

# BRCA en BRCAness

## BRCA and BRCAness

drs. T.G. Meijer<sup>1</sup>, drs. S.B. Vlieg<sup>2</sup>, dr. D.C. van Gent<sup>1</sup>, prof. dr. S.C. Linn<sup>3</sup>, dr. A. Jager<sup>4</sup>

### SAMENVATTING

Optimale selectie van patiënten die baat kunnen hebben bij poly-[ADP-ribose]-polymerase (PARP)-remmers is van groot klinisch belang gezien de relatief geringe toxiciteit van de behandeling. PARP-remmers zijn effectief bij patiënten met tumoren die homologe recombinatiedeficiënt (HRD) zijn. Mammacarcinomen die zich ontwikkelen bij patiënten met een pathogene kiembaanmutatie in een *BRCA1/2*-gen zijn in de regel HRD, en daarmee dus gevoelig voor behandeling met PARP-remmers. Er zijn echter ook tumoren die HRD zijn zonder kiembaanmutaties in de *BRCA1/2*-genen. Patiënten met deze zogenoemde HRD-tumoren, ook wel *BRCA*-like- of BRCAness-tumoren genoemd, zouden ook baat kunnen hebben bij PARP-remmers. Er wordt wereldwijd onderzoek gedaan naar het ontwikkelen van de ultieme HRD-test om naast tumoren met *BRCA1/2*-kiembaanmutaties ook HRD- of *BRCA*-like-tumoren te identificeren. De afgelopen jaren zijn er verschillende testen ontwikkeld, echter een klinisch gevalideerde test is op dit moment nog niet beschikbaar. In dit overzichtsartikel worden de voor- en nadelen van de verschillende testen besproken die op verschillende wijzen HRD detecteren en wat de klinische consequenties hiervan zouden kunnen zijn.

(NED TIJDSCHR ONCOL 2018;15:306-15)

### SUMMARY

Optimal patient selection for poly-[ADP-ribose]-polymerase (PARP) inhibitors is of great clinical importance, as these inhibitors have relatively low toxicity. It is known that tumors with germline mutations in *BRCA1/2* are often homologous recombination deficient (HRD) and therefore respond well to this type of therapy. However, HRD also occurs in tumors without germline mutations in *BRCA1/2*. These HRD tumors, which show BRCAness characteristics, could also benefit from PARP inhibitor therapy. A worldwide search for the ultimate HRD test is ongoing, to identify HRD or *BRCA*-like tumors without germline mutations in *BRCA1/2*. Lately, several HRD tests have been developed, however, a clinical validated test is not yet available. In this review, we discuss the (dis)advantages of different HRD tests that detect BRCAness in different ways and their clinical consequences.

### INLEIDING

Bij ongeveer 10% van de vrouwen die borstkanker ontwikkelen betreft het een erfelijke vorm, waarbij een derde wordt

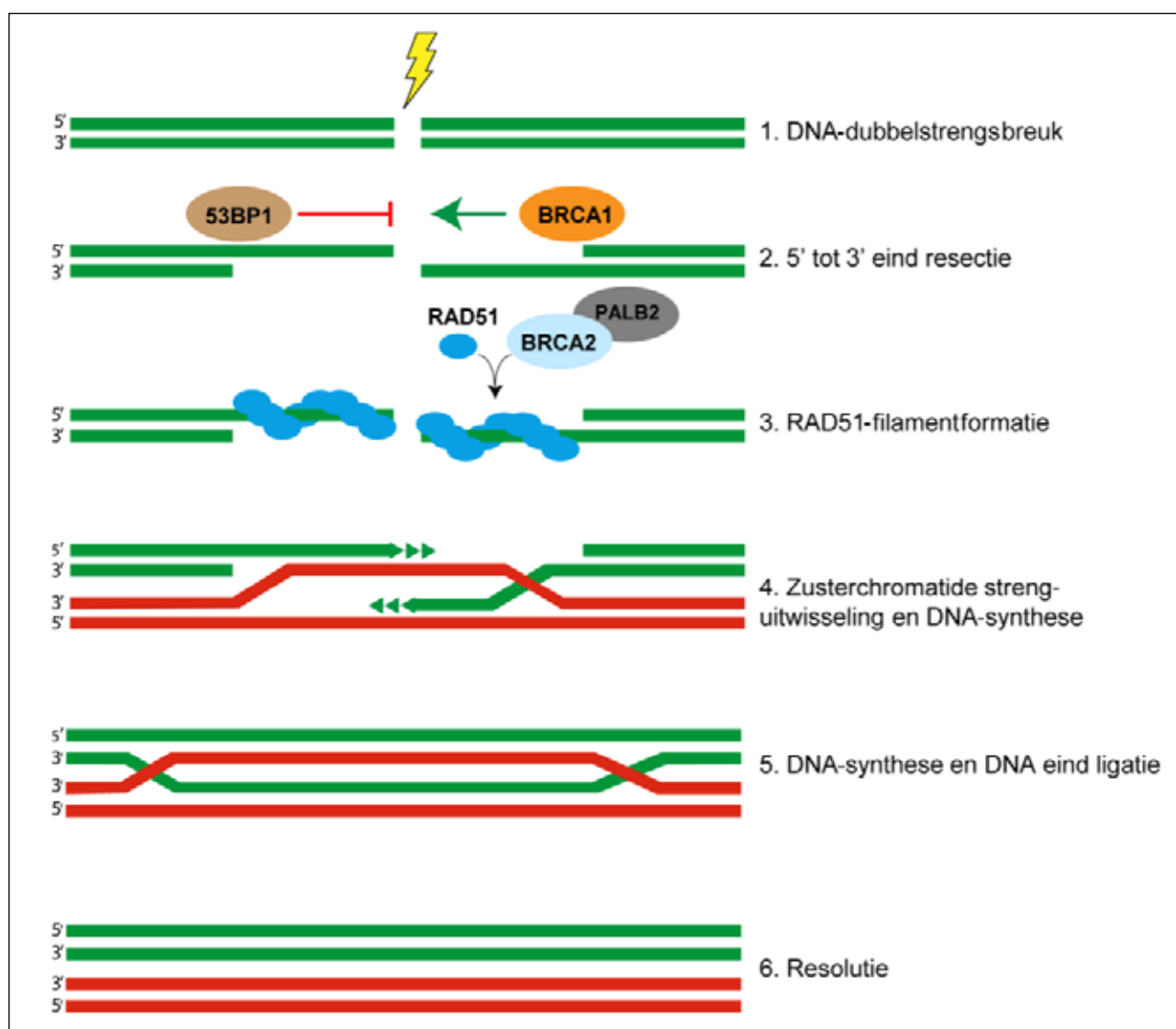
verklaard door een pathogene kiembaanmutatie in het *BRCA1*- of *BRCA2*-gen.<sup>1</sup> Dit betekent dat van alle borstkankers ongeveer 3% wordt verklaard door een *BRCA1/2*-gen-

<sup>1</sup>afdeling Moleculaire Genetica, Erasmus Medisch Centrum, <sup>2</sup>afdeling Moleculaire Pathologie, Nederlands Kanker Instituut, <sup>3</sup>afdeling Medische Oncologie, Antoni van Leeuwenhoek, <sup>4</sup>afdeling Medische Oncologie, Erasmus Medisch Centrum. Correspondentie graag richten aan mw. dr. E. Driehuis, Hubrecht Instituut, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, tel.: 06 20 87 91 55, e-mailadres: e.driehuis@hubrecht.eu

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: geen gemeld.

