

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Rafał Dziadziuszko

**MOLEKULARNE CZYNNIKI PREDYKCYJNE KORZYŚCI
KLINICZNEJ LECZENIA INHIBITORAMI RECEPTORA
DLA NASKÓRKOWEGO CZYNNIKA WZROSTU (EGFR)
CHORYCH NA NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO
RAKA PŁUCA**

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Klinika Onkologii i Radioterapii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: Prof. dr hab. med. Jacek Jassem

Gdańsk 2009

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

© Copyright by Medical University of Gdańsk

Wydawca: Gdański Uniwersytet Medyczny
Druk: Dział Wydawnictw AMG
Gdańsk, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a
Zlecenie KW/169/09

SPIS TREŚCI

Wykaz prac będących przedmiotem rozprawy	5
Wykaz skrótów	7
1. Wstęp	9
1.1. Terapie ukierunkowane molekularnie w NDRP	10
1.2. Indywidualizacja leczenia w NDRP	12
1.3. Molekularne czynniki rokownicze	13
1.4. Molekularne czynniki predykcyjne	14
2. Cele pracy	17
3. Omówienie wyników	18
4. Wnioski	28
5. Streszczenie	29
6. Summary	32
7. Piśmiennictwo	35
8. Prace będące przedmiotem rozprawy	47

WYKAZ PRAC BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY

- A. Dziadziuszko R, Szostakiewicz B, Hirsch FR. **Epidermal growth factor receptor targeted therapy - markers of sensitivity and response**. Podręcznik pod redakcją Pandya KJ, Brahmer J, Hidalgo M. "Lung Cancer - Translational and Emerging Therapies", wyd. 1; 2007: 97-122. New York, Informa Healthcare
- B. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Franklin WA, Dziadziuszko R, Thatcher N, Chang A, Parikh P, Pereira JR, Ciuleanu T, von Pawel J, Watkins C, Flannery A, Ellison G, Donald E, Knight L, Parums D, Botwood N, Holloway B. **Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer**. J Clin Oncol 2006; 24: 5034-5042
[IF=13,598]
- C. Dziadziuszko R, Holm B, Skov BG, K, Sellers M, Franklin W, Bunn P, Jr., Varella-Garcia M, Hirsch FR. **Epidermal growth factor receptor gene copy number and protein level are not associated with outcome of non-small-cell lung cancer patients treated with chemotherapy**. Ann Oncol 2007; 18: 447-452
[IF=4,875]
- D. Dziadziuszko R, Witta SE, Cappuzzo F, Park S, Tanaka K, Danenberg PV, Baron AE, Crino L, Franklin WA, Bunn PA, Jr., Varella-Garcia M, Danenberg KD, Hirsch FR. **Epidermal growth factor receptor messenger RNA expression, gene dosage, and gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer**. Clin Cancer Res 2006; 12: 3078-3084
[IF=6,177]
- E. Hirsch FR, Dziadziuszko R, Thatcher N, Mann H, Watkins C, Parums DV, Speake G, Holloway B, Bunn PA Jr, Franklin WA. **Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry: comparison of antibodies and cutoff points to predict benefit from gefitinib in a phase 3 placebo-controlled study in advanced nonsmall-cell lung cancer**. Cancer 2008; 112: 1114-1121
[IF=5,238]
- F. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Dziadziuszko R, Xiao Y, Gajapathy S, Skokan M, Lin M, O'Neill V, Bunn PA. **Fluorescence in situ hybridization subgroup analysis of TRIBUTE, a phase III trial of erlotinib plus carboplatin and paclitaxel in non-small cell lung cancer**. Clin Cancer Res 2008; 14: 6317-6323
[IF=6,488]

Finansowanie:

Stypendium Naukowe, Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem (UICC),
2005–2007

Stypendium Naukowe, Międzynarodowe Stowarzyszenie do Badań nad Rakiem
Płuca (IASLC), 2006–2008

Praca Statutowa Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego ST-23, 2005–2007

Wykaz skrótów

BR.21 – badanie kliniczne III fazy oceniające skuteczność erlotynibu u chorych na zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca po niepowodzeniu jednej lub dwóch linii chemioterapii

CI – *confidence interval* – zakres ufności

CISH – chromogenna hybrydyzacja *in situ*

EGFR – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu

FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

HR – *hazard ratio* – współczynnik ryzyka w analizie przeżycia

HER2 – receptor c-erbB2 z rodziny receptorów dla naskórkowego czynnika wzrostu

IGF1R – receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1

IHC – immunohistochemia

INTEREST – badanie kliniczne III fazy oceniające skuteczność gefitynibu w porównaniu do docetakselu w drugiej linii leczenia chorych na zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca

ISEL – badanie kliniczne III fazy oceniające skuteczność gefitynibu u chorych na zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca po niepowodzeniu jednej lub dwóch linii chemioterapii

NDRP – niedrobnokomórkowy rak płuca

NSCLC – *non-small-cell lung cancer* – niedrobnokomórkowy rak płuca

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy

qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

RT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona odwrotną transkrypcją

SISH – hybrydyzacja *in situ* z wysrebrzaniem

TRIBUTE – badanie kliniczne oceniające skuteczność erlotynibu w skojarzeniu z paklitakselem i karboplatiną a następnie leczenia podtrzymującego erlotynibem uprzednio nie leczonych chorych na zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca

VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu

1. WSTĘP

Rak płuca jest najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów złośliwych w Polsce. Liczba zarejestrowanych nowych zachorowań na raka płuca w naszym kraju w 2006 roku wyniosła 20.232, natomiast liczba zgonów – 21.731 [1]. Około 80% rozpoznań histopatologicznych stanowi rak niedrobnokomórkowy (NDRP), który obejmuje następujące najczęstsze typy histopatologiczne: rak płaskonabłonkowy, rak gruczołowy (wraz z rakiem oskrzelikowo-pęcherzykowym) oraz rak wielkomórkowy. Pozostałe 20% rozpoznań stanowi rak drobnokomórkowy, charakteryzujący się wysokim wskaźnikiem proliferacji i występowaniem przerzutów odległych u większości chorych w momencie rozpoznania.

Podstawową metodą leczenia NDRP jest doszczętna resekcja miąższu płucnego. Zastosowanie tradycyjnych metod terapeutycznych – chirurgii, radioterapii i chemioterapii, przyniosło w NDRP zaledwie nieznaczną poprawę wyników leczenia. We wczesnych stopniach zaawansowania nadal jedynie około 40–60% chorych przeżywa pięć lat po leczeniu operacyjnym [2], natomiast mediana czasu przeżycia chorych na nieoperacyjnego, miejscowo zaawansowanego oraz rozsianego raka nie przekracza na ogół odpowiednio 20 i 12 miesięcy [3-8]. NDRP jest uważany za nowotwór o względnej oporności na chemioterapię. Metaanaliza badań klinicznych prowadzonych w latach 90. wykazała niewielką, ale znamioną poprawę czasu przeżycia chorych na zaawansowanego NDRP leczonych przy użyciu schematów zawierających pochodne platyny [9].

