



BRÖSTCANCER
FÖRBUNDET

Forskningsrapport



Huvudsökande:

Fredrika Killander

Överläkare, medicine doktor

Skånes Universitetssjukhus, Lunds Universitet

Frågeställning:

Hur ska man hitta de som har, och inte har, avsedd effekt av Her2 riktad behandling?

Tre frågor till Fredrika:

Hur kan resultatet av er forskning hjälpa patienterna, rent konkret?

Det är känt att immunförsvaret har en viktig roll för försvaret av tumörer.

Vi arbetar med att hitta sätt att belysa interaktionen mellan tumörceller och den immunrespons tumören skapar i patienten med Her2 positiv bröstcancer. Detta genom att skapa en gensignatur som skulle kunna särskilja patienter avseende bättre/sämre prognos efter standard anti-HER2 behandling.

Detta kan i sin tur innebära att behandlingen kan bli mer individualiserad.

Hur viktigt har stödet från Bröstcancerförbundet varit för er forskning?

Avgörande för att kunna gå igenom ett stort antal patienter och skapa en databas som arbetet kan grundas i.

Vad vill du hälsa alla Bröstcancerförbundets givare?

Stort tack för att ni vill stödja klinisk forskning!

Fredrikas populärvetenskapliga sammanfattning, finns att läsa på efterföljande sidor för dig som vill läsa mer.

HER2-projektet, rapport till Bröstcancerförbundet för medel 2018

Fredrika Killander, överläkare vid Skånes Universitetssjukhus, med dr, institutionen för kliniska vetenskaper

**Johan Staaf, Docent, Universitetslektor vid avdelningen för translationell cancerforskning
Lunds Universitet
250130**

Syfte

Det övergripande syftet med detta projekt var att skapa genexpressionsbaserade prediktorer (gensignaturer) för immunrespons vilka skulle kunna särskilja patienter med primär HER2-positiv bröstcancer avseende bättre/sämre prognos efter standard anti-HER2 behandling.

Bakgrund

Trots god observerad klinisk effekt av anti-HER2 behandling kvarstår det faktum att många HER2-positiva bröstcancerpatienter uppvisar behandlingsresistens, antingen "de novo" eller "acquired", dvs. i ett mer avancerat sjukdomsförlopp efter erhållen behandling. Då det är vida känt att immunförsvaret har en viktig roll för eradikeringen av tumörer så ligger fokus i detta projekt på interaktionen mellan tumörceller och den immunrespons tumören inducerar i patienten. Närvaron av tumörinfiltrerade lymfocyter (TILs), bedömt antingen patologiskt eller genomiskt, har visat sig korrelera med en bättre prognos och behandlingsrespons vid anti-HER2 behandling [1, 2]. Vår hypotes är således att ett kraftigt immunsvär uppmätt i tumörmikromiljön via exempelvis uttryck av immunmarkörer kan prediktera god behandlingseffekt med riktad anti-HER2 terapi, och därmed också god prognos.

Metodik

Projektet baserades på att användningen av RNA-sekvenseringsdata från primära tumörer skulle kunna identifiera många olika gensignaturer med potentiellt prognostiska associationer för HER2-positiva patienter. En välkänd begränsning inom framtagandet av multigen signaturer/biomarkörer på genuttrycksnivå är den tekniska databearbetningen, vilket ofta kräver att man utför så kallad gencentrering för att kunna jämföra genuttryck mellan patienter. Detta steg leder till att såväl framtagandet av en signatur/biomarkör som applikationen av densamma på nya oberoende tumörprov kommer att bli beroende av den patientkohort man använt / har tillgång till. Således fungerar de enbart som lämpliga prediktorer inom kohorter med liknande sammansättning av patienter. Detta har visats för exempelvis PAM50 signaturen i bröstcancer, men även för gensignaturer i lungcancer [3, 4]. Sammantaget finns det i dagsläget alltså inga ordentligt validerade prediktiva eller prognostiska genexpressionssignaturer som är fokuserade på immunresponsen HER2-positiva tumörer framkallar i kliniskt bruk. I detta projekt ämnade vi därför att genom speciella "machine learning" metoder adressera detta problem inom fältet genom att skapa robusta och noggrant validerade "single sample" prediktorer (SSPs) som är baserade på olika immunsignaturer i HER2-positiv bröstcancer för prognos och eventuellt behandlingsrespons.

