

На правах рукописи



СТЕПАНОВА
Мария Леонидовна

**РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В
ПРОГНОЗИРОВАНИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ У
ПАЦИЕНТОВ МЕТАСТАТИЧЕСКИМ EGFR-АССОЦИИРОВАННЫМ
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург
2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Моисеенко Федор Владимирович

Официальные оппоненты:

Орлов Сергей Владимирович – член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», директор.

Сакаева Дина Дамировна – д.м.н., профессор, Клинический госпиталь «Мать и Дитя», заместитель главного врача по онкологии.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «27» октября 2021 г. в 12.00 на заседании диссертационного совета Д 208.116.01 при ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 70.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России и на сайте центра - www.rrcrst.ru/dissertacionnye-issledovaniya/

Автореферат разослан « ____ » _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук



Генералов Михаил Игоревич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Рак легкого (РЛ) занимает одно из ведущих мест в структуре заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований [Каприн А.Д. и соавт., 2018]. Одним из главных событий за последние 20 лет в терапии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) является открытие активирующих мутаций в гене рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [Lynch T.J. et al., 2004, Paez J.G. et al., 2004]. Применение ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) достоверно улучшило частоту объективного ответа, время без прогрессирования, а в отдельных случаях и общую выживаемость [Han J.Y. et al., 2012, Park K. Et al, 2016, Wu Y.-L. et al., 2017].

Однако при назначении ИТК первого-второго поколений (гефитиниб, эрлотиниб, афатиниб) у больных НМРЛ через 8-12 месяцев развивается так называемая вторичная резистентность [Dagogo-Jack I. et al., 2018, Reguart N. et al., 2015]. Одной из причин ее появления может быть возникновение вторичных мутаций в гене EGFR. По литературным данным, наиболее часто резистентность возникает за счет появления мутации T790M [Sequist L.V. et al., 2011, Yu H.A. et al., 2013]. Ее появление приводит к изменению конформации самого АТФ-связывающего кармана тирозинкиназы EGFR, что определяет снижение сродства к ней ингибиторов первого-второго поколений [Lara-Guerra H. et al., 2012, Oxnard G.R. et al. 2011].

Первым таргетным препаратом, который был одобрен для клинического применения у больных НМРЛ, ранее получавших ИТК EGFR, стал осимертиниб – необратимый ингибитор тирозинкиназы EGFR третьего поколения. Изучение его эффективности по сравнению с платиносодержащим вариантом химиотерапии в исследовании AURA III, определило стандартный подход к лечению таких больных [Mok T.S.K. et al., 2015]. К сожалению, в среднем через 10-11 месяцев возникает прогрессирование с развитием третичной резистентности.

Параллельно с поиском новых терапевтических подходов расширился и арсенал диагностических возможностей. Так, уже в исследованиях AURA на фоне прогрессирования заболевания были предприняты попытки к определению мутации резистентности не на основании гистологического материала, полученного из ранее выявленных и увеличивающихся очагов, а с помощью детекции циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) в плазме крови [Eisenhauer E.A. et al., 2009, Oxnard G.R. et al., 2016].

В настоящее время до конца не изучена значимость молекулярно-генетического анализа цоДНК в определении механизмов резистентности и оценке эффективности терапии у пациентов метастатическим EGFR-ассоциированным НМРЛ, из чего проистекает вся значимость данной проблемы.

Степень разработанности темы

Назначение в качестве первой линии терапии ингибиторов тирозинкиназ является «золотым стандартом» лечения пациентов метастатическим EGFR-ассоциированным НМРЛ. При прогрессировании у таких пациентов рекомендуют проводить повторное гистологическое исследование опухолевого материала. Применение этого метода в реальной клинической практике не всегда возможно и может иметь ряд ограничений (ослабленное состояние пациента, длительность проведения анализа). Кроме того, материал, полученный путем биопсии опухолевого очага, может не отражать всей гетерогенности опухоли и поэтому иногда имеет ложноотрицательный характер. Поэтому однократная биопсия опухоли не может служить репрезентативным профилем для определения преобладающего механизма резистентности.

Данные проблемы послужили отправной точкой развития нового метода диагностики – жидкостной биопсии, с появлением которого появилась возможность оценивать мутации в гене EGFR как однократно (для их

выявления), так и динамически – в процессе проведения терапии ингибиторами тирозинкиназ.

Определение роли молекулярно-генетического анализа цоДНК позволит оценить не только его важность для выявления механизма резистентности, но и изучить прогностическое значение на ВВП и ОВ динамического исследования мутаций в гене EGFR в цоДНК на продолжительность терапии. Эти данные могут быть использованы для улучшения результатов и оптимизации алгоритма лечения таких пациентов.

Цель исследования

Улучшение результатов лечения пациентов с метастатическим EGFR – ассоциированным немелкоклеточным раком легкого, получающих терапию ингибиторами тирозинкиназ на основании данных молекулярно-генетического анализа цоДНК.

Задачи исследования:

1. Оценить частоту выявления мутации T790M при прогрессировании метастатического EGFR-ассоциированного немелкоклеточного рака легкого на фоне терапии ингибиторами тирозинкиназы первого и второго поколений.

2. Изучить возможность продолжения первой линии лечения ингибиторами тирозинкиназы первого-второго поколений при бессимптомном прогрессировании.

3. Определить прогностическое влияние динамического исследования мутаций EGFR при терапии осимертинибом на эффективность лечения у пациентов метастатическим EGFR-ассоциированным немелкоклеточным раком легкого.

4. Разработать диагностическую платформу для мониторинга механизмов возможной резистентности к осимертинибу.

Научная новизна

1. Была изучена частота выявления мутации T790M при прогрессировании на фоне терапии ингибиторами тирозинкиназы первого-второго поколений с помощью молекулярно-генетического анализа цоДНК.