**Trefwoorden:** *BRCA*, BRCAness, homologe recombinatiedeficiëntie (HRD), PARP

**Keywords:** *BRCA*, BRCAness, homologous recombination deficiency (HRD), PARP



**FIGUUR 1. De BRCA-eiwitten zijn betrokken bij de homologe recombinatie-‘pathway’.** De HR-‘pathway’ verzorgt het foutloos repareren van DSB tijdens de S- en G2-fase van de celcyclus, omdat het zusterchromatide dan als sjabloon kan worden gebruikt. De BRCA-eiwitten spelen een belangrijke rol in de HR-‘pathway’. Het BRCA1-eiwit zorgt in de eerste stappen van de HR-‘pathway’ voor 5'- tot 3'-resectie van de DSB, waardoor 3'-enkelstrengs-DNA ontstaat aan beide zijden van de DSB. BRCA2 bindt aan het RAD51-eiwit, dat op zijn beurt filamenten vormt om het enkelstrengs-DNA direct naast de DSB. De breuk kan dan weer worden hersteld doordat het enkelstrengs-DNA (met behulp van strenginvasie) het intacte dubbelstrengs-DNA van het zusterchromatide gebruikt om de ontbrekende informatie in te vullen via DNA-synthese. Gezien de bovengenoemde rollen van BRCA1/2, leidt afwezigheid van een functioneel BRCA1/2-eiwit tot HR-deficiëntie (HRD).

mutatie, een percentage dat onder de subgroep van tripeel-negatieve (ER-, PR- en HER2-neu-negatief) borstkanker (TNBC)-patiënten oploopt tot 10-20%.<sup>1-3</sup> BRCA1/2-genen zijn essentieel voor het repareren van DNA-dubbelstrengsbreuken (DSB) door middel van zogenoemde homologe recombinatie (HR).

### DNA-REPARATIE VIA HOMOLOGE RECOMBINATIE

Er bestaan verschillende soorten DNA-schade, die worden

veroorzaakt door zowel endogene (bijv. fouten tijdens replicatie) als exogene factoren (bijv. roken).<sup>4</sup> Voor elk type DNA-schade bestaat een specifieke ‘repair pathway’, bijvoorbeeld ‘mismatch repair’ en ‘nucleotide excision repair’ (NER) voor enkelstrengs-DNA-laesies. De meest toxische vorm van DNA-schade zijn DSB. DSB ontstaan niet spontaan, maar kunnen wel worden geïnduceerd door bepaalde typen chemotherapie en bestraling.<sup>5</sup> Voor het herstel van DSB, die ontstaan tijdens de verdubbeling van het DNA, is een intact HR-mechanisme nodig. Indien deze breuken niet

worden hersteld, leidt dit tot genomische instabiliteit en uiteindelijk tot celdood.<sup>6</sup> Om genomische instabiliteit te voorkomen, moet DNA-schade op tijd worden gerepareerd, dat wil zeggen voordat een (tumor)cel in deling gaat.

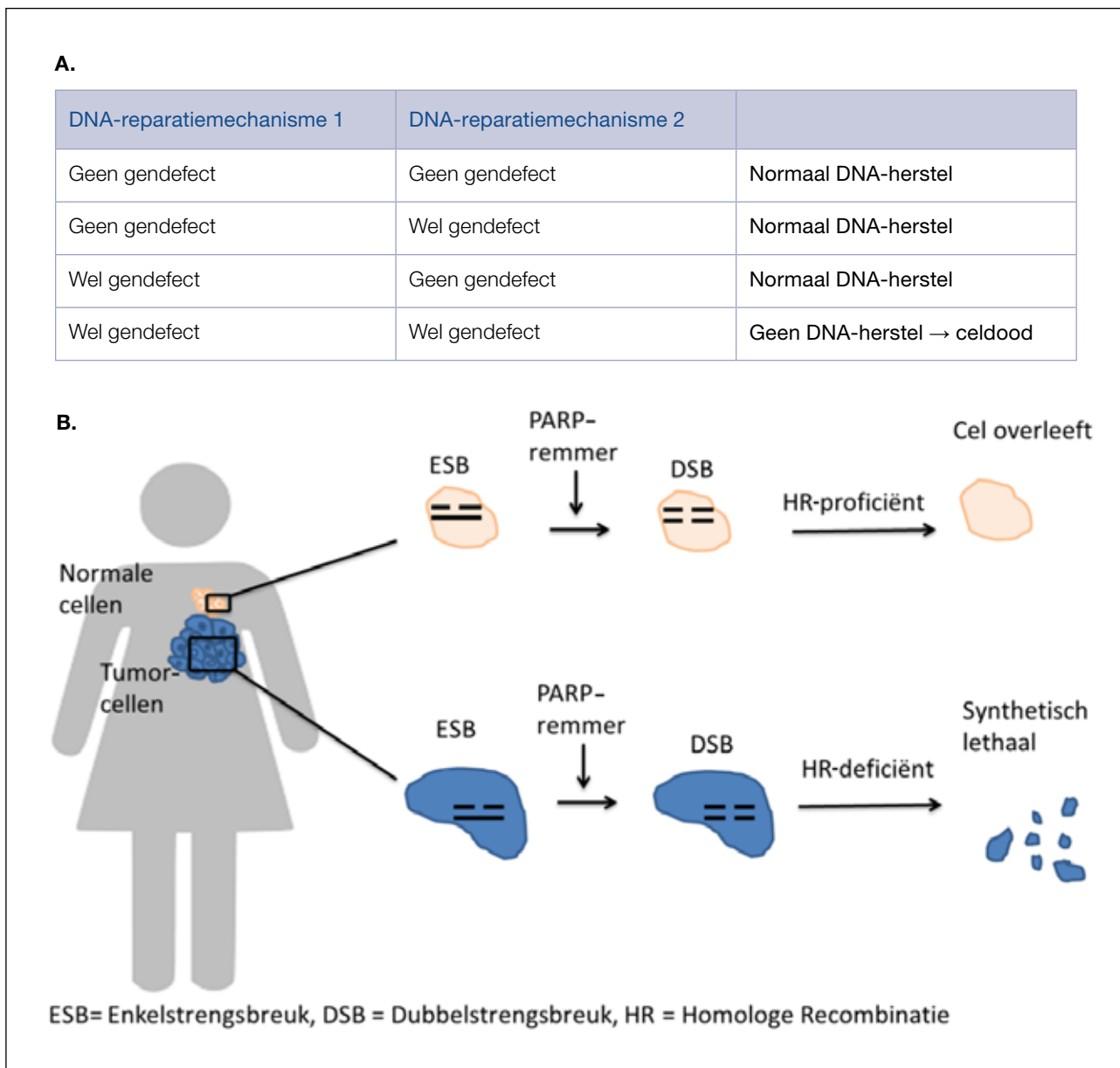
De HR-‘pathway’ zorgt voor het foutloos repareren van DSB tijdens de S- en G2-fase van de celcyclus, omdat het zusterchromatide dan als sjabloon kan worden gebruikt (zie *Figuur 1*).<sup>7</sup> Belangrijk is dat de BRCA1- en BRCA2-eiwitten een essentiële rol spelen binnen deze HR-‘pathway’.<sup>8</sup> Een tumor met een niet-functioneel BRCA1- of BRCA2-eiwit is daardoor HR-deficiënt (HRD) en niet in staat DSB te herstellen. Dit maakt dat tumoren met een pathogene BRCA1/2-genmutatie bij voorkeur worden behandeld met modaliteiten die DSB induceren, zoals bestraling en platinumbevattende chemotherapie. Recentelijk is gebleken dat behandeling met poly-ADP-ribosepolymerase (PARP)-remmers ook buitengewoon effectief kan zijn in tumoren met een BRCA1/2-gendefect.<sup>9,10</sup> PARP-remmers zijn effectief via het principe van synthetische letaliteit.

