

Válasz prof.dr. Kopper László bírálatára

Tisztelettel köszönöm Kopper László Professzor Úrnak az igen alapos, részletekbe menő bírálatát és a nyilvános vitára bocsátást támogató nyilatkozatot.

Válaszok a bíráló kérdéseire:

Nem említi a jelenleg a klinikumban alkalmazott tumormarkereket (pl.CEA, PSA, CA125) és azt a markerekkel kapcsolatos gondot, hogy szenzitivitásuk és specificitásuk alacsony - gondolja a jelölt, hogy az általa talált markerek ettől mentesek?

A dolgozat formai korlátai nem tették lehetővé, hogy a tumorok követésére és felderítésére is alkalmazott valamennyi tumormarkert részletesen bemutassuk. A bevezetőben ezért csak a vizsgálatok szempontjából releváns kettő biomarkert (a HER2 és az ösztrogén receptort) tárgyaltuk részletesen. Az általunk azonosított új markerek sem érik el a 100%-os szenzitivitást és specificitást. A tumorok heterogenitása miatt ezt csak több marker kombinációjával és egyidejű vizsgálatával lehet a jövőben javítani.

A tamoxifen meghatározásával kapcsolatban említi az IHC-t és a microarrayt (utóbbi mellett foglal állást) - megbecsülné a költség/hatékonyságot a két módszer esetében?

Amennyiben a gén chipeket csak az ösztrogén receptor meghatározására használnánk, akkor a költség/hatékonyság terén az IHC messze hatékonyabb lenne. Azonban a dolgozat alapfeltevése, hogy egy gén-chip alapú többgénos tesztet végzünk, amellyel egyidejűleg tudjuk az ösztrogén receptor státuszt is meghatározni. A gén chipek felépítése miatt a mért gének számának növelése a költségeket semennyivel sem növeli (kb. 20 ezer gén méréséig), ezért egy ilyen esetben már microarray-ok vezetnek a költség/hatékonyság terén.

„a klinikumban csak negatív biomarkerekkel találkozunk” a jelölt szerint – ezt gondolja pl. a tüdőrák esetében a mutáns EGFR1-ről vagy az ALK-ról? Ezek ugyanis pozitívan utalnak a kiválasztandó terápiás szerekre. ... Ha a „HER2 pozitivitás mértéke egyenesen arányos a trastuzumab kezelésre várható válasz mértékével” – akkor a HER2 miért negatív biomarker?

Az dolgozatban használt beosztás alapja, hogy egy biomarker két különböző csoportot tud azonosítani: vagy azokat a betegeket mutatja meg, akik reagálni fognak a terápiára („pozitív biomarker”), vagy azokat a betegeket, mutatja meg, akik nem fognak reagálni („negatív biomarker”). A bíráló által említett három gén (HER2, ALK, EGFR) esetén alapvetően igaz, hogy a negatív betegek nem reagálnak. Ez kiegészül azzal, hogy:

- A HER2 ellenes trastuzumab kezelésre az objektív válasz a HER2 pozitív betegeken belül 50%-os (Ref: Brufsky, Am J Clin Oncol, 2010).
- Az ALK kinázra hat a crizotinib, amelyet az amerikai FDA ALK expresszázó NSCLC kezelésére hagyott jóvá. Az ennek alapjául szolgáló két vizsgálatban az ALK pozitív betegek 50% és 61%-a reagált a gyógyszerre (Ref: Malik, Clin Cancer Res, 2014).
- Az EGFR inhibitor erlotinibet NSCLC és hasnyálmirigyrák kezelésére hagyta jóvá az FDA, az EGFR pozitív tumorok 65%-a válaszolt a kezelésre (Ref: Rossell, Lancet, 2012).

Ki kell emelni, hogy az onkológiában alkalmazott gyógyszerek között ezek kimagaslóan jó eredmények, azonban a pozitív betegek nagyon nagy aránya továbbra sem mutat a kezelésre választ. Tehát egyik szer esetén sem mondhatjuk, hogy a gén által kiválasztott betegcsoport benne van a kezelésre reagáló betegek egy egyébként tágabb csoportjában - ebben az esetben beszélhetnénk ugyanis egy valódi „pozitív biomarkerről”.