Klinisk relevans

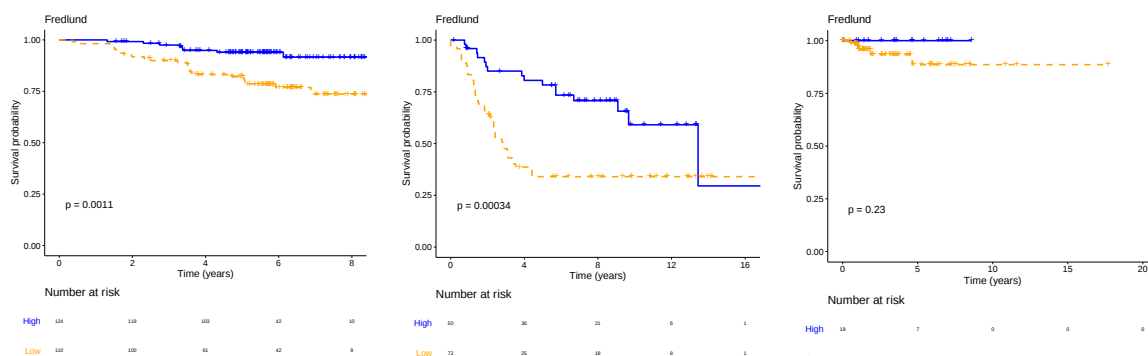
Den kliniska relevansen för detta projekt är att på ett bättre sätt kunna identifiera dels de HER2-positiva bröstcancerpatienter som svarar fördelaktigt på nuvarande anti-HER2 behandling (trastuzumab) (och som därmed inte kan anses "behöva" nyare och mer kostsamma behandlingar ur ett samhällsekonomiskt perspektiv) och dels de patienter med en hög återfallsrisk baserat på nuvarande terapi där det kan vara motiverat att ändra/komplettera existerande terapi för att minska återfallsrisken.

Resultat

I detta projekt har vi utvecklat SSPs i en patientkohort (=träningskohort) bestående av 291 HER2-amplifierade patienter med primär bröstcancer vilka alla rekryterats till den prospektiva observationella kliniska studien Sweden Cancerome Analysis Network – Breast (SCAN-B) mellan september 2010 och mars 2015 i Region Skåne [5]. Vi har utgått från redan tillgängliga genexpressionsdata från patienter provtagna innan start av anti-HER2 behandling. Varje patient är monitorerad individuellt avseende stadium, behandling (neoadjuvant/ adjuvant) samt uppföljning avseende lokala, regionala och fjärr - recidiv, övriga maligna sjukdomar samt överlevnad. Att vi kunnat karaktärisera patienter och behandling på individnivå har varit avgörande för att kunna träna / utvärdera prediktorer korrekt, till skillnad från om vi använt enbart registerdata.

För att identifiera ett brett spektrum av olika gensignaturer som bas för prediktorutvecklingen screenade vi databasen "Broad Institute Molecular Signatures Database" (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>) för immunsignaturer baserat på relevanta immunologiska nyckelord. Utifrån det identifierade biblioteket av olika signaturer valdes enbart de som var signifikant kopplade till recidivfri överlevnad (hazard ratio $4 \leq$, $P < 0.05$) efter adjuvant trastuzumab behandling i vårt träningsset, vilket gav 27 stycken signaturer, samt tillägg av en "in-house" immunsignatur [6]. Specifikt så beräknades för varje utvald signatur ett medelrankvärde för varje prov. Därefter skapades två grupper innehållande antingen proverna med de 30% högsta värdena eller med de 30% lägsta värden och Cox regressionsanalys utfördes. Av de totalt 28 signaturer skapades (träna) 28 SSP modeller, en för varje immunsignatur genom användandet av AIMS algoritmen [3], kapabel att oberoende ("single sample") kunna klassificera nya tumörprover som hög eller låg immunstatus.

