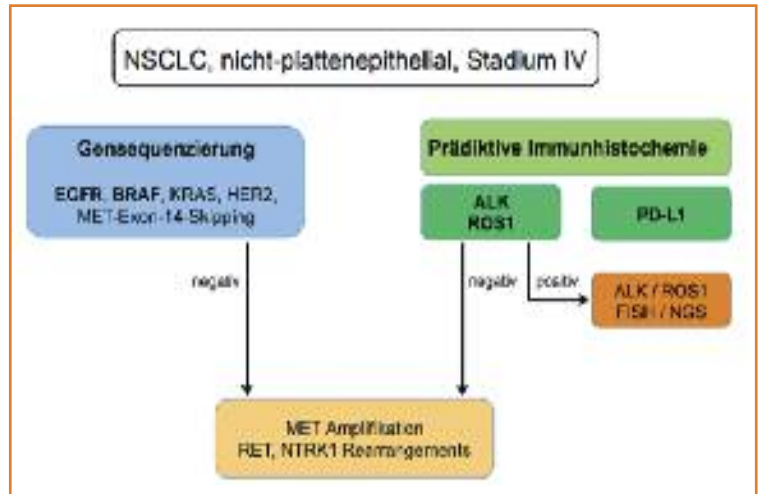


Abbildung: Algorithmus zur Bestimmung der prädiktiven Marker beim nicht-plattenepithelialen NSCLC im Stadium IV, empfohlen von der Schweizerischen Arbeitsgruppe für Lungenpathologie (Swiss Lung Pathology Group, <http://sgpath.ch/qualitaets-sicherung/>). **Fett Gedrucktes: obligatorisch**

ALK- respektive ROS1-Genfusion mit Expression eines entsprechend pathologischen Fusionsproteins mit konstitutioneller Tyrosinkinase-Aktivierung. Gegen ALK und ROS1 richtet sich der orale TKI Crizotinib, der kompetitiv die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase-Domäne dieser beiden Proteine inhibiert und damit deren Kinasefunktion unterbindet, die für das Wachstum von Tumorzellen entscheidende Impulse gibt (4). Da ALK und ROS1 physiologischerweise nicht exprimiert werden, kann die immunhistochemische Detektion einer ALK- respektive ROS1-Expression als Surrogatmarker für ein zugrunde liegendes Rearrangement genutzt werden. Die ALK-Immunhistochemie ist als verlässliche und kostengünstige Methode in der Schweiz mittlerweile flächendeckend etabliert. Eine fehlende ALK-Expression schliesst ein ALK-Rearrangement praktisch aus, während eine eindeutige immunhistochemische ALK-Expression mit einem ALK-Rearrangement gleichgesetzt werden kann. Die Bestätigung eines positiven immunhistochemischen Resultats mittels FISH, NGS oder RT-PCR wird aber empfohlen. Unklare immunhistochemische ALK-Färbungen müssen unbedingt mit einer dieser alternativen molekularen Methoden abgeklärt werden. Die ROS1-Immunhistochemie ist dagegen weniger spezifisch. Darum sollte eine immunhistochemisch nachgewiesene ROS1-Expression zwingend mit einer anderen molekularen Methode (FISH, NGS) bestätigt werden (5).

Aktuelle Liste molekularer Marker

Eine umfassendere molekulare Analyse mittels NGS schliesst weiterhin Mutationen in den Genen KRAS, PIK3CA, HER2, p53, MET und DDR2, Translokationen in RET und NTRK1 sowie Amplifikationen in HER2,

MET und FGFR1 ein. Die Liste der untersuchten molekularen Veränderungen wird aufgrund aktueller Forschungsergebnisse ständig erweitert. Die häufigsten Treibermutationen in NSCLC vom nicht-plattenepithelialen Typ sind KRAS-Mutationen (30%). Da allerdings KRAS keinen therapeutischen Angriffspunkt darstellt und gegen KRAS gerichtete Medikamente in klinischen Studien erfolglos getestet wurden, führt der Nachweis einer KRAS-Mutation nicht direkt zu einer therapeutischen Option für den Patienten. Da sich aber onkogene Treibermutationen gegenseitig ausschließen, kann bei Anwendung eines sequenziellen Testalgorithmus bei Nachweis einer KRAS-Mutation auf weitere Gensequenzierungen und FISH-Untersuchungen zum Nachweis von ALK-, ROS1-, RET-Rearrangements und MET-Amplifikationen verzichtet werden, nicht jedoch auf die Bestimmung des PD-L1-Status, da KRAS-mutierte Karzinome PD-L1 exprimieren und auf eine Immuntherapie ansprechen können.

Andere Genveränderungen sind beim NSCLC selten, jedoch sehr gut beschrieben und charakterisiert. Zielgerichtete Medikamente gegen HER2, MET und RET sind zwar zurzeit in der Schweiz für fortgeschrittene NSCLC noch nicht zugelassen, jedoch teilweise im Rahmen von klinischen Studien erhältlich. Daher wird empfohlen, im Rahmen der molekularen Gensequenzierungen auch eine Untersuchung auf HER2 und MET-Exon-14-Skipping-Mutationen, MET-Amplifikationen und RET-Rearrangements durchzuführen.

