

Znaczenie badań molekularnych w kwalifikacji do terapii I linii erlotynibem chorych na NDRP na podstawie wyników badania EURTAC

Role of molecular examinations in qualification to first line treatment with erlotinib in NSCLC patients based on EURTAC study results

dr hab. n. med. Paweł Krawczyk

*Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Janusz Milanowski*

STRESZCZENIE

W latach 2010–2011 pierwszy inhibitor kinazy tyrozynowej EGFR (IKT EGFR) – gefitynib uzyskał w wielu krajach rejestrację do leczenia w I linii chorych na zaawansowanego i miejscowo zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP), u których występowały mutacje w genie *EGFR*. Okazało się także, że obecność tych mutacji jest kluczowa dla skuteczności innego odwracalnego IKT EGFR – erlotynibu, stosowanego dotychczas głównie w monoterapii II linii u chorych na NDRP z nieznanym statusem genu *EGFR*. Badania obu leków przeprowadzano najczęściej na azjatyckich populacjach chorych na NDRP, w których częstość występowania mutacji w genie *EGFR* jest dużo wyższa niż w populacjach kaukaskich. Badanie EURTAC oraz poprzedzające je badanie przeprowadzone przez Rosella i wsp. były pierwszymi, które potwierdziły skuteczność erlotynibu u chorych na gruczołowego raka płuca rasy kaukaskiej posiadających najczęstsze mutacje w genie *EGFR*, tj. delecje w eksonie 19 lub substytucję L858R w eksonie 21 tego genu. Nowatorski charakter w tym badaniu miała próba wykrycia mutacji w genie *EGFR* w wolnym DNA krążącym we krwi obwodowej, co mogłoby rozszerzyć możliwości kwalifikacji chorych na zaawansowanego NDRP do leczenia IKT EGFR. Badanie EURTAC ma także pewne mankamenty, do których należy przede wszystkim dyskwalifikacja z leczenia erlotynibem chorych z innymi postaciami niepłaskonabłonkowego NDRP (np. pacjentów z rakiem wielkokomórkowym mogących być nosicielami mutacji w genie *EGFR*) oraz z rzadkimi mutacjami w genie *EGFR*.

SŁOWA KLUCZOWE: rak gruczołowy płuca, mutacje genu *EGFR*, erlotynib

ABSTRACT

Between 2010–2011 the first EGFR thymosine kinase inhibitor (EGFR TKI) – gefitinib, was registered in many countries in I line of treatment in patients with advanced and locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC), among whom *EGFR* gene mutations have been detected. It was also found that the presence of these mutations is crucial for the effectiveness of EGFR TKI – erlotinib, used so far mainly in monotherapy in II line in NSCLC patients, with unknown *EGFR* gene status. Studies of these two drugs concerned mostly Asian NSCLC populations, where *EGFR* gene mutations occurrence is much higher than in Caucasian populations. The EURTAC study, and a study by Rosell et al. previous to it, were the first ones that confirmed the effectiveness of erlotinib in adenocarcinoma patients of Caucasian origin, who carried *EGFR* gene mutations: exon 19 deletions or L858R substitution in exon 21 of this gene. The innovative nature of this study is to attempt to detect *EGFR* gene mutations in free circulating DNA in peripheral blood, which could broaden the possibility of advanced NSCLC patients qualification to EGFR TKI treatment. The EURTAC study also has its weaknesses, among which disqualification of patients with other forms of non-squamous NSCLC (e.g. large cell carcinoma patients, who also might be carriers of *EGFR* gene mutations) and patients with rare *EGFR* gene mutations, are the most distinct.