Na początku obecnej dekady wykazano znamioną poprawę czasu przeżycia chorych na NDRP pod wpływem leku z grupy taksoidów - docetakselu w drugiej linii chemioterapii [10;11]. Podobny efekt uzyskuje się przy użyciu leku nowej generacji z grupy antymetabolitów – pemetreksedu [12]. Wyniki badań klinicznych z ostatnich lat wskazały również na korzyść z zastosowania chemioterapii w leczeniu uzupełniającym, przy czym największą poprawę czasu przeżycia uzyskano przy użyciu dwulekowego schematu zawierającego cisplatynę i winorelbinę [13-15]. Należy jednak podkreślić, że wyniki chemioterapii, zarówno w leczeniu raka zaawansowanego (poprawa mediany czasu przeżycia o około 2 miesiące), jak i w leczeniu pooperacyjnym (poprawa pięcioletniego prawdopodobieństwa przeżycia o około 5%) nie stanowią jednak przełomu w leczeniu NDRP.

1.1. Terapie ukierunkowane molekularnie w NDRP

Szybki postęp biologii molekularnej umożliwił poznanie mechanizmów powstawania i rozwoju nowotworów złośliwych. Charakterystyczne dla NDRP zaburzenia molekularne mogą być celem interwencji terapeutycznych. Przykładem sukcesu w klinicznym wykorzystaniu wiedzy z zakresu biologii molekularnej w onkologii jest leczenie przewlekłej białaczki szpikowej i podścieliskowych nowotworów przewodu pokarmowego (GIST). W przewlekłej białaczce szpikowej wykazano istnienie genu fuzyjnego *BCR/ABL* kodującego konstytutywnie aktywną kinazę tyrozynową, natomiast w GIST - występowanie mutacji w genie kodującym receptor c-kit (*KIT*) lub genie kodującym łańcuch α receptora dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (*PDGFRA*). Wszystkie te zaburzenia są punktem uchwytu dla imatynibu, drobnocząsteczkowego inhibitora kinazy tyrozynowej [16;17].

Aktywacja kinazy tyrozynowej receptora c-kit jest przykładem dominującego zaburzenia molekularnego leżącego u podłoża powstawania podścieliskowych nowotworów przewodu pokarmowego a jednocześnie uzależniającego proliferację komórek nowotworowych od jego obecności. Przykładem takiego zaburzenia w NDRP są mutacje genu kinazy tyrozynowej receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor receptor* – EGFR). W populacji europejskiej i amerykańskiej występują one w komórkach nowotworowych u około 10% chorych na NDRP a w populacji dalekowschodniej – aż u 30–50% [18;19]. Mutacje genu *EGFR* występują najczęściej w nowotworach u chorych, którzy nie palili tytoniu oraz w nieśluzotwórczym raku oskrzelikowo-pęcherzykowym [20;21]. W około 90% przypadków są to delecje egzonu 19 lub mutacje punktowe egzonu 21 tego genu [19;22]. W doświadczeniach *in vitro*, większość hodowli komórkowych z mutacjami receptora *EGFR* wykazywała wrażliwość na transfekcję krótkimi hamującymi fragmentami RNA komplementarnymi do mRNA kodującego receptor [23]. Komórki tych hodowli wykazują również wysoką wrażliwość na drobnocząsteczkowe inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR (gefitynib i erlotynib) w zakresie stężeń IC_{50} rzędu 10–100 nM [24]. Wynikiem zahamowania aktywności kinazy tyrozynowej receptora EGFR w tych komórkach jest nasilona apoptoza [23]. Innym niedawno opisanym zaburzeniem molekularnym, występującym w guzach u około 3–5% chorych, jest występowanie genu fuzyjnego *EML4/ALK* [25;26]. Gen ten koduje kinazę tyrozynową ALK, która ulega konstitu-

tywnej aktywacji. Wstępne dane *in vitro* sugerują możliwość wykorzystania tej re-aranżacji jako celu molekularnego dla inhibitorów kinazy ALK.

U większości chorych na NDRP zaburzenia molekularne w komórkach guzów nowotworowych wynikają z większej niestabilności genomu i mają złożony charakter, obejmujący wiele szlaków przekazywania sygnału, kontroli cyklu komórkowego, apoptozy i angiogenezy [27]. Przykładami takich zaburzeń są mutacje genu *TP53*, występujące w około 50–70% przypadków NDRP [27–29]. Mutacje genów szlaku proliferacyjnego ras-raf-MEK, obejmujące *K-ras* (10–40% chorych) [27;30;31], *B-raf* oraz *MEK* (łącznie 3–5% chorych) [32], prowadzą do aktywacji kinazy *MEK* oraz aktywacji cyklu komórkowego poprzez cyklinę D1. Mutacje te stanowią atrakcyjny cel molekularny dla inhibitorów kinazy MEK, których skuteczność stwierdzono w badaniach *in vitro* [32].

W postaci płaskonabłonkowej raka płuca dominuje nadmierna metylacja szeregu genów, która jest zjawiskiem epigenetycznym, zachodzącym na etapie zmian przednowotworowych i dotyczy często całego nabłonka górnych dróg oddechowych [33]. Nadmierną metylację genów można wykryć za pomocą sekwencjonowania wodorosiarczynowego [34]. Nasilona metylacja promotorów wybranych genów w komórkach płwociny związana jest z podwyższonym ryzykiem zachorowania na raka płuca [35]. U chorych po zabiegu operacyjnym z powodu raka płuca wysoki stopień metylacji promotorów wybranych genów jest związane z niekorzystnym rokowaniem [36]. Leki regulujące nasilenie metylacji są obecnie oceniane w warunkach *in vitro*, w zwierzęcych modelach nowotworów [37] i w badaniach klinicznych u chorych na NDRP.

Do rozwoju unaczynienia w tkankach guzach płuca dochodzi na etapie zmian przedinwazyjnych, czego przykładem jest angiogenna dysplazja płaskonabłonkowa [38]. Angiogeneza nowotworowa jest regulowana przez szereg proangiogennych czynników wzrostu, spośród których największe znaczenie przypisywane jest naczyniowo-śródbłonkowemu czynnikowi wzrostu (VEGF), zasadowemu czynnikowi wzrostu fibroblastów (bFGF) oraz czynnikowi wzrostu hepatocytów (HGF). Ekspresja tych białek w niedrobnokomórkowym raku płuca ma związek z gęstością naczyń i rokowaniem [39–41].

