

# A TUMORMUTÁCIÓS TERHELÉS (TMB) MINT TUMORAGNOSZTIKUS PREDIKTÍV BIOMARKER: JAVASLATOK ÉS MEGFONTOLÁSOK

*The predictive marker, tumor mutational burden (TMB): controversies and facts*

**Kiss András<sup>1,2</sup>, Fillinger János<sup>2,3</sup>, Méhes Gábor<sup>2,4</sup>, Barbai Tamás<sup>1</sup>, Rásó Erzsébet<sup>1</sup>, Sükösd Farkas<sup>5</sup>, Tornóczki Tamás<sup>6</sup>, Tímár József<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet, Budapest

<sup>2</sup>Egészségügyi Szakmai Kollégium, Patológiai Tagozat

<sup>3</sup>Országos Korányi Pulmonológiai Intézet, Budapest

<sup>4</sup>Debreceni Egyetem, Patológiai Intézet, Debrecen

<sup>5</sup>Szegedi Tudományegyetem, Patológiai Intézet, Szeged

<sup>6</sup>Pécsi Tudományegyetem, Patológiai Intézet, Pécs

**ÖSSZEFOGLALÓ** – A tumormutációs terhelés (TMB) a rosszindulatú daganatok genomját ért károsodás mérőszáma, azonban pontos meghatározásának módszertana még nem kiforrott. Ugyanakkor a TMB fontos úgynevezett tumoragnosztikus prediktív markerré vált azzal, hogy egy immunellenőrzőpont-gátló gyógyszer kísérő diagnosztikuma lett. Az elmúlt időben több multicentrikus vizsgálatban elemezték a TMB-meghatározás módszertanát és azonosították a legfontosabb technológiai problémáit. Másrészt, a klinikai vizsgálatok utólagos részletesebb elemzéseit feltárták a TMB mint tumoragnosztikus prediktív marker klinikai használatának korlátait. A TMB-meghatározás hazai szélesebb körű bevezetése előtt célszerűnek láttuk összefoglalni a TMB-vel kapcsolatos alapvető ismereteinket, és az ezzel kapcsolatos ESMO-ajánlást, hogy ezzel is segítsük az oncoteam munkáját.

**Kulcsszavak:** *tumormutációs terhelés, prediktív diagnosztika, immunellenőrzőpont-gátló kezelés*

**SUMMARY** – Tumor mutational burden (TMB) is a sensitive marker of the carcinogenic damages of the tumor genome, but its definition and the exact technical protocol of its determination is not widely accepted. Meanwhile TMB became as one of the predictive marker of administration of immune checkpoint inhibitors (ICI). Recently several large multicentric studies analysed the technologies of TMB determination and identified problematic key factors. On the other hand, several retrospective analyses of the clinical trials data revealed problems of the use of high TMB as predictor of efficacy of ICI administration in a wide variety of malignancies. Before introducing widely TMB as predictive biomarker in Hungary, we have summarized TMB-associated knowledge and the relevant ESMO guidance to support decisions of multidisciplinary teams.

**Key words:** *tumor mutational burden, tumor-agnostic predictive marker, immune checkpoint inhibitor*

## Bevezetés

Az elmúlt évtized a daganatok kezelésének forradalmát jelentette, ami részben a célzott terápiák egyre szélesebb alkalmazásának, részben az immunonkológiai (IO) szerek megjelenésének köszönhető. Ezen új gyógyszerek alkalmazásakor azonban prediktív markerekre van

szükség és gyakran az egyes gyógyszerekhez mindjárt a kísérő diagnosztikumot is törzskönyvezték. Az egyes célzott gyógyszerek vagy az IO-szerek több daganatban is törzskönyvezésre kerültek, aminek eredményeként egyre inkább elterjedt az a nézet, hogy a daganat típusa már nem is érdekes a kezelés szempontjából, csak a megfelelő biomarker/génhiba legyen jelen: így született meg a tumoragnosztikus célzott terápia gondolata, aminek fő elindítói a MMR-státusz és a tumormutációs terhelés (TMB) prediktív markerek voltak. A jelen összefoglaló a TMB molekuláris patológiai alapjait, a meghatározás metodológiáját és az alkalmazás legfontosabb kérdéseit érinti.

