

Výskyt mutací genu EGFR u pacientů s NSCLC v České republice

Ondřej Fiala¹, Monika Šatánková², Juraj Kultán³, Miloš Pešek⁴, Jana Skříčková², Vítězslav Kolek³, Jindřich Fínek¹, Zuzana Zbožínková⁵, Zbyněk Bortlíček⁵

¹Onkologická a radioterapeutická klinika FN a LF UK v Plzni

²Klinika nemocí plicních a TBC LF MU a FN Brno

³Klinika plicních nemocí a tuberkulózy FN a LF UP Olomouc

⁴Klinika pneumologie a ftizeologie FN a LF UK v Plzni

⁵Institut biostatistiky a analýz MU, Brno

Úvod: Nízkomolekulární inhibitory tyrozinkináz receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) představují moderní, účinné preparáty užívané k léčbě pacientů s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC). Aktivační mutace genu EGFR predikují dobrý efekt léčby EGFR tyrozinkinázovými inhibitory. Cílem této studie bylo zmapování výskytu mutací genu EGFR u pacientů s NSCLC v České republice.

Metodika: Celkem 486 pacientů s pokročilým stadiem NSCLC (stadium IIIB a IV) neskvamózního histologického typu bylo vyšetřeno na přítomnost mutace genu EGFR na třech pneumoonkologických pracovištích. Porovnání zastoupení EGFR mutace dle pohlaví, věku a kouření bylo provedeno pomocí Fisherova-exaktního testu.

Výsledky: Mutace genu EGFR byla prokázána u 74 (15,2 %) pacientů. Mutace byly prokázány u 25 (8,8 %) mužů vs. u 49 (24,3 %) žen ($p < 0,001$), u 12 (6,7 %) kuřáků vs. u 20 (11,2 %) exkuřáků vs. u 38 (37,3 %) nekuřáků ($p < 0,001$) a u 32 (15,7 %) pacientů do 65 let věku vs. u 42 (14,9 %) pacientů nad 65 let věku ($p = 0,898$).

Závěr: Mutace genu EGFR byly prokázány u 15,2 % vyšetřených pacientů, nejčastěji u žen a nekuřáků. Dosažené výsledky jsou dobře srovnatelné s doposud publikovanými daty.

Klíčová slova: EGFR, mutace, NSCLC, cílená léčba.

Occurrence of EGFR gene mutations in patients with NSCLC in the Czech Republic

Introduction: Low-molecular-weight tyrosine kinase inhibitors for epidermal growth factor receptor (EGFR) are modern, effective agents used to treat patients with advanced non-small-cell lung carcinoma (NSCLC). Activating EGFR gene mutations predict a good effect of treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors. The goal of this study was to map the occurrence of EGFR gene mutations in patients with NSCLC in the Czech Republic.

Methods: A total of 486 patients with advanced stage of NSCLC (stage IIIB and IV) of nonsquamous histological type were investigated for the presence of EGFR gene mutations at three pneumo-oncology centres. A comparison of distribution of the EGFR mutation according to sex, age, and smoking status was performed by means of Fisher's exact test.

Results: EGFR gene mutation was demonstrated in 74 (15.2%) patients. Mutations were shown in 25 (8.8%) men vs. 49 (24.3%) women ($p < 0.001$), in 12 (6.7%) smokers vs. 20 (11.2%) ex-smokers vs. 38 (37.3%) non-smokers ($p < 0.001$), and in 32 (15.7%) patients under 65 years of age vs. 42 (14.9%) patients over 65 years of age ($p = 0.898$).

Conclusion: EGFR gene mutations were shown in 15.2% of the patients examined, most commonly in female patients and non-smokers. The results obtained are well comparable with the data published to date.

Key words: EGFR, mutation, NSCLC, targeted therapy.

