

Ocena wyników leczenia dorosłych chorych na mięsaka Ewinga na podstawie danych pochodzących z Kliniki Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie wraz z opracowaniem profilu molekularnego.

Słowa kluczowe: mięsak Ewinga, leczenie, czynniki prognostyczne, diagnostyka, profil molekularny, NGS, terapie celowane

## Wprowadzenie

Mięsak Ewinga jest trzecim co do częstości występowania złośliwym nowotworem kości, który w 80% przypadków dotyczy populacji chorych <20 roku życia (r.ż.). Nowotwór ten może rozwijać się również pozaszkieletowo i ta lokalizacja jest częstsza w grupie pacjentów >18 r.ż. Występowanie mięsaka Ewinga jest częstsze w krajach europejskich (ok 1,5 przypadków na milion dzieci i młodych dorosłych rocznie) czy azjatyckich lub afrykańskich (odpowiednio 0,8 i 0,2 nowych przypadków na milion dzieci rocznie).

W około 90% przypadków w komórkach nowotworowych występują swoiste translokacje między rodzinami genów *TET* i *ETS*, z których najczęstszą jest *EWSR1-FLI* obserwowana w 80-85% przypadków, a drugą w kolejności *EWSR1-ERG* występująca u ok. 15% chorych. Poza charakterystyczną fuzją, w wielu genach obserwuje się dodatkowe patogenne mutacje punktowe, najczęściej są to mutacje utraty funkcji w genach *STAG2*, *TP53* i *CDKN2A*.

Leczenie pacjentów z rozpoznaniem zlokalizowanego mięsaka Ewinga opiera się na wielolekowej chemioterapii indukcyjnej (12–18 tygodni) z następowym leczeniem miejscowym (zabieg chirurgiczny +/- radioterapia lub radioterapia) i chemioterapią konsolidującą łącznie do około 48–52 tygodni. Wprowadzenie leczenia systemowego w latach 60-tych XX wieku pozwoliło na znamienne poprawę 5-letniego czasu przeżycia całkowitego (OS – overall survival) z 10% do 55-65% u pacjentów z chorobą zlokalizowaną. Należy podkreślić, że zastosowanie jedynie leczenia miejscowego z pominięciem chemioterapii w ponad 90% przypadków związane jest z nawrotem choroby. Dlatego ważne jest, aby dokładnie zaplanować proces terapeutyczny poprzedzony wcześniejszą biopsją. Uważa się, że pacjenci z rozpoznaniem mięsaka Ewinga powinni pozostawać pod opieką ośrodków o wyższym stopniu referencyjności doświadczonych w leczeniu tych rzadkich guzów.

W literaturze dostępne są liczne analizy, pokazujące różnice w rokowaniu i w przebiegu choroby w zależności od wieku chorego. Do innych, równie istotnych czynników prognostycznych należą płeć, wielkość, objętość i lokalizacja ogniska pierwotnego choroby oraz wyjściowa aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH, *lactate dehydrogenase*) i hemoglobiny. Szczególnie źle rokującą grupą są pacjenci z chorobą w stadium rozsiewu, gdzie 5-letni OS nie przekracza 20%.

Brak standardów leczenia choroby nawrotowej oraz niesatysfakcjonujące wyniki leczenia drugiej i

kolejnych linii opartych o standardowe chemioterapeutyki zmusza do poszukiwania nowych celów terapeutycznych. Terapie ukierunkowane molekularnie są bardzo obiecującą opcją terapeutyczną w onkologii, ale ich rola jest ograniczona z uwagi na niepełną wiedzę na temat profilu mutacyjnego mięsaka Ewinga, który charakteryzuje się wysoką heterogennością.