Eine MET-Mutation mit Verlust von Exon 14 (MET-Exon-14-skipping-Mutation) oder eine MET-Amplifikation kann zu einer Aktivierung der MET-Rezeptor-Tyrosinkinase mit Überexpression auf Proteinebene führen. Eine Überexpression des MET-Proteins kann in der Routinediagnostik mittels Immunhistochemie einfach und schnell bestimmt werden. Der zugrunde liegende Mechanismus sollte weiter durch eine FISH-Untersuchung, RT-PCR oder NGS abgeklärt werden, da nur Patienten mit einer MET-Amplifikation oder einer MET-Exon-14-Skipping-Mutation gut auf eine Therapie mit TKI wie Crizotinib oder Carbozantinib ansprechen (6, 7). Da Veränderungen des MET-Gens sowohl in unbehandelten Patienten als auch bei Patienten mit einer Resistenzentwicklung unter zielgerichteter Therapie auftreten, gewinnt die Testung des MET-Gens in der Primärdiagnostik, aber auch in der resistenzbasierten Diagnostik als prädiktiver Biomarker zunehmend an Bedeutung.

Immunhistochemische PD-L1-Testung

Die Einführung und zunehmende Verbreitung der Immuntherapie stellt die molekulare Diagnostik des NSCLC vor neue Herausforderungen. Fortgeschrittene NSCLC mit einer immunhistochemischen PD-L1-Expression in mindestens 50% der Tumorzellen,

doch ohne EGFR-Mutation, ALK- oder ROS1-Rearrangement qualifizieren für eine Erstlinientherapie mit dem Immuncheckpoint-Inhibitor Pembrolizumab (8). Daher muss der PD-L1-Status in allen fortgeschrittenen NSCLC unabhängig vom histologischen Tumortyp zwingend immunhistochemisch bestimmt werden. Es wird empfohlen, die PD-L1-Bestimmung bei Diagnosestellung mit validierten Immunhistochemie-Protokollen und Antikörpern durchzuführen (*Abbildung*). Im Falle von laborintern entwickelten Protokollen mit konzentrierten Anti-PD-L1-Antikörpern («laboratory developed test») ist eine rigorose Validierung und Qualitätskontrolle erforderlich.

Obwohl eine immunhistochemische Färbung von PD-L1 in einem Routinelabor auch an kleinen Biopsien und Zytologien relativ unkompliziert durchzuführen ist, sind bei der Auswertung der PD-L1-Färbung verschiedene Punkte zu beachten. Unter den diversen kommerziell verfügbaren PD-L1-Antikörpern werden vor allem die Antikörperklone SP263 (Ventana) oder 22C3 (Dako) empfohlen (9). Bei der Auswertung der Tumorzellen ist membranäre (zirkulär oder partiell) PD-L1-Expression unabhängig von der Färbintensität in % der Tumorzellen anzugeben. Bei dem Checkpoint-Inhibitor Atezolizumab, der für die Zweitlinientherapie zugelassen ist, wird bei der fakultativen immunhistochemischen PD-L1-Testung auch der Anteil PD-L1-exprimierender tumorassoziierter Immunzellen (ebenfalls in %) berücksichtigt. Für eine adäquate Auswertung der immunhistochemischen PD-L1-Färbung müssen mindestens 100 vitale Tumorzellen vorhanden sein. Wegen dieser Besonderheiten sollte die PD-L1-Auswertung nur von erfahrenen Pathologen vorgenommen werden. Erste Pilotdaten und eigene Beobachtungen zeigen, dass der PD-L1-Status bei ausreichender Validierung und Qualitätskontrolle auch an zytologischen Ausstrichen bestimmt werden kann. Eine Beurteilung der tumorassozierten Immunzellen ist am zytologischen Material jedoch nicht möglich.

Suche nach neuen prädiktiven Biomarkern über «hohe Mutationslast»

Die Suche nach neuen zuverlässigen prädiktiven Biomarkern sollte mit den neuen therapeutischen Ansätzen beim NSCLC Schritt halten. Als besonders vielversprechend hierfür kristallisiert sich die Analyse der Mutationslast («mutational burden») heraus (10). Lungenkarzinome sind in der Regel durch eine hohe Anzahl von Genmutationen («mutational load») gekennzeichnet, was insbesondere für Patienten mit ausgeprägtem Nikotinabusus gilt (11). Patienten mit hoher Mutationslast scheinen besser auf eine Immuntherapie anzusprechen, und die Mutationslast könnte eine zuverlässigere Prädiktion für das Ansprechen auf Immuntherapeutika erlauben als die Expression von PD-L1 (12). Ausserdem wurde die Im-

muntherapie mit einem Checkpoint-Inhibitor auch für Patienten mit malignen Tumoren mit einer Mikrosatelliteninstabilität zugelassen. Solche Tumoren weisen wegen eines gestörten DNA-Reparaturmechanismus eine hohe Anzahl an Mutationen auf (13).