2. Продемонстрирована возможность продолжения эффективного лечения тем же ингибитором тирозинкиназы при бессимптомном прогрессировании, в среднем в течении 3,8 мес.

3. Разработан и внедрен диагностический метод, позволяющий идентифицировать группу с положительным прогнозом среди пациентов, получающих терапию осимертинибом ($p=0,012$).

4. Разработана и апробирована оригинальная диагностическая платформа для исследования механизмов резистентности к ингибиторам тирозинкиназы третьего поколения, в частности, мутации C797S методом жидкостной биопсии.

Теоретическая и практическая значимость

1. Определена возможность выявления мутации EGFR T790M методом жидкостной биопсии при прогрессировании на фоне терапии ингибиторами тирозинкиназы.

2. Резистентность к ИТК первого-второго поколения через T790M наблюдалась чаще при делециях в экзоне 19, большей длительности первой линии терапии, бессимптомном характере прогрессирования. Впервые данные факторы были описаны зарубежными исследователями, но подтверждены нами на клинической группе пациентов в рамках диссертационного исследования.

3. Подтверждены данные о возможности продолжения терапии ингибиторами тирозинкиназы первого-второго поколений при бессимптомном прогрессировании на первой линии

4. Изучено прогностическое клиническое значение динамического исследования мутаций EGFR. Определена связь их исчезновения при детекции методом жидкостной биопсии на фоне терапии осимертинибом и показателями выживаемости: общей продолжительностью жизни, частотой объективных ответов и длительностью интервала времени без прогрессирования опухоли.

Методология и методы исследования

Методологической основой квалификационного исследования является применение методов научного познания. В качестве материала исследования будут использованы данные первичной медицинской документации пациентов, полученные в результате диагностики, лечения и динамического наблюдения в период с 2008-2019 гг. Для формирования цели и задач исследования, был выполнен анализ литературных данных изучающих проблему диагностики механизмов резистентности и лечения пациентов с метастатическим EGFR-ассоциированным НМРЛ. Исследование включает в себя как ретроспективную, так и проспективную части. В ходе проведения исследования с помощью статистических методов (анализ выполнялся в стандартном пакете «IBM SPSS Statistics Standard Edition для Windows» (версии 17.0)) были получены и систематизированы результаты, а также сформулированы выводы и практические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту

1. Молекулярно-генетический анализ цоДНК позволяет определять мутацию Т790М у пациентов метастатическим EGFR-ассоциированным НМРЛ при прогрессировании после терапии ингибиторами тирозинкиназ первого-второго поколений.

2. При бессимптомном прогрессировании на фоне первой линии терапии, целесообразно продолжение лечения ингибиторами тирозинкиназы первого-второго поколения.

3. Исчезновение мутаций EGFR (первичных активирующих нарушений и мутаций резистентности), при исследовании цоДНК плазмы крови через 2 месяца терапии осимертинибом достоверно связано с увеличением показателей выживаемости.

4. Выполнение повторной биопсии при прогрессировании опухоли после терапии осимертинибом влияет на определение оптимальной тактики дальнейшей терапии.

Личный вклад автора

Автором был лично осуществлен подготовительный этап исследования – литературный обзор, постановка цели и задач; формирование исследуемой группы и клиническое обследование пациентов, сбор и систематизация результатов инструментальных и лабораторных исследований. Диссертант принимал непосредственное участие в обследовании и лечении большинства пациентов, а также осуществлял динамическое наблюдение за ними. Автором выполнен сбор и анализ полученного научного материала, сформулированы и оформлены основные научные положения диссертации, выводы и практические рекомендации. Диссертантом подготовлены публикации по результатам проведенного исследования. Доля участия автора в получении и накоплении результатов – 100%, в статистической обработке – 100%.

Апробация диссертации

Материалы исследования представлены на IV-м и V-м Петербургском онкологическом форуме с международным участием «Белые Ночи» (Санкт-Петербург, 2018-2019); XXII–XXIII Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2018-2019); конференция RUSSCO «Немелкоклеточный рак легкого» (Санкт-Петербург, 2019), Международном конгрессе «World conference on Lung cancer» (Барселона, 2019), Международном конгрессе «Molecular analysis for personalized therapy congress» (Лондон, 2019). Одна из частей диссертации поддержана некоммерческой организацией «Фондом

поддержки научных исследований в онкологии (РакФонд)» – 2018-01-YS-ESI. Работа заняла III место в конкурсе молодых ученых Российского онкологического конгресса 2019 г. (г.Москва).

Основные материалы исследования опубликованы в 18 печатных работах, из них 3 – статьи в журналах из перечня ВАК РФ, в которых рекомендуются публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 5 – тезисы, опубликованные в материалах международных конгрессов и конференций, 2 – тезисы, опубликованные в материалах конгрессов и конференций, 7 – тезисов, рекомендованных к постерному докладу (Барселона, 2019; Лондон, 2019, Москва 2019).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа «Роль молекулярно-генетического анализа цоДНК в прогнозировании эффективности лечения у пациентов метастатическим EGFR-ассоциированным немелкоклеточным раком легкого», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, соответствует специальности 14.01.12 – онкология.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации составляет 125 страниц машинописного текста на русском языке, содержит 16 таблиц, 17 рисунков. Список литературы включает 150 источников, в том числе 16 на русском языке и 134 на иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика пациентов

За 2016–2019 гг. была проанализирована клиническая информация о 1050 пациентах, у которых впервые выявили НМРЛ. Из них у 450/1050 (42,9%) опухоль была гистологически представлена аденокарциномой легкого: этим больным выполнялось молекулярно-генетическое исследование статуса гена

EGFR. Молекулярные нарушения EGFR были выявлены у 102/450 (22,7%) человек, которых и включили в анализ. Кроме того, в анализ были включены 22 больных, продолжавших получать терапию ИТК в 2008–2015 гг. Диаграмма CONSORT включенных пациентов представлена на рисунке 2. Таким образом, изучение факторов, определяющих прогрессирование заболевания, его характеристики, а также сопровождающие его молекулярно-генетические особенности, производилось на основании анализа клинических данных и биологического материала, полученного от 124 больных с EGFR-ассоциированным НМРЛ.

