

Paulina Gapska, Paweł Stajno, Roman Sosnowski,
Tomasz Demkow, Maciej Wieczorek, Aleksandra Stańczak

Wykorzystanie nowoczesnych biomarkerów w diagnostyce i leczeniu raka pęcherza moczowego na przykładzie szlaku FGFR3

Rak pęcherza

Rak pęcherza moczowego (*bladder cancer* – BCa) jest jednym z najczęstszych współcześnie występujących nowotworów stanowiących istotne wyzwanie kliniczne. W Polsce w 2015 roku stwierdzono 6898 nowych przypadków tej choroby (5. miejsce pod względem zachorowalności na nowotwory złośliwe u mężczyzn i 14. u kobiet). Jest on trzykrotnie bardziej powszechny u mężczyzn niż u kobiet i rzadko jest rozpoznawany przed 40. rokiem życia [1].

Rak pęcherza moczowego nienaciekający mięśniówki (*non-muscle invasive bladder cancer* – NMIBC) (Ta, T1 i rak *in situ* – CIS) stanowi najczęstsze stadium zaawansowania wśród nowych rozpoznań (75–85%) [2]. Nawrót choroby występuje u prawie 80% pacjentów z grupy NMIBC i jest głównym problemem dla chorych w stopniu Ta, natomiast nawrót i progresja choroby występują u 30% pacjentów i stanowią główne zagrożenie dla pacjentów w stopniu klinicznym T1 lub CIS [2]. W grupie chorych z NMIBC dobór właściwego narzędzia prognostycznego ma istotny wpływ na proces terapeutyczny w zakresie schematu aktywnego nadzoru i kwalifikacji do leczenia uzupełniającego (wlewki dopęcherzowe).

Precyzyjne narzędzia predykcyjne mogą pomóc w przewidywaniu ryzyka progresji u pacjentów z NMIBC wysokiego ryzyka, umożliwiając w ten sposób wybór właściwej terapii – np. wczesnej radykalnej cystektomii (*radical cystectomy* – RC), lub terapii dopęcherzowej, np. wlewki *Bacillus Calmette-Guerin* (BCGth) [3]. Inne zastosowanie narzędzi predykcyjnych w grupach pacjentów z NMIBC wysokiego ryzyka i chorych z naciekającym mięśniówką rakiem pęcherza moczowego (*muscle invasive bladder cancer* – MIBC) ma na celu oszacowanie ryzyka występowania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (LN) lub prawdopodobieństwa nawrotu choroby. Fakt ten może stanowić istotną wskazówkę przy wyborze dodatkowego leczenia, np. neoadjuwantowej chemioterapii [3].

Aby przewidzieć krótko- (po 1 roku) i długoterminowe (po 5 latach) prawdopodobieństwo nawrotu cho-

roby i progresji, European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Genito-Urinary Cancers Group opracowała narzędzia (tabele) prognostyczne [4]. Narzędzia te stworzono w oparciu o bazę danych pochodzących od 2596 pacjentów, u których zdiagnozowano raka pęcherza moczowego w stadium Ta/T1. Pacjenci z rozpoznaniem wyłącznie CIS nie zostali włączeni do próby. Siedemdziesiąt osiem procent pacjentów poddano leczeniu dopęcherzowemu, w większości chemioterapii. Nie przeszli oni powtórnej resekcji ani nie otrzymali podtrzymującej BCGth. Podobne narzędzie predykcyjne stanowiące model punktacji przewidujący nawrót choroby i progresję opracowane zostało przez The Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico (CUETO) w oparciu o dane pochodzące od 1062 pacjentów z NMIBC leczonych wlewkami BCG [5].

Rak pęcherza moczowego naciekający błonę mięśniową cechuje się znacznie gorszym rokowaniem niż NMIBC. Spośród pacjentów z zajętej mięśniówką w momencie rozpoznania u 10–15% stwierdza się odległe przerzuty [6]. W przypadku wykrycia MIBC bez przerzutów (cN0cM0) podstawową metodą postępowania jest radykalna cystektomia.

W przypadku choroby przerzutowej stosowana jest chemioterapia paliatywna oparta na cisplatynie [7]. Odpowiedź na takie leczenie uzyskiwana jest w około 50% przypadków, jednakże mediana czasu przeżycia w tej grupie pacjentów wynosi około 14 miesięcy [6, 8].

Obecnie podejmowanie decyzji terapeutycznych i oszacowanie rokowania w BCa wciąż opiera się w dużej mierze na klinicznym i patologicznym zaawansowaniu guza, stanie regionalnych węzłów chłonnych i występowaniu przerzutów odległych [9]. Narzędzia predykcyjne, których zadaniem jest oszacowanie ryzyka nawrotu, progresji miejscowej czy rozwoju przerzutów odległych nowotworu mają umiarkowaną czułość i swoistość. W związku z tym w ostatnich latach badacze poszukują nowych narzędzi, między innymi biomarkerów, które w połączeniu z wyżej wymienionymi parametrami umożliwiłyby precyzyjniejszą predykcję przebiegu choroby nowotworowej [10].