Onkologie 2014; 8(4): 156–159

Úvod

Významný rozvoj cílené léčby v několika posledních letech přinesl řadu preparátů, které prokázaly svojí účinnost v léčbě různých zhoubných nádorů. Zavedení nízkomolekulárních inhibitorů tyrozinkináz receptoru pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor, EGFR) do léčby nemalobuněčného plicního karcinomu (non-small cell lung cancer, NSCLC) přispělo k prodloužení přežití i zlepšení kvality života pacientů s pokročilým stadiem tohoto závažného onemocnění. Tím, jak se zlepšilo porozumění některým molekulárním buněčným mechanismům,

byly nalezeny účinné prediktivní biomarkery této cílené léčby. Aktivační mutace genu EGFR, které jsou lokalizované převážně na exonech 19 (delece) a 21 (bodová mutace, L858R), významným způsobem predikují dobrý efekt léčby EGFR tyrozinkinázovými inhibitory (EGFR-TKI) u pacientů s pokročilým stadiem NSCLC (1, 2). Cílem této studie bylo zmapování výskytu mutací genu EGFR u pacientů s NSCLC v České republice.

Metodika

Do studie bylo zařazeno celkem 486 pacientů s histologicky nebo cytologicky verifikovaným

lokoregionálně pokročilým (IIIB) nebo metastatickým (IV) stadiem NSCLC neskvamózního histologického typu (adenokarcinom nebo nespecifikovaný NSCLC). Pacienti byli v období od 15. 11. 2011 do 30. 6. 2013 vyšetřeni na přítomnost mutace genu EGFR na třech pneumoonkologických pracovištích: Klinika pneumologie a ftizeologie FN a LF UK v Plzni, Klinika nemocí plicních a TBC LF MU a FN Brno a Klinika plicních nemocí a TBC FN a LF UP Olomouc. Charakteristika souboru pacientů je podrobně uvedena v tabulce 1.

Histologické nebo cytologické vzorky nádorové tkáně byly procesovány standardním

Tabulka 1. Charakteristiky pacientů a vyšetření na EGFR mutace

Charakteristika	Celkem (n = 486)
Pohlaví, n (%)	
Muž	284 (58,4)
Žena	202 (41,6)
Věk při vyšetření (roky)	
medián (min-max)	66,5 let (24-87)
Kouření, n (%)	
Kuřák	178 (38,9)
Bývalý kuřák	178 (38,9)
Nekuřák	102 (22,3)
Neznámo	28
Morfologie, n (%)	
Adenokarcinom	459 (94,4)
Nespecifikovaný NSCLC	27 (5,6)
Odběr vzorku, n (%)	
Intraluminální biopsie	260 (55,1)
Operace	108 (22,9)
Punkční biopsie pod CT	59 (12,5)
Intraluminální biopsie a operace	8 (1,7)
Jiný	37 (7,8)
Neznámo	14
Diagnóza stanovena dle vzorku, n (%)	
z primárního nádoru	418 (86,0)
ze vzdálené metastázy	55 (11,3)
z lymfatických uzlin	26 (5,3)
Při vyšetření vzorku provedena, n (%)	
Histologie (včetně případů, kdy byla provedena i cytologie)	394 (81,1)
Jen cytologie	92 (18,9)
Vzorek vyšetřen*, n (%)	
Mutation-enriched PCR nebo real time PCR	210 (43,9)
Sekvenování	209 (43,7)
Pyrosekvenování	54 (11,3)
Denaturační kapilární elektroforéza	30 (6,3)
Panagene PNA Clamp EGFR Mutation Detection Kit	22 (4,6)
Konformační metoda	1 (0,2)
Neznámo	8

* U jednoho vzorku mohlo být použito více metod stanovení

způsobem na pracovištích s akreditací pro vyšetřování prediktivních biomarkerů. 210 vzorků bylo vyšetřeno metodou PCR (mutation enriched PCR nebo real time PCR), 209 vzorků bylo vyšetřeno metodou přímého sekvenování, 54 vzorků bylo vyšetřeno pyrosekvenováním, 30 vzorků bylo vyšetřeno metodou denaturační kapilární elektroforézy (přítomnost mutace zde byla následně verifikována sekvenací), 22 vzorků bylo vyšetřeno metodou Panagene PNA Clamp EGFR Mutation Detection Kit, 1 vzorek byl vyšetřen

konformační metodou a u 8 vzorků nebyla provedená metodika stanovení zaznamenána (Pozn.: U jednoho vzorku mohlo být použito více metod stanovení).