---

### Levelező szerző:

Dr. Tímár József,

Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet;

1091 Budapest, Üllői út 93.

E-mail: jtimar@gmail.com

## A TMB molekuláris epidemiológiája (1, 2)

A rosszindulatú daganatok kialakulásának alapja a genomban keletkező genetikai hibák felhalmozódása, amelyek kulcsfontosságú, úgynevezett driver géneket érint. Ugyanakkor ezen génhibák száma a teljes mutációs terheléshez képest elenyésző, ezért és más okokból úgynevezett kísérő (passenger) mutációknak tekintették. A tumor mutációs terhelése a nem szinonim mutációk egy megabázis DNS-re eső számában került kifejezésre, és a különféle daganatok genomikai feltérképezése során keletkezett. Ezeket a vizsgálatokat gyakorlatilag friss fagyasztott mintákon teljesexom-RNS-szekvenálással végezték. A különféle emberi daganatok nagy számának teljesgenom-szekvenálása bemutatta azt, hogy a rosszindulatú daganatok a mutációs terhelés tekintetében igen heterogének. A legnagyobb TMB-jű daganatok a bőrdaganatok (az UV-expozíció eredményeként), de a lista élbolyában vannak tüdőrákok is, bár ezek közül az adenocarcinomáé a legalacsonyabb. Talán kissé meglepő, hogy a B-sejtes NHL is ebbe a csoportba tartozik. A spektrum másik végében az igen alacsony mutációs terhelésű daganatok állnak, mint a glioblastoma, hasnyálmirigy- vagy emlőrák, és a két végtel között csaknem két nagyságrendi az eltérés. Legalább ilyen fontosságú azonban azt látni, hogy milyen nagy az eltérés az egyes daganatok között abból a szempontból, hogy milyen arányban található bennük a kifejezetten magas TMB, ami a >20 mutáció/megabázis. Ebből a szempontból is a bőrdaganatok vezetnek, amelyekben ez az arány 50% körüli, de igen magas (30%) a vastag- és végbélrákokban, elég magas (~20%) a B-NHL-ben, gyomorrákban és endometriumrákban. Fontos látni, hogy a tüdőrákok ebből a szempontból is heterogének, mert a nagy sejtes formában 25%-hoz közelít ez az arány, míg a többi típusban inkább 10%

### Legfontosabb megállapítások

- A tumormutációs terhelés (TMB) az immunellenőrző-pont-gátlók alkalmazásának egyik prediktív markere.
- A TMB pontos definíciója még nem született meg, és így a meghatározás pontos technikája és a kiértékelés szigorú feltételei sem forrottak ki.
- A TMB-re alapozott klinikai döntések a mindennapi rutin részévé váltak akkor, amikor ennek a markernek a kritikus határértékéről is eltérő vélemények vannak.
- A TMB-meghatározás hazai alkalmazását igen körültekintően kell végezni és eredményének felhasználását a klinikai gyakorlatban kritikusan kell megtenni.

körüli. A spektrum másik végén a prosztata- és emlőrák áll néhány százalékkal, de megjegyzendő, hogy a vesesejtes rákban, májrákban, hasnyálmirigyrákban vagy glioblastomában alig lehet találni ilyen daganatot (1. táblázat).

## A magas TMB kialakulásában szerepet játszó genetikai hibák (3–5)

A TMB kialakulásáért a DNS-hiba-javítási mechanizmusok károsodása felel: a homológ rekombinációsé, a nem homológ excíziós hibajavításé, a mismatch hibajavításé és az excíziós hibajavításé. Ezen mechanizmusok leggyakoribb genetikai okait a 2. táblázat mutatja. Amennyiben egy daganatban ezen gének patogén mutációit detektálják, az ilyen daganatokban magas TMB-vel lehet számolni. Fontos megjegyezni, hogy ennek alapján az MMR-defekt daganatokban magas a TMB is, aminek fontos gyakorlati következményei vannak (lásd később). Hasonlóan érdekes és fontos hogy a DNS-hiba-javítás egyik fő szabályozója a p53, így a P53-mutáns daganatokban is számolni kell a magas TMB kialakulásával. Ugyanakkor a rosszindulatú daganatok mutációs terheléséért az APOBEC-rendszer (aktiváció-indukált deaminázok) ténykedése is felelős gyakran, azonban ennek eredménye nem okoz immunológiaiul kedvező körülményeket (6).

1. táblázat. TMB az egyes emberi daganatokban (1, 2)

Tumortípus	Átlagos mutáció/Mb	%, >20 mutáció/Mb
Bazálsejtes rák (bőr)	47,3	70,7
Laphámrák (bőr)	45,2	67,3
Melanoma (bőr)	14,4	39,7
Nagysejtes tüdőrák	12,2	24,3
Kissejtes tüdőrák	9,9	9
Tüdőlaphámrák	9	11,3
Tüdőadenocarcinoma	6,3	12,3
Diffúz nagysejtes B-NHL	10	18,4
Húgyhólyagrák	8,1	14,3
Vastag- és végbélrák	7,5	30,0
Fej-nyaki laphámrák	5,0	10,1
Gyomorrák	5,0	19,0
Endometriumrák	4,5	18,5
Májrák	5,0	0,0
Világos sejtes veserák	4,5	0,0
Prosztatarák	2,0	1,0
Emlőrák	1,0	2,0
Hasnyálmirigyrák	0,9	0,0
Glioblastoma	0,8	0,0

TMB = tumormutációs terhelés [mutáció/megabázis (Mb) DNS]