Spośród licznych inhibitorów angiogenezy, rejestrację w leczeniu zaawansowanego NDRP w skojarzeniu z chemioterapią, uzyskało dotychczas przeciwciało monoklonalne przeciw VEGF (bewacyzumab). Podstawą rejestracji leku były wyniki badań

klinicznych III fazy przeprowadzone w USA, w którym wykazano wydłużenie mediany czasu przeżycia o około 2 miesiące w wyselekcjonowanej pod względem cech klinicznych grupie chorych [42]. W badaniach klinicznych II i III fazy znajdują się inne inhibitory angiogenezy, w tym drobnocząsteczkowe mieszane inhibitory VEGF i innych kinaz tyrozynowych [43]. Jak dotąd nieznane są cechy molekularne guza pozwalające wyodrębnić chorych o największym prawdopodobieństwie uzyskania korzyści pod wpływem leków hamujących angiogenezę.

1.2. Indywidualizacja leczenia w NDRP

W obecnie prowadzonych badaniach, zarówno u chorych na zaawansowanego, jak i operacyjnego NDRP, analizowana jest wartość predykcyjna wybranych cech histopatologicznych oraz molekularnych guzów. Oczekuje się, że pozwolą one wyodrębnić podgrupy chorych, w których istnieje największe prawdopodobieństwo uzyskania korzyści klinicznej z zastosowania klasycznych leków cytotoksycznych i terapii celowanych. W odniesieniu do chorych na operacyjnego NDRP wyodrębniono tymczasem szereg cech molekularnych posiadających większą wartość rokowniczą niż klasyczne cechy histologiczne, takie jak oceniany patomorfologicznie stopień zaawansowania pTNM, typ histologiczny raka i naciekanie naczyń krwionośnych i limfatycznych. Molekularne czynniki rokownicze pozwalają wyróżnić grupę chorych szczególnie zagrożonych ryzykiem niepowodzenia („niekorzystne rokowanie”) od grupy chorych, u których rokowanie jest na tyle dobre, że potencjalna korzyść w wyniku zastosowanego leczenia byłaby znikoma („korzystne rokowanie”). Z kolei molekularne czynniki predykcyjne pozwalają spośród ogółu chorych wyodrębnić tych, u których dana metoda leczenia przynosi oczekiwany efekt; w ten sposób można uniknąć nieskutecznego i często toksycznego leczenia u pozostałych chorych [44]. Dodatkowym uzasadnieniem dla poszukiwania cech molekularnych związanych z rokowaniem i wynikami leczenia jest ich wartość poznawcza, prowadząca do lepszego zrozumienia biologii nowotworu. Oczekuje się, że wdrożenie molekularnych wskaźników rokowniczych i predykcyjnych w kwalifikacji do leczenia onkologicznego pozwoli uzyskać poprawę wskaźnika terapeutycznego oraz zmniejszyć koszty opieki medycznej.

nej. Obecnie koszty nowych leków onkologicznych, zwłaszcza terapii celowanych, przewyższają możliwości budżetowe nawet najbardziej rozwiniętych krajów.

1.3. Molekularne czynniki rokownicze

Przykładem praktycznego zastosowania molekularnych czynników rokowniczych są testy oparte o wyniki analizy ekspresji genów, wykorzystywane w kwalifikacji chorych na operacyjnego raka piersi do systemowego leczenia uzupełniającego (*Mammaprint*[®], Agendia, i *OncotypeDx*[®], Genomic Health). Przydatność kliniczna obu testów jest przedmiotem obecnie prowadzonych badań klinicznych III fazy [45-47].

W ostatnich latach zaproponowano wiele molekularnych „sygnatur” rokowniczych, dobrze opisujących czas do progresji i czas przeżycia chorych na NDRP po leczeniu operacyjnym. Testy te wykorzystują technologię mikromacierzy RNA [48-50], ekspresji genów za pomocą ilościowej reakcji RT-PCR [51-53], ekspresji mikroRNA za pomocą ilościowej reakcji RT-PCR [54;55] lub profilu białkowego guza z wykorzystaniem spektrometrii masowej [56]. Wartość rokownicza tych testów jest na ogół wyższa niż klasycznych cech klinicznych i histologicznych. Wieloośrodkowe badanie walidacyjne obejmujące chorych na gruczolowego raka płuca poddanych leczeniu operacyjnemu wskazuje komplementarną wartość sygnatur ekspresji genów w odniesieniu do stopnia zaawansowania [57]. Przydatność kliniczna profilu ekspresji genów określonego przez Potti i wsp [49]. jest obecnie przedmiotem badania klinicznego III fazy prowadzonego przez amerykańską grupę badawczą *Cancer and Leukemia Group B (CALGB)*. Przedmiotem tego badania jest ocena skuteczności chemioterapii pooperacyjnej u chorych na NDRP w stopniu zaawansowania pIA, u których test mikromacierzy RNA wskazuje na niekorzystne rokowanie.

Niezależnie od konieczności prospektywnej weryfikacji potencjalnie wartościowych molekularnych testów rokowniczych, istotna jest także ocena wartości rokowniczej poszczególnych zaburzeń molekularnych leżących u podłoża powstawania i progresji raka płuca. Ocena taka pozwala na lepsze zrozumienie historii naturalnej przebiegu nowotworu w grupie chorych, u których występuje określone zaburzenie oraz pozwala na dokładniejsze określenie jej predykcyjnej wartości. Przykładowo,

mutacje części genu *EGFR* kodującej kinazę tyrozynową spotykane są w guzach u około 10–20% chorych na NDRP rasy białej. Mutacje te związane są ze znacznie lepszym rokowaniem – mediana czasu przeżycia chorych z mutacjami w komórkach guza wynosi około 2 lata, podczas gdy mediana czasu przeżycia u chorych z niezmutowanym typem receptora *EGFR* nie przekracza roku [58;59]. Udowodnienie wartości predykcyjnej mutacji *EGFR* wymaga więc odpowiedniego zaplanowania badań klinicznych III fazy z uwzględnieniem spodziewanego czasu przeżycia w grupie chorych, u których stwierdza się mutacje genu *EGFR* w komórkach nowotworu.

1.4. Molekularne czynniki predykcyjne

Skuteczność leczenia w onkologii jest mierzona kilkoma wskaźnikami korzyści klinicznej: odsetkiem obiektywnych odpowiedzi na leczenie, czasem do progresji nowotworu i czas całkowitego przeżycia chorych. Molekularne testy predykcyjne pozwalają na wyróżnienie grupy chorych o wysokim odsetku odpowiedzi lub u których dochodzi do poprawy czasu przeżycia po zastosowaniu określonej terapii. Najlepszym miernikiem wartości predykcyjnej testu jest test interakcji, porównujący współczynniki ryzyka zgonu dla dwóch metod leczenia w zależności od wyniku testu predykcyjnego w badaniu klinicznym III fazy z grupą kontrolną [60].