För att validera våra framtagna signaturer applicerade vi dem på oberoende HER2-positiva patientkohorter med olika former av anti-HER2 behandling samt även retrospektiva kohorter utan anti-HER2 behandling (för att utreda modellernas "sanna" prognostiska prediktionspotential) [7, 8]. I den ena retrospektiva kohorten (GOBO, [7]) fann vi att 23 av 28 SSPs kunde påvisa en signifikant skillnad i recidivfri överlevnad mellan de två immungrupperna med HR 1.69-5.91. I den andra kohorten (TCGA [8]) fann vi ingen SSP som lyckades med detta. Det ska dock noteras att det i TCGA kohorten fanns väldigt få händelser (dödsfall/recidiv) vilket påverkar överlevnadsanalysen negativt. Vid närmare eftergranskning av vår SSP baserad på vår "in-house" immunsignatur så fann vi att alla 5 händelser i TCGA kohorten ändå förekom i den låga immungruppen. Se figur 2 för prestanda av vår SSP baserad på vår "in-house" immunsignatur i de olika dataseten SCAN-B, GOBO och TCGA.



Figur 2. Överlevnadsanalys med olika dataset och endpoints för "in-house" gensignatur. Till vänster SCAN-B träningsdatan (n=291) – IDFS (invasive disease-free survival). I mitten GOBO (n=240) – RFS (relapse-free survival). Till höger TCGA (n=107) – DSS (disease-specific survival).

Vi har nu tagit våra genexpressionssignaturer vidare till validering också i patientmaterial med anti-HER2 behandling. I steg 1 har vi applicerat våra signaturer till HER2-positiva SCAN-B patienter med anti-HER2 behandling från vår studie publicerad i NPJ Breast Cancer 2022 [9]. Från denna studie identifierade vi patienter som inte ingår i träningsdatan och applicerade därefter våra signaturer. Detta identifierade ett antal kandidatsignaturer som nu slutligen även har applicerats på opublicerad Affymetrix baserad genexpressionsdata för cirka 120 patienter från den danska klinisk adjuvant trastuzumab studien DBCG05H [10]. Preliminära analyser visar på att åtminstone 2 utvecklade signaturer verkar vara prognostiska i alla valideringskohorter bortsett från TCGA. Sammanställning av resultat pågår, inklusive multivariata överlevnadsanalyser inkluderandes standard prognostiska variabler. Målsättningen är att sammanställa all data under 2025 för att därefter publicera fynden. Tyvärr har projektet försenats betydligt under delar av 2023 samt hela 2024 på grund av att den biträdande forskare som varit ansvarig för projektet har valt att fokusera helt på en ny karriär som läkare (nu ST-tjänst).

Referenser

- Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al: **Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial.** *Ann Oncol* 2014, **25**:1544-1550.
- Kwon MJ: **Emerging immune gene signatures as prognostic or predictive biomarkers in breast cancer.** *Arch Pharm Res* 2019, **42**:947-961.
- Paquet ER, Hallett MT: **Absolute assignment of breast cancer intrinsic molecular subtype.** *J Natl Cancer Inst* 2015, **107**:357.
- Ringner M, Jonsson G, Staaf J: **Prognostic and Chemotherapy Predictive Value of Gene-Expression Phenotypes in Primary Lung Adenocarcinoma.** *Clin Cancer Res* 2016, **22**:218-229.
- Vallon-Christersson J, Hakkinen J, Hegardt C, Saal LH, Larsson C, Ehinger A, et al: **Cross comparison and prognostic assessment of breast cancer multigene signatures in a large population-based contemporary clinical series.** *Sci Rep* 2019, **9**:12184.
- Fredlund E, Staaf J, Rantala JK, Kallioniemi O, Borg A, Ringner M: **The gene expression landscape of breast cancer is shaped by tumor protein p53 status and epithelial-mesenchymal transition.** *Breast Cancer Res* 2012, **14**:R113.
- Ringner M, Fredlund E, Hakkinen J, Borg A, Staaf J: **GOBO: Gene Expression-Based Outcome for Breast Cancer Online.** *PLoS ONE* 2011, **6**:e17911.

8. Cancer Genome Atlas N: **Comprehensive molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2012, **490**:61-70.
9. Staaf J, Hakkinen J, Hegardt C, Saal LH, Kimbung S, Hedenfalk I, et al: **RNA sequencing-based single sample predictors of molecular subtype and risk of recurrence for clinical assessment of early-stage breast cancer.** *NPJ Breast Cancer* 2022, **8**:94.
10. Jensen JD, Knoop A, Laenkholm AV, Grauslund M, Jensen MB, Santoni-Rugiu E, et al: **PIK3CA mutations, PTEN, and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early-stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab.** *Ann Oncol* 2012, **23**:2034-2042.