**2. táblázat.** Tipikus DNS-hiba-javítási defektusok emberi daganatokban [3–5]

Hibajavítási mechanizmus	Mutált gének
Homológ DNS-repair (HDR)	BRCA1/2 CHEK1 RAD50-54 PALB2 FRANCA ATM ATR POLOQ BARD1 BRIP1 CDK12
Nem homológ excíziós repair (NHER)	XRCC4
Mismatch repair (MMR)	MLH1 MSH2 MSH6 PMS2 POLD/E
Bázisexcíziós repair (BER)	ERCC1/2 CDK7

## A magas mutációs terhelés és a daganatos neoantigének közötti kapcsolat

A TMB közvetve kapcsolódik a tumorimmunológiához. A daganatellenes immunválaszt a tumorantigének határozzák meg, amelyek lehetnek tumorasszociáltak (mint a differenciációs, az úgynevezett rák-here vagy túlexpresszált antigének), vagy tumorspecifikus neoantigének. Míg az előbbiek normálisan csak a férfi csírasejteken található, az utóbbiakat semmilyen normális sejt nem expresszája. A vizsgálatok igazolták fontosságukat mind a spontán előforduló, mind az immunterápiák által kiváltott tumorelles immunválaszban [7, 8]. A tumor-neoantigének szoros kapcsolatban állnak a TMB-vel, minthogy a fehérjekódoló gének nem szinonim mutációi állhatnak a kialakulásuk hátterében. *Ezért ebből a szempontból a TMB-meghatározásnak a teljes vagy részleges exom vizsgálata alapján van értelme és nem a teljes genomra vonatkozóan.* Sajnos a kódoló exom mutációinak csak körülbelül egyharmada eredményezi neoantigén kialakulását, emellett a mutált fehérjéknek meg kell felelniük az antigenicitás és HLA-I-hez vagy -II-höz történő kötődés kívánalmainak. A genomot érintő mutációk között nagy különbségek vannak. Viszonylag csekély hányaduk (genomként legfeljebb néhány tíz) képes onkogén driverként működni, míg a többi úgynevezett utazó (passenger) mutáció. Immunológiai szempontból azonban a passenger mutációk nagyon fontosak, mert főként ezek felelősek a neoantigének létrejöttéért. Egy nagy mintájú bioinformatikai daganatanalízis azt mutatja, hogy az úgynevezett neoantigén-terhelés (neoanti-

gen burden) szempontjából az élen nem azok a daganatok vannak, amelyek a TMB szerinti sorrendben, mivel a listát a méhdaganat vezeti a gastrointestinalis daganatokkal, valamint a bőrdaganatokkal. Másrészt pedig a lista alján az emlő-, prosztata- és veserákok vannak, amelyek a TMB-rangsorok közepén helyezkednek el [9].

## A TMB-meghatározás technikája: a magas TMB határértékének meghatározása

A TMB meghatározásánál legfontosabb definiálni, mit is értünk ez alatt (mutáció száma/Mb). Ideális esetben a tumormintában előforduló és proteinszinten neoantigénként megfigyelhető változást okozó összes mutáció számát, amelynek meghatározása kulcsfontosságú a megfelelő alapossággal lefolytatott vizsgálati folyamatban [10, 11]. Történelmi távlatokban az első adatok az RNS-alapú teljesexom-szekvenálásokból (WES whole exom sequencing) származnak [1, 2], amelyek robusztusságuk és nagy költségük miatt hátrébb szorultak az olcsóbb és gyorsabban kivitelezhető NGS-gén-panelek miatt. A klinikai gyakorlatban mára szinte egyeduralkodóvá váltak a nagy, 300–500 gén vizsgálatán alapuló DNS-alapú TMB-meghatározások, amelyek a statisztikai hibahatárok mellett mintegy egymilliárd bázis (1 Mb) vizsgálata alapján becsüli meg a fent említett genetikai eltérések mennyiségét: a hazánkban elérhető paneleket és sajátosságait a **3. táblázatban** foglaltuk össze. Látható, hogy az F1CDx-kódoló régió tekintetében nem felel meg a fenti lefedettségi kritériumnak. A táblázat arra is felhívja a figyelmet, hogy az egyes panelek (kivéve a Qiagen) változó arányban, de tartalmaznak úgynevezett nem kódoló DNS-szakaszokat is, amelyek mutációit csak nagyon nehezen lehet megfeleltetni új neoantigén keletkezésével, azaz kicsit felülmérhetik a TMB-t [10–12].

A döntő lépés, azaz a mutációk számának meghatározása során számos paramétert kell megfelelő gondossággal figyelembe venni. Mint minden molekuláris patológiai vizsgálat, a TMB meghatározása során is kiemelt figyelmet kell fordítani a mintára. Az általános patológiai gyakorlatnak megfelelően a leggyakrabban FFPE-minták kerülnek vizsgálatra. Fontos a megfelelő preanalitikai standardok használata. A formalin okozta genetikai hibák (fragmentáció, keresztkötés, citozindeamináció) kimutatásának korrekcióját egyrészt szoftverek, másrészt a kitekbe beépülő specifikus protokollok biztosítják (mint például az OncoPrint esetében a deamináció mérése) [10–12].