Kategoriální proměnné jsou prezentovány pomocí četností výskytu jednotlivých kategorií a příslušným procentuálním zastoupením. Věk při vyšetření je sumarizován pomocí popisné statistiky, konkrétně mediánu, minima a maxima. Porovnání zastoupení EGFR mutace dle pohlaví, věku a kouření bylo provedeno pomocí Fisherova-exaktního testu.

Výsledky

Z celkového počtu 486 pacientů bylo molekulárně-genetické vyšetření na přítomnost mutace genu EGFR úspěšně provedeno u 481 pacientů. Mutace genu EGFR byly prokázány u 74 (15,2 %) pacientů, 407 (83,7 %) pacientů bylo nositeli wild-type EGFR genu, u 5 (1 %) pacientů nebylo možné stav genu EGFR hodnotit. Mutace genu EGFR na exonu 18 (typ G719X) byla prokázána u 3 (0,6 %) pacientů, mutace na exonu 19 (delece) byla prokázána u 42 (8,6 %) pacientů, mutace na exonu 20 byla prokázána u 7 (1,5 %) pacientů, z toho u 2 (0,4 %) pacientů typ T790M, u 4 (0,8 %) pacientů inzerce a u 1 (0,2 %) pacienta typ S768I, mutace na exonu 21 byla prokázána u 23 (4,8 %) pacientů. U 1 (0,2 %) pacienta byla prokázána přítomnost mutace genu EGFR na exonu 19 i na exonu 20 (tabulka 2).

Mutace genu EGFR byly prokázány u 25 (8,8 %) mužů vs. u 49 (24,3 %) žen. Rozdíl ve výskytu mutací dle pohlaví pacientů byl statisticky vysoce signifikantní ($p < 0,001$). Mutace genu EGFR byly prokázány u 12 (6,7 %) kuřáků vs. u 20 (11,2 %) exkuřáků vs. u 38 (37,3 %) nekuřáků. Rozdíl ve výskytu mutací dle kuřáctví byl statisticky vysoce signifikantní ($p < 0,001$). Mutace genu EGFR byly prokázány u 32 (15,7 %) pacientů do 65 let věku vs. u 42 (14,9 %) pacientů nad 65 let věku. Rozdíl ve výskytu mutací dle věku pacientů nebyl statisticky signifikantní ($p = 0,898$) (tabulka 3, graf 1).

Celkem 45 pacientů s prokázanou aktivační mutací genu EGFR bylo léčeno EGFR-TKI (erlotinib nebo gefitinib), z tohoto počtu bylo 33 (73,3 %) pacientů léčeno v první linii, 9 (20 %) pacientů bylo léčeno ve druhé linii a 2 (4,4 %) pacienti byli léčeni ve třetí linii. U pacientů léčených EGFR-TKI v první linii byl ve všech případech užít gefitinib a u pacientů léčených EGFR-TKI v druhé nebo třetí linii byl užít erlotinib, v souladu s tehdejší platnou úhradovou vyhláškou.

Diskuze

Aktivační mutace genu EGFR představují v současné době jediný molekulárně-genetický prediktivní biomarker pro léčbu EGFR-TKI u pacientů s pokročilým NSCLC, který je využíván v běžné klinické praxi. U pacientů, kteří jsou nositeli těchto mutací, se většinou setkáváme s velmi dobrým efektem léčby EGFR-TKI (1, 2). Výsledky recentně publikovaných randomizovaných klinických studií fáze III prokázaly, že u nositelů aktivační mutace genu EGFR, kteří byli v první linii léčeni EGFR-TKI, bylo dosaženo významně delšího přežití bez známek progresu než u pacientů léčených chemoterapií, významný rozdíl v celkovém přežití tyto studie neprokázaly, což