W ostatnich latach zaproponowano wiele czynników predykcyjnych korzyści klinicznej z chemioterapii w leczeniu zaawansowanego NDRP oraz w pooperacyjnym leczeniu uzupełniającym. Przykładowo, w tabeli 1 przedstawiono podsumowanie badań oceniających wartość predykcyjną testów immunohistochemicznych i molekularnych dla uzupełniającej chemioterapii [61-64]. Najbardziej obiecujący spośród nich - immunohistochemiczna ocena ekspresji białka ERCC1 (*excision repair cross-complementary 1*) nie został jak dotąd wdrożony do codziennej praktyki, albowiem konieczne jest zweryfikowanie go w prospektywnym badaniu klinicznym oraz standaryzacja metody detekcji tego białka.

Tab. 1. Immunohistochemiczne i molekularne czynniki predykcyjne korzyści klinicznej z zastosowania pooperacyjnej chemioterapii u chorych na NDRP

Autor [poz. piśm.]	Rodzaj testu (marker)	Badanie kliniczne	Współczynnik ryzyka zgonu (HR) w grupie z „ujemnym” markerem (95% ZU*)	Współczynnik ryzyka zgonu (HR) w grupie z „dodatnim” markerem (95% ZU*)	Współczyn- nik P dla testu interakcji
Olaussen [63]	immunohistochemia (białko ERCC1)	IALT	0,65 (0,50-0,86)	1,14 (0,84-1,55)	0,009
Filipits [61]	immunohistochemia (białko p27 ^{Kip1})	IALT	0,66 (0,50-0,88)	1,09 (0,82-1,45)	0,02
Filipits [61]	immunohistochemia (cyklina D1)	IALT	0,87 (0,64-1,18)	0,85 (0,65-1,11)	0,90
Filipits [61]	immunohistochemia (cyklina D3)	IALT	0,83 (0,63-1,09)	0,88 (0,65-1,19)	0,78
Filipits [61]	immunohistochemia (cyklina E)	IALT	0,77 (0,57-1,02)	0,94 (0,71-1,25)	0,33
Filipits [61]	immunohistochemia (białko Ki-67)	IALT	0,79 (0,59-1,04)	0,92 (0,69-1,22)	0,45
Filipits [62]	immunohistochemia (białko MRP1)	IALT	0,79 (0,60-1,04)	0,95 (0,71-1,28)	0,37
Filipits [62]	immunohistochemia (białko MRP2)	IALT	0,93 (0,71-1,21)	0,82 (0,60-1,12)	0,56
Tsao [64]	immunohistochemia (białko TP53)	JBR.10	1,40 (0,78-2,52)	0,54 (0,32-0,92)	0,02
Tsao [64]	DHPLC** (mutacje genu <i>TP53</i>)	JBR.10	0,67 (0,46-0,98)	0,78 (0,46-1,32)	0,65
Tsao [46]	DHPLC** (mutacje genu <i>K-ras</i>)	JBR.10	0,69 (0,49-0,97)	0,95 (0,53-1,71)	0,29

* 95% ZU – 95% zakres ufności

** DHPLC – denaturująca wysokosprawna chromatografia cieczowa

Identyfikacja czynników predykcyjnych dla terapii celowanych w leczeniu NDRP jest uzasadniona z wielu względów. Korzyść kliniczna z zastosowania tych leków jest ograniczona do wąskiej grupy chorych, u których aktywacja określonego

szlaku przekazywania sygnału ma zasadnicze znaczenie dla progresji nowotworu. Leki ukierunkowane molekularnie są związane z pewnym ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych [42;44], a ich wysoki koszt ogranicza możliwość ich powszechnego stosowania. W tej sytuacji wyodrębnienie spośród ogółu chorych na NDRP podgrupy o największym prawdopodobieństwie uzyskania korzyści klinicznej związanej ze stosowaniem tych leków ma istotne znaczenie poznawcze i aplikacyjne.

Niniejsza rozprawa obejmuje cykl pięciu oryginalnych doniesień naukowych, których wspólnym celem było poszukiwanie molekularnych czynników predykcyjnych związanych z korzyścią kliniczną z zastosowania inhibitorów EGFR w leczeniu chorych na zaawansowanego NDRP [65-69]. Dodatkowo w rozprawie umieszczono rozdział z monografii na temat molekularnych czynników predykcyjnych korzyści klinicznej związanej z zastosowaniem inhibitorów EGFR, który stanowi wstęp do omawianych prac [70]. Zastosowane metody badawcze oraz materiał kliniczny i wyniki opisane są szczegółowo w poszczególnych pracach, zamieszczonych jako załączniki do rozprawy.

2. CELE PRACY

Celem doniesień ujętych w rozprawie była ocena molekularnych czynników predykcyjnych związanych z korzyścią kliniczną z zastosowania inhibitorów EGFR u chorych na zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Szczegółowe cele poszczególnych prac oryginalnych przedstawiono poniżej w kolejności odpowiadającej poszczególnym doniesieniom.

1. Określenie immunohistochemicznych oraz molekularnych czynników predykcyjnych korzyści klinicznej z zastosowania doustnego inhibitora kinazy tyrozynowej EGFR, gefitynibu, u chorych na zaawansowanego NDRP [67]. Badanie wykonano na archiwalnych wycinkach guzów chorych uczestniczących w międzynarodowym badaniu III fazy ISEL (*Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer*) [71], oceniającym skuteczność gefitynibu w porównaniu do placebo w II i III linii leczenia.
2. Ocena rokowniczej wartości liczby kopii genu *EGFR* metodą FISH oraz ocena rokowniczej wartości stopnia ekspresji białka EGFR metodą immunohistochemiczną w wycinkach z guza u chorych otrzymujących chemioterapię I linii [72].
3. Określenie przydatności ilościowej reakcji PCR do oceny liczby kopii genu *EGFR* oraz przydatności ekspresji mRNA tego genu jako czynników predykcyjnych korzyści klinicznej związanej z zastosowaniem gefitynibu u chorych na zaawansowanego NDRP [65].
4. Ocena predykcyjnej wartości różnych metod barwienia immunohistochemicznego (dwóch przeciwciał oraz dwóch metod oceny półilościowej) na obecność białka EGFR w komórkach guza oraz próba wyboru optymalnego punktu odcięcia definiującego wynik „dodatni” w ramach analizy materiału retrospektywnego pochodzącego od uczestników badania ISEL [68].
5. Ocena wartości predykcyjnej liczby kopii genu *EGFR* w badaniu FISH w guzach chorych leczonych erlotynibem w skojarzeniu z chemioterapią a następnie erlotynibem w formie leczenia podtrzymującego [69]. W pracy wykorzystano materiał tkankowy guzów NDRP uzyskany od chorych leczonych w ramach międzynarodowego badania klinicznego III fazy TRIBUTE [73].