Celem niniejszej pracy jest ocena czynników wpływających na przeżycie pacjentów chorych na mięsaka Ewinga o różnym stopniu zaawansowania w różnych grupach wiekowych, a także opracowanie profilu molekularnego z dostępnych preparatów histopatologicznych pochodzących z biopsji, ogniska pierwotnego, a także wznowy/przerzutu. Uzasadnieniem podjęcia tych badań były skąpe i rozbieżne informacje dotyczące czynników prognostycznych w tej jednostce chorobowej, a także ograniczona wiedza dotycząca profilu mutacyjnego.

Rozprawa doktorska powstała w oparciu o trzy tematycznie powiązane artykuły opublikowane w recenzowanych czasopismach w latach 2020-2021 (dodatek stanowią doniesienia konferencyjne prezentowane na zjazdach krajowych i międzynarodowych). Wszystkie prace zawierają opracowania oryginalne danych dotyczących oceny czynników prognostycznych i profilu molekularnego mięsaka Ewinga.

Materiał do analizy stanowiła kohorta chorych na mięsaka Ewinga, którzy byli leczeni w Narodowym Instytucie Onkologii – Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie oraz w Instytucie Matki i Dziecka w Warszawie w latach 1998-2018. W toku badań przeprowadzono:

- Analizy statystyczne klinicznych czynników prognostycznych z uwzględnieniem podgrup wiekowych.
- Sekwencjonowanie nowej generacji dostępnego materiału histopatologicznego w celu oceny występowania mutacji w wybranych genach.

Chronologicznie pierwsza z publikacji pt. „*The clinical prognostic factors and treatment outcomes of adult patients with Ewing sarcoma*” dotyczy czynników prognostycznych mających wpływ na OS i czas wolny od progresji choroby (PFS – progression free survival) w grupie dorosłych pacjentów >18 r.ż.

Druga praca pt. „*Age as a Prognostic Factor in Patients with Ewing Sarcoma-The Polish Sarcoma Group Experience.*” dotyczy analizy wieku jako czynnika prognostycznego, a także przedstawiono w niej zależności między wiekiem chorego a innymi czynnikami klinicznymi.

Ostatnia publikacja pt. „*Mutational landscape of primary and recurrent Ewing sarcoma.*” skupia się na określeniu występowania wybranych mutacji w materiale tkankowym

pochodzącym z biopsji, ogniska pierwotnego po indukcyjnym leczeniu chemioterapią oraz z ogniska wznowy/przerzutu ocenianych za pomocą sekwencjonowania nowej generacji .

## **Streszczenia prac wchodzących w skład cyklu prac rozprawy doktorskiej**

### ***Artykuł 1: The clinical prognostic factors and treatment outcomes of adult patients with Ewing sarcoma.***

Mięsak Ewinga jest rzadkim rodzajem agresywnego nowotworu, który może występować zarówno w kościach, jak i tkankach miękkich. Standardem leczenia jest podejście wielodyscyplinarne z zastosowaniem chemioterapii oraz leczenia miejscowego pod postacią radioterapii i chirurgii. Biorąc pod uwagę, że choroba ta najczęściej występuje wśród dzieci i młodzieży, dane na temat wyników leczenia u dorosłych pacjentów są ograniczone. Celem mojej pracy była analiza czynników prognostycznych i wyników leczenia w grupie chorych  $\geq 18$  r.ż.

Do pracy włączyłam 180 pacjentów  $\geq 18$  r.ż. z rozpoznaniem mięsakiem Ewinga leczonych w latach 2000 - 2018 w Narodowym Instytucie Onkologii – Państwowym Instytucie Badawczym im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. U 50 chorych (28%) leczenie rozpoczęto poza naszym ośrodkiem, a u 23 pacjentów z tej grupy wdrożenie terapii było opóźnione o minimum 3 miesiące od daty biopsji/nieplanowanej operacji. W czasie prowadzonych analiz oceniałam wpływ wstępnego leczenia na OS i PFS a także wpływ na ostateczne wyniki leczenia takich czynników jak wiek, płeć, lokalizację ogniska pierwotnego czy wyjściowe zaawansowanie choroby. Do analizy statystycznej wykorzystałam estymator Kaplana-Meiera, logarytmiczny test rang i model proporcjonalnego hazardu Coxa.