Tabulka 2. Výsledek vyšetření na přítomnost mutace genu EGFR

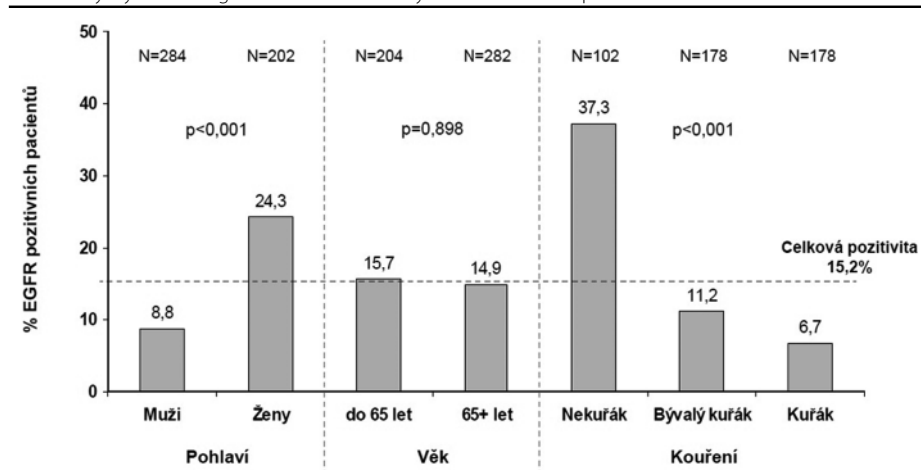
Charakteristika	Celkem (n = 486)
Výsledek EGFR vyšetření, n (%)	
Mutace prokázána	74 (15,2)
Divoký typ EGFR	407 (83,7)
Nelze stanovit	5 (1,0)
Typ EGFR mutace, n (%)	
Exon 18	
G719X	3 (0,6)
Exon 19	
Delece	42 (8,6)
Exon 20	
T790M	2 (0,4)
Inzerce	4 (0,8)
S768I	1 (0,2)
Exon 21	
L858R	23 (4,7)
Výskyt EGFR mutací v centrech	
Celkem	74/486 (15,2 %)
FN Plzeň	18/157 (11,5 %)
FN Brno	26/146 (17,8 %)
FN Olomouc	30/183 (16,9 %)

bylo ale dáno zejména vysokou mírou cross-overu (3, 4, 5). Dále je zde důležité zmínit i relativně příznivý bezpečnostní profil EGFR-TKI v porovnání s chemoterapií. Na základě těchto zjištění se aktivační mutace genu EGFR staly rutinně užívaným prediktivním biomarkerem, který je nezbytný pro rozhodnutí o optimální prvoliniové léčbě pacientů s pokročilým stadiem NSCLC, kdy pacienti s prokázanou mutací jsou indikováni k léčbě EGFR-TKI již v první linii (6). Kromě zmiňovaných aktivačních mutací genu EGFR, které představují relativně spolehlivý prediktor dobrého efektu léčby EGFR-TKI, byly nalezeny i mutace, které predikují rezistenci k této léčbě. Nejčastější rezistentní mutace tyrozinkinázové domény EGFR jsou označovány jako T790M, které se nachází na exonu 20 (7, 8, 9, 10). Mezi další, méně časté, rezistentní EGFR mutace lokalizované na 20. exonu patří například D761Y a L747S. Mutace genu EGFR jsou nalézány cca u 10–30 % pacientů s NSCLC. Bylo prokázáno, že tyto mutace jsou častěji nalézány u některých specifických skupin pacientů, kterými jsou Asiaté, nekuřáci, ženy, pacienti s adenokarcinomem a pacienti mladšího věku. V kavkazské populaci jsou aktivační mutace genu EGFR nalézány u cca 10–15 % pacientů (11, 12, 13, 14).