A vizsgált tumorminta tumorsejt-tartalmának meghatározása során a reprezentatív terület kiválasztására kell törekedni (döntő részben a tumorról), amely a patológus által százalékos értékkel jellemezhető (T/N%). A nagy mennyiségű normálszövet jelenléte jelentős torzító ha-

**3. táblázat.** A tumor mutációs terhelés (TMB) vizsgálatára hazánkban használt NGS-panelek összehasonlítása (11-13)

Módszer	Szükséges DNS-mennyiség	Elemzett génszakasz/kódoló régió (Mb)	Elemzett gének száma	Génhibák	Csíravonal-korrektció	Rákgén torzítás-korrektció	FFPE-hiba-korrektció
FoundationOneCDx	50 ng	2,2/0,8	324	SNV (NS+S) in/del	bioinformatikai	van	bioinformatikai
Illumina TSO500	40 ng	1,9/1,3	523	SNV (NS+S) in/del	bioinformatikai	van	egyedi molekuláris azonosítóval
Oncomine-TMB	20 ng	1,7/1,2	409	SNV (NS)	bioinformatikai	nincsen	deamináció-mérés
QIAseq-TMB	40 ng	1,3/1,3	486	SNV (NS) in/del	bioinformatikai	nincsen	egyedi molekuláris azonosítóval
GenoSmart DX-TMB	40 ng	2,5/2,2	524	SNV (NS(+S) in/del, CNV	bioinformatikai	van	bioinformatikai

in/del = inszerció/delécio; Mb = megabázis; NGS = (next generation sequencing) új generációs szekvenálás, NS = nem szinonim mutáció, S = szinonim mutáció; SNV = (single nucleotide variant) báziscsere; CNV = copy number variation

tást von maga után, amely az egymást követő lépésekben a valós TMB-értéket jobban torzíthatja, mint a százalékos értékből következtethetnénk erre. Ennek oka az úgynevezett csíravonalas SNV-k jelének felerősödése, amit aztán informatikailag lehet, illetve kell korrigálni (10-12). Ideális esetben normálszövet vagy vérminta szolgálhatnak kiváló csíravonalas háttérgénhiba-kontrollnak, de ilyen a rutindiagnosztikában gyakorlatilag nincsen. A 10%-nál alacsonyabb tumorarányt tartalmazó mintákat nagy körültekintéssel kell kezelni, mivel itt a fentiek miatt valid eredményt csak a szekvenálás mélységének növelésével remélhetünk, azaz több primer szekvenciát kell az adott mintából lefuttatni a fals negatív eredmény kiküszöbölésére (10). A becslési módszer standardizálása kapcsán perszonális különbségek elengedhetetlenül felléphetnek. Próbálkozások történtek in silico tumorsejttartalom-meghatározásra, azonban ennek is vannak technikai korlátai. A legtöbb WES-protokoll nukleinsavigénye 150–200 ng genomi DNS, ezzel szemben az NGS-panelekhez sokkal kevesebb is elégséges (20–40 ng) (3. táblázat), azonban a minta intaktsága (töredezettsége) vagy alacsony DNS-tartalma erősen kihat az eredmények felhasználhatóságára és szükségessé teheti a felhasznált DNS mennyiségének növelését (10, 11, 13).

A minta-előkészítés fontos lépése a könyvtárkészítés, amelynek során a szekvenálandó fragmentek sokaságát egy közös platformra építjük fel, azaz könyvtárát készítünk, ami azt is jelenti, hogy akár 4–500 gén kódolószekvenciái mind megtalálhatók egyetlen reakcióban. Az NGS-panelek esetében több beteg mintája egyedi molekuláris azonosítóval jelölve egy reakcióban kerül futtatásra, amelynek ismeretében fontos a keresztkontaminációk kizárása, ami a nagyszámú amplifikációs lépés miatt jelentős torzító hatást generálva téves ered-

ményhez vezethet (úgynevezett deduplikációs hiba informatikai korrekciója) (10, 11).

A keletkezett nagy mennyiségű adat bioinformatikai kiértékelése kulcsfontosságú, azonban az alkalmazott vizsgálati platformtól függően akár jelentős eltéréshez is vezethet az új variánsok detektálásában. Alapvető jelentőségű, hogy a kiértékelés során mit tekintünk tumoros mutációnak. A nemzetközi konszenzus szerint a neoantigének keletkezése szempontjából jelentős genetikai eltérések mérésére lenne szükség, amelynek elérésére két út áll a vizsgáló előtt. Az első a tumort a saját normálszövetével összehasonlító vizsgálat, a második pedig a különböző in silico szűrőmetódusok alkalmazása a csíravonal-eredetű eltérések kiszűrésére. A csíravonalas korrekció populációs eltéréseinek kiszűréséhez a nagy nemzetközi reprezentatív adatbázisok használata indokolt (ExAC, db SNP, 1000 Genomes). Ezzel kapcsolatban azonban tudni kell, hogy ezekben etnikai egyenlőtlenség van, az elemzett populációk nem heterogének, így kisebb etnikai minoritások adatai alig szerepelnek (10, 11, 13).