KEY WORDS: lung adenocarcinoma, EGFR gene mutations, erlotinib

WPROWADZENIE

Kwalifikację chorych do leczenia erlotynibem lub chemioterapią w badaniu III fazy EURTAC (*European Tarceva versus Chemotherapy*) poprzedziło badanie molekularne statusu genu *EGFR* w komórkach nowotworowych 1227 chorych na NDRP. Przeprowadzono je w latach 2007–2010 w 42 hiszpańskich, francuskich i włoskich ośrodkach klinicznych, niemal wyłącznie u chorych rasy kaukaskiej. Należy zauważyć, że EURTAC, którego głównym organizatorem była Hiszpańska Grupa Raka Płuca oraz Rafael Rosell z Katalońskiego Instytutu Onkologii w Barcelonie, jest największym badaniem możliwości zastosowania IKT *EGFR* u chorych rasy kaukaskiej. Nic więc dziwnego, że jego wyniki miały ogromny wpływ na sposób planowania leczenia za pomocą IKT *EGFR* w wielu krajach europejskich. W Polsce oddziaływały one na kryteria sposobu kwalifikowania do terapii IKT *EGFR* w ramach obowiązujących od lipca 2012 r. programów lekowych. Badanie IPASS (*Iressa Pan-Asian Study*), choć rozpoczęło okres wielkiego zainteresowania terapiami ukierunkowanymi molekularnie (gefitynib) stosowanymi zamiast standardowej chemioterapii w I linii leczenia NDRP u wyselekcjonowanych genetycznie chorych (obecność mutacji w genie *EGFR*), dotyczyło głównie chorych azjatyckich, u których biologia raka płuca jest inna niż u chorych rasy kaukaskiej [1–3].

BADANIE MUTACJI W GENIE *EGFR* U CHORYCH KWALIFIKOWANYCH DO LECZENIA ERLOTYNIBEM LUB CHEMIOTERAPIĄ W BADANIU EURTAC

Komórki nowotworowe do badania DNA na obecność mutacji w genie *EGFR* były pozyskiwane z blozków parafinowych

i preparatów histologicznych na drodze mikrodysekcji tkanki nowotworowej, a wolne, krążące DNA uzyskiwano z osocza krwi obwodowej. Metody wykorzystujące powinowactwo DNA do ziół krzemionkowych posłużyły do izolacji DNA. Obecność najczęstszych mutacji w eksonach 19 i 21 była analizowana metodą bezpośredniego sekwencjonowania, której czułość pozwala na wykrycie mutacji w materiale zawierającym co najmniej 50% komórek nowotworowych. Ponadto autorzy badania posłużyli się własnymi metodami (LDTs, *home-made, lab-developed tests*) detekcji delecji w eksonie 19 genu *EGFR* za pomocą analizy długości amplifikowanych fragmentów DNA znakowanych fluorochromem (FAM) w sekwenatorze ABI Prism 3130 (Genescan). Natomiast do wykrycia substytucji L858R posłużyły im sondy TaqMan firmy Applied Biosystem oraz technika real-time PCR (brak rejestracji do diagnostyki in vitro – CE/IVD). Czułość tych metod powinna być wystarczająca do wykrycia mutacji w materiałach zawierających 1–10% komórek nowotworowych. Niestety, w artykule, który ukazał się w „Lancet Oncology” w 2012 r., zabrakło porównania czułości i swoistości wymienionych metod [1]. Dopiero w retrospektywnej analizie przedstawionej przez Benllocha i wsp. podczas kongresu ASCO 2012 porównano możliwości wykrycia mutacji w genie *EGFR* metodami LDTs (w tym za pomocą sekwencjonowania bezpośredniego i sekwencjonowania następných generacji) oraz nowym wówczas testem opartym na technice allelospecyficznego PCR (ASP-PCR) i metodzie real-time PCR z wykorzystaniem platformy Cobas firmy Roche Diagnostic. Zgodność wyników pozytywnych na obecność mutacji w genie *EGFR* uzyskanych testami LDTs i ASP-PCR wynosiła 93,7%, a wyników negatywnych – 97,5%, przy czym największe rozbieżności uzyskanych wyników odnotowano między

techniką ASP-PCR a sekwencjonowaniem bezpośrednim. Metoda ASP-PCR ujawniła 25 chorych z delecją w eksonie 19 i 7 chorych z substytucją L858R w eksonie 21 genu *EGFR*, u których nie udało się potwierdzić tych mutacji metodą bezpośredniego sekwencjonowania (88,3% zgodności wyników) [4].