V této práci jsme se zaměřili na zmapování frekvence výskytu EGFR mutací u pacientů s po-

Tabulka 3. Výskyt mutací genu EGFR dle klinických charakteristik pacienta

Charakteristika	Výsledek EGFR vyšetření		p-hodnota Fisherova exaktního testu
	Mutace prokázána (n = 74)	Divoký typ EGFR / nelze stanovit (n = 412)	
Pohlaví, n (%)			
Muž	25 (8,8)	259 (91,2)	< 0,001
Žena	49 (24,3)	153 (75,7)	
Věk, n (%)			
do 65 let	32 (15,7)	172 (84,3)	0,898
nad 65 let	42 (14,9)	240 (85,1)	
Kouření, n (%)			
Kuřák	12 (6,7)	166 (93,3)	<0,001
Bývalý kuřák	20 (11,2)	158 (88,8)	
Nekuřák	38 (37,3)	64 (62,7)	

Graf 1. Výskyt mutací genu EGFR dle klinických charakteristik pacienta

ročilým neskvamózním NSCLC v České republice, na velkém souboru pacientů ze tří významných pneumoonkologických center (Plzeň, Brno, Olomouc). Mutace genu EGFR jsme prokázali celkem u 15,2 % pacientů. Drtivou většinu mutací představovaly mutace na exonu 19 (delece) a mutace na exonu 21 (L858R). Tyto mutace bývají mnohdy označovány jako tzv. klasické aktivační mutace EGFR a v našem souboru představovaly 87,8 % všech prokázaných EGFR mutací. TKI-rezistentní EGFR mutace typu T790M jsme prokazovali vzácně, a to pouze u dvou pacientů (0,4 %). Tyto mutace jsou častým mechanismem vzniku sekundární rezistence k EGFR-TKI, kdy růst rezistentních klonů s touto mutací je indukován právě léčbou EGFR-TKI (15). U pacientů, kteří nebyli léčeni EGFR-TKI, jsou mutace T790M velmi vzácné. Naše výsledky se zde shodují s prací, kterou publikovali Girard et al., kteří popisují záchyt mutace T790M u cca 0,5 % pacientů s NSCLC, kteří nebyli léčeni EGFR-TKI (pozn.: jednalo se o nekuřáky) (16). Prokázali jsme významně častější výskyt EGFR mutací u žen než u mužů (24,3 vs. 8,8 %, $p < 0,001$) a dále jejich významně častější

výskyt u nekuřáků v porovnání s bývalými nebo současnými kuřáky (37,3 vs. 11,2 vs. 6,7 %, $p < 0,001$). Celkový výskyt mutací a rovněž jejich vyšší četnost u žen a nekuřáků dobře koreluje s doposud publikovanými daty. Oproti tomu, výsledky naší studie nepotvrdily vyšší četnost mutací u pacientů nižšího věku (15,7 vs. 14,9 %, $p = 0,898$), jak to ukazují některé publikované práce. Co se týče vlastního vyšetření nádorové tkáně, ve většině případů byly vyšetřovány histologické vzorky (81,1 %), většinou se jednalo o vzorky získané biopsií primárního tumoru (86 %). Vzorky byly nejčastěji získávány cestou bronchoskopického vyšetření (55,1 %), ale relativně vysoký podíl vzorků byl získán při operaci, respektive z resektátů. S ohledem na fakt, že se v našem souboru jednalo o pacienty s pokročilým stadiem onemocnění, kteří většinou nejsou indikováni k chirurgickému řešení, byla většina takto získaných vzorků vyšetřována při recidivě onemocnění. Zde se pak logicky nabízí zatím nezodpovězená otázka, zda lze s jistotou tvrdit, že stav genu EGFR je i při následné recidivě stejný? Je to sice velmi pravděpodobné, ale dostupných literárních dat