Biomarkery

Nowoczesne modele predykcyjne coraz częściej poza oceną stadium zaawansowania klinicznego i patologicznego zawierają markery molekularne (biomarkery), które w istotny sposób pomagają w podjęciu właściwej decyzji terapeutycznej. W ostatnich latach zidentyfikowano wiele biomarkerów odgrywających istotną rolę w szlakach molekularnych komórek raka pęcherza moczowego, między innymi onkogeny, geny supresorowe, czynniki wzrostu, receptory hormonalne, geny odpowiedzialne za apoptozę, markery proliferacji oraz cząsteczki adhezji komórkowej.

Szlaki molekularne w kancerogenezie BCa można podzielić na 4 różne poziomy: 1. Zmiany na poziomie chromosomów, obejmujące ich anomalie numeryczne i/lub strukturalne; 2. Zmiany na poziomie genu (mutacje genowe); 3. Zaburzenia ekspresji genów oraz 4. Zaburzenia ekspresji białek regulatorowych [10]. Wiele biomarkerów badano pod kątem ich roli w procesach powstawania, rozwoju oraz progresji raka pęcherza moczowego. Wśród nich istotną rolę odgrywają białka wpływające na ekspresję onkogenów, genów supresorowych, regulatorów cyklu komórkowego, czynników wzrostu i cząsteczek adhezji komórkowej [13, 14].

Heterogenna ekspresja biomarkerów pozostaje jednak ważnym ograniczeniem przy ich włączaniu do codziennej praktyki klinicznej. Pomimo coraz powszechniej stosowanej tzw. diagnostyki molekularnej wśród różnych nowotworów wciąż w aspekcie raka pęcherza moczowego postępowanie takie nie jest rutynowe. Wyniki badań ostatnich lat ukazują postęp w tej dziedzinie, a w szczególności w aspekcie tzw. terapii celowanej w raku pęcherza moczowego i pozwalają mieć nadzieję na jej dalszy rozwój w odniesieniu do zmniejszenia istotnej częstotliwości nawrotów NMIBC czy poprawy niskiej skuteczności leczenia przerzutowego raka pęcherza moczowego [11]. Prace te ujawniły zasadnicze różnice na poziomie molekularnym między NMIBC i MIBC oraz umożliwiły określenie nowych sposobów predykcji przebiegu choroby czy możliwości wdrożenia terapii w oparciu o nowo poznane aspekty biologii BCa. Wśród nich najistotniejsze klinicznie wydają się być wyniki badań dotyczących szlaku związanego z receptorami dla czynników wzrostu fibroblastów – FGFR [12].

Szlak FGFR3

Zarówno doniesienia literaturowe, jak i dane dostępne w bazie mutacji somatycznych (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer – COSMIC), dowodzą, że gen *FGFR3* należy do najlepiej przebadanych genów w materiale pochodzącym z pęcherza moczowego.

W bazie COSMIC pod względem występowania mutacji w raku pęcherza moczowego, gen *FGFR3* zajmuje drugie miejsce (35%), zaraz za genem *PTEN*, w obrębie którego mutacje zostały wykryte aż w 54% materiału histologicznego pochodzącego z nowotworu pęcherza moczowego. Kolejne geny, w obrębie których mutacje występują z wysoką częstością w raku pęcherza moczowego, to: *TP53* (28%), *STAG2* (16%), *KDM6A* (16%), *PIK3CA* (15%), *CDKN2A* (12%) oraz *ARID1A* (11%) [15, 16, 17].

Czynniki wzrostu fibroblastów (*fibroblast growth factors* – FGFs) są rodziną liczącą obecnie 22 polipeptydy, których masa molekularna wynosi 17–34 kDa. Szlak FGFR odgrywa istotną rolę zarówno w trakcie embiogenezy, jak i w proliferacji, różnicowaniu oraz migracji komórek dorosłego organizmu, angiogenezie i (w przypadku zaburzonej sygnalizacji) w nowotworzeniu. W przeciwieństwie do licznych (18) ligandów (FGF) istnieją tylko cztery ludzkie receptory FGFR, oznaczone kolejno, tj. FGFR 1–4. Wszystkie FGFR cechują się podobną budową – składają się z fragmentu zewnątrzkomórkowego z trzema domenami immunoglobulinopodobnymi, z hydrofobowej domeny przezłonowej oraz z części wewnątrzkomórkowej, będącej kinazą tyrozynową.

Wiązanie czynników wzrostu fibroblastów do FGFR indukuje jego dimeryzację w części błonowej, co skutkuje powstaniem zmian konformacyjnych w obrębie jego struktury. Zmiany te z kolei prowadzą do autofosforylacji w obrębie cytoplazmatycznej domeny kinazowej [18, 19, 20]. Następnie zaktywowane FGFR są miejscem wiązania białek sygnałowych oraz pomocniczych, które po przyłączeniu do receptora ulegają fosforylacji. Proces ten zapoczątkowuje kaskadę przekazywania sygnału w komórce oraz transkrypcji odpowiednich genów [21]. Efektem tych procesów jest indukcja szlaków Ras/Raf/MEK1/2/ERK1/2 oraz PI3K-AKT, do której dochodzi za pośrednictwem białek adaptorowych FRS2 (*FGFR substrate 2*), GRB2 (*growth factor receptor-binding protein 2*) oraz SOS (*son of sevenless*), bądź aktywacja kinazy białkowej C (*protein kinase C* – PKC) poprzez fosfolipazę C gamma (*phosphoinositide phospholipase C γ* – PLC γ) [22].