Ugyanaz a molekuláris hiba különböző tumorokban támogathatja a célzott terápiát, vannak ez alól kivételek is (nem is kevés). Jelölt ezeket kivételként értékeli?

Annak ellenére sem mondanám, hogy ezek feltétlenül „kivételek”, hogy a jelenlegi tudásunk alapján annak tűnnek. Egy példával illusztrálva: amikor eredetileg a KRAS-t független prognosztikai tényezőként azonosították (Ref: Andreyec, JNCI, 1998), akkor számtalan vizsgálat indult, amelyekben azonban ezt nem sikerült igazolni (Ref: Samowitz, Can Epidemiol Biomarkers Prev 2000; Ince, JNCI, 2005; Ogino, Gut, 2008). Később, amikor egyes terápiákhoz viszonyították, akkor igazolást nyert, hogy a KRAS mégis egy klinikailag is használható biomarker – csak nem prognosztikai hanem prediktív előrejelzőként (Ref: Karapetis, NEJM, 2008; Bokemeyer, JCO, 2008; Tejpar, JCO, 2008; Van Cutsem, JCO, 2008; Van Cutsem, NEJM, 2009; Amado, JCO, 2008). Lényegében tehát a későbbi tudásunk alapján, egy másik kérdésben, vagy másik gyógyszerrel kombinációban lehet, hogy ezek a molekuláris hibák is segíteni fognak a helyes célzott terápia megválasztásában.

A tamoxifen és a trastuzumab csak a részletes tárgyalás miatt maradtak ki a szisztémás terápiával szembeni rezisztencia tárgyalása során.

Ha egyszer a minták heterogének, akkor hogy lehet a különböző sejtvonalakat összehasonlítani?

Az általunk végzett vizsgálatok során szinte mindig több különböző sejtvonalat használtunk. Abból a feltevésből indultunk ki, hogy a sejtvonalak közötti különbségek mellett egy-egy hasonló tulajdonság (pld adott gyógyszerrel szemben létrehozott rezisztencia) alapján hasonlítani fognak

egymásra és így segíthetnek az adott tulajdonság molekuláris jellemzőinek felderítésében.

Ezen túlmenően ki kell emelnem, hogy a rezisztencia párhuzamos modellezése során pontosan ez is volt a célunk. A klinikailag heterogén mintákban egy adott szerrel szembeni rezisztencia különböző molekuláris mechanizmusokkal jöhet létre. Amennyiben több nagyon hasonló, párhuzamosan kezelt sejtvonalat tanulmányozunk, akkor az ezek közötti eltérés már azt is lehetővé teheti, hogy a valós betegekben egymástól függetlenül kialakuló rezisztencia-mechanizmusok közül többet is egyszerre azonosítani tudjunk.

Külön kérdés, amit jó lenne modellezni, hogy a rezisztencia kialakulása után nem egyszer ugyanazzal a szerrel kezelnek, sokszor sikeresen.

A tumorok progressziója során a klonális evolúció azt is eredményezi, hogy miközben lesznek lassan osztódó, egy adott szerrel szemben rezisztens klónok, eközben ezek mellett kialakulhatnak gyorsan osztódó további al-vonalak is. Mivel ezek szaporodása meghaladhatja a rezisztens klónt, ezért a tumor nagy tömegét adhatják és a terápiára való érzékenységük folytán a kezelés újból eredményes lehet.

Mit ért tumortípustól független biomarker alatt? Ez a klinikumban alig képzelhető el. Alkalmasként ezek azonosítására az in vitro rendszerek?

Itt utalnék a fentebb már említett, az EGFR-en ható erlotinibre, amelyet NSCLC mellett hasnyálmirigyrák esetében is jóváhagytak (illetve jelenleg még további más tumortípusok esetén is klinikai vizsgálat alatt van), tehát az EGFR ebben az esetben a tumor típusától független.

Azzal egyetértek, hogy tisztább a megfogalmazás, ha a „tumor típusa” helyett a tumor „szöveti/anatómiai eredetétől” független biomarkerről beszélünk.