## SYNTHETISCHE LETALITEIT EN PARP-REMMERS

Het principe van synthetische letaliteit houdt in dat celdood alleen optreedt als er sprake is van een combinatie van twee deficiënties, terwijl een van deze deficiënties op zichzelf geen negatieve gevolgen heeft. Behandeling met PARP-remmers leidt tot synthetische letaliteit in tumoren met BRCA1/2-gendefecten. Het PARP-enzym is betrokken bij DNA-reparatie van enkelstrengs-DNA-breuken. Door PARP te remmen, worden enkelstrengs-DNA-breuken minder efficiënt opgeruimd. De overgebleven enkelstrengsbreuken worden bij celdeling DSB die gerepareerd dienen te worden door een ander DNA-herstelmechanisme, namelijk HR. In gezonde cellen van BRCA1/2-genmutatiedraagsters is sprake van slechts één aangetast allel en daarmee is de HR-‘pathway’ intact en zijn deze cellen in staat DSB te repareren, waardoor de PARP-remmer dus nauwelijks effect heeft op normale lichaamscellen. In tumorcellen van BRCA1/2-genmutatiedraagsters zijn in de regel beide allelen van het BRCA1- of BRCA2-gen aangedaan, daardoor is de HR-‘pathway’ niet intact en dus niet in staat de DSB te repareren met als gevolg celdood (zie *Figuur 2*, pagina 309). Door deze indirecte benadering, geeft PARP-remming met name in de tumorcellen aanleiding tot celdood. Dit is in contrast met reguliere chemotherapie, waarbij de DNA-schade in alle cellen van het lichaam meer bijwerkingen geeft. Daarom behoren PARP-remmers tot de categorie ‘targeted therapies’. Kortom, het principe van synthetische lethaliteit biedt een hele elegante en gerichte manier van behandelen waardoor minder toxiciteit optreedt.

De eerste klinische studie met PARP-remmers bij bewezen BRCA1/2-genmutatiedraagsters met verschillende soorten tumoren (borst, ovarium, prostaat) was veelbelovend. In deze fase 1-studie lieten 12 van de 19 (63%) patiënten klinische respons zien (complete, partiële respons of stabiele ziekte voor minstens vier maanden) na behandeling met olaparib, ondanks dat zij al uitgebreid waren voorbehandeld (53% had vier of meer lijnen chemotherapie gehad). In een gerandomiseerde fase 2-studie bleek vervolgens dat onder BRCA1/2-genmutatiedraagsters met een recidief platinumgevoelig sereus ovariumcarcinoom onderhoudsbehandeling met olaparib de mediane progressievrije overleving (PFS) met 6,9 maanden (van 4,3 naar 11,2 maanden met HR=0,18 [0,10–0,31]) verlengde.<sup>9</sup> De recent gepubliceerde resultaten van de interim-analyse van het secundaire eindpunt totale overleving van de gehele studiepopulatie toonden, na een mediane follow-up van 71 maanden, geen significant verschil. Patiënten met een bewezen BRCA-mutatie in de olaparib-groep hadden een langere mediane totale overleving dan die in de placebogroep: 34,9 versus 30,2 maanden (HR 0,62; 95%-BI 0,41-0,94; p=0,025).<sup>11</sup> Op basis van deze resultaten werd het gebruik van olaparib als onderhoudstherapie voor recidief platinumgevoelig sereus ovariumcarcinoom door de FDA en EMA goedgekeurd. Recentelijk keurde de FDA olaparib ook goed voor de behandeling van het BRCA1/2-geassocieerde mammacarcinoom naar aanleiding van de resultaten van de OlympiAD-studie. In deze gerandomiseerde fase 3-studie werd olaparib vergeleken met standaardbehandeling (capecitabine, eribuline of vinorelbine) bij BRCA1/2-genmutatiedraagsters met gemetastaseerd HER2-negatief mammacarcinoom die niet meer dan twee lijnen behandeling hadden gehad voor de gemetastaseerde ziekte. De mediane PFS (primaire eindpunt) bleek 2,8 maanden langer voor de patiënten die met olaparib werden behandeld ten opzichte van de standaardbehandeling (7,0 versus 4,2 maanden; HR=0,58 [0,43-0,80]).<sup>10</sup>