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Szczegółowe omówienie uzyskanych wyników przedstawiono w poszczególnych pracach składających się na niniejszą rozprawę. Zawarte w tej części zbiorcze omówienie wyników uwzględnia głównie doniesienia, które ukazały się po opublikowaniu tych prac.

Omówienia wymaga stosowana wielokrotnie w niniejszej rozprawie metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, stosowana do oceny liczby kopii genu *EGFR* w wycinkach z guzów chorych na NDRP. Korzystną cechą tej metody jest doskonała rozdzielczość sygnałów obserwowanych w odpowiednio wybarwionych jądrach komórkowych oraz możliwość równoczesnego zastosowania znakowanych różnymi fluorochromami sond molekularnych wiążących różne sekwencje DNA. Metoda FISH jest szeroko stosowana do oceny amplifikacji genu *HER2* w raku piersi, oceny amplifikacji genu *N-myc* w nerwiaku zarodkowym oraz w diagnostyce i monitorowaniu wyników leczenia białaczek. Przy badaniu w mikroskopie fluorescencyjnym widoczne są jedynie jądra komórkowe, metoda ta nie umożliwia więc dokładnej jednoczesowej oceny architektoniki tkankowej. Metoda FISH jest również pracochłonna, kosztowna oraz wymaga mikroskopu fluorescencyjnego, wyposażonego w oryginalne filtry i oprogramowanie, dostępnego jedynie w nielicznych pracowniach genetycznych czy histopatologicznych. W ostatnich latach opracowano nowe metody oceny liczby kopii genu *EGFR*. Jedną z nich jest ilościowa reakcja PCR, którą można przeprowadzić również w utrwalonym materiale tkankowym. W jednej z prac składających się na niniejszą rozprawę wykazano, że metody te prowadzą do różnych wyników i nie powinny być stosowane zamiennie [65]. Rozbieżne wyniki uzyskiwane przy użyciu obydwu metod mogą wynikać z punktu odcięcia liczby kopii *EGFR* w badaniu FISH (≥ 4 kopii w 40% komórek nowotworowych; punkt ten jest znacząco odmienny w porównaniu do oceny FISH *HER2*). W ilościowej reakcji PCR konieczne jest uwzględnienie wyłącznie komórek nowotworowych, co uzyskuje się metodą mikrodysekcji laserowej. Nie ma jednak pewności, czy pewien odsetek komórek podścieliska, zawsze obecny w preparacie, nie zaburzy wyniku reakcji. Istotnym elementem ilościowej reakcji PCR jest wykorzystanie genu referencyjnego, który także może ulec amplifikacji lub delecji w komórkach guza. Wyniki niniejszej pracy stawiają pod znakiem zapytania dane z innych doniesień, w których liczbę kopii *EGFR* jako wskaźnik predykcyjny dla lecze-

nia inhibitorami EGFR oceniano za pomocą ilościowej reakcji PCR bez uprzedniego porównania z wynikami uzyskanymi metodą FISH [58].

Do innych metod oceny liczby kopii genu *EGFR* należy hybrydyzacja *in situ* z reakcją barwną (CISH, *chromogenic in situ hybridization*) oraz hybrydyzacja *in situ* z detekcją sygnału za pomocą soli srebra (SISH, *silver in situ hybridization*). Obydwie metody umożliwiają ocenę liczby kopii genu w wycinkach guza w mikroskopie świetlnym, co zapewnia ocenę w jądrach komórek nowotworowych oraz szeroką dostępność testu. Wadą metody jest względnie słaba rozdzielczość (zwłaszcza dla metody CISH) oraz brak możliwości jednoczesnej oceny dwóch lub więcej sekwencji DNA. Pomimo ograniczeń, metoda SISH jest bardzo obiecująca i postęp technologiczny w ostatnich latach umożliwił jej pełną automatyzację. Opracowywana jest również metoda oceny dwóch sekwencji DNA jednocześnie za pomocą sond umożliwiających detekcję sygnału o różnych barwach. Metoda ta jest obecnie oceniana pod kątem jej przydatności klinicznej.

Od chwili ukazania się prac zawartych w niniejszej rozprawie piśmiennictwo poświęcone metodologii oceny markerów predykcyjnych oraz ich znaczenia klinicznego w odniesieniu do leczenia inhibitorami EGFR znacznie się wzbogaciło. Potwierdzeniem predykcyjnego znaczenia liczby kopii genu *EGFR* dla czasu przeżycia chorych leczonych erlotynibem była analiza molekularna badania BR.21 [74;75]. W badaniu tym, chorzy na NDRP po niepowodzeniu jednej lub dwóch linii chemioterapii, zostali losowo przydzieleni do leczenia erlotynibem lub placebo. Zastosowanie erlotynibu było związane z poprawą czasu przeżycia chorych (wydłużenie mediany czasu przeżycia o ok. 2 miesiące). Wyniki tego badania stały się podstawą rejestracji erlotynibu. W ramach badania BR.21 przeprowadzono również analizę wycinków guzów celem określenia zaburzeń molekularnych o znaczeniu predykcyjnym. Wysoka liczba kopii genu *EGFR* oceniona metodą FISH okazała się być najlepszym czynnikiem predykcyjnym w analizie jednoczynnikowej (współczynnik ryzyka zgonu dla erlotynibu względem placebo HR=0,44 w grupie chorych z dodatnim badaniem FISH *versus* HR=0,85 w grupie chorych z ujemnym badaniem FISH). W analizie wieloczynnikowej wartość predykcyjna badania FISH nie została jednak potwierdzona. W kolejnej analizie tego samego badania ocenę molekularną wykonano na zwiększonej liczbie guzów, a analizę statystyczną przeprowadzono po dłuższym okresie obserwacji, co umożliwiło uzyskanie większej mocy statystycznej do porównań podgrup [75]. W badaniu tym liczba kopii genu *EGFR* okazała się istotnym czynnikiem predykcyjnym dla

czasu przeżycia zarówno w analizie jedno-, jak i wieloczynnikowej. W grupie z wysoką liczbą kopii genu *EGFR* mediana czasu przeżycia chorych otrzymujących erlotynib wyniosła 10,5 miesięcy w porównaniu do 3,1 miesięcy w grupie chorych otrzymujących placebo ($P=0,0042$). Inne analizowane cechy molekularne – mutacje wybranych egzonów genu *EGFR* (17% chorych) i mutacje genu *K-ras* (15% chorych) nie posiadały znaczenia predykcyjnego.