A rezisztenciagének előrejelzésénél fontos említeni az EGFR1 rezisztenciagént, amit már elég jól ismerünk, és tipikus példáját kínálja annak, hogy ezt a gént próbálják gátolni. Ez belefér a koncepcióba?

Ez pontosan így van, azonban az általunk vizsgált modellekben az EGFR nem volt a legjobb gének között, ezért ezt a gént nem vizsgáltuk részletesen.

Az előrejelzés nehézségét a kombinációk jelentik. Jelölt számos módszer közül ennek megközelítésére melyik alkalmas?

Az első jelentős, az Oncogene-ben megjelent közleményünkben abban a szerencsés helyzetben voltunk, hogy valamennyi beteg monoterápiás kezelést kapott, ezek 2000 előtt Norvégiában operált betegek voltak. Ez ma már szinte teljesen elképzelhetetlen. Az általunk használt módszerek elviekben a kombinációkkal szembeni rezisztencia azonosítását is lehetővé teszik, azonban ehhez jóval több betegminta szükséges, mint amennyi jelenleg rendelkezésünkre áll. A jövőben nagyobb mintaszámú vizsgálatok lehetővé tehetik, hogy a betegeket az egyes kezelési kombinációk szerint további alcsoportokba osszuk, ami ezen csoportok vizsgálatának az alapját adhatja.

A jelölt szerint az OncotypeDx-szel sem független, sem reprodukálható vizsgálat nem történt. Tudomásom szerint a klinikai reprodukálhatóság 95% körüli, az eladott tesztek a félmilliót közelítik.

A teszt során az RT-PCR méréseket az USA-ban fizikálisan egy helyen végzik el. Ez azt jelenti, hogy valamennyi mérést ugyanazok az emberek végzik. További zavaró tényező, hogy a megrendelőnek nem csak a méréshez szükséges egyetlen mintát, de pld további metszeteket is be kell küldenie – ezek alapján egy magasan képzett patológus már egyedül is jó hatékonysággal meg tudja a klinikai kérdést válaszolni.

Eközben az egyes gének meghatározására az OncotypeDX teljesen alkalmatlan. Összesen 784 beteg vizsgálata során az IHC/FISH módszerrel HER2 pozitívnak mért 36 betegből az teszt elfogadhatatlanul keveset, mindössze 10-et talált meg (Ref: Dabbs, JCO, 2011).

Véleményem szerinte egy diagnosztikai teszt csak onnantól megbízható, ha látjuk a nyers eredményeket, amelyeket egy független csoport is reprodukálni tudott. Ennek hiánya az oka annak, hogy az OncotypeDX-et az FDA nem hagyta jóvá. Németországban a teszt befogadását szintén az alacsony megbízhatóság miatt utasították el.

Az, hogy ennek ellenére közel félmillió tesztet eladtak, arra vezethető vissza, hogy a teszt eredményeképpen kevesebb beteg esetében szükséges kemoterápia, amely a biztosítók számára nagyobb költségmegtakarítással jár, mint amibe maga a vizsgálat kerül (Ref: Lyman, Cancer, 2007).

Van arra adat, hogy miért nem kezelnek daganatos betegeket – akik így „negatív” kontrollként szolgálnak?

A „kezeletlen” kifejezés az értekezésben nem arra vonatkozik, hogy a beteg nem részesült kezelésben, csupán azt tartalmazza, hogy a sebészet után nem részesült gyógyszeres kezelésben. A kutatásaink során vizsgált „kezeletlen” minták elsősorban emlőrákos betegek voltak, amely tumor esetében nem minden esetben szükséges kemoterápiát adni. A retrospektíven elvégzett gén-chip vizsgálatokba többször direkt azok a minták kerülnek be, ahol

a betegek nem kaptak szisztémás kezelést, mert ez teszi lehetővé, hogy a tumor „természetes” lefolyását tanulmányozni tudjuk.

A transzkriptom mennyire veszi figyelembe a mikroRNS-eket?

A transzkriptom csak az mRNS-ek mérését tartalmazza. Az általunk használt gén chippek sem mérték a mikroRNS-ek kifejeződését - kivéve egy vizsgálatunkat, ahol azonban csak ezt mértük (Ref: Tchernitsa, J Pathol, 2010).