Aberracje genów *FGFR1–4*

Wyniki badań przeprowadzonych przez Helstena i współpracowników w 2015 roku na grupie 4835 pacjentów z chorobą nowotworową różnych narządów, z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS), stanowią reprezentatywne źródło informacji dotyczących aberracji genów *FGFR1–4*. Dane te prezentują zarówno rodzaj, jak

i częstość występowania poszczególnych aberracji w obrębie genów *FGFR1–4*, z uwzględnieniem lokalizacji nowotworu [23]. W cytowanym badaniu aberracje *FGFR1–4* wykryto u 360 spośród 4853 przebadanych pacjentów, co stanowi 7,1% grupy objętej badaniem. Najwięcej zmian odnotowano w obrębie genu *FGFR1* (49%) oraz *FGFR3* (26%), nieco mniej w *FGFR2* (19%), najmniej zaś w genie *FGFR4* (7%).

Spośród wszystkich wykrytych aberracji (*FGFR 1–4*) amplifikacje genu występowały z najwyższą częstością na poziomie 66%, mutacje stanowiły 26%, a najmniej liczne okazały się rearanżacje, które pojawiły się w 8% wszystkich zidentyfikowanych zmian [23].

Najwięcej aberracji wykryto w obrębie genu *FGFR1*, z czego większość z nich stanowiły amplifikacje genu (89%). Wysoki stopień amplifikacji wykazano również w przypadku genu *FGFR4* (78%). Mutacje stanowiły największy odsetek zmian w genach *FGFR3* oraz *FGFR2*. Ponadto geny *FGFR2* i *FGFR3* cechowała najwyższa częstość rearanżacji, które stanowiły odpowiednio 16% oraz 19% wszystkich wykrytych aberracji [23].

Nowotwory pęcherza moczowego charakteryzowała najwyższa częstość występowania genetycznych aberracji w obrębie genów *FGFR*. Spośród przebadanej grupy pacjentów zmiany w obrębie genów *FGFR1–4* wykryto u 32% chorych ze zdiagnozowanym nowotworem urotelialnym. Kolejne grupy pacjentów onkologicznych, u których aberracje *FGFR* występowały z wysoką częstością, to nowotwory następujących narządów: piersi (18%), trzonu macicy (13%), płuca (13%) oraz jajnika (9%) [23].

Z przedstawionych przez Helstena wyników (potwierdzonych przez kolejnych badaczy) wynika, że większość zmian wykrytych w obrębie grupy pacjentów z nowotworami urotelialnymi to aktywujące mutacje genu *FGFR3* [10, 19, 26, 28, 30–35]. Stanowiły one 15% wszystkich przebadanych przypadków. Amplifikację genu *FGFR1* odnotowano u 7%, zaś rearanżacje u 6% pacjentów z nowotworami urotelialnymi włączonych do badania [23].

Gen *FGFR3*

Gen *FGFR3* kodujący receptor czynnika wzrostu fibroblastów typu 3. (*fibroblast growth factor receptor 3 – FGFR3*, OMIM ID*134934) zmapowany został w obrębie krótkiego ramienia chromosomu 4. (locus 4p16.3) [25]. Zbudowany jest on z 19 eksonów (4,2 kb) oraz 18 regionów intronowych (11 kb), pozostałe 1,5 kb obejmuje region nieulegający translacji (5' – UTR)

oraz sekwencję promotorową genu. Białko kodowane przez gen *FGFR3* składa się z 807 aminokwasów. Kodon inicjujący proces translacji (kodon start – 5' ATG) zlokalizowany jest w środkowej części eksonu 2., podczas gdy kodon terminujący (kodon stop – TGA) znajduje się w początkowej części eksonu 19. [26].

W obrębie całej rodziny receptorów *FGFR* (*FGFR1–4*) występuje zjawisko alternatywnego składania mRNA (*alternative splicing*), prowadzące do powstania różnych izoform kodowanego białka [27]. Region genu *FGFR3* objęty alternatywnym splicingiem to III domena immunoglobulinopodobna – IgIII. W przypadku genu *FGFR3* w wyniku opisanego procesu powstają dwie izoformy: IIIb (obejmująca ekson 7. oraz 8.) i IIIc (ekson 7. oraz 9.) [28]. Dowiedziono, iż izoformy te są specyficzne tkankowo – izoforma IIIb powstaje w tkankach pochodzenia epitelialnego, podczas gdy druga izoforma – IIIc jest pochodzenia mezenchymalnego [29, 30]. Ponadto izoforma *FGFR3c* ma szersze powinowactwo do ligandów FGF (m.in. FGF 1, 2, 4), w porównaniu do izoformy *FGFR3b*, mającej wysokie powinowactwo jedynie do FGF1 [27].

Mutacje genu *FGFR3*

Do tej pory zidentyfikowano ponad 3500 mutacji/polimorfizmów w obrębie genu *FGFR3*, z czego ponad 700 zmian zlokalizowanych jest w jego części kodującej [31].