Naast patiënten met een BRCA1/2-kiembaanmutatie wordt momenteel ook onderzocht of de indicatie voor behandeling met PARP-remmers kan worden verbreed. In de gerandomiseerde fase 2-studie bleek olaparib ten opzichte van placebo ook van toegevoegde waarde als onderhoudsbehandeling bij patiënten met een recidief platinumgevoelig sereus ovariumcarcinoom zonder BRCA1/2-genmutatie, met echter slechts een bescheiden absolute verbetering van mediane PFS van 1,9 maanden (7,4 vs. 5,5 maanden met HR=0,54 [0,34-0,85]).<sup>9</sup> Er werd in deze studie bij afwezigheid van een BRCA1/2-genmutatie niet vooraf geselecteerd op aanwezigheid van HRD in de tumoren. In de NOVA-studie, een gerandomiseerde fase 3-studie bij patiënten met een recidief platinumgevoelig sereus ovariumcarcinoom bleek behande-



**FIGUUR 2. Mechanisme van PARP-remmers. A.** Het principe van synthetische letaliteit houdt in dat een combinatie van twee gendefecten in twee verschillende DNA-reparatiemechanismen leidt tot celdood, terwijl één gendefect geen effect heeft, omdat het andere DNA-reparatiemechanisme de taak overneemt. **B.** PARP-remmers werken volgens het principe van synthetische letaliteit. Het PARP1-enzym is betrokken bij DNA-schadereparatie van enkelstrengs-DNA-breuken. Door PARP te remmen, worden de enkelstrengsbreuken minder efficiënt opgeruimd, waardoor na replicatie DSB ontstaan die gerepareerd dienen te worden door de HR-‘pathway’. In (tumor)cellen met een intact homologo recombiniatiemechanisme is dit geen probleem, maar HRD-tumoren zullen DSB niet kunnen opruimen en dat leidt tot celdood.

ling met niraparib ten opzichte van placebo de mediane PFS te verlengen, ongeacht de *BRCA1/2*-mutatiestatus. In de *BRCA1/2*-gemuteerde groep verlengde niraparib-behandeling de PFS met 15,5 maanden ten opzichte van de placebo-groep (21,0 vs. 5,5 maanden; HR=0,27 [0,17-0,41]) en in de niet-*BRCA*-gemuteerde groep met 5,4 maanden (9,3 vs. 3,9 maanden; HR=0,45 [0,34-0,61]).<sup>12</sup> Binnen de niet-*BRCA1/2*-

gemuteerde groep is nog onderscheid gemaakt op basis van de aanwezigheid van HRD in de tumor of niet. Deze indeling was gebaseerd op de Amerikaanse Myriad-test, waarover hieronder meer. Opmerkelijk was dat in beide groepen ovariumcarcinoompatiënten (HRD- en niet-HRD-groep) een verbetering van PFS werd gezien voor niraparib-behandeling ten opzichte van placebo, wat de vraag doet rijzen of

de Myriad-test wel optimaal in staat is de HRD-groep goed te onderscheiden van de niet-HRD-groep. Hoewel deze resultaten bewijzen dat er tumoren zijn die zich gedragen als *BRCA1/2*-deficiënte tumoren, in de afwezigheid van een kiembaan *BRCA1/2*-mutatie, is de belangrijkste vraag hoe nu deze patiënten met HRD-tumoren adequaat te selecteren.

### BIOMARKERS VOOR HRD

De afgelopen jaren zijn verschillende testen ontwikkeld om HRD-tumoren te selecteren, echter een klinisch gevalideerde test is op dit moment nog niet beschikbaar. Een goede HRD-test moet makkelijk toepasbaar en robuust zijn. Daarnaast is een snelle (bij voorkeur binnen 1-2 weken) uitslag gewenst. Hieronder geven wij een overzicht van de HRD-testen die momenteel in de literatuur zijn beschreven (zie *Tabel 1*, pagina 311).

### DEFECTEN IN GENEN BETROKKEN BIJ HOMOLOGE RECOMBINATIE

Een manier om op zoek te gaan naar HRD-tumoren is om te zoeken naar mutaties in genen die naast *BRCA1/2* betrokken zijn bij de HR-‘pathway’. Onderzoek in cellijnen heeft laten zien dat defecten in bijvoorbeeld de *ATM*-, *ATR*-, *RAD51C*- en *CHEK1/2*-genen inderdaad PARP-remmergevoeligheid kunnen veroorzaken.<sup>13</sup> Mede door de technische vooruitgang van ‘whole genome sequencing’ zijn inmiddels veel genen die betrokken zijn bij HR bekend.<sup>14-16</sup>

Wat HR-gendefecten, anders dan *BRCA1/2*, betekenen voor PARP-remmer- of rechtstreeks DSB-inducerende chemotherapiegevoeligheid bij patiënten, begint langzaam duidelijk te worden. Bij 390 patiënten met ovariumcarcinoom bleek 31% van de tumoren mutaties te bevatten in 13 HR-genen (24% kiembaan en 9% somatisch).<sup>15</sup> Patiënten met mutaties in deze genen lieten een betere respons ( $p=0,0002$ ) en OS ( $p=0,0006$ ) zien op platinumbevattende therapie als werd vergeleken met patiënten zonder deze mutaties. Voor ovariumcarcinoompatiënten met kiembaan-, somatische en afwezige mutaties in HR-genen bleek de totale overleving respectievelijk 66, 59 en 41 maanden.<sup>17</sup> Hoewel werd gedacht dat HRD met name voorkwam bij het hooggradige sereus ovariumcarcinoom, bleek uit deze studie dat het percentage tumoren met afwijkingen in HR-genen ongeveer 30% was voor alle histologische subtypen (hooggradig sereus 31%, ‘clear cell’ 26%, endometroïd 27% en carcinosarcoom 33%). Dit zou in de toekomst het indicatiegebied voor behandeling met PARP-remmers bij ovariumcarcinoom wellicht kunnen uitbreiden naar non-sereuze tumoren. Voor mammacarcinoom is er nog geen bewijs dat defecten in andere HR-genen dan *BRCA1/2* ook daadwerkelijk gevoeligheid voor PARP-remmers of DSB-inducerende chemotherapie veroor-

zaken bij patiënten, maar klinische studies zijn gaande (NCT02401347). HRD-testen gebaseerd op defecten in HR-genen bieden zeker mogelijkheden, maar de klinische gegevens zijn momenteel nog erg beperkt.