Autorzy EURTAC pominęli możliwość badania rzadkich mutacji w genie *EGFR*, w tym stosunkowo częściej (5% mutacji) substytucji L861Q w eksonie 21 i substytucji G719X w eksonie 18 [1]. Natomiast informacje o wpływie obecności w komórkach nowotworowych substytucji T790M w eksonie 20 genu *EGFR* na przeżycie leczonych erlotynibem (hipotetyczna oporność na IKT *EGFR*) ukazały się w formie doniesienia konferencyjnego ogłoszonego podczas kongresów ESMO (w doniesieniu tym analizowano także znaczenie substytucji R273H w genie *TP53* oraz rearanżacji *EML4-ALK*) oraz ASCO w 2012 r. [5, 6]. W doniesieniu Rosella i wsp. substytucję T790M wykryto za pomocą sond TaqMan i PNA (*peptide nucleic acid*) u 21 chorych z najczęstszymi mutacjami w genie *EGFR* leczonych erlotynibem (32,8%) i u 26 takich chorych leczonych chemioterapią (44,1%). Mutacja ta była wykrywana pierwotnie przed rozpoczęciem jakiegokolwiek leczenia. Ku zaskoczeniu badaczy u chorych z najczęstszymi mutacjami genu *EGFR* i substytucją T790M zarówno leczenie erlotynibem, jak i chemioterapia były skuteczniejsze niż u chorych pozbawionych mutacji T790M. Mediana czasu wolnego od progresji po leczeniu erlotynibem u chorych z substytucją T790M wynosiła 12,1 miesiąca, a u chorych bez tej mutacji tylko 8,8 miesiąca ($p < 0,0001$). Chorzy z mutacją w eksonie 20 mieli także dłuższe całkowite przeżycie niż chorzy bez substytucji T790M [6].

Fakty te miały poważne konsekwencje dla planowania leczenia IKT *EGFR* w wielu krajach europejskich. W Polsce obowiązujący obecnie program lekowy dotyczący stosowania gefitynibu w I linii leczenia NDRP oraz erlotynibu w II linii leczenia NDRP umożliwia kwalifikowanie do terapii jedynie w przypadku delecji w eksonie 19 lub substytucji L858R w eksonie 21, choć wiadomo, że chorzy z rzadkimi mutacjami w eksonach 18 i 21 także mogliby odnieść korzyść z terapii IKT *EGFR*, a chorzy z substytucją T790M w eksonie 20 oraz z rzadkimi insercjami w tym eksonie (są to także mutacje kierujące) mogą nie być oporni na tego rodzaju terapię.

Nowością w tak dużym badaniu klinicznym, jakim było EURTAC, stanowiło poszukiwanie metod umożliwiających wykrycie mutacji w genie *EGFR* we krwi obwodowej oraz porównanie tych metod pod względem czułości i skuteczności z metodami stosowanymi do wykrywania mutacji w komórkach nowotworowych. Mutacje w wolnym, krążącym DNA były wykrywane za pomocą opisanych wyżej metod oraz za pomocą bardzo czułej ($< 0,1\%$

zmutowanego DNA) metody PNA/LNA Clamp PCR (zaciskowy PCR) z wykorzystaniem sond PNA, których zadaniem było wyciszenie amplifikacji dzikiego typu genu *EGFR* [1].

Mimo dyskusyjnego sposobu doboru metod diagnostyki molekularnej genu *EGFR* badacze wykryli 173 chorych (14,1%) na NDRP z najczęstszymi mutacjami genu *EGFR* w komórkach nowotworowych. Chorzy ci następnie zostali zakwalifikowani do terapii erlotynibem lub do chemioterapii. Wysoki odsetek chorych z mutacjami w genie *EGFR* w tym badaniu wynikał prawdopodobnie z przeprowadzenia przez autorów wstępnej selekcji pod kątem cech demograficzno-klinicznych. W związku z tym w grupie, w której przeprowadzono badania molekularne, wysoki był odsetek kobiet i osób niepalących. Jednak autorzy niestety nie podali charakterystyki wyjściowej populacji, w której wykonano oznaczenie mutacji genu *EGFR* [1].

EFEKT LECZENIA ERLOTYNIBEM LUB CHEMIOTERAPIĄ A STATUS MUTACJI W GENIE *EGFR* WEDŁUG WYNIKÓW BADANIA EURTAC

W badaniu EURTAC erlotynib otrzymało 86, a standardową chemioterapię 87 chorych na NDRP w stopniu zaawansowania IIIB lub, w przeważającej większości (wg obecnie przyjętej klasyfikacji), IV (tylko jeden chory w stopniu zaawansowania IIIA) z aktywnymi mutacjami w genie *EGFR*. W czasie planowania badania EURTAC pemetreksed nie był standardowo stosowany w leczeniu I linii NDRP, dlatego też schematy chemioterapii obejmowały połączenie cisplatyny lub karboplatyny z winorelbina lub gemcytabiną (najczęściej) [1].