Badania ISEL i BR.21 obejmowały chorych na zaawansowanego NDRP, u których doszło do niepowodzenia po jednej lub dwóch liniach chemioterapii i u których nie planowano zastosowania kolejnego leczenia cytotoksycznego. Grupę kontrolną w tych badaniach stanowili chorzy otrzymujący placebo. Dalszą strategią rozwoju inhibitorów EGFR w NDRP jest stosowanie tych leków na wcześniejszych etapach leczenia. Cztery duże badania kliniczne III fazy z zastosowaniem gefitynibu lub erlotynibu w skojarzeniu z chemioterapią zakończyły się niepowodzeniem [73;76-78]. Najbardziej prawdopodobną przyczyną braku korzyści z jednoczasowego stosowania inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR i leków cytotoksycznych było najpewniej zatrzymanie komórek nowotworu w fazie G1 cyklu komórkowego pod wpływem gefitynibu lub erlotynibu [79]. W tej fazie cyklu komórki guza są niewrażliwe na fazospecyficzne cytostatyki stosowane w leczeniu chorych na NDRP. Zawarta w niniejszej rozprawie analiza molekularna badania TRIBUTE sugeruje możliwość uzyskania korzyści klinicznej z podtrzymującego leczenia erlotynibem w grupie chorych, u których stwierdza się wysoką liczbę kopii genu *EGFR* w komórkach guza. W badaniu III fazy TRIBUTE chorzy po zakończeniu chemioterapii w skojarzeniu z erlotynibem lub placebo otrzymywali leczenie podtrzymujące erlotynibem lub placebo. W grupie chorych z wysoką liczbą kopii genu *EGFR* w badaniu FISH, po zakończeniu chemioterapii, krzywe czasu do progresji choroby uległy separacji na korzyść erlotynibu względem placebo (współczynnik ryzyka dla czasu do progresji, $HR=0,59$, $P=0,043$). Wpływu tego nie zaobserwowano w grupie chorych z niską liczbą kopii genu *EGFR*. Skuteczność leczenia podtrzymującego erlotynibem po zakończeniu chemioterapii jest obecnie przedmiotem dużego randomizowanego badania klinicznego III fazy SATURN, w ramach którego planowana jest ocena liczby kopii genu *EGFR* metodą FISH. Wstępne wyniki tego badania zostały przedstawione na kongresie Amerykańskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej w czerwcu 2009 r. [80] U chorych na zaawansowanego NDRP, u których uzyskano stabilizację lub regresję choroby po przynajmniej czterech cyklach chemioterapii I linii, zastosowanie leczenia podtrzymującego erlotynibem by-

ło związane ze znamieną poprawą czasu do progresji (współczynnik ryzyka $HR=0,71$; 95% zakres ufności $[ZU]=0,62-0,82$, $P<0,001$). Wyniki badania SATURN dotyczące całkowitego czasu przeżycia wymagają dodatkowego okresu obserwacji i zostaną przedstawione w najbliższej przyszłości. Wstępne wyniki analizy molekularnej wycinków z guza od chorych uczestniczących w tym badaniu wskazują na brak znaczenia predykcyjnego barwienia immunohistochemicznego na obecność białka EGFR, liczby kopii genu *EGFR* w badaniu FISH oraz mutacji genu *K-ras* [81]. Zaczęnie predykcyjne wykazano natomiast dla aktywujących mutacji genu *EGFR*; współczynnik ryzyka dla czasu do progresji u chorych otrzymujących erlotynib wynosił 0,10 w porównaniu do chorych otrzymujących placebo i był wysoce znamieny ($P<0,001$).

W trzech badaniach klinicznych (jednym badaniu II fazy [82] i dwóch badań III fazy [83;84]) porównano skuteczność chemioterapii oraz inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR w monoterapii w drugiej linii leczenia. W badaniach tych czas przeżycia chorych otrzymujących chemioterapię i leczonych gefitynibem był porównywalny, jednak jedynie wyniki badania INTEREST [83] posiadały moc statystyczną pozwalającą wykazać równą skuteczność gefitynibu i docetakselu w niewyselekcjonowanej grupie chorych. Analiza molekularna badania INTEREST obejmowała wycinki z guzów pochodzące od niewielkiej części chorych (174 spośród 1466 chorych biorących udział w badaniu), pomimo deklarowanej przez autorów badania prospektywnej oceny markerów predykcyjnych. W analizie tej nie wykazano korzyści predykcyjnej oceny liczby kopii genu *EGFR* metodą FISH dla czasu przeżycia czy czasu do progresji. Być może więc skuteczność chemioterapii i gefitynibu w drugiej linii leczenia jest porównywalna, aczkolwiek liczebność podgrup analizowanych w powyższym badaniu była niewystarczająca do stwierdzenia wartości predykcyjnej testu.

W badaniu klinicznym III fazy IPASS chorzy na zaawansowanego gruczołowego raka płuca niepalący tytoniu lub chorzy którzy palili mniej niż 1 paczkę papierosów dziennie przez 10 lat zostali losowo przydzieleni do pierwszorazowej chemioterapii (schemat karboplatyna/paklitaksel) lub do leczenia gefitynibem. Badanie zostało przeprowadzone w reprezentatywnej grupie 1217 chorych w krajach Azji Daleko-wschodniej, w których odsetek osób niepalących tytoniu jest wyższy niż w Europie czy Ameryce Północnej. Wstępne wyniki tego badania przedstawione w postaci doniesienia zjazdowego wskazują na podobną skuteczność powyższych metod terapeutycznych w odniesieniu do czasu przeżycia (współczynnik ryzyka zgonu $HR=0,91$, 95% $ZU=0,76-1,10$) oraz na wyższość leczenia gefitynibem w odniesieniu do popra-

wy jakości życia mierzonej kwestionariuszem FACT-L [85]. Przedstawiono również analizę molekularną tego badania uwzględniającą występowanie mutacji genu *EGFR* oraz liczbę kopii genu *EGFR* w badaniu FISH w wycinkach nowotworów. Analiza ta wskazała na predykcyjne znaczenie obydwu zaburzeń, przy czym wartość predykcyjna mutacji genu *EGFR* była silniejsza w porównaniu do analizy liczby kopii genu *EGFR* (współczynnik ryzyka zgonu HR=0,48 w grupie chorych z aktywującymi mutacjami genu *EGFR* otrzymujących gefitynib w porównaniu do chemioterapii, $P<0,0001$ oraz współczynnik ryzyka zgonu HR=2,85 w grupie chorych bez mutacji genu *EGFR* otrzymujących gefitynib w porównaniu do chemioterapii, $P<0,0001$).