### GENEXPRESSIEPROFIELEN (RNA) VAN GENEN BETROKKEN BIJ HOMOLOGE RECOMBINATIE

Een andere mogelijkheid om HRD-tumoren te selecteren is op basis van genexpressieprofielen (RNA). Binnen de I-SPY2-studie werden 116 HER2-negatieve mammacarcinoompatiënten gerandomiseerd tussen neoadjuvante behandeling met veliparib (PARP-remmer) plus carboplatine (VC) versus reguliere chemotherapie.<sup>18</sup> Vijftien patiënten hadden *BRCA1/2*-kiembaanmutaties en lieten vaker een pathologisch complete respons (pCR) zien na behandeling met VC dan niet-*BRCA*-mutatiedraagsters (75% versus 29%; oddsratio (OR) 7,25). Binnen deze studie werden naast de *BRCA1/2*-mutatiestatus ook naar drie verschillende genexpressieprofielen gekeken als maat voor HRD-tumoren. Zowel een genexpressieprofiel voor PARP-gevoeligheid (PARPi-7, 7-genpanel), als voor BRCAness (*BRCA1*nness, 77-genpanel) en de Mammaprint (MP) ‘High1/High2 risk status’ (MP1/2) bleken geassocieerd met respons op VC (resp. OR 6,82,  $p=0,0002$ ; OR 3,2,  $p=0,03$  en OR 9,15,  $p<0,0001$ ).<sup>18</sup> Het BRCAness-profiel identificeerde niet alle *BRCA*-kiembaanmutaties (13/15). Tevens was er een matige concordantie tussen PARPi-7 en BRCAness (64%). Er lijkt dus een verschil tussen profielen afgeleid van genexpressieniveaus die worden gevonden bij enerzijds PARP-gevoelige tumorcellijnen en anderzijds *BRCA*-gemuteerde tumoren. Bovendien liet 95% van de TNBC een positieve score zien bij één van de drie genexpressieprofielen, terwijl slechts 38% een positieve score bij alle drie de profielen liet zien. Patiënten met een combinatie van deze biomarkers bleken iets vaker een pCR te hebben bereikt na behandeling met VC dan patiënten met slechts één positieve biomarker (75% versus 56-70% binnen TNBC en 41% versus 33% in ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>), hoewel de groep patiënten met een positieve gecombineerde biomarkerscore wel klein is (42% van de TNBC en 11% van ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>). Kortom, selectie van patiënten op basis van slechts één van deze biomarkers lijkt beperkte sensitiviteit en specificiteit te hebben om pCR te voorspellen en niet beter dan selectie op basis van hormoonstatus (TNBC). Of pCR in alle HRD-subgroepen een goede surrogaatbiomarker voor PFS/OS is, is onbekend. Omdat alle patiënten doxorubicine (A) en cyclofosfamide (C) kregen, beide ook alkylerende middelen (middelen die DNA-schade veroorzaken), is bovendien onduidelijk hoeveel patiënten naast deze combinatie nog carboplatine met veliparib nodig hadden om een pCR te bereiken.

TABEL 1. Overzicht van studies met verschillende HRD-testen.

Categorie	Biomarker/ test	Studietype	N	Materiaal	Primair eindpunt	Resultaten	Populatie	Hoe snel resultaat?	Behan- deling	Referenties
'HR gene alterations' (BRCA1 BRCA2 ATM PALB2)	30 genen (BRCA1/2 en 11 HR-ge- nen)	Exploratief	390	Bloed (kiem- baan), vries en FFPE	OS	Somatische en kiembaanmutaties voorspel- den platinumgevoeligheid ( $p=0,0002$ ) en verbeterde OS ( $p=0,0006$ ), met mediane OS van 66 maanden indien kiembaanmutaties in HR-gen, 59 maanden indien somatische mutaties in HR-genen of 41 maanden indien geen defecten	Ovarium- carcinoom	?	Platinum	Pennington [17]
HR-expres- sieve profielen	77-gen BR- CAness en PARP1-7-ge- nexpressie- profiel	Explora- tief in een gerando- miseerde studie (I-SPY 2)	116	Vers/vriès	pCR	PARP1-7- en 77-gen-BRCAness-panel bleken geassocieerd met respons op veliparib/car- boplatine (resp. OR 6,82, $p=0,0002$ en OR 3,2, $p=0,03$ )	Hoogrisi- co-HER2- mamma- carcinoom	?	Veliparib/ carbopla- tine	Wolf [18]
BRCA1- hypermethy- lering	BRCA1- hypermethy- lering	Gerandomi- seerde stu- die (ARIEL2 deel 1)	204	FFPE	PFS	BRCA1-promoterhypermethylering was geassocieerd met respons op rucaparib (PARP-remmer), waarbij 52,4% (11/21) een respons liet zien en een mediane PFS van 7,4 maanden. Verschil tussen respons van de BRCA1-gemuteerde groep ten opzichte van de wildtype-groep was veel groter ( $HR=0,27$ ) dan dat van de BRCA1-gemethyleerde groep ten opzichte van wildtype ( $HR=0,62$ )	Hooggraadig ovariumcar- cinoom	2 weken	Rucapa- rib	Swisher [19]
DNA-kopie- nummervaria- tie (CNV)	BRCAness (BRCA1) classifier	Exploratief	48	FFPE	BRCAness array-CGH-pro- fiel; correlatie met BRCA1/2- mutatie	BRCA1-deficiëntie werd 91% accuraat gede- tecteerd. Bij 48 non-BRCA1/2-patiënten, lieten 2 ook een BRCA1-profiel zien	Erfelijk mamma- carcinoom	2 weken	-	Joosse [21]
	BRCAness (BRCA2) classifier	Exploratief	89	FFPE	BRCAness ar- ray-CGH profiel; correlatie met BRCA1/2-muta- tie	BRCA2-deficiënte tumoren werden met 89% sensitiviteit en 84% specificiteit gedetecteerd	Erfelijk mamma- carcinoom	2 weken	-	Joosse [20]
	BRCAness (BRCA1) classifier	Fase 3-stu- die onge- plande post- hoc-analyse van steek- proef uit RCT	230	FFPE	BRCAness array-CGH-pro- fiel; MLPA voor B1-promotor- methylering	BRCA1-lijke stadium 3 HER2-mammocarci- noompatiënten hadden meer baat bij hoge dosis platinumgebaseerde chemotherapie ( $p=0,006$ )	Mamma- cacinoom stadium 3, HER2-	2 weken	Hoge dosis pla- tinum-ge- baseerde chemo- therapie	Vollebergh [22]