A fennmaradó genetikai változások detektálása után különféle interpretációs labirintusba vezetnek a különböző platformok programjai. Egyöntetű és szilárdan megalapozottnak tekinthető, hogy a neoantigén-keletkezés szempontjából jelentős elváltozások körébe sorolhatjuk az SNV-eket (single nucleotide variation), amelyek azonban szinonim és nem szinonim formában jelenhetnek meg. A szinonim variáns azt jelenti, hogy ez esetben a báziscsere nem jár aminosavszerintű eltéréssel, azaz a neoantigén szempontjából neutrális génhiba. A különféle platformok nem egységesen kezelik ezt, az F1CDx és az Illumina TSO500 ezeket beszámítja a TMB meghatározásakor (3. táblázat), ezzel

mintegy felülértékeli a TMB-t. Másrészt a leolvasási keret eltolódásához, a keletkező protein terminálásához vezető inszerciós/deléciós mutációkat is figyelembe kell venni, amit csak az F1CDx és az Illumina eljárásai végeznek, így ebből a szempontból az OncoPrint és a Qiagen platform alulméri a TMB-t (3. táblázat). A legbiztosabb eredményt azonban az in silico szűrés manuális interpretációjával érhetjük el, főleg a fals pozitív esetek kiszűrése kapcsán. Az egyes panelek technikai paramétereinek teljesítenie kell az in silico analízishez szükséges legalább 1,1 Mb nyers szekvenciadatot kinyerését. A minimális panelméret több mint 300 gént foglal magába, hogy az elégséges lefedettség meglegyen, de láthatóan a panelek elég nagy eltéréseket mutatnak ebből a szempontból is [324–523] (10, 11, 13).

Mindezeket túl a vizsgálati eredmények klinikai interpretálásánál a pusztán számértékek megadásán túl azok klinikai összefüggését is vizsgálni kell. Összehasonlító vizsgálatok szerint (10, 13) három TMB-kategóriába lehetne besorolni a vizsgálati mintákat, az egyértelműen magas (>20 mutáció/Mb), az egyértelműen alacsony (<5 mutáció/Mb), valamint a mutációs terhelés szempontjából a kettő között elhelyezkedő, technológiailag sokkal kisebb biztonsággal meghatározható, és klinikailag bizonytalan viselkedést mutató tumorokra. Ugyanakkor a jelenlegi törzskönyvezési protokoll a 10 mutáció/Mb értékben határozta meg a magas TMB határértékét. Ezzel az a probléma, hogy a különféle platformok összehasonlíthatóan jobban teljesítenek a magasabb TMB-határértékek alkalmazása esetén (1–2% fals negatív vagy fals pozitív hibázási arány). Ugyanakkor az alacsony TMB-értékű daganatok esetében jelentősen megnő elsősorban a fals pozitivitás aránya (15–30%). A klinikailag jelentős tartományban, a 10 mutáció/Mb értékhatárnál a különféle platformok helytelen klaszifikációs aránya még mindig 5–10% (14). A fentiek alapján egyértelmű, hogy a bioinformatikai elemzés, annak lépései és paramétereik kritikus fontosságúak a kapott eredményre nézve. Szükségszerű, hogy rövid időn belül az elemzés standardizált, validált és kontrollálható módon történjen. A GenoSmart DX-TMB panel esetében kérésre elérhető a bioinformatikai elemzésben felhasznált szoftverek és paraméterek pontos leírása, illetve a későbbiekben akár a TMB-számolás paramétere is kívánság szerint változtathatók (például szinonim mutációk kivétele/belefoglalása stb.). Mindezek figyelembevételével, nagy körültekintéssel kell eljárni a TMB-értékek misztifikálásával, mert láthatóan a technológia még nem képes olyan nagy precizitással definiálni a klinikailag megkövetelt TMB értékét. Ezért is törekedni kell a minél magasabb technikai színvonalra, a minták optimalizálására, mert ezek döntően befolyásolják a meghatározás biztonságát.

Végül érdemes néhány szót ejteni a liquid biopszia szerepéről is a TMB-meghatározásban. Az egyik állítás, hogy lehetséges TMB-meghatározás liquid biopsziából is, de tisztában kell lenni a korlátokkal, ami az alacsony keringő DNS mennyiségéből és a vérben lévő haemopoieticus sejtek csíravonalas és/vagy klonális haemopoiesisből fakadnak. Mindezek eredőjeként a keringő DNS-alapú TMB-meghatározáskor a „magas” határérték 16 mutáció/Mb körül van, mert ez felel meg a szöveti alapú 10 mutáció/Mb értéknek (12).