W obu ramionach badania ponad 90% stanowili chorzy na raka gruczołowego, choć do leczenia zakwalifikowano także pojedynczych chorych na raka wielkokomórkowego i płaskonabłonkowego, u których zdiagnozowano mutację w genie *EGFR* [1]. Jest to kolejny fakt, który wpłynął pośrednio na sposób planowania leczenia NDRP w wielu krajach europejskich. W Polsce zgodnie z zapisem programu lekowego do terapii IKT *EGFR* (niezależnie od linii stosowanego leczenia) mogą być kwalifikowani jedynie chorzy na raka gruczołowego, choć wiadomo, że u chorych na raka wielkokomórkowego bez cech neuroendokrynnych mutacje w genie *EGFR* występują z częstością ok. 7–8%. Chorzy ci nie mogą być leczeni IKT *EGFR*, choć w ich komórkach nowotworowych można wykryć mutację w genie *EGFR*. Inna sprawa, że rak wielkokomórkowy wykrywany jest stosunkowo rzadko ($< 10\%$ przypadków NDRP), a do jego zdiagnozowania konieczne jest przebadanie całego guza usuniętego podczas zabiegu operacyjnego. Większy problem stanowi natomiast rezygnacja z przeprowadzania diagnostyki mutacji w genie *EGFR* u chorych na

NDRP bez zdiagnozowanego patomorfologicznego typu nowotworu (NOS, *not-otherwise specified*). W polskich warunkach u wielu chorych nie wykonuje się pełnej diagnostyki patomorfologicznej z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych używanych w diagnostyce immunohistochemicznej (IHC) lub w trakcie diagnostyki pobrano u nich zbyt mało materiału, aby precyzyjnie zdiagnozować typ NDRP. Takich chorych może być w Polsce nawet ponad 20%, a połowa z nich choruje na raka gruczołowego, w którym diagnostyka mutacji w genie *EGFR* powinna być wykonana. Bardzo istotna jest natomiast informacja, że wynik badania molekularnego niezbędnego do prawidłowej kwalifikacji do leczenia był w badaniu EURTAC dostępny już po 7 dniach od rozpoczęcia procedury diagnostycznej, co w Polsce jest trudne do zrealizowania i w skrajnych przypadkach, z powodu opóźnień diagnostycznych, prowadzi nawet do rezygnacji z terapii ukierunkowanych molekularnie na rzecz chemioterapii [7].

Delecja w eksonie 19 genu *EGFR* w badaniu EURTAC była wykrywana znacznie częściej (ponad 65%) niż substytucja L858R w eksonie 21. Brakuje informacji, którą z metod molekularnych stosowanych w badaniu wykrywano mutacje i czy istniał wpływ zastosowanej metody na możliwość wykrycia mutacji w genie *EGFR*. Mutacje wykrywano przede wszystkim u osób niepalących (66% chorych leczonych erlotynibem i 72% leczonych chemioterapią), ale diagnozowano je także u byłych (odpowiednio 26% i 14%) i aktualnych palaczy (odpowiednio 8% i 14%). Mutacje niemal nie występowały u osób młodych, przed 50. r.ż., a mediana wieku badanych z mutacją w genie *EGFR* wynosiła 65 lat [1]. Dane demograficzne dotyczące występowania mutacji w genie *EGFR* są bardzo charakterystyczne dla populacji kaukaskiej i różnią się od analogicznych danych uzyskanych w grupach azjatyckich, co potwierdza hipotezę o zupełnie innym podłożu molekularnym NDRP u chorych z różnych etnicznie populacji. Ponadto potwierdza się fakt, że cechy kliniczne (płeć i status palenia) chorych rasy kaukaskiej nie mogą być wykorzystane przy kwalifikacji do badania mutacji w genie *EGFR* oraz leczenia IKT EGFR [2, 3].