	BRCAness (BRCA1) classifier	Fase 3-studie ongeplande post-hoc-analyse van steekproef uit RCT	143	FFPE	BRCAness array-CGH-profiel	BRCA1-lijke stadium 3 HER2-mammacarcinopatiënten hadden meer baat bij hoge dosis chemotherapie (HR 0,19; p<0,01)	Mamma-carcinoom met >9 kliermetastasen	2 weken	Hoge dosis chemo	Schouten [23]
'Structural rearrangements'	LOH	Fase 2/correlatie	80	Naald-biopt	pCR	Binnen stadium 1-3A TNBC of gBRCA-mammacarcinoom was HRD-LOH hoger bij responders onafhankelijk van BRCA1-mutatiestatus	TNBC en BRCA1/2-gemuteerd-mammacarcinoom	?	Neoadjuvant gemcitabine, carboplatine, iniparib	Telli [31]
	Combi LOH/LST/TAI	Retrospectief	215	Paraffine-blokje	Voorkomen van BRCA1/2-defecten in BRCA-subtypen	Combi HRD-score geassocieerde sterk met BRCA1/2-defecten ongeacht mammacarcinoomsubtypen	Mammacarcinoom alle subtypen	-	-	Timms [24]
	Combi LOH/LST/TAI	Retrospectief	79	Paraffine-blokje	pCR	Combi HRD-score geassocieerd met pCR na cisplatine-bevattende behandelingen (resp. OR 10,18, p=0,001 en OR 17,00, p=0,007)	Neoadjuvant TNBC	-	Cisplatine	Telli [25]
	Combi LOH/LST/TAI	Gerandomiseerde fase 3-studie	553	Paraffine-blokje	PFS	Alle patiënten behandeld met niraparib hadden een langere PFS dan de placebogroep, ongeacht BRCA1/2-status en combi HRD-score	Platinum-gevoelig recidief ovariumcarcinoom	-	Niraparib	Mirza [12]
WGS/'mutational signatures'	HRDetect	Exploratief	560	Vries	HRDetect-score van >0,7 is aanwezigheid van HRD	124/560 (22%) waren HRD	Mammacarcinoom	maanden	-	Davies [27]
	HRDetect	Exploratief	33	Vries	OS, 'total duration on platinum-based therapy' (TDT), en 'radiographic evidence of clinical improvement' (CI)	HRDetect-scores >0,7 waren geassocieerd met 3-maand langer mediane TDT (p=0,0003) en 1,3-jaar langer mediane OS (p=0,04)	Vergevorderd mammacarcinoom	maanden	Ja	Zhao [28]
Functionele HR-testen	RECAP-test (RAD51-foci)	Exploratief	45	Vers	RAD51-foci na ex-vivo-radiatie	5/45 waren HRD	Mammacarcinoom alle subtypen	1 week	-	Naipal [30]
	RAD51-foci	Exploratief	56	Vers	RAD51-foci na ex-vivo-radiatie	45% waren HRD	Mammacarcinoom alle subtypen	1 week	-	Mutter [29]

## METHYLERING VAN HET *BRCA1*-GEN

Hypermethylering van de *BRCA1*-promoter leidt tot verminderde expressie of afwezigheid van het *BRCA1*-eiwit en daarmee theoretisch tot HRD. In de praktijk is het nog onzeker of *BRCA1*-promoterhypermethylering daadwerkelijk leidt tot PARP-remmergevoeligheid. Van de 165 patiënten met ovariumcarcinoom in de ARIEL2-studie hadden 21 een tumor met *BRCA1*-promoterhypermethylering. *BRCA1*-promoterhypermethylering was geassocieerd met een mediane PFS van 7,4 (95%-BI 5,3-9,7) maanden (NCT01891344). Ter vergelijking, bij patiënten met een bewezen *BRCA1/2*-genmutatie was de mediane PFS 12,8 (95%-BI 9-14,7) maanden.<sup>19</sup> Belangrijk te vermelden is dat tumoren deze *BRCA1*-methylering vaak lijken te verliezen in de loop van de tijd. In deze studie gold dat voor 31% (4/13) van de tumoren. Aangezien de methyleringsstatus dynamisch is, is het van belang om de *BRCA1*-promotormethyleringsstatus te bepalen op een metastatische laesie en niet op archiefmateriaal van de oorspronkelijke tumor. Desondanks blijft de voorspellende waarde van *BRCA1*-methylering onzeker, onder andere ook door onzekerheid over de betrouwbaarheid van de verschillende testen die worden gebruikt om dit kenmerk te meten.

## VARIATIE IN AANTAL DNA-KOPIEËN

Bij variatie in het aantal DNA-kopieën, oftewel 'copy number variation' (CNV), ontbreken bepaalde stukken van het DNA (deleties) of komen er extra kopieën van het DNA bij (amplificaties). Ook CNV-profielen kunnen worden gebruikt voor de selectie van HRD-tumoren, zoals de *BRCA1*-like (en *BRCA2*-like) 'classificer'. Dit profiel is gebaseerd op een specifiek patroon van amplificaties en deleties die optreden in het DNA bij *BRCA1* (en -2)-deficiënte borsttumoren. Dit patroon kan ook worden teruggevonden in sporadische tumoren.<sup>20,21</sup> Patiënten met *BRCA1*-like-tumoren bleken meer baat te hebben bij hoge dosis platinumbevattende chemotherapie (HR=0,12) dan patiënten met non-*BRCA1*-like-tumoren (HR=0,78), met een significant verschil in effectiviteit ( $p=0,006$ ).<sup>22</sup> Retrospectieve analyse in een andere serie waarin hoge dosis chemotherapie werd vergeleken met conventionele behandeling toonde een vergelijkbaar resultaat voor de *BRCA1*-like-tumoren (HR=0,19).<sup>23</sup> Ondanks deze indrukwekkende resultaten identificeert de 'BRCA1-like classificer' niet alle *BRCA1*-geassocieerde tumoren (8/13). Dit kan te maken hebben met het ontbreken van HRD in sommige *BRCA*-geassocieerde tumoren (bijvoorbeeld doordat het andere allel niet verloren is gegaan), maar ook door gevoeligheid van de test voor bijmenging van normaal DNA van cellen die de tumorcellen omringen. Voor de zekerheid wordt deze test daarom vooralsnog gecombineerd met *BRCA1/2*-mutatieanalyse. De 'BRCA1-like classificer', geba-

seerd op DNA-kopienummerprofielen, is uitgebreid gevalideerd en de eerste prospectieve resultaten worden in 2019 verwacht. De 'classificer' wordt momenteel in een aantal klinische studies, waaronder de SUBITO (NCT02810743), toegepast. In deze fase 3-studie wordt in stadium 3 HER2-negatief *BRCA1*-like mammacarcinoom de hoge dosis chemotherapie vergeleken met platinumbevattende conventionele chemotherapie gevolgd door een jaar lang olaparib (zie voor meer informatie pagina 317-21). De 'BRCA1- (en *BRCA2*)-like classificer' is een relatief goedkope en makkelijk implementeerbare test, aangezien deze kan worden uitgevoerd op (reeds opgeslagen) paraffinemateriaal en de uitslag binnen 2-3 weken beschikbaar kan zijn. Desalniettemin missen de 'classifiers' nog enkele *BRCA1/2*-deficiënte tumoren en lijkt vooralsnog met name de 'BRCA1-like classificer' veelbelovend. Binnen TNBC identificeert de 'BRCA1 classificer' ruim 50% als *BRCA1*-like evenals een klein percentage van de hooggradige beperkt (maximaal 50% ER<sup>+</sup>) hormoongevoelige tumoren.