Miért gondolja a jelölt, hogy független rezisztencia-markerek lennének, amikor a tumorok génexpressziós profilja is igen eltérő – vagy csak ebben egyeznek? Négy tumortípus vizsgálata elegendő a függetlenség kimondásához?

A vizsgálatban (Ref: Györffy, Oncogene, 2005) nem egyszerűen négy különböző tumortípust vizsgáltunk, hanem négy sejtvonal párt. Mindegyik pár egy eredeti (kemoterápiára érzékeny) és egy ebből származó, a kemoterápiára rezisztens vonalat tartalmazott. Statisztikai elemzés során ezeket párba állítottuk, majd azokat a géneket kerestük, amelyek mind a négy párban eltérő expressziót mutattak. Ezzel a megközelítéssel azt akartuk elérni, hogy a tumorok közötti eredendő génexpressziós különbség csak minimálisan befolyásolja a végeredményt. A megközelítés hatásosságát alátámasztja, hogy a mintázat ezután független beteganyagban (amely csak egy tumortípust tartalmazott) is működött.

A microarray rendszer által használt hibridizációs próbák figyelembe veszik-e a ... splicing variánsok pontos kimutatásának szükségességét?

Ma már vannak ilyen microarray rendszerek, azonban mi még nem ilyen gén chipet használtunk, mivel ezek az általunk végzett mérések időpontjában nem álltak rendelkezésre.

Mi biztosítja, hogy ugyanarra a transzkriptomra tervezett oligo-szett és RT-PCR szett minden tumor minden állapotára használható lesz? Hogyan kezelhető az intra- és intertumorális heterogenitás? A human genom array mindenkire alkalmazható?

Az Affymetrix gén chippek (mint technológia) reprodukálhatósága és specifitása áll a mögött, hogy ezt a technológiát az FDA 2011-ben humán diagnosztikai alkalmazásra is jóváhagyta.

Nagy valószínűséggel az egyes alanyokban levő eltérések (pld. SNP-k) miatt a chipen levő egyes próbák alkalmazhatósága nem tökéletes, azonban nem ismerek olyan irodalmi hivatkozást, amely pontosan ezt a kérdést a már kereskedelmi forgalomban árult, FDA által jóváhagyott tesztek esetében megválaszolná (ezek a gén chip alapú MammaPrint és a Nanostring technológiát használó PAM50).

Ezen tesztek fejlesztése alatt az általunk is használt megközelítést alkalmazták: ennek során lényegében két korábbi csoporthoz hasonlítják a beteget. Más szóval a csoportok közötti különbséget használjuk fel arra, hogy az aktuális beteget pld a jó vagy rossz prognózisú csoportba soroljuk. A teszt fejlesztése során alkalmazott tanulóhalmaz nagy mérete teszi lehetővé, hogy az egy csoporton belüli tumorok közötti heterogenitás ellenére is megbízható legyen a végeredmény.

Bár egy mérés alapján az intra-tumor heterogenitás pontosan nem mérhető, azonban a kialakulásának okait már lehet quantifikálni. Erre alkalmasak például a szintén Affymetrix microarray mérést felhasználó, a kromoszómális instabilitást mérő mintázatok (Ref: Carter, Nat Genet, 2006).

Milyen tanácsot tud adni az in vitro rendszer eredményei alapján a gyógyszeriparnak? Segítenek az in vivo driver gének azonosítására?

Amikor egy gén klinikai mintákban összefüggést mutat egy tumoral, annak alapvetően kettő oka lehet. Egyrészt a gén lehet egy oki (driver) gén, amely a tumor létrejöttének vagy progressziójának folyamatában közvetlenül is részt vesz – erre példa az KRAS vagy az ösztrogén receptor; másrészt az is lehet, hogy a gén ugyan nem maga okozza a molekuláris elváltozást, azonban annak eredményeképpen eltérést mutat. Erre tipikus példa a KI67, amely a tumor proliferációjának mértékére enged következtetni. Ezen második csoport is kiválóan alkalmas biomarkernek, azonban a gyógyszeripar számára az első (driver) gének jelentik az igazi célpontot. Azt, hogy a kettő csoport közül egy gén melyikbe kerüljön, csak in vitro vizsgálatok segítségével lehet eldönteni.