W badaniu EURTAC odsetek chorych z całkowitą odpowiedzią na leczenie erlotynibem wynosił 3%, a chorych z odpowiedzią częściową – 61%. Tymczasem w grupie leczonych chemioterapią odnotowano jedynie 18% obiektywnych odpowiedzi (iloraz szans = 7,5; $p < 0,0001$). Najważniejszym wynikiem badania EURTAC jest stwierdzenie istotnie dłuższego czasu wolnego od progresji (PFS, *progression free survival*) u chorych na NDRP z aktywującymi mutacjami w genie *EGFR* w grupie leczonej erlotynibem niż u chorych otrzymujących chemioterapię – mediana PFS wynosiła 9,7 vs 5,2 miesiąca, HR (*hazard ratio*) wynosił 0,37. Spektakularny jest fakt, że dwa lata bez progresji przeżyło

10% chorych leczonych erlotynibem i żaden chory otrzymujący chemioterapię. Natomiast całkowity czas życia (OS, *overall survival*) był podobny (mediana OS nieco ponad 19 miesięcy) u leczonych erlotynibem i u otrzymujących chemioterapię – większość chorych na NDRP z mutacją w genie *EGFR* otrzymujących w I linii chemioterapię, w II linii otrzymało IKT EGFR (76% – efekt *crossover*) [1].

Wiele typowych czynników klinicznych, jak stan sprawności chorych (PS, *performance status*), miało wpływ na skuteczność leczenia w obu ramionach badania. Na uwagę zasługuje fakt, że osoby niepalące i z mutacją w genie *EGFR* odnoszą spektakularną korzyść z terapii erlotynibem w porównaniu z efektami chemioterapii. Natomiast w grupie chorych palących oraz wśród byłych palaczy takich różnic skuteczności leczenia w badaniu EURTAC nie odnotowano [1]. Odpowiedzialna za to zjawisko może być heterogenność guzów NDRP u palących chorych rasy kaukaskiej. Prawdopodobnie pod wpływem palenia dochodzi do powstawania szeregu nieprawidłowości genetycznych, na poziomie zarówno chromosomalnym, jak i pojedynczych genów. Tymczasem w innym klonie komórkowym nabłonka, zwłaszcza kilka lat po zaprzestaniu palenia, dochodzi do pojedynczych mutacji w genie *EGFR*. Dlatego w jednym guzie mogą współistnieć komórki nowotworowe z mutacją w genie *EGFR* wrażliwe na IKT EGFR oraz komórki bez mutacji niewrażliwe na taką terapię. U chorych z molekularnie heterogennymi guzami możemy obserwować słabą odpowiedź na leczenie IKT EGFR, a nawet szybką progresję klonu komórek nowotworowych bez mutacji [2, 3].

Większą korzyść z leczenia erlotynibem niż z chemioterapii odnosili chorzy posiadający delecje w eksonie 19 niż mający substytucję L858R w eksonie 21 genu *EGFR* (HR dla delecji wynosił 0,33, a dla substytucji 0,55) [1]. Mimo że różnica ta nie była istotna statystycznie ($p = 0,075$), to należy zauważyć, że podobną tendencję odnotowano w kilku azjatyckich badaniach porównujących skuteczność IKT EGFR ze skutecznością chemioterapii I linii u chorych z mutacjami w genie *EGFR* [2, 3]. Chociaż obie mutacje są tzw. mutacjami kierującymi (*driver mutations*) i odpowiadają za proces kancerogenezy komórek nabłonka oskrzeli, to można przypuszczać, że ich role nie są jednakowe. Delecja 15 par zasad w eksonie 19 (najczęstsza delecja) skutkuje ubytkiem 5 aminokwasów w domenie kinazy tyrozynowej EGFR, co doprowadza do nadmiernej zdolności tej kinazy do fosforylacji kolejnych białek szlaku sygnałowego (Pi3K/AKT/RAS) i proliferacji komórki. Substytucja w eksonie 21 prowadzi do zamiany tylko jednego aminokwasu w pozycji 858 domeny kinazy tyrozynowej (leucyny na argininę), co funkcjonalnie może nie być identyczne z delecją 5 aminokwasów w pozycjach 746–750 tej domeny. Innym wytłumaczeniem różnic w odpowiedzi na tera-