## A TMB mint tumoragnosztikus biomarker

A történet azzal kezdődött, hogy a különféle daganatokban elkezdtek a tumoros mikro környezet szisztematikus feltérképezését és ennek keretében úgynevezett immunoscore-meghatározást alakítottak ki, amelyet a vastagbélrákban végeztek el először. Ezen biomarker igen hatékony független prognosztikus markerré vált. Majd amikor a magas immunoscore-csoport genetikai sajátosságait elemezték, kiderült hogy ezen daganatok nagy része mikroszatellitainstabil csoportba tartozik (15). A történet folytatása lett az anti-PD1 antitest (pembrolizumab) tesztelése vastagbélrákban, ami nagyon kiábrándító eredménnyel zárult, mert a daganatok csak egy igen kis része bizonyult hatékonynak, amelyekről később kiderült, hogy ezek az MSI-státuszú daganatok. Ezért egy további vizsgálatban már csak MSI+ vastagbélrákokat kezeltek, és ebben a genetikailag szelektált csoportban a pembrolizumab a kemoterápiát meghaladó mértékben volt klinikailag hatásos (16). A következő lépésben már MSI+ nem vastagbélrákos daganatcsoportban tesztelték a pembrolizumab hatását, és a vizsgálat pozitív eredményére való tekintettel kapott tumoragnosztikus törzskönyvet a pembrolizumab az MSI+ daganatokra. Ugyanakkor a vizsgálatokban nem túl széles daganatféleségi spektrum volt jelen, és nagyon egyenetlen számban kerültek beválasztásra a különféle daganatok, így sokan óvatosságra intettek a valódi tumoragnosztikusságot illetően. A későbbi szélesebb körű és alaposabb elemzések aztán kiderítették, hogy az elemzett daganatok között voltak kifejezetten rezisztensek is, mint a pancreasrák és a glioblastoma (GBM) (4. táblázat) (17).

Ennek a történetnek a folytatása lett a TMB vizsgálata mint tumoragnosztikus markeré, mivel az MSI+ daganatokban a mutációs terhelés egy-két nagyságrenddel nagyobb, mint a stabilaké. Mivel magas mutációs terhelés, mint bemutattuk, nemcsak MMR-defektuson alapulhat, jogosan vetődött fel, hogy a magas TMB-vel rendelkező daganatokban is hatásosabb lehet az ICI-kezelés. A klinikai vizsgálatban az MSI-stabil daganatokat kezelték pembrolizumabbal és meghatározták a TMB prediktív szerepét. A kísérő diagnosztikum a



**4. táblázat.** A magas mutációs terhelés kapcsolata a különféle daganatok ICI-érzékenységével

Prediktív marker	ICI-reszponzív daganatok	ICI-rezisztens daganatok
MSI (17)	vastagbélrák endometriális rák vékonybélrák gyomorrák ováriumrák epeútrák	pancreasrák GBM
TMB-H (18, 21)	vastagbélrák endometriális rák húgyhólyagrák melanoma tüdőadenocarcinoma	pancreasrák GBM tüdő kissejtes rák laphámrákok (tüdő, szájüreg, nyelőcső) veserák májrák pajzsmirigyrák prosztatatarák emlőrák (TNBC)
ESMO ajánlás TMB meghatározásra (22)	méhnyakrák vulvacarcinoma NET pajzsmirigyrák nyálmirigyrák	

GBM = glioblastoma; ICI = immunellenőrzőpont-gátló; MSI = mikroszatellita instabilitás; TMB-H = magas tumormutációs terhelés; TNBC = tripla negatív emlőrák

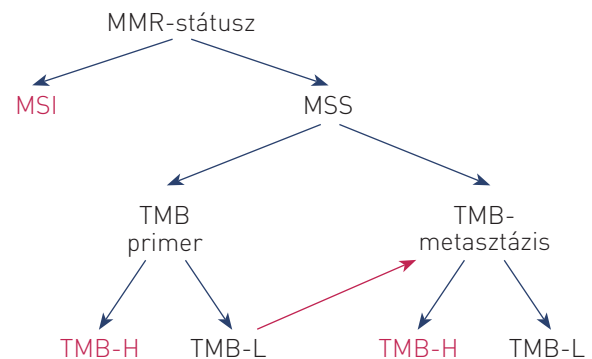
F1CDx-módszer volt, amely 0,8 Mb DNS-en elemzi a mutációs terhelést több mint 300 onkogén exonját vizsgálva. A fázis II. vizsgálat eredményei alapján kapott tumoragnosztikus törzskönyvet a pembrolizumab a magas TMB-vel rendelkező daganatokra, és a szelekciós határérték 10 mutáció/Mb lett (18).