Najczęściej występujące mutacje *FGFR3* sklasyfikowano na podstawie ich lokalizacji w obrębie kodowanego białka receptora. Do najczęściej występujących mutacji genu *FGFR* należą zmiany położone w obrębie zewnątrzkomórkowego regionu immunoglobulinopodobnego (IgII–IgIII) (R248C, S249C), obszaru transbłonowego (G370C, Y373C, A391E) oraz wewnątrzkomórkowej domeny kinazowej (K650E/M). Wybrane mutacje występują w szeregu nowotworów różnych narządów (pęcherz moczowy, szyjka macicy, głowa oraz szyja, płuco), a także w nowotworach hematologicznych (szpiczak mnogi) [24].

Większość zidentyfikowanych dotychczas somatycznych aberracji genu *FGFR3* to zmiany typu *gain-of-function* prowadzące do aktywacji kodowanego receptora.

Najbardziej powszechnym mechanizmem aktywacji receptora jest substytucja typu *missense* (substytucja aminokwasu), prowadząca do wprowadzenia pojedynczej, niesparowanej cysteiny (np. R248C, S249C, G370C, Y373C, S433C, R399C, G697C), co skutkuje niezależną od ligandu aktywacją receptora poprzez tworzenie wiązań dwusiarczkowych [32, 33].

Innym mechanizmem prowadzącym do aktywacji receptora są mutacje w jego wewnątrzkomórkowej domenie kinazowej, w obrębie motywu YYKK, będącego głównym miejscem autofosforylacji receptora [24]. Oprócz szeregu opisanych mutacji aktywujących poznane zostały również zmiany wywierające hamujący wpływ na receptor FGFR3. Do najczęściej opisywanych mutacji inaktywujących należą następujące zmiany: D617G oraz G637W [34].

Mutacje *FGFR3* w nowotworach pęcherza moczowego

Istnieje szereg doniesień literaturowych opisujących częstość występowania mutacji w obrębie genu *FGFR3* w raku pęcherza moczowego. Dane te wskazują na szeroką rozpiętość uzyskiwanych wyników niezależnie od populacji objętej badaniem oraz liczebności poszczególnych grup pacjentów.

Jednakże istnieje tendencja wskazująca na znacznie wyższą częstość występowania mutacji *FGFR3* w grupie pacjentów z mniej zaawansowaną postacią choroby w porównaniu do przypadków zaawansowanych (NMIBC (pTa-1) vs MIBC (pT2-4)) [35].

Christensen wraz ze współpracownikami, objawszy badaniem grupę 363 pacjentów z nieinwazyjną formą choroby (NMIBC) oraz 764 przypadki zaawansowane poddane cystektomii (MIBC), wykazał występowanie mutacji *FGFR3* w przebadanym materiale na poziomie odpowiednio 25,34% oraz 12,31% [36].

Dowiedziano również, iż częstość występowania mutacji genu *FGFR3* znacząco spada wraz ze wzrostem stopnia złośliwości nowotworu (*low grade vs high grade*). Opisane zależności zostały potwierdzone w szeregu kolejnych przeprowadzonych badań [37, 38, 39].

Jednakże, pomimo różnic w częstości występowania poszczególnych zmian, czołówka najczęściej wykrywanych mutacji pozostaje niezmienna [23, 36, 37, 39–45].

Doniesienia te są spójne z informacjami dostępnymi w bazie danych mutacji somatycznych – COSMIC, która opiera się na wynikach badań przeprowadzonych na grupie 9140 przypadków zachorowań na raka pęcherza moczowego. Mutacje w obrębie genu *FGFR3* zostały wykryte u 35,66% pacjentów, z czego 99,54% (3244/3259) zidentyfikowanych mutacji stanowiły substytucje typu *missense*. Najczęściej wykrywane mutacje to następujące zmiany: S249C (14,56%), Y373C (4,71%), R248C (2,10%) oraz G370C (1,25%) [15].

Mutacje *FGFR3* w nowotworach urotelialnych innych niż rak pęcherza moczowego

Mutacje genu *FGFR3* wykrywane są również w innych nowotworach urotelialnych. Doniesienia z bazy COSMIC wskazują na występowanie mutacji R248C, S249C oraz Y373C zarówno w raku miedniczki nerkowej, jak i moczowodu. Ponadto odnotowano pojedyncze przypadki mutacji w kodonie numer 370 w raku miedniczki nerkowej oraz substytucji w pozycji 650 w moczowodzie. Wszystkie wykryte mutacje to substytucje typu *missense* i stanowią one kolejno 15,31% (15/98) przebadanych przypadków raka miedniczki nerkowej oraz 13,08% (17/130) zachorowań na raka moczowodu [15].

W doniesieniach literaturowych dostępne są również informacje potwierdzające występowanie mutacji genu *FGFR3* w nowotworach miedniczki nerkowej oraz moczowodu. Van Oers wraz ze współpracownikami, przebadawszy grupę 80 pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem miedniczki nerkowej oraz 63 przypadki zachorowań na raka moczowodu, wykrył odpowiednio 39% i 59% mutacji aktywujących *FGFR3* w przebadanym materiale. Najczęściej wykrywane mutacje stanowią niezmiennie: R248C, S249C oraz Y375C (Y373C – izoforma IIIc) [37].

Rearanżacje genu *FGFR3*

Poza opisanymi aktywującymi mutacjami somatycznymi genu *FGFR3*, kolejnym opisanym mechanizmem prowadzącym do aktywacji kinaz tyrozynowych jest zjawisko rearanżacji, prowadzące do powstania białek fuzyjnych. Do najczęściej występujących partnerów fuzyjnych genu *FGFR3* należy gen *TACC3*, ze względu na wspólną lokalizację w obrębie chromosomu 4. (4p16), oraz gen *BAIAP1*.