A betegek osztályozása a monoterápia (ami igen ritka) előtt történt, vagy retrospektíven? Hogyan magyarázza az ábrán a plató kialakulását?

A doxorubicin monoterápiában részesült betegminták egy retrospektív biobankból származtak – ma már szinte lehetetlen lenne ilyen beteganyagot összeállítani.

A „plató” kialakulása véleményem szerint csak technikai eredetű. Bár öt év után egyik vizsgált csoportban sem volt esemény, azonban már csak 11 beteg volt itt a vizsgálatban és ezek is mind cenzorált értékkel rendelkeztek. Ki kell emelnem, hogy a betegek utánkövetése nem egyszerre kezdődött, hanem időben eltolva, a műtétek időpontjában, azonban magát a cenzorálást a vizsgálat időpontjában el kellett végeznünk. Más szóval nem várhattuk meg, hogy az összes betegben meglegyen a teljes utánkövetés. Emiatt nagy valószínűséggel a vizsgálat lezárása után lehetett még további relapszus a cenzorált betegek között is.

Egy újabb esemény pld 75 hónap után a Kaplan-Meier görbe felépítése miatt (hogy a túlélők proporcionális arányát mutassa) a platófázist teljesen

megszüntetné, miközben a számolt szignifikancia csak minimálisan változna (mivel a teljes grafikon csak elenyésző mértékben változna).

PSMB7... szerepel ez a gén az előzőekben prognosztikai képességekkel kimutatottak között? Ha nem, miért nem? Mi a sejtek „relatív viabilitása”?

A PSMB7 nem szerepelt az első doxorubicin érzékenységgel foglalkozó cikkünkben. Ennek valószínűleg az az oka, hogy két eltérő gén-chip platformot használtunk a két vizsgálat során (az elsőben a Stanfordi Egyetem-en készített chipeket, a másodikban pedig kereskedelmi forgalomban kapható Affymetrix gén chipeket). Különböző platformok egy adott gént különböző dinamikus tartományban, eltérő érzékenységgel és specificitással határoznak meg. Nem ismerek olyan vizsgálatot, ahol a Stanfordi-i és az Affymetrix chipeket közvetlenül egymással hasonlították volna össze.

A relatív viabilitás a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva mutatott sejtviabilitást jelenti. Ennek értéke ezért a kontroll esetében 1 lenne, azonban ezt nem tüntettük fel a grafikonon.

A parallel evolúciós modell érdekes lehetőség a rezisztenciához vezető mechanizmusok azonosítására. Ez a modell is jól illeszkedik a tumortípustól való függetlenségre?

A parallel evolúciós modell során egyetlen tumortípust vizsgáltunk. Amennyiben azt találtuk volna, hogy valamennyi sejtvonal ugyanazzal a mechanizmussal alkalmazkodik a gyógyszeres kezeléshez, akkor ezt meg kellett volna erősítenünk más tumortípusok esetén is. Eredményeink ezzel szemben pont a tumorok heterogenitását emelik ki, ezért véleményem szerint ezek az eredmények más tumortípusokra való vonatkoztatás esetén is megállják a helyüket.

Tudjuk, hogy a sunitinib több támadásponttal rendelkezik. Ezekből mennyire függnék vagy függetlenek a feltételezett rezisztenciagének?

A rezisztenciagének nagy része független volt ezektől. Azonban még az RT-PCR-el validált gének között is találtunk olyat, amelyik a sunitinib célpontjaitól (VEGFR, C-KIT, FLT3, PDGFR) downstream helyezkedik el (pld a RAB17, amelyik a RAS onkogének családjába tartozik). A kutatás során ezen kívül sikerült több olyan gént is igazolnunk, amelyek a vizsgált szerek által modulált jelátviteli útvonalhoz kapcsolódnak (pld ERBB2, TGFA, PDGFA, AKT1). Figyelembe véve, hogy még nem ismerjük a TK gátlószerek valamennyi célpontját (ezt mutatja az úgynevezett off-target hatások feltérképezetlen volta), ezek a pozitív leletek is igazolják, hogy az általunk alkalmazott megközelítés helyes. Az eddig a rezisztenciával kapcsolatba nem hozott, de szignifikánsan

összefüggő gének részletes vizsgálatára lesz szükség a jövőben ahhoz, hogy a gén és a gyógyszer közötti kapcsolatot teljesen felderítsük.