A törzskönyvet sok kritika érte, mivel itt sem volt túl széles a vizsgált daganatféleségek köre és a 10-es TMB-határérték a korábbi elemzések alapján várt 15-20-nál jóval alacsonyabb. A későbbi komplex immunológiai és statisztikai elemzések aztán feltárták, hogy a magas TMB-vel rendelkező daganatok két csoportra oszthatók: az egyikben a magas TMB egyben magas neoantigén-expresszióval is jár és magas T-sejtes infiltrációval, míg a másik csoportban a magas TMB nem jár magas neoantigén-expresszióval. A klinikai eredmények pedig azt mutatták, hogy a magas TMB-vel rendelkező daganatoknak csak egy kisebb csoportjában bizonyult hatásosnak a pembrolizumabkezelés, amelyek az I. kategóriába estek, míg a II. kategória daganatai esetében olyannyira hatástalan volt a kezelés, hogy a komparátor kemoterápia hatásosabbnak is bizonyult... Az érzékeny daganatok között szerepelt a vastagbélrák és az endometriális rák, amely az MSI-csoportban is az érzékenyek között szerepelt, és ide tartozott a húgyhólyagrák, a melanoma és a tüdő adenocarcinómája. A TMB-H-rezisztens csoportban újra feltűnt a pancreasrák és a GBM, amely a mikroszatellita-instabilitás (MSI)

szerinti vizsgálatban is rezisztens volt, és itt találunk sok laphámrákféleséget (tüdő, szájüregi vagy nyelőcső), de ide tartozik a veserák, a májrák, a prosztata- és emlőrák is (19). Ezeknek a megfigyeléseknek figyelmeztetőnek kell lenniük a kritikátlan tumoragnosztikus szemlélet terjedése szempontjából (4. táblázat) (20).

Mindezen elemzések fényében az ESMO áttekintette a TMB prediktív szerepét és tier IIA fokozatúnak értékelte, ami meglepetés ahhoz képest, hogy törzskönyvezett prediktív markerről van szó, aminek tier I. fokozatú besorolást kellene jelentenie. Az ajánlás alapja a KEYNOTE-158-as vizsgálat volt, amelyben 10 daganatféleség szerepelt (anális rák, méhnyakrák, endometriális rák, kissejtes tüdőrák, nyálmirigyrák, pajzsmirigyrák, NET, epeúti rák, vulvális rák és mesothelioma). A válaszadási arány 27% volt a TMB-H/mikroszatellitastabil (MSS) csoportban a TMB-L-csoport 7%-ához képest (21). Az epeúti rákok között nem is volt TMB-H genetikai státuszú, és az anális rákokban és a mesotheliomában a TMB-H daganatok rosszabbul reagáltak, mint ezen daganatok TMB-L-variánsai. Ennél talán meglepőbb az, hogy milyen szűk daganatcsoportban javasolja az ESMO a TMB diagnosztikus elvégzését: *méhnyakrák, vulvacarcinoma, NET, nyálmirigyrák és pajzsmirigyrák* (4. táblázat) (22). Ezen vélemény háttérében az a megfontolás állt, hogy a TMB mellett a PDL1 marker is prediktív több daganat esetében, így ahol mindkettő elérhető, az ESMO a PDL1-et részesítette előnyben a TMB-meghatározással szemben. Ugyanakkor az úgynevezett tumoragnosztikus prediktív marker szerepe a TMB-nek jelentős lehet még azon ritka daganatok esetében is, amelyekről alig vannak klinikai hatékonysági adatok, mivel a törzskönyvezési vizsgálatokban nem voltak jelen vagy igen kis számban: ilyenek a lágyszövet-daganatok és a gyermekkori daganatok.

Ugyanakkor az úgynevezett tumoragnosztikus prediktív marker szerepe a TMB-nek jelentős lehet még azon ritka daganatok esetében is, amelyekről alig vannak klinikai hatékonysági adatok, mivel a törzskönyvezési vizsgálatokban nem voltak jelen vagy igen kis számban: ilyenek a lágyszövet-daganatok és a gyermekkori daganatok.



**1. ábra.** A TMB-meghatározás javasolt algoritmus

## A TMB-meghatározás racionális algoritmus (1. ábra)

Amint azt korábban már lefektettük, a magas TMB kialakulásának egyik gyakori oka az MMR-gének genetikai vagy funkcionális (epigenetikai) hibái. Ennek az a jelentősége, hogy az MSI-státuszú daganatokban magas TMB-vel kell automatikusan számolni. Ennek megfelelően célszerű a magas TMB-jű daganatok szelektálását az MMR-deficientia kimutatásával kezdeni, annál is inkább, mert annak vizsgálata gyors és relatíve olcsó. Amennyiben a daganat MS-instabil, nem érdemes még TMB-meghatározást is végezni, főleg, mert az MSI is tumoragnosztikus prediktív marker az immunonkológiai szerek alkalmazása szempontjából. Tehát a TMB-meghatározást csak az MSS-daganatokban indokolt elvégezni. A következő kérdés, hogy a primer tumorból vagy az áttétből érdemes-e TMB-meghatározást végezni. Amennyiben egy primer tumorban az TMB magasnak adódik, nem kell azzal számolni, hogy a progresszió során esetleg ez lecsökken: a daganat nem tud visszafele fejlődni genetikailag, nem tudja újra megtanulni a DNS-hiba-javítást. Ugyanakkor, ha a primer tumorban alacsony a TMB, érdemes a kezelés utáni recidívában vagy a keletkezett áttétekben újra elemezni a TMB-t, mert a genetikai progresszió során folyamatosan emelkedik a mutációs terhelés.