Для всех пациентов, включенных в исследование, были оценены основные клинические характеристики. В исследуемой группе преобладали женщины (95/124) – 76,6%. Средний возраст больных на момент верификации диагноза составил 65 лет (35 лет–83 года). Большинство больных никогда не курили (98,4% – 122/124). В анамнезе курение имели 2/124 пациентов до 20 пачка/лет. У всех пациентов опухоли были представлены аденокарциномами разной степени дифференцировки. С молекулярно-генетической точки зрения большинство нарушений составляли делеции в 19 экзоне 76/124 (61,3%), несколько реже встречались L858R – 46/124 (36,3%). У двух пациентов были выявлены редкие мутации EGFR: у одного пациента имела место комплексная мутация G719S + S768I (1/124 – 0,8%), у второго – L861Q. В целом редкие виды мутаций составили 1,6% (2/124). У большинства больных заболевание было выявлено на диссеминированной стадии (83/124 – 66,9%). При этом первичное хирургическое лечение было проведено 41/124 пациенту, что составило 33,1%. В 6/124 (4,8%) случаях пациенты в качестве первой линии лечения получили химиотерапию.

Всем пациентам после прогрессирования, а также 77 больным с изначально диссеминированным процессом, начата таргетная терапия ИТК первого или второго поколения в стандартных дозировках. По количеству зон поражения на момент начала этой терапии пациенты распределялись следующим образом: в 65,5% случаев у них была 1 зона поражения, 26,6%

имели 2 зоны поражения, 20,9% – 3 и более зон. Чаще всего метастатическое поражение было выявлено в легких (58,1%); костях (35,5%); плевре (27,4%). Первичное метастатическое поражение головного мозга выявлено у 21/124 (16,9%). В качестве первичного лечения таких пациентов стереотаксическую лучевую терапию выбрали для 10/21 (47,6%), хирургическое лечение 4/21 (19,1%), тотальное облучение головного мозга для 2/21 (9,5%). Стоит отметить, что у 5/21 (23,8%) локальное воздействие на метастазы в головном мозге не проводилось. Все пациенты с EGFR-ассоциированным НМРЛ получали лечение низкомолекулярными ИТК первого или второго поколения в следующем соотношении: 106/124 (85,5%) – гефитиниб, 10/124 (8,1%) – эрлотиниб, 8/124 (6,4%) – афатиниб.

При выявлении рентгенологического и/или симптоматического прогрессирования производилось исследование механизмов резистентности. Было рекомендовано выполнить повторную биопсию увеличивающейся первичной опухоли/очага или вновь появившегося метастаза. Возможность выполнения повторной биопсии определялась на мультидисциплинарной комиссии совместно с торакальным хирургом и специалистом по эндоскопии. Также пациентам было выполнено взятие цельной крови для определения мутации резистентности с помощью исследования цоДНК.

Методика проведения молекулярно-генетического анализа на наличие мутаций в гене EGFR

Забор крови для исследования цоДНК производился до начала лечения и далее каждые 8 недель терапии на визитах оценки эффекта. Для анализа на наличие мутации в вакуумные пробирки Improvacuter для гематологических исследований с К2 и К3 ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) отбирали образцы цельной крови объемом 8–10 мл. Далее центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин, после чего в пустую пробирку переносили не менее 2 мл. отделенной плазмы, избегая попадания эритроцитов и лейкоцитов в образец. Полученную плазму повторно

центрифугировали в течение 15 мин. на скорости 15000 g и снова переносили полученный образец плазмы. Далее его использовали для выделения цодНК сразу, либо, при необходимости, однократно замораживали при температуре не выше -70°C .

Для определения механизма резистентности после получения гистологического материала из первичной опухоли или метастазов выполняли срезы 15 мкм. с парафиновых блоков и наносили их на предметные стекла. Для получения ДНК использовалась стандартная методика.

Молекулярно-генетический анализ проводился методом ПЦР в режиме реального времени в соответствии с инструкцией к наборам EGFR-плазма-24 (производитель ООО «Тест Ген», Ульяновск, Россия) на амплификаторах CFX96 (Био-Рад Лаборатории, США). Интерпретация результатов проводилась в соответствии с рекомендациями производителя наборов для определения мутаций.

Статистические методы

Статистический анализ выполнялся в стандартном пакете SPSS версии 17.0. При этом применялись методы параметрической и непараметрической статистики в зависимости от типа распределения переменных.

Количественные переменные тестировали на нормальность распределения при помощи критерия Холмогорова-Смирнова. Для непрерывных нормально распределенных переменных использовались методы параметрической статистики. Для анализа непараметрических переменных применяли ранговые тесты типа U-теста Манна–Уитни. Качественные переменные анализировали при помощи критерия χ -квадрат и точного критерия Фишера.

В случае анализа связанных выборок применялись парные тесты с учетом типа данных и распределения величин. Межгрупповые различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Анализ выживаемости проводили по методу Каплана-Майера с построением кривых выживаемости и вычислением медиан выживаемости. Для оценки межгрупповых различий применялись тесты лог-ранк, Бреслоу. Для сравнительной оценки рисков наступления событий в группах применялась модель пропорциональных интенсивностей Кокса (регрессия Кокса) с независимыми от времени предикторами. Выполнялось вычисление отношения рисков и 95% доверительных интервалов для них.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клиническая характеристика пациентов при прогрессировании на фоне ИТК первого-второго поколений

В исследование механизмов резистентности к ИТК EGFR первого и второго поколений включались все больные EGFR-ассоциированным НМРЛ, получавшие гефитиниб, эрлотиниб или афатиниб. В нашем исследовании из 124 больных прогрессирование заболевания было выявлено у 51 (41,1%) пациента.