## STRUCTURELE CHROMOSOMALE VERANDERINGEN

Er zijn drie HRD-testen die zijn gebaseerd op verschillende soorten chromosomale veranderingen in tumoren: 'telomeric allelic imbalance' (TAI), 'large-scale transition' (LST) en 'loss of heterozygosity' (LOH). In de eerder genoemde ARIEL2-studie bleek bij 165 patiënten met ovariumcarcinoom de mediane PFS bij *BRCA*-wildtype patiënten met een hoge LOH-HRD-score iets langer dan bij patiënten met een lage LOH-HRD-score (5,2 naar 5,7 maanden met HR 0,62 [0,42-0,9]).<sup>19</sup> De eerder genoemde Myriad-test is gebaseerd op de combinatie van deze drie HRD-maten, de combinatie leidt tot betere detectie van *BRCA*-deficiënte tumoren dan één van de drie HRD-maten op zichzelf, ongeacht borstkan-kersubtype.<sup>24</sup> In een retrospectieve analyse van twee neoadjuvante klinische studies met in totaal 79 TNBC-patiënten, was het pCR-percentages na cisplatine-bevattende behandelingen bij *BRCA*-wildtype-patiënten met een hoge gecombineerde HRD-score 26,3% en bij patiënten met een lage HRD-score 0% (OR 14,79 [1,49-2001];  $p=0,018$ ). In deze studie mist echter een controlegroep.<sup>25</sup> In een methodologisch correct opgezette studie voorspelde deze gecombineerde HRD-test tot op heden niet voor respons op PARP-remmers bij recidiverend ovariumcarcinoom of voor respons op platinumbevattende therapie bij gemetastaseerd mammacarcinoom. In de eerder genoemde NOVA-studie verlengde niraparib-behandeling de PFS met 5,4 maanden (9,3 vs. 3,9 maanden; HR 0,45 [0,34-0,61]) ten opzichte van de placebogroep bij alle niet-*BRCA*-gemuteerden en bij niet-*BRCA*-gemuteerde patiënten met HRD-tumoren volgens Myriad



van 3,8 naar 12,9 maanden (HR 0,38 [0,24-0,59]).<sup>12</sup> In een fase 3-studie werd eerstelijns-carboplatine vergeleken met docetaxel bij 376 gemetastaseerde TNBC-patiënten, waarbij carboplatine tot een hoger 'overall response' (OR)-percentage zorgde bij patiënten met *BRCA1/2*-kiembaanmutaties ten opzichte van docetaxel (68,0% vs. 33,3%;  $p=0,03$ ), maar niet bij patiënten met een hoge HRD-score volgens Myriad (38,2% vs. 40,4%;  $p=1,00$ ).<sup>26</sup> Kortom, zoals eerder al genoemd lijkt de Myriad-test niet voorspellend voor respons op platinumbevattende chemotherapie of PARP-remmers.

### HRD-TEST GEBASEERD OP 'WHOLE GENOME SEQUENCING'

Recentelijk is het HRDetect-algoritme gepubliceerd, gebaseerd op verschillende parameters die uit 'whole genome sequencing'-gegevens van 560 primaire mammacarcinomen zijn geëxtraheerd.<sup>27</sup> Deze parameters zijn 'base substitutional signatures' ('mutational signatures'), 'rearrangement signatures', kopienummerprofielen en insertie/deletie-'signatures'. De combinatie van deze veranderingen verspreidt over het gehele genoom zijn ontstaan als het gevolg van processen in de cel, zoals DNA-replicatie en DNA-schadereparatie, en weerspiegelen daarom de somatische processen in de cel (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures>). Volgens de onderzoekers waren 124/560 (22%) tumoren HRD, waaronder 55 met *BRCA1/2*-kiembaanmutaties, 22 met somatische *BRCA1/2*-mutaties of *BRCA1*-promotormethylering en 47 tumoren zonder *BRCA1/2*-defecten. Bij 33 vergevorderde borstkankers die waren behandeld met cisplatine hadden de patiënten met een hoge HRDetect-score een langere mediane totale overleving van 1,3 jaar ten opzichte van patiënten met een lage score ( $p=0,04$ ). Daarnaast was een hoge HRDetect-score geassocieerd met drie maanden langere 'total duration of therapy' (TDT) ten opzichte van patiënten met een lage score ( $p<0,001$ ).<sup>28</sup> Hierbij moet worden vermeld dat deze retrospectieve analyse een gebrekkige methodologische opzet had en slechts een eerste indicatie geeft. Er is uitgebreider onderzoek nodig naar de voorspellende waarde van HRDetect voor klinische respons. Alhoewel de test veelbelovend is, is het voor klinisch gebruik momenteel nog niet geschikt gezien de kosten (uitgebreide genetische analyses), de noodzaak voor vriesmateriaal en dat het lang duurt voordat de testuitslag bekend is (zeker enkele weken tot maanden).

### FUNCTIONELE BEPALING VAN HR-CAPACITEIT

Bovengenoemde HRD-testen vallen in principe alle in dezelfde categorie, aangezien ze gebaseerd zijn op veranderingen op DNA- en RNA-niveau in de tumor. Deze testen meten de accumulatie van veranderingen die in de tumor in de