## Konklúzió

A TMB prediktív szerepe az immunellenőrzőpont-gátlók alkalmazása szempontjából egy nagyon izgalmas és forrongó kérdés, amelyet az élet (és a törzskönyvezés) az onkológiai ellátás fókuszába helyezett. Egyrészt a pontos definíció még nem született meg, és így a meghatározás pontos technikája és a kiértékelés szigorú feltételei sem forrottak ki. Ehhez képest az erre alapozott klinikai döntések a mindennapi rutin részévé váltak akkor, amikor a TMB kritikus határértékéről is eltérő vélemények vannak. Mindezek fényében a TMB-meghatározás hazai alkalmazását igen körültekintően kell végezni és eredményének felhasználását a klinikai gyakorlatban kritikusan kell megtenni. Azokban az esetekben, ahol ICI-kezelés része lehet a terápiás protokollnak, ott molekuláris oncoteam határozza meg a kezelés alapjául szolgáló szűrővizsgálat elvégzéséről, legyen az MMR-deficientia-kimutatás, PD-L1 vagy TMB-meghatározás.

## Irodalom

1. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013;499:214-8.

2. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* 2017;9:34.
3. Kass EM, Moynahan ME, Jasin M. When genome maintenance goes badly awry. *Mol Cell* 2016;62:777-87.
4. Pilie PG, Tang C, Mills GB, Yap TA. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;16:81-92.
5. Motegi A, Masutani M, Yoshioka KI, Bessho T. Aberrations in DNA repair pathways in cancer and therapeutic significances. *Semin Cancer Biol* 2019;58:29-46. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.02.005>
6. Ladányi A, Tímár J. Immunologic and immunogenomic aspects of tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2020;60:249-61.
7. Robbins PF, Lu YC, El-Gamil M, et al. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 2013;19:747-52.
8. van Rooij N, van Buuren MM, Philips D, et al. Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol* 2013;31:e439-42.
9. Wu J, Zhao W, Zhou B, et al. TSNADB: a database for tumor-specific neoantigens from immunogenomics data analysis. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2018;16:276-82.
10. Stenzinger A, Endris V, Budczies J, et al. Harmonization and standardization of panel-based tumor mutational burden measurement: real-world results and recommendations of the quality in pathology study. *J Thorac Oncol* 2020;15:1177-89.
11. Sholl LM, Hirsch FR, Hwang D, et al. The promises and challenges of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: a perspective from the International Association for Study of Lung Cancer Pathology Committee. *J Thorac Oncol* 2020;15:1409-24.
12. Addeo A, Friedlaender A, Banna GL, Weiss GJ. TMB or not TMB as a biomarker: That is the question. *Crit Rev Oncology/Hematology* 2021;163:103374.
13. Heydt C, Rehker J, Pappesch R, et al. Analysis of tumor mutational burden: correlation of five large gene panels with whole exome sequencing. *Scientific Rep* 2020;10:11387.
14. Mankor JM, Paats MS, Groenendijk FH, et al. Impact of panel design and cut-off on tumour mutational burden assessment in metastatic solid tumor samples. *Br J Cancer* 2020;122:953-6.
15. Pages F, Mlecnik B, Marliot F, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 2018;391:2128-39.
16. Andre T, Shiu K-K, Kim TW, et al. Pembrolizumab in microsatellite-instability-high advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2020;383:2207-18.
17. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, et al. Efficacy of pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite instability/mismatch repair-deficient cancer: results from the phase II KEYNOTE-158 study. *J Clin Oncol* 2019;38:1-10.
18. Subblah V, Solit DB, Chan TA, et al. The FDA approval of pembrolizumab for adult and pediatric patients with tumor mutational burden (TMB)>10: a decision centered on empowering patients and their physicians. *Ann Oncol* 2020;31:1115-8.
19. McGrail DJ, Poilie PG, Rashid NU, et al. High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Ann Oncol* 2021;32:661-72.
20. Stricker JH, Hanks BA, Khasraw M. Tumor mutational burden as a predictor of immunotherapy response: is more always better? *Clin Cancer Res* 2021;27:1236-41.
21. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, et al. Association of tumor mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumors treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase-2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol* 2020;21:1353-65.
22. 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;31:1491-505.