Данную группу больных можно охарактеризовать нижеперечисленными параметрами: средний возраст исследуемой группы пациентов составил 61,8 года (95% ДИ [50–76]). Число женщин, 37 (74%), преобладало над числом мужчин – 13 (26%). Подавляющее большинство пациентов – 49 (98%) не курили; 1 (2%) курил более 30 лет. При гистологическом исследовании биоптатов во всех случаях была верифицирована аденокарцинома. На момент начала первой линии терапии у 47/50 (94%) заболевание имело диссеминированный характер, у 3/50 (6%) пациентов определена III А стадия опухолевого процесса. При оценке молекулярно-генетического статуса обнаружены следующие варианты мутаций: ex19del у 30 (50%) больных, L858R – 18 (36%), двойные и редкие мутации выявлены – 2 (4%): G719S + S768I – 1 (2%), L861Q – 1 (2%). До начала терапии ИТК 16/50 (32%) пациентам

было проведено оперативное лечение, 3/50 (6%) проведено химиотерапевтическое лечение.

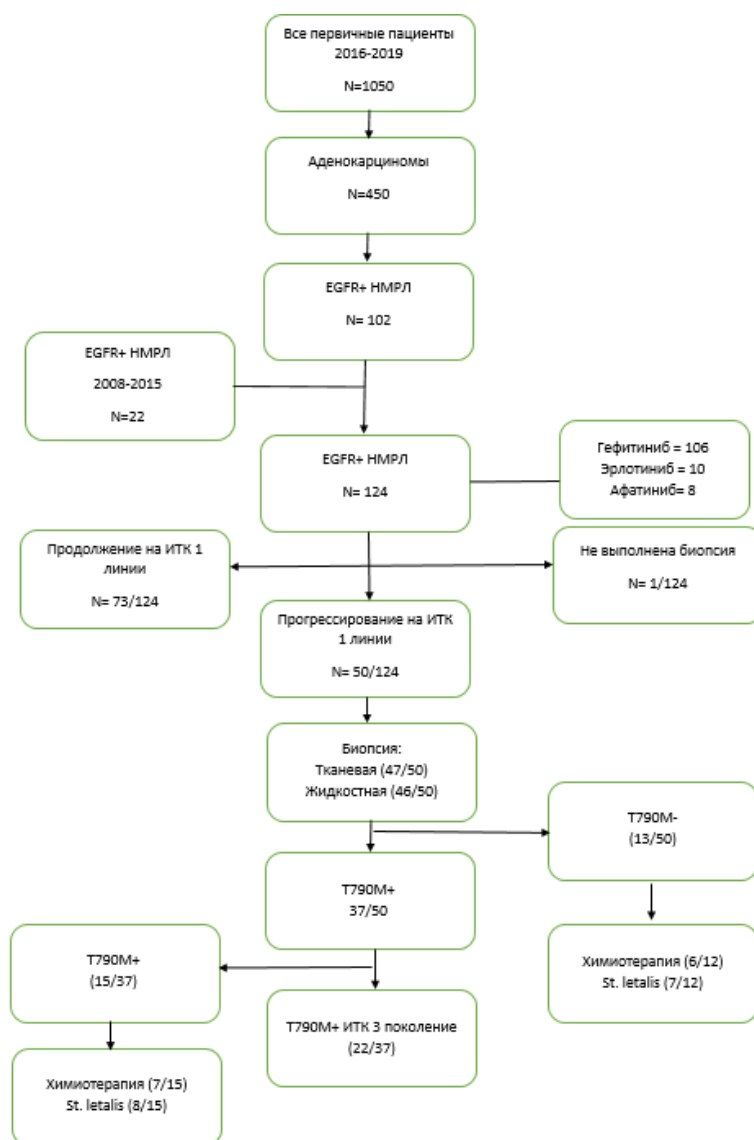


Рисунок 1. – Схема включения пациентов в исследование механизмов резистентности на фоне терапии ИТК EGFR

К началу первой линии терапии ИТК большая часть пациентов имела 1 зону поражения – 20/50 (40%), 15/50 (30%) – 2 зоны поражения, 15/50 (30%) – 3 и более. Наиболее частыми локализациями метастатического поражения оказались легкие 32/50 (64%), плевра – 16/50 (32%), и кости – 21/50 (42%). Важно отметить, что первичное метастатическое поражение головного мозга было выявлено в 8/50 (16%) случаях. В данной подгруппе пациентов локальное лечение на область головного мозга было выполнено 7/8 (87,5%) пациентам, среди них стереотаксическая лучевая терапия – 5 (62,5%),

хирургическое лечение 1 (12,5%) и тотальное облучение головного мозга по 1 (12,5%). 80% всех пациентов получали терапию ИТК первого поколения гефитинибом. Назначение эрлотиниба и афатиниба в качестве первой линии было суммарно назначено только 10/50 (20%) пациентам. Оценка времени без прогрессирования проводилась суммарно по обеим группам и составила 15,9 мес. (95% ДИ [1,0–87,7]).

При оценке характера прогрессирования оказалось, что 23/50 (46%) пациентов были выявлены новые метастатические очаги, в то время как у 26/50 (52%) прогрессирование заключалось только в увеличении ранее визуализируемых очагов (таблица 1). У 1/50 (2%) оценить характер прогрессирования не удалось. При бессимптомном прогрессировании заболевания 35/50 (70%) пациентам была продолжена терапия тем же препаратом или его сменили на низкомолекулярные ингибиторы другого поколения. Прием гефитиниба продолжили 16/35 (45,7%) пациентов, эрлотиниба – 8/35 (22,9%), афатиниба – 11/35 (31,4%). Медиана времени без прогрессирования (ВБП 2) на фоне продолжения лечения ИТК после прогрессирования составила 3,8 мес. (95% ДИ [0,7–25,4]).