pię erlotynibem u chorych z różnymi mutacjami w genie *EGFR* mogą być problemy diagnostyczne. W EURTAC do badania obu mutacji wykorzystano metodę bezpośredniego sekwencjonowania oraz dwie różniące się metodologicznie i pod względem czułości techniki PCR. Technika z zastosowaniem sond TaqMan wykorzystana do badania substytucji L858R wydaje się bardziej czuła niż PCR z badaniem długości amplifikowanych odcinków eksonu 19, a konstrukcja sond TaqMan dodatkowo może wiązać się z nieswoistym ich wiązaniem z niezmutowanym odcinkiem pofragmentowanego i złego jakościowo DNA (brak certyfikatu CE/IVD w przypadku obu metod). Wziąwszy to pod uwagę, możliwe jest wykrycie substytucji L858R w bardziej heterogenych genetycznie guzach NDRP (komórki z mutacją i bez niej) niż w przypadku delecji w eksonie 19, a nawet istnieje ryzyko uzyskania wyników fałszywie dodatnich oznaczania substytucji L858R. Obie te hipotezy wydają się równie prawdopodobne i mogą wyjaśniać gorszą odpowiedź na IKT *EGFR* u niektórych chorych z substytucją L858R [1–3].

Potwierdzenia pierwszej z powyższych teorii można doszukać się w doniesieniach Costy i wsp. oraz Buges i wsp. ogłoszonych podczas kongresu ASCO 2012. W pierwszym z nich autorzy przeanalizowali wpływ rodzaju delecji w eksonie 19 na skuteczność leczenia erlotynibem i chemioterapią w badaniu EURTAC. Okazało się, że chorzy z najczęstszą delecją 15 par zasad w kodonach 746–750 eksonu 19 (w badaniu EURTAC – 71,9% wykrywanych mutacji u chorych leczonych erlotynibem) odnoszą mniejszą korzyść z terapii erlotynibem i chemioterapii niż chorzy z rzadkimi delecjami w domenie kinazy tyrozynowej genu *EGFR* (w tym delecje 9, 12 i 18 par zasad). Chorzy z najczęstszą delecją w eksonie 19 leczeni erlotynibem nie tylko rzadziej odpowiadali na terapię niż chorzy z rzadkimi delecjami w eksonie 19 (53,6% vs 68,7%), ale również mieli krótszy czas do progresji i całkowity czas życia [8].

W doniesieniu Buges i wsp. dokonano analizy wpływu rodzaju mutacji na pojawienie się najczęstszego powikłania terapii erlotynibem pod postacią wysypki, której wystąpienie zazwyczaj jest związane z lepszą odpowiedzią na terapię IKT *EGFR*. 80% chorych z wysypką w stopniu umiarkowanym lub ciężkim miało delecje w eksonie 19, a tylko 20% substytucję L858R w eksonie 21 genu *EGFR* ($p = 0,039$). U chorych z wysypką w stopniu 2+ mediana PFS w trakcie terapii erlotynibem wynosiła 11,2 miesiąca, a u chorych bez wysypki lub z wysypką w stopniu 1 (według CTC, *common toxicity criteria*) tylko 8,4 miesiąca. Stopień ciężkości wysypki korelował nie tylko z długością PFS, ale także z długością całkowitego przeżycia po terapii erlotynibem (mediany OS różniły się tylko, jeśli porównano grupy chorych z wysypką w stopniu 2+ i chorych bez wysypki) [9].

MOŻLIWOŚĆ WYKRYCIA MUTACJI W GENIE *EGFR* WE KRWI OBWODOWEJ I DALSZE KIERUNKI BADAŃ

Nowatorskie podejście w badaniu Rosella i wsp. polegało na próbie oznaczenia obecności mutacji w genie *EGFR* w wolnym, krążącym DNA izolowanym z surowicy krwi obwodowej za pomocą bardzo czułej metody PNA/LNA Clamp PCR [1]. Gdyby w tej próbie dowiedziono, że mutacja we krwi obwodowej wykrywana jest u niemal wszystkich chorych z potwierdzoną mutacją genu *EGFR* w guzie pierwotnym, to pojawiłaby się nadzieja na kwalifikowanie do terapii IKT *EGFR* pacjentów, u których materiał pobrany do diagnostyki patomorfologicznej był niewystarczający do poszerzenia diagnostyki o badanie molekularne lub DNA po izolacji było złe jakościowo. Byłoby to szczególnie ważne dla chorych, u których niemożliwe jest powtórne pobranie materiału z tkanki nowotworowej (np. w złym stanie sprawności czy w podeszłym wieku).