Wyniki: W analizowanej grupie dominowali pacjenci płci męskiej (110 osób – 61%). Mediana wieku wynosiła 28 lat (18-67 lat), lokalizacja osiowa ogniska pierwotnego choroby dotyczyła 114 chorych (63%), a u 107 chorych (59%) miejscem wyjścia nowotworu była kość. Przerzuty w momencie rozpoznania wykryto u 51 chorych (28%). 5-letni OS wynosił 65% dla pacjentów z chorobą miejscowo zaawansowaną i 15% dla pacjentów z chorobą uogólnioną. Obecność i liczba przerzutów oraz rodzaj zastosowanego leczenia były istotnym, niezależnym czynnikiem rokowniczym. Innym czynnikiem mającym wpływ na OS była częstotliwość podawania chemioterapii (tzw. gęstość dawki), która była uzależniona od tolerancji leczenia (zależność to wykazywała trend statystyczny na poziomie  $p = 0,098$ ). Istotnie lepsze statystycznie wyniki leczenia pod kątem 5-letniego PFS uzyskali chorzy leczeni od początku

w ośrodku referencyjnym lub skierowani do ośrodka referencyjnego w ciągu 3 miesięcy od daty biopsji, aniżeli chorzy leczeni pierwotnie poza ośrodkiem referencyjnym; 5-letnie wskaźniki PFS wynosiły odpowiednio 28 i 13%;  $p < 0.001$

Wnioski: Około 2/3 dorosłych chorych na zlokalizowanego mięsaka Ewinga przeżywa mniej niż 5 lat. Na poprawę rokowania ma wpływ wielodyscyplinarne podejście do leczenia zgodnie z obowiązującymi standardami i powinno być prowadzone w ośrodku referencyjnym.

**Artykuł 2. *Age as a Prognostic Factor in patients with Ewing Sarcoma-The Polish Sarcoma Group Experience.***

Dane porównujące wyniki leczenia mięsaka Ewinga w zależności od wieku są ograniczone. Na podstawie analiz retrospektywnych przypuszcza się, że pacjenci dorośli mają gorsze rokowanie niż dzieci. Duży wpływ na gorsze wyniki leczenia mają niekorzystne czynniki rokownicze, których w przewadze obserwuje się w populacji pacjentów dorosłych.

Przeanalizowałam dokumentację medyczną 569 pacjentów z rozpoznaniem mięsaka Ewinga leczonych w latach 1998-2018 w dwóch ośrodkach referencyjnych, należących do Polskiej Grupy Mięsakowej. 211 pacjentów było leczonych w Narodowym Instytucie Onkologii – Państwowym Instytucie Badawczym im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, a 358 w Instytucie Matki i Dziecka w Warszawie. Chorych podzieliłam na cztery grupy wiekowe ( $\leq 10$  lat; 11-18 lat; 19-25, i  $> 25$ ). W każdej grupie wiekowej oceniałam wyniki leczenia i występowanie czynników uznanych za prognostyczne. Do analiz statystycznych wykorzystałam test  $\chi^2$ , estymator Kaplana-Meiera, logarytmiczny test rang oraz wieloczynnikowy model Coxa.

Wyniki: W całej grupie 5 - letni OS wyniósł 56%. W podgrupach wiekowych:  $\leq 10$  lat, 11-18 lat, 19-25 lat i  $> 25$  lat, 5-letnie OS wyniosły odpowiednio 75%, 58%, 41% i 52% ( $p < 0.001$ ). Wykazałam w pracy, że korzystne czynniki prognostyczne to płeć żeńska ( $p = 0,024$ ), lokalizacja pozaosiowa ( $p = 0,005$ ), zastosowanie chemioterapii wg protokołu VIDE w porównaniu z innymi schematami tj. EI/AC, VADRIAC/EIAO, EVAIA, EI ( $p < 0,001$ ) oraz przeprowadzenie resekcji chirurgicznej ogniska pierwotnego ( $p < 0,001$ ). Czynniki prognostyczne mające wpływ na korzystne rokowanie dominowały w grupie  $\leq 10$ , a w grupie pacjentów  $> 10$  r.ż. częściej występowały czynniki pogarszające rokowanie. W analizie wieloczynnikowej niekorzystne czynniki rokownicze związane z OS to płeć męska (HR = 1,53, CI 1.17-1.99), lokalizacja osiowa (HR = 1,46, CI 1.12-1.90), występowanie