Таблица 1 Характер прогрессирования у пациентов, получающих лечение ИТК первого-второго поколений

Характер прогрессирования на фоне ТТ первой линии	n (%)
Появление новых метастазов	23 (46)
Увеличение ранее выявленных метастазов	26 (52)
Характер прогрессирования не оценен	1 (2)
Локализация метастазов (на фоне прогрессирования на ТТ первой линии), n (%)	n=23
Легкие	14 (60,9)
Кости	4 (17,4)
Плевра	7 (30,4)
Печень	6 (26,1)
Головной мозг	14 (60,9)
Надпочечники	1 (4,3)
Другие	3 (13)

Возможности выявления T790M при прогрессировании на ИТК первого-второго поколений с использованием методов гистологического исследования материала и цоДНК

Прогрессирование опухолевого процесса зарегистрировано у 51/124 (41,1%) пациентов. В связи с летальным исходом одного пациента, молекулярно-генетическое исследование с целью определения механизма резистентности к первой линии терапии было выполнено у 50 больных. Из них 4 (8%) было невозможно выполнить повторную биопсию, а 3 (6%) не было выполнено взятие крови для выделения цоДНК по причине недоступности метода жидкой биопсии на начальном этапе. T790M в гене EGFR методом детекции цоДНК была выявлена у 27 (54%) и у 29 (58%) больных методом тканевой биопсии. Статистически значимых различий между частотой выявления T790M мутации при оценке по цоДНК и гистологическому материалу выявлено не было ($p=0,352$). Сравнение двух методов представлено в таблице 2.

Прогрессирование заболевания ассоциировалось с появлением мутации T790M у 37 из 50 больных, что составило 74%. Мутация T790M⁺ выявлялась значительно чаще у больных с постепенным увеличением размеров очагов по сравнению с появлением новых метастазов: 17/20 – 85% против 20/29 – 68,9%. На рисунке 2 графически представлена группа пациентов, которым была выполнена биопсия для выявления мутации резистентности, а также представлена частота распределения пациентов с EGFR T790M⁺ в зависимости от активирующей мутации. С целью выявления факторов, связанных с появлением мутаций T790M, был проведен подгрупповой анализ.

Отдельное значение имеет отсутствие статистических корреляций между отдельными клиническими признаками и появлением резистентности за счет возникновения T790M: возраст $p=0,597$; пол $p=0,719$; гистологический тип $p=0,260$; статус курения $p=1,000$; количество зон поражения $p=0,876$. Единственным фактором, определяющим более высокую вероятность

появления T790M, может считаться наличие первичной активирующей мутации – делеции в 19 экзоне ($p=0,014$).

Оценка медианы общей выживаемости у больных с прогрессированием на ИТК первого и второго поколений составила 51,7 мес. (ДИ 95% [35,8–67,7]). На рисунке 3 представлены результаты анализа выживаемости методом Каплана-Майера, демонстрирующая общую выживаемость в зависимости от наличия мутации T790M в гене EGFR. Медиана ОВ пациентов с выявленной мутацией составила 54,0 мес. (ДИ 95% [32,6–75,4]), в то время как при отсутствии мутации T790M – 25,5 мес. (95% ДИ [0–54,5]). В случае выявления мутации T790M 2х летняя выживаемость составила 89%, при ее отсутствии – 60%. Несмотря на достаточно большую разницу в числовых значениях медианы общей продолжительности жизни, различия между группами не оказались статистически достоверными ($p=0,117$), что может быть связано с небольшим размером групп (37 против 13).

Таблица 2 – Сравнительная характеристика тканевой и жидкостной биопсии

Мутации	Тканевая биопсия	Жидкая биопсия	p
T790M +	29 (58%)	27 (54%)	0,352
T790M -	18 (36%)	19 (38%)	
анализ не проведен	3 (6%)	4 (8%)	

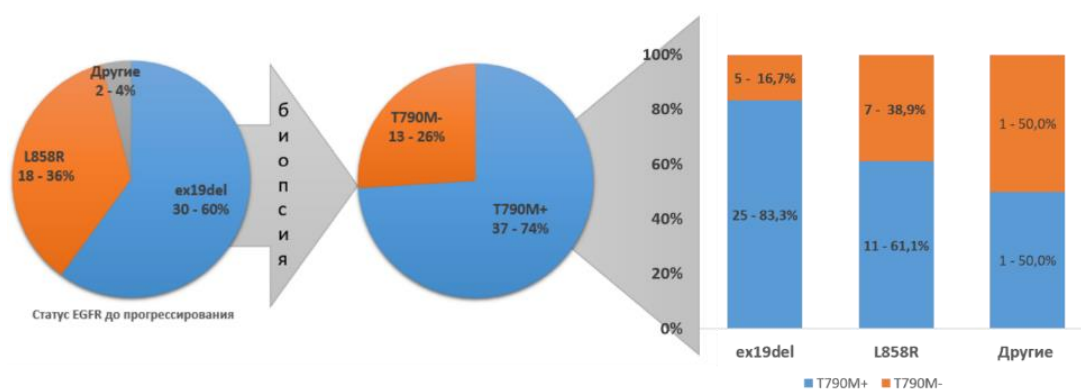


Рисунок 2 – Связь между активирующей мутацией и T790M

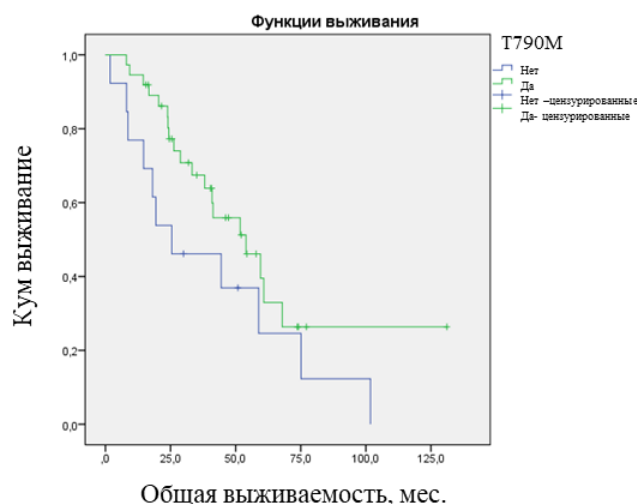


Рисунок 3 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие ОВ в зависимости от статуса Т790М мутации

Динамическое исследование цоДНК и его влияние на эффективность терапии у пациентов на фоне терапии осимертинибом.