je zatím velmi málo. Na druhou stranu, mnohdy je značně obtížné získat dostatečné množství kvalitní tkáně pro provedení molekulárně-genetického vyšetření, v případě recidiv zejména při vzdálené generalizaci do mozku, nitrobřišních orgánů nebo skeletu. Naše výsledky jsou dobře srovnatelné s výsledky dosaženými v recentní mezinárodní observační studii INSIGHT, která mapovala výskyt EGFR mutací u pacientů s NSCLC středoevropské populace. V porovnání s výsledky studie INSIGHT jsme v naší studii zaznamenali mírně vyšší výskyt mutací genu EGFR (13,8% vs. 15,2%) (17). Co se týče léčby pacientů s aktivační mutací genu EGFR, tak 73,3% těchto pacientů bylo léčeno EGFR-TKI v první linii, oproti tomu ve studii INSIGHT bylo v první linii léčeno 64,1% pacientů (18). Toto zjištění dobře dokumentuje, že pacienti s pokročilým NSCLC v České republice jsou léčeni standardním způsobem, dokonce lze říci, že nad středoevropským průměrem.

Závěr

Mutace genu EGFR jsme prokázali u 15,2% pacientů s neskvamózním NSCLC pokročilého stadia, nejčastěji byly prokazovány u žen a nekuřáků. Drtivou většinu mutací představovaly aktivační mutace na exonech 19 a 21. TKI-rezistentní EGFR mutace T790M jsme prokázali jen u 0,4% pacientů. Naše výsledky jsou dobře srovnatelné s doposud publikovanými daty. V první linii bylo léčeno EGFR-TKI 73,3% pacientů s prokázanou aktivační mutací genu EGFR.

Literatura

1. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004; 350(21): 2129–2139.
2. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004; 304(5676): 1497–1500.
3. Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2011; 12(8): 735–742.
4. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012; 13(3): 239–246.
5. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009; 361(10): 947–957.
6. Ettinger DS, ed. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Non-Small Cell Lung Cancer Version 3.2011. Dostupný z WWW: <http://www.nccn.org>.
7. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*. 2005; 2(3): e73.
8. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2005; 352(8): 786–792.
9. Suda K, Onozato R, Yatabe Y. EGFR T790M mutation: a double role in lung cancer cell survival? *J Thorac Oncol*. 2009; 4(1): 1–4.
10. Jancarikova D, Pesek M, Benesova L, et al. Acquired resistance of pulmonary adenocarcinoma to initially successful targeted therapy due to EGFR mutation T790M. *Anticancer Res*. 2007; 27(4): 1879–1882.
11. Zhang Z, Stiegler AL, Boggon TJ, et al. EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. *Oncotarget*. 2010; 1(7): 497–514.
12. Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, et al. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25(5): 587–595.
13. Gandara DR, Lara PN Jr, Mack P, et al. Individualizing therapy for non-small-cell lung cancer: a paradigm shift from empiric to integrated decision-making. *Clin Lung Cancer*. 2009; 10(3): 148–150.
14. West H, Lilenbaum R, Harpole D, et al. Molecular analysis-based treatment strategies for the management of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009; 4(Suppl. 2): S1029–1039.
15. Lin L, Bivona TG. Mechanisms of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors and Novel Therapeutic Strategies to Overcome Resistance in NSCLC Patients. *Chemother Res Pract*. 2012; 2012: 817297.
16. Girard N, Lou E, Azzoli CG, et al. Analysis of genetic variants in never-smokers with lung cancer facilitated by an Internet-based blood collection protocol: a preliminary report. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(2): 755–763.
17. Pirker R, Dziadziuszko R, Berzinec P, et al. EGFR mutations in NSCLC patients in Central Europe: the INSIGHT observational study. WCLC 2013 (Sydney) [<http://abstracts.webges.com/wclc2013/myitinerary>], abstrakt P2.11–018.
18. Cufer T, Dziadziuszko R, Berzinec P, et al. Treatment strategies in patients with EGFR mutation positive NSCLC in Central Europe. WCLC 2013 (Sydney) [<http://abstracts.webges.com/wclc2013/myitinerary>], abstrakt P2.11–019.

Článek přijat redakcí: 1. 8. 2014

Článek přijat k publikaci: 14. 8. 2014

MUDr. Ondřej Fiala

Onkologická a radioterapeutická klinika

FN a LF UK v Plzni

E. Beneše 13, 305 99 Plzeň

fiala@fnplzen.cz