Powstanie białek fuzyjnych umożliwia dimeryzację receptora FGFR oraz autofosforylację jego domeny kinazowej, prowadząc do aktywacji szlaku FGFR, w szczególności PI3K/AKT, MAPK oraz JAK/STAT, skutkując zwiększoną proliferacją komórek oraz progresją choroby nowotworowej [24].

Informacje dostępne w bazie COSMIC potwierdzają wykrycie najczęściej opisywanej translokacji *FGFR3-TACC3* u dwóch pacjentów z rakiem pęcherza moczowego. Ponadto odnotowano występowanie czterech innych translokacji z udziałem genu *FGFR3* oraz *TACC3*, a także jeden przypadek *FGFR3-BAIAP2L1*. Nie potwierdzono występowania rearanżacji genu *FGFR3* w przypadku innych nowotworów urotelialnych, takich jak raka miedniczki nerkowej czy też moczowodu [15].

Najnowsze doniesienia literaturowe również wskazują na niską częstość występowania rearanżacji *FGFR3* w nowotworach urotelialnych. Helsten wraz ze współpracownikami opisał częstość występowania genów fuzyjnych *FGFR3-TACC3* w materialne nowotworowym pochodzenia urotelialnego na poziomie 3,17%. Przebadawszy 126 pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem urotelialnym, występowanie genów fuzyjnych *FGFR3-TACC3* potwierdzono tylko w 4 przypadkach [23].

Markery prognostyczne oraz predykcyjne

Doniesienia literaturowe wskazują na zarówno prognostyczną, jak i predykcyjną rolę mutacji *FGFR3* w nowotworach pęcherza moczowego.

Hernandez wraz ze współpracownikami, przebadawszy grupę 772 przypadków NMIBC, wyznaczył współczynnik ryzyka (*hazard ratio* – HR) progresji choroby, wystąpienia wznowy oraz śmiertelności, w zależności od profilu molekularnego *FGFR3*. Dowiedziano, że grupę pacjentów, u których wykryto obecność somatycznych mutacji genu *FGFR3*, charakteryzowała zmniejszone ryzyko śmiertelności (HR = 0,79; 95% CI: 0,35–1,77) oraz progresji choroby (HR = 0,99; (95% CI: 0,52–1,86) w porównaniu do pacjentów bez mutacji *FGFR3*. Ponadto, występowanie somatycznych mutacji *FGFR3* związane było z około 1,5-krotnie zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby (HR = 1,53; 95% CI: 1,18–1,97; $p = 0,001$) [39].

Podobnie w kolejnym badaniu przeprowadzonym na grupie 98 pacjentów ze zdiagnozowanych nowotworem pęcherza moczowego (pTa–pT4), u których nie wykryto mutacji *FGFR3*, współczynnik śmiertelności był prawie 1,5 razy wyższy (HR = 1,4; 95% CI: 0,5–3,5; $p = 0,53$) w porównaniu do grupy pacjentów z wykrytą mutacją genu *FGFR3*. Wskaźnik 5-letniego przeżycia wynosił odpowiednio 52% oraz 82%. W przypadku innych nowotworów urotelialnych wskaźnik ten określono na poziomie: 35% w grupie nowotworów moczowodu bez mutacji *FGFR3*, 75% w grupie chorych z mutacją oraz odpowiednio 50% i 79% w grupie zachorowań na raka miedniczki nerkowej [37].

Badania przeprowadzone w podgrupie 126 przypadków zaawansowanej postaci nowotworów pochodzenia urotelialnego (MIBC, pT2–4) potwierdzają opisaną zależność. Wyznaczony współczynnik śmiertelności był prawie dwukrotnie wyższy w grupie pacjentów bez mutacji genu *FGFR3* (HR = 1,8; 95% CI: 1,0–3,2; $p = 0,05$) w porównaniu do grupy pacjentów z wykrytą mutacją. Wskaźnik 5-letniego przeżycia w grupie pacjentów bez/z mutacją *FGFR3* określono na poziomie odpowiednio 38% i 65% [37].

Prowadzone są badania nad szeregiem innych biomarkerów o potencjalnym znaczeniu zarówno prognostycznym, jak i predykcyjnym. Do najczęściej opisywanych genów należą: *TP53*, *p16 (CDKN2A)*, *ARID1A*, *HER-2* oraz *PD-1/PD-L1* [46–50].

Inhibitory kinaz tyrozynowych (*tyrosine kinase inhibitors* – TKIs)

Przedstawione zależności tłumaczą szerokie zainteresowanie rozwoju terapii antynowotworowej opartej o zastosowanie inhibitorów FGFR. Z uwagi na częstość zaburzeń sygnalizacji FGFR uważa się, że większość pacjentów z NMIBC i istotna część chorych z MIBC może odnieść korzyść z terapii ukierunkowanej na ten szlak.

W badaniach klinicznych oceniana jest skuteczność substancji blokujących szlak FGFR na różnych etapach – badane są: 1. nieselektywne oraz selektywne inhibitory kinaz tyrozynowych (TKIs), 2. przeciwciała monoklonalne oraz 3. substancje wiążące FGF.