Molekulare Diagnostik in der Resistenzsituation inklusive «Liquid Biopsy»

Derzeit ist ein EGFR-TKI der 3. Generation (Osimertinib) zur Behandlung von EGFR-mutierten Lungenkarzinomen zugelassen, welche aufgrund einer sekundären p.T790M-Mutation eine Resistenz auf den TKI der 1. Generation entwickeln (14). Deshalb müssen alle EGFR-mutierten NSCLC, welche eine sekundäre Resistenz auf die initiale EGFR-TKI-Therapie entwickeln, molekular re-analysiert werden, insbesondere mit der Frage nach der sekundären EGFR-Resistenzmutation (p.T790M). Heutzutage kann diese molekulare Zusatzuntersuchung schnell und sehr zuverlässig an zirkulierender Tumor-DNA aus dem Blutplasma (sogenannte Flüssigbiopsie oder «Liquid Biopsy») durchgeführt werden. Allerdings liegt die Sensitivität dieser Methode nur bei zirka 60–70%, sodass bei fehlendem Nachweis einer EGFR-Resistenzmutation eine Re-Biopsie beziehungsweise Gewinnung von zytologischem Material aus einem progressiven Tumorherd angestrebt werden muss. Ausserdem wird bei fehlendem Nachweis einer p.T790M-Mutation eine Analyse des MET und des HER2-Amplifikationsstatus (mittels FISH oder NGS) empfohlen, da eine Amplifikation in diesen genomischen Regionen weitere sekundäre und potenziell therapeutisch relevante Resistenzmechanismen unter Behandlung mit den EGFR-TKI darstellen.

Ausblick

Die Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren hat die Therapie des NSCLC erheblich verändert. In naher Zukunft sind eine weitere Zunahme von zugelassenen immunmodulatorischen Substanzen und unterschiedliche Therapiekombinationen zu erwarten. Dies wird auch die Anforderungen an die komplementäre molekulare Diagnostik des NSCLC verändern.

Die molekulare Testung wird zukünftig in der klinischen Routine einen noch grösseren Stellenwert einnehmen. Zudem wird es in der Schweiz flächendeckend zu einer immer breiteren Testung verschiedener molekularer Marker und zur Anwendung hochsensitiver Testverfahren wie NGS kommen. Neue prädiktive Marker wie PD-L1-Expression und möglicherweise auch die Mutationslast werden in Zukunft

für die Selektion von Immuntherapeutika für geeignete Patienten entscheidend sein. Dies wird zu neuen Herausforderungen in der klinischen Interpretation und Translation der Befunde führen. Die interdisziplinäre Zusammenarbeit, insbesondere auch in Form von «molekularen Tumorboards», wird helfen, mit diesen Veränderungen Schritt zu halten. ■

PD Dr. med. Kirsten D. Mertz
(Erstautorin)
Institut für Pathologie Liestal
Kantonsspital Baselland
4410 Liestal

PD Dr. med. Spasenija Savic Prince
und
Prof. Dr. med. Lukas Bubendorf
(Korrespondenzadresse)
Institut für Medizinische Genetik und Pathologie
Universitätsspital Basel
4031 Basel
E-Mail: Lukas.Bubendorf@usb.ch

Interessenkonflikte: keine.

Quellen:

1. Savic Prince S: Molecular diagnostics in NSCLC. *Schweizer Zeitschrift für Onkologie* 2015; 4: 6–10.
2. Hiley CT, Le Quesne J, Santis G, Sharpe R, de Castro DG, et al.: 2016. Challenges in molecular testing in non-small-cell lung cancer patients with advanced disease. *Lancet* 2016; 388: 1002–1011.
3. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, et al.: Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2013; 8: 823–859.
4. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, et al.: Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371: 1963–1971.
5. Bubendorf L, Buttner R, Al-Dayel F, Dietel M, Elmberger G, et al.: Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2016; 469: 489–503.
6. Bubendorf L, Dafni U, Schobel M, Finn SP, Tischler V, et al.: Prevalence and clinical association of MET gene overexpression and amplification in patients with NSCLC: Results from the European Thoracic Oncology Platform (ETOP) Lungscope project. *Lung Cancer* 2017; 111: 143–149.
7. Drlon A, Cappuzzo F, Ou SI, Camidge DR: Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET? *J Thorac Oncol* 2017; 12: 15–26.
8. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csomos T, et al.: Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016; 375: 1823–1833.
9. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, et al.: PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol* 2017; 12: 208–222.
10. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, et al.: Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015; 348: 124–128.
11. Leigh NB, Rekhtman N, Biermann WA, Huang J, Mino-Kenudson M, et al.: Molecular testing for selection of patients with lung cancer for epidermal growth factor receptor and anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitors: ASCO endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the study of lung cancer/association for molecular pathology guideline. *J Clin Oncol* 2014; 32: 3673–3679.
12. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R, et al.: Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* 2016; 351: 1463–1469.
13. Khagi Y, Kurzrock R, Patel SP: Next generation predictive biomarkers for immune checkpoint inhibition. *Cancer Metastasis Rev* 2017; 36: 179–190.
14. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, Kim HR, et al.: Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017; 376: 629–640.