przerzutów odległych w momencie rozpoznania (HR = 2,64, CI 2.05-3.41) oraz wiek chorego > 10 lat (HR = 2,29, CI 1.41-3.72).

Wnioski: Wyniki leczenia mięsaka Ewinga są najlepsze u dzieci poniżej 10 r.ż. Dużym wyzwaniem jest leczenie młodzieży i młodych dorosłych, także w kontekście występowania u nich częściej niż u pacjentów młodszych czynników związanych z niekorzystnym rokowaniem. Aby poprawić wyniki leczenia chorzy na mięsaka Ewinga powinni być diagnozowani i leczeni w ośrodkach referencyjnych.

### **Artykuł 3. *Mutational landscape of primary and recurrent Ewing sarcoma.***

Mięsak Ewinga charakteryzuje się obecnością fuzji genetycznej obejmującej gen *EWSRI*. U ponad jednej trzeciej chorych dochodzi do rozwoju przerzutów odległych, co wiąże się z niekorzystnym rokowaniem. Wiedza na temat uwarunkowań genetycznych choroby może przyczynić się do postępu w stosowaniu terapii celowanych w leczeniu mięsaka Ewinga.

Celem pracy była ocena profilu mutacyjnego w materiale histopatologicznym pochodzącym z biopsji, z ogniska pierwotnego po zastosowaniu chemioterapii neoadjuwantowej oraz w materiale pochodzącym z przerzutów lub ze wznowy choroby dzieci i dorosłych leczonych w ośrodkach referencyjnych w Warszawie. Do badania zakwalifikowałam 22 pacjentów (17 dorosłych, 5 dzieci) z rozpoznaniem mięsaka Ewinga. Pozyskałam 39 próbek tkankowych których materiał genetyczny oceniany był za pomocą sekwencjonowania nowej generacji (ang. Next Genomic Sequencienig, NGS) z wykorzystaniem panelu Oncomine Comprehensive Assay v3gene. Analizę statystyczną wykonano za pomocą testu Fishera. W celu porównania profilu mutacyjnego pomiędzy tkanką pochodzącą z biopsji i ogniska pierwotnego po chemioterapii indukcyjnej policzono stosunek liczby mutacji w tkance z guza pierwotnego do liczny mutacji w tkance z biopsji (porównywano pary blozków). Obliczone proporcje wykorzystano do analizy funkcjonalnej, wykonanej przy użyciu oprogramowania GSEA na zbiorach Hallmark i Reactome. Uwzględniono tylko zestawy genów >5. Za istotne statystycznie uznano wyniki, których współczynnik FDR (false discovery rate) wynosił <25% oraz z wartością p value <0.05. Obciążenie mutacyjne (ang. Tumor Mutational Burden, TMB) obliczono przy użyciu biblioteki GenVisR (wersja 1.6.3).

Wyniki: Wszystkie próbki tkankowe charakteryzowały się niskim obciążeniem mutacyjnym guza, które nie przekraczało <10 mut/Mb. Najczęściej zmutowanymi genami były *PIK3R1* (59%) i *POLE* (50%). Najczęściej wykrywanymi wariantami w próbkach biopsyjnych były *PIK3R1 T369I* (50%), *FGFR1 E159K* i *TP53* w kodonie 72 (oba w 27,3%). Dodatkowo, geny *ATR*, *BRCAl*, *RAD50*, *ATM*, *CHEK1* i *NBN* wykazywały znaczącą nadreprezentację mutacji

w tej grupie. Mutacje w *PIK3RI* były istotnie częstsze u dorosłych, natomiast mutacje w szlakach odpowiedzialnych za kontrolę cyklu komórkowego, naprawę DNA i regulację transkrypcji były częstsze u dzieci.