Przedmiotem szeregu badań klinicznych jest ocena skuteczności gefitynibu lub erlotynibu w pierwszorazowym leczeniu chorych wyselekcjonowanych na podstawie cech molekularnych. W większości tych badań w doborze chorych uwzględnia się obecność mutacji genu *EGFR* kodującego kinazę tyrozynową (ok. 10–20% chorych). Wyniki jednoramiennych badań II fazy wskazują na wysoki odsetek odpowiedzi (58–84%) oraz obiecujący czas do progresji (mediana w zakresie 8,9–13,0 miesięcy) [86–89]. Obecność mutacji genu *EGFR* jest związana z wolniejszym przebiegiem choroby również u chorych otrzymujących chemioterapię [58;59]. W tej sytuacji jedyną metodą oceny wartości predykcyjnej testu pozostaje randomizowane badanie kliniczne III fazy z grupą kontrolną otrzymującą leczenie cytotoksyczne. Badania takie są obecnie prowadzone przez cztery grupy badawcze (dwa badania toczą się w Japonii, jedno w Chinach, jedno jest koordynowane przez Hiszpańską Grupę Raka Płuca). Plan badań zakłada ocenę czasu do progresji jako pierwszoplanowego punktu końcowego, a ich wyniki spodziewane są w 2010 roku.

W piśmiennictwie dostępne są również wyniki jednoramiennego badania klinicznego II fazy oceniającego skuteczność pierwszorazowego leczenia erlotynibem chorych na zaawansowanego NDRP spełniających dwa spośród trzech następujących kryteriów: brak palenia tytoniu w wywiadzie, wysoka liczba kopii genu *EGFR* w badaniu FISH lub dodatnie barwienie na obecność fosforylowanego białka Akt (pAkt) w wycinkach guzów. Wykazany w tym badaniu czas do progresji w grupie chorych z wysoką liczbą kopii genu *EGFR* (7 miesięcy) jest obiecujący. Wyniki tego badania są jednak trudne do interpretacji z uwagi na bardzo selektywne kryteria doboru chorych.

Obecnie toczą się dwa badania kliniczne II fazy, w których chorzy kwalifikowani są do pierwszej linii leczenia erlotynibem na podstawie oceny zaburzeń liczby kopii genu *EGFR*. Pierwsze z nich, FLIKER, prowadzone jest w kilku ośrodkach w

Polsce i koordynowane w Klinice Onkologii i Radioterapii AM w Gdańsku; drugie zostało przeprowadzone w kilku ośrodkach amerykańskich przez firmę OSI (OSI-774-203) i jego wyniki oczekiwane są wkrótce. FLIKER jest jednoramiennym badaniem z doborem chorych na podstawie badania FISH, a czas do progresji jest pierwszoplanowym punktem końcowym. OSI-774-203 jest badaniem klinicznym II fazy, w którym chorzy kwalifikowani są na podstawie stwierdzenia obecności białka w ocenie immunohistochemicznej lub wysokiej liczby kopii genu *EGFR* w badaniu FISH. Badanie to zostało zaprojektowane z prospektywną stratyfikacją względem testu FISH. Wyniki obydwu badań pozwolą na określenie znaczenia testu *EGFR* FISH w kwalifikacji chorych do pierwszorazowego leczenia erlotynibem. W grupie chorych z wysoką liczbą kopii genu *EGFR* w guzie (ok. 30-40% chorych na NDRP) znajduje się większość chorych z mutacjami egzonu 19. lub 21. genu *EGFR*, gdyż te dwa zaburzenia molekularne są ze sobą związane – zmutowany gen ulega łatwiejszej amplifikacji [67].

Inhibitory kinazy tyrozynowej *EGFR* stanowią potencjalnie atrakcyjną metodę uzupełniającego leczenia chorych na NDRP poddanych resekcji miększu płucnego, pod warunkiem ich właściwego doboru na podstawie cech molekularnych guza. Dwa badania z zastosowaniem gefitynibu w leczeniu uzupełniającym u niewyselekcjonowanych chorych na NDRP zostały przedwcześnie zakończone ze względu na nieskuteczność leku w badaniu klinicznym III fazy ISEL lub ryzyko choroby śródmiąższowej płuc [90]. To poważne powikłanie po leczeniu inhibitorami kinazy tyrozynowej *EGFR* dotyczy ok. 2-3% populacji dalekowschodniej oraz poniżej 1% chorych populacji europejskiej czy amerykańskiej. W obecnie toczącym się międzynarodowym wieloośrodkowym badaniu klinicznym RADIANT, chorzy na NDRP po leczeniu operacyjnym otrzymują erlotynib lub placebo na podstawie profilu molekularnego guza – do badania włączani są chorzy, u których w wycinkach guza stwierdza się obecność białka *EGFR* w badaniu immunohistochemicznym i/lub wysoką liczbę kopii genu *EGFR* w badaniu FISH. Wyniki badania RADIANT są spodziewane za około pięć lat. Pomimo braku wskazania rejestracyjnego, w przedstawionym niedawno doniesieniu zjazdowym przedstawiono retrospektywne wyniki uzupełniającego leczenia gefitynibem lub erlotynibem chorych, u których w materiale pooperacyjnym z guza pierwotnego stwierdzono obecność mutacji genu *EGFR*. W analizowanej grupie 90 chorych, po skorygowaniu względem czynników demograficznych i kliniczno-patologicznych, stwierdzono znamienne dłuższy czas do progresji pod wpływem stosowania inhibitorów *EGFR* (współczynnik ryzyka dla czasu do progresji $HR=0,38$, 95% zakres ufno-

ści=0,16–0,90) oraz trend w kierunku poprawy czasu przeżycia [91]. Ze względu na retrospektywny charakter badania i krótki okres obserwacji (mediana 16 miesięcy), wyniki tej analizy należy interpretować z ostrożnością.

Ocena immunohistochemiczna obecności białka EGFR w komórkach guza jako czynnik predykcyjny dla czasu przeżycia chorych jest przedmiotem kontrowersji. Zarówno w badaniu BR.21, jak i w badaniu ISEL wykazano brak korzyści z zastosowania inhibitorów EGFR w grupie chorych z ujemnym barwieniem na obecność białka EGFR [67;74]. Ze względu na powszechną dostępność badania, może być ono uznane jako najbardziej dostępny negatywny czynnik predykcyjny. Przedmiotem jednej z prac zawartych w niniejszej rozprawie była próba znalezienia optymalnego punktu odcięcia, przy którym wartość predykcyjna testu byłaby największa [68]. Takim punktem okazało się być 10% komórek z dodatnim produktem reakcji barwnej w metodzie immunohistochemicznej z wykorzystaniem powszechnie dostępnego zestawu EGFR PharmDx. Wyniki tej analizy są zbieżne z pracą przeprowadzoną na materiale tkankowym pochodzącym od chorych uczestniczących w badaniu BR.21, w którym stosowano z erlotynib [60]. Jednocześnie wykazano, że przeciwciała służące do oceny ekspresji białka EGFR nie mogą być stosowane zamiennie – wykorzystanie przeciwciała firmy Zymed 31G7 oraz wskaźnika reakcji barwnej nie posiadało znaczącego znaczenia predykcyjnego przy żadnym punkcie odcięcia. Ograniczeniem wykorzystania metody immunohistochemicznej w praktyce klinicznej jest wysoki udział guzów z dodatnim barwieniem, stanowiący w zależności od analizowanej metody 60–90% wszystkich guzów, wyższy dla dominującej w Polsce płaskonabłonkowej postaci raka płuca.