Badania molekularne przeprowadzone przez zespół Rosella, poprzedzające badanie EURTAC, pozwoliły wykryć w komórkach nowotworowych różne delecje w eksonie 19 genu *EGFR* u 135 chorych, a substytucję L858R w genie *EGFR* u 82 chorych. Nie wszyscy z tej 217-osobowej grupy otrzymali leczenie erlotynibem lub chemioterapię, a materiał w postaci wyizolowanego z krwi obwodowej wolnego, krążącego DNA był dostępny w przypadku 164 chorych. Wstępne wyniki Rosella i wsp. pozwalają ocenić skuteczność metody PNA/LNA Clamp PCR zastosowanej do wykrycia mutacji w genie *EGFR* w wolnym, krążącym DNA. W materiale tym badane mutacje wykryto u 97 chorych (pełna zgodność badania molekularnego wolnego, krążącego DNA i DNA z komórek nowotworowych guza NDRP), natomiast u 67 chorych (40,85%) z mutacją genu *EGFR* wykrytą w komórkach nowotworowych nie udało się potwierdzić jej obecności w wolnym, krążącym DNA. Odsetki chorych z poszczególnymi rodzajami mutacji wykrytymi w wolnym, krążącym DNA były niemal identyczne z tymi, które były oszacowane na podstawie badań komórek nowotworowych. Delecję w eksonie 19 genu *EGFR* wykryto u 64 chorych (66% wykrytych mutacji w wolnym, krążącym DNA), a substytucję L858R genu *EGFR* u 33 chorych (34%) [10]. Wyniki tego badania nie potwierdzają możliwości wykorzystania badania PNA/LNA Clamp PCR do wykrywania którejkolwiek z najczęstszych mutacji genu *EGFR* w wolnym, krążącym DNA zamiast badania molekularnego różnymi metodami (w tym sekwencjonowania metodą Sangera) DNA wyizolowanego z komórek nowotworowych. Istnieją jednak doniesienia o bardzo wysokiej czułości technik, takich jak wysokosprawna chromatografia cieczowa, w wykrywaniu mutacji genu *EGFR* we krwi obwodowej. Jednak z drugiej strony rezultaty badania EURTAC nie prze-

kreślają możliwości wykorzystania wyniku badania molekularnego krwi obwodowej w kwalifikacji do terapii IKT EGFR w sytuacji zupełnego braku dostępu do tkanki nowotworowej [1, 10].

Taką możliwość stwarzają wyniki badania EURTAC dotyczące skuteczności erlotynibu u chorych z mutacją genu *EGFR* wykrytą w wolnym, krążącym DNA. Badanie to przeprowadzono w grupie 109 chorych z badania EURTAC, w których przypadku dostępne było DNA wyizolowane z krwi obwodowej. 57 osób z tej grupy było leczonych erlotynibem, a 52 – chemioterapią. U 58 chorych mutację w genie *EGFR* wykryto w wolnym, krążącym DNA i w komórkach nowotworowych, a u pozostałych – tylko w komórkach nowotworowych. Stwierdzono podobną odpowiedź na leczenie erlotynibem i chemioterapią u chorych, u których mutację wykryto jednocześnie w komórkach nowotworowych i w wolnym, krążącym DNA, oraz u chorych z mutacją wykrytą tylko w komórkach nowotworowych. Mediana czasu wolnego od progresji w grupie z mutacją genu *EGFR* wykrytą w wolnym, krążącym DNA leczonej erlotynibem wynosiła 10,7 miesiąca (95% CI: 6,8–15,5), natomiast w analogicznej grupie, ale otrzymującej chemioterapię – 4,2 miesiąca (95% CI: 3,2–6,0; HR = 0,25; p = 0,0002). U chorych, u których mutacja genu *EGFR* w wolnym, krążącym DNA nie była możliwa do wykrycia, mediana czasu wolnego od progresji w grupie leczonej erlotynibem wynosiła 12,6 miesiąca (95% CI: od 8,3 miesiąca, górnej granicy nie określono, ponieważ chorzy pozostawali w remisji po zakończeniu badania), a w grupie otrzymującej chemioterapię 6 miesięcy (95% CI: 4,9–9; HR = 0,29; p = 0,001) [1].