Wnioski: Poza fuzją *EWSRI*, mięsak Ewinga charakteryzuje się licznymi mutacjami punktowymi, które są potencjalnym celem dla leków ukierunkowanych molekularnie z wykorzystaniem agnostycznego podejścia do kwalifikacji terapeutycznej. Jednocześnie w mięsaku Ewinga potwierdziłam znaczą heterogenność genomową, która może tłumaczyć różnice w wynikach leczenia pacjentów.

### **Podsumowanie i wnioski**

Na rokowanie pacjentów z rozpoznaniem mięsaka Ewinga mają wpływ różne czynniki prognostyczne, jednym z nich jest wiek chorego. W populacji pediatrycznej obserwuje się znacznie częściej mniejszą kumulację niekorzystnych czynników mających wpływ na rokowanie niż w grupie pacjentów powyżej 18 roku życia. Poprawa wyników leczenia pacjentów możliwa jest dzięki zidentyfikowaniu nowych celów terapeutycznych a także modelu prognostycznego umożliwiającego indywidualizację leczenia chorych.

Wyniki publikacji wchodzących w skład niniejszej pracy doktorskiej pozwalają na wyciągnięcie następujących zbiorczych wniosków:

Ad. 1 Analiza wieloczynnikowa danych pochodzących od pacjentów  $\geq 18$  roku życia wykazała, że do istotnych, niezależnych czynników prognostycznych, mających wpływ na OS należą: obecność oraz ilość zmian przerzutowych w momencie rozpoznania choroby oraz osiowa lokalizacja zmiany pierwotnej, ponadto opóźnienie rozpoczęcia leczenia o  $>3$  miesiące od rozpoznania choroby znacząco pogarsza rokowanie pacjentów.

Ad. 2. Występowanie poszczególnych czynników rokowniczych znacząco różni się w podgrupach wiekowych pacjentów. Analiza wieloczynnikowa danych pochodzących od dorosłych i pediatrycznych chorych wykazała, że do niezależnych czynników o złym rokowaniu należy płeć męska, osiowa lokalizacja ogniska pierwotnego, występowanie przerzutów w momencie rozpoznania oraz zastosowanie schematu chemioterapii innego niż VIDE. Powyższe czynniki rokownicze dominowały w grupie pacjentów  $>10$  roku życia i mają bezpośredni wpływ na gorszy OS.

Ad. 3. Profil mutacyjny mięsaka Ewinga jest heterogeny, a wiedza na ten temat jest znacznie ograniczona. Niniejsza analiza pokazała, że pomimo niskiego obciążenia mutacyjnego mięsaka Ewinga, wykrywano są liczne prawdopodobnie patogenne warianty w genach

supresorowych i regulatorowych. Niektóre z tych mutacji mogą pełnić rolę markera prognostycznego lub predykcyjnego. Kierunek medycyny precyzyjnej w kontekście mięsaka Ewinga wymaga dalszych badań.

Zgodnie z obowiązującymi rekomendacjami leczenie chorych na mięsaka Ewinga powinno mieć miejsce w ośrodkach referencyjnych, w których jest dostęp do odpowiedniej diagnostyki jak również wiedzy eksperckiej i badań klinicznych z innowacyjnymi terapiami. Ważna jest także współpraca między ośrodkami pediatrycznymi i zajmującymi się chorymi dorosłymi z uwagi na konieczność zapewnienia kontynuacji opieki a także wymiany doświadczeń oraz prowadzenia wspólnie prac badawczych w tym rzadko występującym, ale bardzo agresywnym nowotworze.