На момент начала лечения осимертинибом 12/22 (54,5%) пациентов имели три и более зон поражения. Наиболее частые локализации: легкие 20/22 (90,9%), плевра 10/22 (45,5%), печень 8/22 (36,4%). До начала лечения у 5/22 (22,7%) больных были выявлены метастазы в головном мозге, ранее не выявлявшиеся. В качестве локального лечения 2/5 (40%) пациентов выполнена стереотаксическая лучевая терапия, остальным локальное лечение метастатического поражения не проводилось. В 9,1% случаев (2/22) терапия осимертинибом была проведена в третьей линии, остальные пациенты 20/22 (90,9%) получали ИТК третьего поколения во второй линии. При оценке ответа на лечение частичный регресс имел место у 11/22 (50%) пациентов, стабилизация процесса наметилась у 10/22 (45,5%), у 1/22 (4,5%) было выявлено прогрессирование. Таким образом, контроль над заболеванием зарегистрирован у 21/22 (95,5%) пациентов.

До начала терапии у 20/22 (90,9%) пациентов была взята цельная кровь с целью оценки молекулярно-генетического статуса (L858R, ex19del, T790M) с помощью цоДНК методом жидкостной биопсии, 2/22 (9,1%) не выполнен анализ в связи с недоступностью метода на начальном этапе. После начала

приема препарата пациентам продолжали выполнять молекулярно-генетическое исследование с помощью цоДНК на наличие как активирующих мутаций, так и мутации резистентности Т790М методом жидкостной биопсии каждые 2 месяца. Медиана ВВП на фоне терапии осимертинибом составила 16,7 мес. (ДИ=95%, 11,4–22,0) (рисунок 4).

Анализ цоДНК в первом контроле после начала терапии осимертинибом показал, что у 8/22 (36,4%) больных сохранялась либо активирующая мутация (ex19del, L858R), либо мутация резистентности Т790М. И при оценке ответа на терапию и прогрессирования опухолевого процесса 10 месяцев спустя после начала лечения было показано, что максимальный регресс был выявлен у больных с отсутствием цоДНК в плазме, в то время как прогрессирование опухоли чаще встречалось в группе с выявленной цоДНК (рис. 5). Гистограмма демонстрирует связь максимального регресса с отсутствием цоДНК в плазме. Прогрессирование опухоли чаще встречалось в группе с выявленной цоДНК.

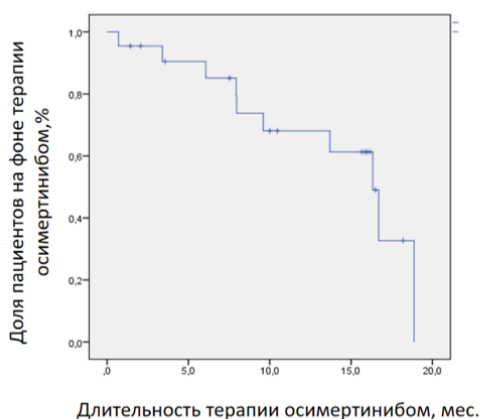


Рисунок 4 – Кривая Каплана-Майера, характеризующая ВВП пациентов на фоне терапии осимертинибом во второй линии

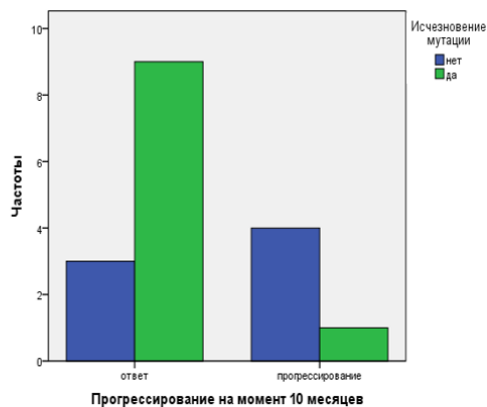


Рисунок 5 – Связь между исчезновением цоДНК, ответом и прогрессированием на фоне терапии ИТК третьего поколения в течение 10 месяцев

С целью определения связи между динамикой цоДНК с Т790М и/или первичной активирующей мутацией и отдаленными показателями выживаемости на фоне терапии осимертинибом 20/22 больных до начала лечения проводилось динамическое взятие крови для выделения цоДНК. На

исследованной группе больных ($n = 22$) было показано, что снижение цоДНК ниже уровня детекции через 2 месяца после начала терапии осимертинибом во второй линии при T790M-опосредованном прогрессировании на ИТК первого – второго поколений позволяет выделить группу с существенно более длительным эффектом терапии ИТК третьего поколения. Так, медиана времени без прогрессирования у пациентов с отсутствием мутации на втором месяце лечения составила 22,5 мес. по сравнению с группой больных, у которых сохранялась цоДНК 8,0 мес. (HR: 8,6; 95%ДИ 1,6 – 46,7; $p=0,012$). Однолетняя выживаемость пациентов с исчезновением мутаций в цоДНК через два месяца от начала лечения составила 87%, при их наличии 35%. Графическая схема изложенного представлена на рисунке 6. Однофакторный анализ связи клинических характеристик (пол, возраст, вариант мутации, статус курения, токсичность) с исчезновением мутации T790M цоДНК методом хи-квадрат, не выявил значимых ассоциаций.