loop van de tijd zijn ontstaan en reflecteren niet precies de daadwerkelijke status van de HR-'pathway' op het moment van testen, waardoor het ontstaan van resistentie kan worden gemist. Een 'real-time' HR-status kan wel worden verkregen door functioneel de activiteit van de HR-'pathway' te testen. Dit kan worden getest door in vers tumorweefsel *ex vivo* te meten of na inductie van dubbelstrengs-DNA-schade bepaalde eiwitten uit de HR-'pathway' (RAD51) naar de breuken in het DNA worden gerekruteerd. De accumulatie van deze RAD51-eiwitten op de plek van de DNA-schade kan microscopisch worden beoordeeld (zichtbaar als foci); HRD-tumoren laten geen RAD51-foci zien, terwijl HR-proficiënte tumoren dat wel doen, wat wijst op een actieve HR-'pathway'. Het voordeel van deze zogenoemde 'REpair CAPacity' (RECAP)-test is de directe maat van HR-capaciteit op dat moment ('real-time'), ongeacht de exacte onderliggende defecten leidend tot HRD. Aangezien resistentie met name optreedt na blootstelling aan chemotherapie of PARP-remmers en genomische HRD-testen theoretisch in de gemetastaseerde setting minder geschikt lijken, zou de functionele HRD-test zeker bij gemetastaseerde ziekte een veelbelovende test kunnen blijken om HRD-tumoren te selecteren. Voor klinische implementatie van de functionele HRD-test is eerst klinische validatie nodig. Functionele HRD-testen hebben lage kosten en de resultaten zijn beschikbaar binnen een week. Een ander voordeel is dat de test ook kan worden uitgevoerd op weefsel met een laag tumorcelpercentage, aangezien de test onder de microscoop wordt uitgelezen, waarbij specifiek wordt gezocht naar de tumorcellen tussen het stroma.<sup>29,30</sup> Dit in tegenstelling tot genomische testen die vaak een hoog percentage tumorcellen nodig hebben voor een betrouwbare testuitslag. Het grootste nadeel van functioneel testen is dat er vers materiaal voor nodig is, wat logistiek lastiger is in de kliniek. Sinds kort is een prospectieve fase 2-studie gestart (de ABC-studie), waarin *BRCA1*-like HER2-negatieve borstkankerpatiënten geselecteerd op basis van de 'BRCA1 classifier' worden behandeld met niraparib (NCT02826512). Naast de 'BRCA1 classifier' wordt in deze studie ook de RECAP-test uitgevoerd, zodat de voorspellende waarden van deze twee HRD-testen kunnen worden vergeleken.

### DISCUSSIE

Er is een duidelijke klinische vraag naar betere voorspellende testen voor respons op PARP-remmers (en DSB-inducerende chemotherapie), aangezien het indicatiegebied voor PARP-remmers zich niet lijkt te beperken tot *BRCA1/2*-kiembaanmutatie-geassocieerde tumoren. HRD-testen komen in allerlei vormen voor, maar studies die de prospectief voorspellende waarde bepalen zijn nog niet gepubliceerd. Daar-

naast zijn de HRD-testen van verschillende categorieën nog niet binnen eenzelfde cohort vergeleken. Het is daarom nog niet duidelijk of alle HRD-testen daadwerkelijk dezelfde patiënten identificeren, hoewel veel HRD-testen ongeveer op hetzelfde aantal (20%) primaire HRD-borsttumoren uitkomt. Kortom, voor primaire tumoren lijken vooralsnog de HRD-testen gebaseerd op genomische veranderingen (zoals BRCA1-like-test, HRDetect) veelbelovend. Validatie in prospectieve studies en vergelijkende studies tussen de testen zijn echter wel gewenst. Bij gemetastaseerde tumoren heeft mogelijk een functionele HRD-test de voorkeur. Prospectieve studies zullen dit uitwijzen.

## REFERENTIES

- Nelson HD, et al. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: a systematic review to update the U.S. Preventive Services Task Force recommendation. *Ann Intern Med* 2014;160(4):255-66.
- Gonzalez-Angulo AM, et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(5):1082-9.
- Hartman AR, et al. Prevalence of BRCA mutations in an unselected population of triple-negative breast cancer. *Cancer* 2012;118(11):2787-95.
- Aguilera A, et al. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* 2008;9(3):204-17.
- Helleday T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis* 2010;31(6):955-60.
- Hiom K. Coping with DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 2010;9(12):1256-63.
- Saleh-Gohari N, et al. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res* 2004;32(12):3683-8.
- Prakash R, et al. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7(4):a016600.
- Ledermann J, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(8):852-61.
- Robson M, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. *N Engl J Med* 2017;377(6):523-33.
- Ledermann JA, et al. Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016;17(11):1579-89.
- Mirza MR, et al. Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer. *N Engl J Med* 2016;375(22):2154-64.
- McCabe N, et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res* 2006;66(16):8109-15.
- Chae YK, et al. Genomic landscape of DNA repair genes in cancer. *Oncotarget* 2016;7(17):23312-21.
- Nik-Zainal S, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* 2016;534(7605):47-54.
- Patch AM, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature* 2015;521(7553):489-94.
- Pennington KP, et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2014;20(3):764-75.
- Wolf DM, et al. DNA repair deficiency biomarkers and the 70-gene ultra-high risk signature as predictors of veliparib/carboplatin response in the I-SPY 2 breast cancer trial. *NPJ Breast Cancer* 2017;3:31.
- Swisher EM, et al. BRCA1 and RAD51C promoter hypermethylation confer sensitivity to the PARP inhibitor rucaparib in patients with relapsed, platinum-sensitive ovarian carcinoma in ARIEL2 Part 1. *Gynecol Oncol* 2017;145:5.
- Joosse SA, et al. Prediction of BRCA2-association in hereditary breast carcinomas using array-CGH. *Breast Cancer Res Treat* 2012;132(2):379-89.
- Joosse SA, et al. Prediction of BRCA1-association in hereditary non-BRCA1/2 breast carcinomas with array-CGH. *Breast Cancer Res Treat* 2009;116(3):479-89.
- Vollebergh MA, et al. An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients. *Ann Oncol* 2011;22(7):1561-70.
- Schouten PC, et al. BRCA1-like profile predicts benefit of tandem high dose epirubicin-cyclophosphamide-thiotepa in high risk breast cancer patients randomized in the WSG-AM01 trial. *Int J Cancer* 2016;139(4):882-9.
- Timms KM, et al. Association of BRCA1/2 defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res* 2014;16(6):475.
- Telli ML, et al. Homologous recombination deficiency (HRD) score predicts response to platinum-containing neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22(15):3764-73.
- Tutt A, et al. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT trial. *Nat Med* 2018;24(5):628-37.
- Davies H, et al. HRDetect is a predictor of BRCA1 and BRCA2 deficiency based on mutational signatures. *Nat Med* 2017;23(4):517-25.
- Zhao EY, et al. Homologous recombination deficiency and platinum-based therapy outcomes in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23(24):7521-30.
- Mutter RW, et al. Bi-allelic alterations in DNA repair genes underpin homologous recombination DNA repair defects in breast cancer. *J Pathol* 2017;242(2):165-77.
- Naipal KA, et al. Functional ex vivo assay to select homologous recombination-deficient breast tumors for PARP inhibitor treatment. *Clin Cancer Res* 2014;20(18):4816-26.
- Telli ML, et al. Phase II study of gemcitabine, carboplatin, and iniparib as neoadjuvant therapy for triple-negative and BRCA1/2 mutation-associated breast cancer with assessment of a tumor-based measure of genomic instability: PRECOG 0105. *J Clin Oncol* 2015;33(17):1895-901.

ONTVANGEN 25 JUNI 2018, GEACCEPTEERD 27 AUGUSTUS 2018.