Początkowo w raku pęcherza moczowego badano nieselektywne inhibitory kinaz tyrozynowych. Znany jest szereg związków o poznanym działaniu anty-FGFR, między innymi ponatinib (AP24534), regorafenib (BAY 73-4506), lenvatinib (E7080), dovitinib (TKI258), lucitanib (E3810), nintedanib (BIBF 1120). Związki te wykazują hamujące działanie nie tylko względem receptora FGFR, ale również VEGFR oraz innych receptorów czynników wzrostu. Część z nich została zatwierdzona przez Agencję Żywności i Leków (Food and Drug Administration – FDA) jako terapia przeciwnowotworowa. Skuteczność tych substancji w badaniach klinicznych w raku pęcherza moczowego była niezadowalająca. Ponadto nieselektywne TKIs powodowały szereg działań niepożądanych, wynikających głównie z hamowania VEGFR.

W celu zwiększenia aktywności względem FGFR oraz ograniczenia toksyczności TKIs opracowano selektywne inhibitory FGFR. Tę grupę związków stanowią inhibitory FGFR (m.in. BGJ398, AZD4547, JNJ-42756493), które obecnie znajdują się w fazie badań klinicznych. Toczące się, jak i zakończone badania kliniczne dotyczące selektywnych inhibitorów FGFR są badaniami I i II fazy. Istotnym elementem prowadzonych prób klinicznych jest selekcja pacjentów pod kątem profilu molekularnego genu *FGFR3*, jako kryterium włączenia do badania z zastosowaniem selektywnych inhibitorów FGFR. Celem tych działań jest wyselekcjonowanie grupy chorych, która odniesie największą korzyść terapeutyczną w wyniku zastosowanego leczenia.

Wyniki pierwszej fazy badań klinicznych przeprowadzonych z zastosowaniem selektywnego inhibitora

FGFR – BGJ398 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT 01004224) wskazują na znacznie lepszą odpowiedź pacjentów urotelialnych z zaawansowaną postacią choroby, będących nosicielami mutacji aktywujących *FGFR3*, a w szczególności zmiany S249C. Całkowity wskaźnik odpowiedzi u wyżej opisanej grupy pacjentów urotelialnych, u których nastąpiło niepowodzenie leczenia po zastosowaniu chemioterapii opartej na platynie, wynosił 38% [51].

Skuteczność onkologiczna wyżej wymienionych substancji istotnie przewyższa efektywność nieselektywnych TKIs. Ponadto profil toksyczności selektywnych inhibitorów FGFR różni się od inhibitorów niewybiórczych – głównym problemem okazuje się być hiperfosfatemia oraz kalcyfikacja tkanek wynikające z hamowania FGF23.

Jak wspomniano wcześniej, zaburzenia szlaku FGFR3 są znacznie częstsze u pacjentów z NMIBC niż z MIBC. Jednakże dotychczas opracowane terapie cechują się toksycznością, która byłaby nie do zaakceptowania dla pacjentów z NMIBC. Pacjenci ci, przede wszystkim z NMIBC pTa i/lub guzami PUNLMP oraz LG, mimo wznów miejscowych raka urotelialnego, mają dobre rokowanie co do czasu przeżycia. Jednakże w grupie pacjentów z NMIBC najwyższego ryzyka (pT1 HG, CIS, niepowodzenie BCG terapii) wykorzystanie terapii systemowej, w tym terapii ukierunkowanej na szlak FGFR3, może stać się alternatywą dla cystektomii.

U pacjentów z NMIBC niskiego ryzyka rozważane jest wykorzystanie terapii anty-FGFR3 podawanej doęcherzowo, np. bezpośrednio po elektroresekcji przezcewkowej guza, w celu eliminacji pozostałych komórek raka. Obecnie taka postać substancji hamujących szlak FGFR3 nie jest dostępna.

W przypadku MIBC uważa się, że grupą pacjentów, która mogłaby najlepiej odpowiedzieć na terapię anty-FGFR, są chorzy, u których początkowo rozpoznano NMIBC oraz stwierdzono w badaniach molekularnych mutację *FGFR3* albo obecność białka fuzyjnego i delecję *CDKN2A*. Ta hipoteza wymaga potwierdzenia w badaniach klinicznych.

Dodatkowym problemem w przypadku terapii ukierunkowanej na dany szlak molekularny jest praktycznie nieunikniony rozwój oporności. Może być ona

konsekwencją nowych mutacji docelowych, jak i innych genów. Oporność może być również następstwem zmian epigenetycznych, czy „plastyczności” szlaków sygnalizacyjnych komórki.

Nowoczesne terapie oparte o inhibitory szlaku FGFR dają nowe możliwości kliniczne w leczeniu raka pęcherza moczowego. Jednakże konieczne jest wykazanie ich skuteczności w bardziej zaawansowanych badaniach klinicznych III fazy, a także ustalenie kryteriów selekcji molekularnej pacjentów, opartych o aberracje FGFR3.