PODSUMOWANIE

Nie ulega wątpliwości, że badanie EURTAC było jednym z najważniejszych i największych tego typu badań dotyczących skuteczności inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR i chemioterapii w leczeniu I linii chorych na NDRP rasy kaukaskiej z najczęstszymi, aktywującymi mutacjami genu *EGFR*. Umożliwiło ono rejestrację erlotynibu w leczeniu I linii w tej grupie, a w Polsce miało duży wpływ na zapisy przygotowanych w lipcu 2012 r. programów lekowych (choć nie dotyczą one stosowania erlotynibu w I linii leczenia NDRP) i dało powód do dyskusji nad ich modyfikacją. Zakres badań molekularnych w badaniu EURTAC był w pewnym stopniu zminimalizowany, być może z powodu rzadkiego występowania mutacji genu *EGFR* w populacji kaukaskiej i konieczności przebadania wielkich grup chorych na NDRP w celu wyselekcjonowania osób, które mogą odnieść korzyść z leczenia IKT EGFR. Dlatego poważnymi wadami badania EURTAC były wykonanie badania molekularnego niemal wyłącznie u chorych na raka gruczołowego, rezygnacja z badania rzadkich mutacji w genie *EGFR* i brak wyraźnego porównania czułości i swoistości testów genetycznych. Może to wpłynąć na niedoskonały i ograniczony sposób prowadzenia diagnostyki molekularnej w wielu krajach europejskich, chociaż badanie EURTAC poszerzyło możliwości badania mutacji o analizę wolnego, krążącego DNA, której wynik mógłby w pewnych szczególnych przypadkach posłużyć do kwalifikacji do leczenia IKT EGFR [1–3].

Piśmiennictwo

1. Rosell R., Carcereny E., Gervais R. et al.; Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Français de Pneumo-Cancérologie and Associazione Italiana Oncologia Toracica: Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13: 239-246.
2. Ku G., Haaland B., de Lima Lopes G.: Gefitinib vs. chemotherapy as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer: meta-analysis of phase III trials. *Lung Cancer* 2011; 74: 469-473.
3. Petrelli F., Borgonovo K., Cabiddu M. et al.: Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutated non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of 13 randomized trials. *Clin. Lung Cancer* 2012; 13(2): 107-14.
4. Benlloch S., Taron M., Botero M. et al.: Retrospective EGFR mutation testing of clinical specimens from the EURTAC trial of erlotinib in non-small cell lung cancer (NSCLC) using a novel allele-specific PCR (AS-PCR) assay. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30(suppl.): abs. 10596.
5. Rosell R., Massuti Sureda B., Costa C. et al.: Concomitant actionable mutations and overall survival (OS) in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p) included in the EURTAC trial: EGFR L858R, EGFR T790M, TP53 R273H and EML4-ALK. *European Society for Medical Oncology* 2012: Abs. LBA31.
6. Rosell R., Molina-Vila M., Taron M. et al.: EGFR compound mutants and survival on erlotinib in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) in the EURTAC study. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30(suppl.): abs. 7522.
7. Krawczyk P., Ramlau R., Powrózek T. et al.: Wykrywalność mutacji w genie EGFR u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca w wybranych ośrodkach w Polsce zaangażowanych w diagnostykę molekularną. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska* 2012; 9 (4): 431-438.
8. Costa E., Taron M., Queralt C. et al.: Differential progression-free survival (PFS) to erlotinib according to EGFR exon 19 deletion type in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) in the EURTAC study. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30 (suppl.): abs. 7540.

9. Buges C., Marti M., Rosell R. et al.: Skin toxicity associated with outcome to erlotinib in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with EGFR mutations in the EURTAC study. J. Clin. Oncol. 2012; 30(suppl.): abs. 7542.
10. Rosell R., Moran T., Queralt C. et al.: Spanish Lung Cancer Group. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. N. Engl. J. Med. 2009; 361(10): 958-67.

For non-commercial use only

Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Paweł Krawczyk
Pracownia Immunologii i Genetyki
Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8, 20-954 Lublin
tel./fax: (81) 724-42-93
e-mail: krapa@poczta.onet.pl