У всех пациентов, получавших лечение в рамках исследования, наблюдались побочные явления. Наиболее часто наблюдалась кожная токсичность в виде сыпи и сухости кожи – 86,3%, диарея – 31,8%. Остальные побочные эффекты (гематологическая токсичность, стоматит) встречались в менее 5% случаев.

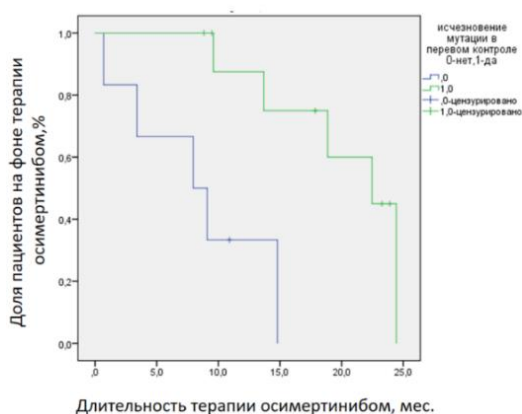


Рисунок 6 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие ВВП в зависимости от исчезновения мутаций.

Определение возможных вариантов резистентности при прогрессировании на осимертинибе

За время проведения исследования (2016–2019 гг.) прогрессирование заболевания на фоне терапии осимертинибом было выявлено у 12/22 (36,4%) пациентов. С целью определения механизма устойчивости к осимертинибу было рекомендовано по возможности выполнить повторную биопсию опухолевого материала (с последующим ИГХ исследованием). Также при поддержке гранта РакФонда # 2018-01-YS-ESI была разработана и апробирована локальная диагностическая платформа для определения мутации C797S методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

В результате у 2 из 12 (16,7%) пациентов по данным ИГХ-исследования материала была выявлена трансформация опухоли в мелкоклеточный рак; в другом случае, также у 1 больного (8,3%) выявили мутацию в гене EGFR C796S. Один из пациентов не был оценен, т.к. на момент прогрессирования на фоне терапии осимертинибом в связи с тяжестью его состояния повторную биопсию выполнить не удалось, а метод жидкой биопсии на C797S в данном случае не был запланирован. Анализ цоДНК был выполнен у 11 из 12 (91,7%) пациентов. Мутация в гене EGFR C797S была выявлена у 1 из 12 (8,3%). (рисунок 7).

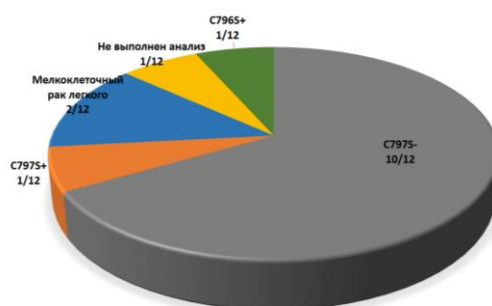


Рисунок 7 – Структура распределения вариантов резистентности при прогрессировании у группы пациентов, получающих осимертиниб.

ВЫВОДЫ

1. Статистически значимых различий между частотами выявления T790M при прогрессировании на фоне терапии ингибиторами тирозинкиназы первого-второго поколений при исследовании цоДНК и гистологического материала, полученного при прогрессировании выявлено не было (цоДНК T790M+ – 27/46 (54%), гистология T790M+ – 29/47(58%), $p=0,352$. Достоверно чаще мутация T790M была выявлена при первоначальном выявлении делеции в экзоне 19 – 25/30 (83.3%), $p=0,014$.

2. Продолжение предшествующей терапии при бессимптомном прогрессировании заболевания на фоне ингибиторов тирозинкиназы первого-второго поколений было возможно в 70% случаев (у 35 из 50 пациентов). Бессимптомное прогрессирование заболевания сопровождалось выявлением мутации T790M+ у 71,4% пациентов. Медиана продолжительности лечения после бессимптомного прогрессирования до момента возникновения клинических симптомов и назначения ингибиторов тирозинкиназы третьего поколения составила 3,8 мес. (95% ДИ [0,7–25,4]).

3. Идентификация исчезновения мутации T790M+ методом анализа цоДНК через 2 месяца от начала терапии осимертинибом позволила выделить группу пациентов ($n = 12$) с достоверно большей продолжительностью выживаемости без прогрессирования: медиана 22,5 мес. против 8,0 мес. (ОР: 8,6; 95% ДИ [1,6 – 46,7]); $p=0,012$. Однолетняя выживаемость пациентов с исчезновением мутаций в цоДНК через два месяца от начала лечения составила 87%, при наличии - 35%.

4. Разработана оригинальная локальная молекулярно-генетическая платформа на основе ПЦР в реальном времени для определения формирования возможной резистентности к осимертинибу методом цоДНК к мутации C797S. Оценка возможных механизмов резистентности к осимертинибу выявила 2 случая (16,6%) трансформации опухоли в мелкоклеточный рак и только один случай (8,3%) формирования мутации C797S+.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Проведение молекулярно-генетического анализа цоДНК при прогрессировании на фоне терапии ингибиторами тирозинкиназы первого и второго поколений может позволить определить профиль резистентности, в частности, выявить мутацию T790M.

2. Выявление мутации T790M может быть одним из возможных маркеров бессимптомного прогрессирования. При бессимптомном прогрессировании на первой линии лечения целесообразно рассматривать продолжение терапии ингибиторами тирозинкиназы первого-второго поколения до появления клинических симптомов.

3. Для определения эффективности и продолжительности лечения ингибиторами тирозинкиназы, рекомендовано выполнять оценку мутаций в гене EGFR до начала лечения и через 2 месяца после него.