Wnioski

Mimo postępu, jaki dokonał się w urologii w ostatnich latach, wyniki leczenia raka pęcherza moczowego pozostają niezadowolające. Szlak FGFR odgrywa istotną rolę w podstawowych procesach prawidłowych komórek, natomiast przy nieprawidłowej sygnalizacji także w onkogenezie. Rak urotelialny pęcherza moczowego charakteryzuje najwyższa częstość występowania aberracji genetycznych w obrębie genów *FGFR*. Mutacje *FGFR3* stwierdzane są znacznie częściej w grupie pacjentów z NMIBC w porównaniu z pacjentami z MIBC. Częstość mutacji spada wraz ze wzrostem stopnia złośliwości guza (*low grade vs high grade*). Badania kliniczne (I i II fazy) dotyczące selektywnych inhibitorów FGFR potwierdzają odpowiedzi na leczenie u pacjentów z mutacją *FGFR3*, u których wcześniejsza chemioterapia była nieskuteczna. Niezbędne są dalsze badania (III fazy) oraz precyzyjniejsze ustalenie kryteriów selekcji molekularnej pacjentów, którzy odnieśliby największą korzyść z leczenia anty-FGFR. ■

dr n. med. **Paulina Gapska**
Dział Badań Przedklinicznych Celon Pharma S.A., Warszawa

lek. Paweł Stajno
Klinika Nowotworów Układu Moczowego, Centrum Onkologii – Instytut, Warszawa

dr n. med. **Roman Sosnowski**
Klinika Nowotworów Układu Moczowego, Centrum Onkologii – Instytut, Warszawa

prof. dr hab. **Tomasz Demkow**
Klinika Nowotworów Układu Moczowego, Centrum Onkologii – Instytut, Warszawa

dr n. med. **Maciej Wieczorek**
Centrum Badawczo-Rozwojowe Celon Pharma S.A., Warszawa

dr n. med. **Aleksandra Stańczak**
Dział Badań Przedklinicznych Celon Pharma S.A., Warszawa

Piśmiennictwo:

- Didkowska J, Wojciechowska U, Olasek P: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2015 r. Krajowy Rejestr Nowotworów, Warszawa 2017; s. 42–53.
- Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al.: Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013; 63(2):234–41.
- Meeks JJ, Bellmunt J, Bochner BH, Clarke NW, Daneshmand S, Galsky MD, et al.: A systematic review of neoadjuvant and adjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2012; 62(3): 523–533.
- Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffoux C, Denis L, et al.: Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006; 49(3): 466–5; discussion 75–77.

5. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Pineiro L, Gonzalez M, et al.: Predicting nonmuscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with bacillus Calmette-Guérin: the CUETO scoring model. *J Urol* 2009; 182(5): 2195–2203.
6. von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, et al.: Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(21): 4602–4608.
7. Sternberg CN, Vogelzang NJ. Gemcitabine, paclitaxel, pemetrexed and other newer agents in urothelial and kidney cancers. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 46 Suppl: S105–115.
8. Gallagher DJ, Milowsky MI, Bajorin DF: Advanced bladder cancer: status of first-line chemotherapy and the search for active agents in the second-line setting. *Cancer* 2008; 113(6): 1284–1293.
9. van Rhijn BW: Combining molecular and pathologic data to prognosticate non-muscle-invasive bladder cancer. *Urol Oncol* 2012; 30(4): 518–523.
10. Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Williamson SR, Lopez-Beltran A, Montironi R: Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Hum Pathol* 2011; 42(4): 455–481.
11. Xylinas E, Kluth LA, Rieken M, Karakiewicz PI, Lotan Y, Shariat SF: Urine markers for detection and surveillance of bladder cancer. *Urol Oncol* 2014; 32(3): 222–229.
12. di Martino E, Tomlinson DC, Williams SV, Knowles MA: A place for precision medicine in bladder cancer: targeting the FGFRs. *Future Oncol* 2016; 12(19): 2243–2263.
13. Tsuji M, Kojima K, Murakami Y, Kanayama H, Kagawa S: Prognostic value of Ki-67 antigen and p53 protein in urinary bladder cancer: immunohistochemical analysis of radical cystectomy specimens. *Br J Urol* 1997; 79(3): 367–372.
14. Caliskan M, Turkeri LN, Mansuroglu B, Toktas G, Aksoy B, Unluer E, et al.: Nuclear accumulation of mutant p53 protein: a possible predictor of failure of intravesical therapy in bladder cancer. *Br J Urol* 1997; 79(3): 373–377.
15. <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
16. Pietzak EJ, Bagrodia A, Cha EK, et al.: Next-generation sequencing of nonmuscle invasive bladder cancer reveals potential biomarkers and rational therapeutic targets. *Eur Urol* 2017; 72: 52–59.
17. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014; 507(7492): 315–322.
18. Beenken A, Mohammadi M: The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 235–253.
19. Ahmad I, Iwata T, Leung HY: Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823: 850–860.
20. Turner N, Grose R: Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 116–129.
21. Hubbard SR, Till JH: Protein tyrosine kinase structure and function. *Ann Rev Biochem* 2000; 69: 373–398.
22. Katoh M, Nakagawa H: FGF receptors: cancer biology and therapeutics. *Med Res Rev* 2013; 34: 280–300.
23. Helsten T, Elkin S, Arthur E, et al.: The FGFR landscape in Cancer: Analysis of 4,853 Tumors by Next-Generation Sequencing. *Clin Cancer Res* 2016; 22(1): 259–267.
24. Gallo LH, Nelson KN, Meyer AN, et al.: Functions of Fibroblast Growth Factor Receptors in cancer defined by novel translocations and mutations. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26(4): 425–449.
25. Thompson LM, Plummer S, Schalling M, et al.: A gene encoding a fibroblast growth factor receptor isolated from the Huntington disease gene region of human chromosome 4. *Genomics* 1991; 11:1133–1142.
26. Perez-Castro AV, Wilson J, Altherr MR: Genomic Organization of the Human Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (*FGFR3*) Gene and Comparative Sequence Analysis with the Mouse *Fgfr3* Gene. *Genomics* 1997; 41: 10–16.
27. Chellaiah AT, McEwen DG, Werner S, et al.: Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(15): 11620–11627.
28. Murgue B, Tsunekawa S, Rosenberg I, et al.: Identification of a novel variant form of fibroblast growth factor receptor 3 (*FGFR3* IIIb) in human colonic epithelium. *Cancer Res* 1994; 54: 5206–5211.
29. Bernard-Pierrot I, Brams A, Dunois-Larde C, et al.: Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis* 2006; (27)4: 740–747.
30. Tomlinson DC, L'Hôte CG, Kennedy W, et al.: Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor 3 produces a secreted isoform that inhibits fibroblast growth factor-induced proliferation and is repressed in urothelial carcinoma cell lines. *Cancer Research* 2015; 65(22): 10441–10449.
31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
32. Webster MK, Donoghue DJ: Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *Embo J* 1996; 15: 520–527.
33. d'Avís PY, Robertson SC, Meyer AN, et al.: Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations responsible for the lethal skeletal dysplasia thanatophoric dysplasia type I. *Cell Growth Differ* 1998; 9:71–78.
34. Patani H, Bunney TD, Thiagarajan N, et al.: Landscape of activating cancer mutations in FGFR kinases and their differential responses to inhibitors in clinical use. *Oncotarget* 2016; 17: 24252–24267.
35. Neuzillet Y, Paoletti X, Ouerhani S, et al.: A Meta-Analysis of the Relationship between FGFR3 and TP53 Mutations in Bladder Cancer. *PLoS ONE* 2012; 7(12): e48993.
36. Christensen E, Birkenkamp-Demtröder K, Nordtoft I, et al.: Liquid Biopsy Analysis of FGFR3 and PIK3CA Hotspot Mutations for Disease Surveillance in Bladder Cancer. *Eur Urol* 2017; 71(6): 961–969.
37. van Oers JMM, Zwarthoff EC, Rehman I, et al.: FGFR3 Mutations Indicate Better Survival in Invasive Upper Urinary Tract and Bladder Tumours. *Eur Urol* 2009 Mar; 55(3): 650–657.
38. Kompier LC, van der Aa MN, Lurkin I, et al.: The development of multiple bladder tumour recurrences in relation to the *FGFR3* mutation status of the primary tumour. *J Pathol* 2009; 218: 104–112.
39. Hernandez S, López-Knowles E, Lloreta J, et al.: Prospective Study of FGFR3 Mutations As a Prognostic Factor in Nonmuscle Invasive Urothelial Bladder Carcinomas. *J Clin Oncol* 2006; 24(22): 3664–3671.
40. Al-Ahmadie AH, Iyer G, Janakiraman M, et al.: Somatic mutation of Fibroblast Growth Factor Receptor-3 (FGFR3) defines a distinct morphologic subtype of high-grade urothelial carcinoma. *J Pathol* 2011; 224(2): 270–279.
41. Gust KM, David JM, Awrey S, et al.: Fibroblast Growth Factor Receptor 3 is a Rational Therapeutic Target in Bladder Cancer. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(7): 1245–1254.
42. Kompier LC, Lurkin L, van der Aa MN, et al.: FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One* 2010; 5(11): e13821.
43. Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P, et al.: FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J Pathol* 2007; 213(1): 91–98.
44. van Rhijn BW, Vis AN, van der Kwast TH, et al.: Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. *J Clin Oncol* 2003; 21(10): 1912–1921.
45. van Rhijn BW, van der Kwast TH, Liu L, et al.: The FGFR3 mutation is related to favorable pT1 bladder cancer. *J Urol* 2012; 187(1): 310–314.
46. Butterfield A, Gupta S. Next-generation sequencing in non-muscle-invasive bladder cancer- a step towards personalized medicine for a superficial bladder tumor. *Transl Androl Urol* 2017; 6(6): 1198–1202.
47. Choi W, Porten S, Kim S, et al.: Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell* 2014; 25(2): 152–165.
48. Netto GJ, Tafe LJ: Emerging Bladder Cancer Biomarkers and Targets of Therapy. *Urol Clin North Am* 2016; 43(1): 63–76.
49. Rentsch CA, Müller DC, Ruiz C: Comprehensive Molecular Characterization of Urothelial Bladder Carcinoma: A Step Closer to Clinical Translation? *Eur Urol* 2017; 72(6): 960–961.
50. Cote RJ, Esrig D, Groshen S, et al.: p53 and treatment of bladder cancer. *Nature* 1997; 385(6612): 123–125.
51. Nogova L, Sequist LV, Perez Garcia JM, et al.: Evaluation of BGJ398, a Fibroblast Growth Factor Receptor 1–3 Kinase Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors Harboring Genetic Alterations in Fibroblast Growth Factor Receptors: Results of a Global Phase I, Dose-Escalation and Dose-Expansion Study. *J Clin Oncol* 2017; 35(2):157–165.