A génexpressziós mintázatokat generáló experimentális és klinikai vizsgálatok reprodukálhatósága alacsony. Vonatkozik ez az előbbieken kimutatott rezisztenciagénekre is?

A klinikai vizsgálatok alacsony reprodukálhatósága mögött nagy valószínűséggel az alacsony mintaszám áll. Az emlőtumor diagnosztikájában alkalmazott MammaPrint-et mindössze 78 betegben (Ref: van't Veer, Nature, 2002), a Genomic Grade Index-et pedig 64 beteg alapján (Ref: Sotiriou, J Natl Cancer Inst, 2006) azonosították. Ezzel szemben mi jóval nagyobb esetszámokkal dolgoztunk, pld a PSMB7 gén prognosztikai szerepét 1592 betegben igazoltuk. Emiatt bízunk abban, hogy az általunk azonosított rezisztenciagének a jövőben is jól reprodukálhatóak lesznek.

A prognosztika mellett, vagy inkább előtt, a prediktív biomarkerek iránt nagy az igény – beleértve a várható rezisztenciát is. Milyen esélyt lát az utóbbiak azonosítására?

A rezisztencia biomarkereinek azonosítását megnehezíti, hogy az utóbbi tíz évben a célzott terápiás szerek rohamos terjedésével az onkológiai kezelés teljesen átalakulni látszik. Azonban klinikailag a várható választ előrejelző (mind pozitív mind negatív) biomarkerek szerepét mutatja, hogy míg egy átlagos kemoterápiás szer esetén a minőséggel korrigált életidő-hosszabbodás (QUALY) mindössze 0,1 év, addig trastuzumab esetén (ahol a HER2 személyében rendelkezünk egy hatásos biomarkerrel) ez már kettő év. Rövidesen a gyógyszeripar csak olyan gyógyszereket hozhat forgalomba, ahol meg tudjuk előre megmondani, hogy ki fog reagálni. Mindezek miatt a prediktív biomarkerek a következő évtized kutatásai során a „slágertermékek” között lehetnek.

A világhálón elérhető rendszerekkel kapcsolatban kerül említésre, hogy génchipek segítségével „direkt tumordiagnózis” készíthető. Megmagyarázná ezt a definíciót a jelölt?

„Direkt tumordiagnózis” alatt a „közvetlen tumordiagnózist” értettem. Egyes diagnosztikus tesztek (pld CT) esetén a mérés és a beteget kezelő onkológus között még egy további szakirányú továbbképzéssel rendelkező orvos is megvizsgálja az eredményt (a példa esetében egy radiológus). Mivel a gén chipek kiértékelése teljesen automatizálható, ezért megfelelő program birtokában az eredmény „direkt a kezelőorvoshoz” futhat be.

Cél lehet-e az, hogy az ilyen típusú adatok az egyes betegek számára is hasznosak legyenek-e? Vagy elégnek bizonyulnak a jelenlegi terápiát meghatározó, befolyásoló biomarkerek?

Úgy néz ki, hogy az onkológiában elkezdődött az a forradalom, amire oly régóta vártunk. Évente a jóváhagyott onkológiai gyógyszerek száma több mint 10%-al nő (az elmúlt 1 év alatt 14-el 133-ra emelkedett). Eközben csak példaként említve a kolon- és rectum-tumor esetén a halálozás esélye 1990 óta 37%-al csökkent, emlőrák esetén pedig 33%-al. Ezen trendek alapján azt várhatjuk, hogy a továbbiakban is új gyógyszerekre és új biomarkerekre lesz igény. Még mindig nagyon sok kutatásra lesz szükség, ameddig eljutunk oda, hogy a gyógyszeres kezelés a sebészi kezelés alternatívájaként is szóba jöjjön.

Végezetül még egyszer köszönöm a lelkiismeretes bírálatot, és köszönöm, hogy a dolgozat elfogadását javasolja.

Budapest, 2014.10.21.

Győrffy Balázs