4. При прогрессировании на фоне терапии осимертинибом целесообразно выполнение повторной биопсии, а также молекулярно-генетического исследования цоДНК, с целью определения механизмов устойчивости к осимертинибу. Выбор метода необходимо согласовывать на мультидисциплинарной комиссии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Повторный молекулярно-генетический анализ материала, полученного из прогрессирующего очага, позволяет определить вторичные мутации, а это, в свою очередь, способствует продолжению таргетной терапии и увеличению как медианы ВВП, так и ОВ. Однако это характерно не для всех пациентов: группу неблагоприятного прогноза составляют те, у кого сохраняется цоДНК. Даже малочувствительное качественное определение цоДНК у отдельных пациентов позволяет выделить их в особую когорту с наименьшей длительностью ответа на фоне наиболее современных препаратов (прежде всего, осимертиниба). Перспективой данной диссертационной работы является изучение вариантов ранней интенсификации лекарственной терапии для означенной когорты пациентов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. М.Л. Степанова Эволюция лекарственной терапии рака легкого ингибиторами EGFR: новые аспекты / Л.В. Халикова, А.С. Жабина, Ф.В. Моисеенко // Практическая онкология. – 2019. – Т. 20. – № 1 – С. 52-63.

2. Моисеенко Ф.В. Предииктивное значение динамического определения циркулирующей опухолевой ДНК на фоне терапии осимертинибом у больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) с EGFR мутацией / Степанова М.Л., Волков Н.М и др. // Вопросы онкологии. - 2020. – Т. 66. - № 2 – С. 135-142.

3.Ф.В. Моисеенко Прогностическая значимость цоДНК у больных НМРЛ, активирующих мутаций EGFR / Н.М. Волков, А.С. Жабина, М.Л. Степанова и др. // Практическая онкология. – 2020. – Т. 21. – № 3 – С. 22-30.

4. Моисеенко Ф.В. Результаты применения иммунотерапевтических препаратов в реальной клинической практике / Волков Н.М., Абдулоева Н.Х., Левченко Н.В., Чубенко В.А., Носова М.В., Тулейко В.М., Шелехова К.В., Хенштейн В.А., Степанова М.Л. и др. // Злокачественные опухоли. – 2020. – Т. 10 - № 1 – С. 5-20.

5. Степанова М.Л. Предииктивное значение цоДНК у больных EGFR мутированным НМРЛ, получающих ИТК 3-го поколения / Жабина А.С., Мыслик А.В. и др. // Тезисы X Съезда онкологов России, Нижний Новгород, 17–19 апреля 2019 г. – С. 44.

6. Моисеенко Ф.В. Определение цоДНК у больных НМРЛ / Жабина А.С., Степанова М.Л. и др. // Тезисы X Съезда онкологов России, Нижний Новгород, 17–19 апреля 2019 г. – С. 140.

7. Степанова М.Л. Прогностическое значение динамического изменения цоДНК у больных EGFR мутированным НМРЛ, получающих ИТК 3-го поколения / Моисеенко Ф.В., Моисеенко В.М. и др. // Тезисы. V Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи 2019» СПб. – 2019. – С. 534

8. **M.L. Stepanova** Predictive value of ctDNA in patients with EGFR positive NSCLC receiving 3rd generation TKI / F.V. Moiseenko, A.S. Zhabina et al. // Abstracts | IASLC 2019 World Conference on Lung Cancer – P. 879

9. A. Zhabina The role of ctDNA detection (liquid biopsy) in patients with NSCLC / F. Moiseenko, **M. Stepanova** et al. // Abstracts | IASLC 2019 World Conference on Lung Cancer – P. 603

10. F. Moiseenko Prediction of PFS using a dynamic assessment of ctDNA in patients with EGFR mutated NSCLC with osimertinib therapy / **M. Stepanova**, A. Zhabina et al. // Ann. Oncology. – 2019. – V. 30, Suppl. 7 – P. vii13.

11. **M. Stepanova** Investigation of osimertinib resistance mechanisms in patients with T790M+ progression NSCLC / F. Moiseenko, A. Zhabina et al. // Ann. Oncology. – 2019. – V. 30, Suppl. 7 – P. vii16.

12. A. Zhabina Dynamics of ctDNA in patients with NSCLC / F. Moiseenko, **M. Stepanova** et al. // Ann. Oncology. – 2019. – V. 30, Suppl. 7 – P. vii22.

13. Моисеенко Ф.В. Предсказание времени без прогрессирования (ВБП) с помощью динамической оценки циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) у больных EGFR мутированным НМРЛ на фоне терапии осимертинибом_ / **Степанова М.Л.**, Жабина А.С. и др. // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т.9 – №3 – С. 64.

14. **Степанова М.Л.** Исследование механизмов резистентности к осимертинибу у больных Т790М- ассоциированным НМРЛ / Моисеенко Ф.В., Жабина А.С. и др. // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т.9 – №3 – С. 65.

15. Жабина А.С. Динамика цоДНК у больных НМРЛ с мутацией EGFR / Моисеенко Ф.В., **Степанова М.Л.** и др. // Евразийский онкологический журнал. – 2020. – Т.8 – № 2 – С. 180.

16. **Степанова М.Л.** Определение механизмов резистентности к осимертинибу у больных Т790М-ассоциированным НМРЛ / Моисеенко Ф.В., Жабина А.С. и др. // Евразийский онкологический журнал. – 2020. – Т.8 – № 2 – С. 197.

17. **Степанова М.Л.** Выявление зависимости уменьшения объема опухоли и цоДНК на длительность времени без прогрессирования НМРЛ на фоне терапии осимертинибом / Моисеенко Ф.В., Жабина А.С. и др. // Евразийский онкологический журнал. – 2020. – Т.8 – № 2 – С. 198.

18. Моисеенко Ф.В. Влияние увеличения финансирования на показатели выживаемости больных НМРЛ (по данным реальной клинической практики) / Чубенко В.А., Жабина А.С., Крамчанинов М.М., **Степанова М.Л.** и др. // Евразийский онкологический журнал. – 2020. – Т.8 – № 2 – С. 781.