W świetle powyższych danych istotnym zagadnieniem staje się praktyczna interpretacja znaczenia predykcyjnego wyżej wymienionych testów w leczeniu chorych na NDRP inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR. Najlepszym czynnikiem predykcyjnym korzyści klinicznej z zastosowania erlotynibu lub gefitynibu w trzeciej linii leczenia lub drugiej linii leczenia chorych opornych na chemioterapię, jest liczba kopii genu *EGFR* w badaniu FISH w wycinkach z guza (ok. 30–40% populacji europejskiej). Wyniki leczenia tymi lekami osób z niską liczbą kopii genu *EGFR* są złe (mediana czasu przeżycia ok. 2–3 miesięcy). Mediana czasu przeżycia chorych z wysoką liczbą kopii genu *EGFR* w komórkach guza wynosi ok. 4–6 miesięcy. Grupa ta zawiera również większość osób z aktywującymi mutacjami genu *EGFR*.

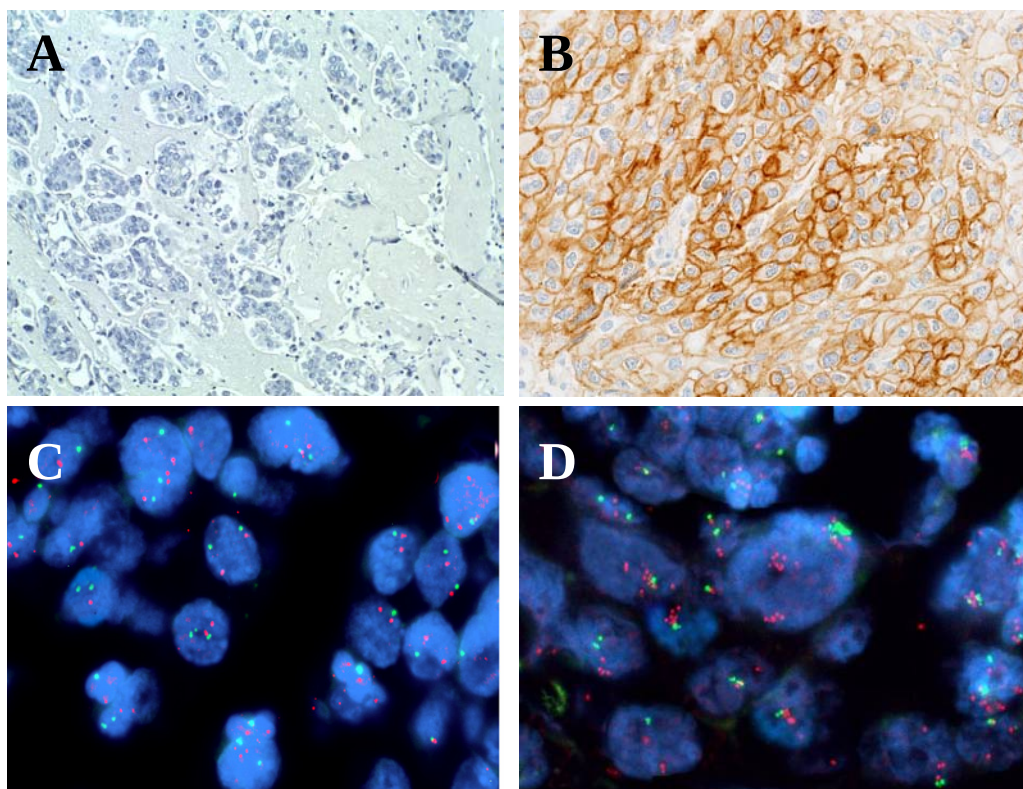
W pierwszej i drugiej linii leczenia chorych będących kandydatami do chemioterapii, największą korzyść odniosą osoby z mutacjami genu *EGFR* w komórkach guza (ok. 10–15% populacji europejskiej) – odsetek odpowiedzi waha się w zakresie 60–90%, natomiast mediana czasu do progresji wynosi ok. 8–12 miesięcy. Dla porównania, pod wpływem pierwszorazowej chemioterapii odsetek odpowiedzi na ogół nie przekracza 30–40%, natomiast czas do progresji wynosi około 4 miesiące. Wskaźniki te dla drugiej linii leczenia wynoszą odpowiednio około 10% i około 3 miesiące. Jak dotąd brak jest silnych dowodów przemawiających za określoną molekularną strategią doboru chorych do leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej *EGFR* w leczeniu pooperacyjnym wczesnych postaci NDRP.

Badanie immunohistochemiczne na obecność białka *EGFR* jest dobrym negatywnym testem predykcyjnym; u chorych nie wykazujących obecności białka w wycinkach guza, odsetek odpowiedzi po zastosowaniu erlotynibu lub gefitynibu nie przekracza 5% a poprawa czasu do progresji lub czasu przeżycia nie została udowodniona. Przy najczęściej stosowanym punkcie odcięcia o wartości predykcyjnej wykazanej w niniejszej rozprawie (10% komórek wykazujących produkt reakcji barwnej), odsetek chorych z ujemnym testem wynosi jedynie ok. 10–30%, co stanowi pewne ograniczenie przydatności klinicznej testu jako wskaźnika doboru chorych do leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej *EGFR*.

Kolejnym etapem rozwoju terapii celowanych w NDRP jest określenie nowych celów molekularnych oraz opracowanie leków hamujących określone szlaki przekazywania sygnału. Cechy molekularne guza wskazujące na aktywację wybranego szlaku przekazywania sygnału powinny być określone już na etapie rozwoju nowych leków ukierunkowanych molekularnie. Optymalnym źródłem danych dotyczących molekularnych cech wrażliwości są badania przedkliniczne - doświadczenia w hodowlach komórkowych oraz doświadczenia na zwierzętach, jak również badania kliniczne I i II fazy. Dotychczasowa wiedza dotycząca wskaźników molekularnych wskazujących na korzyść kliniczną z zastosowania inhibitorów kinazy tyrozynowej *EGFR* w leczeniu NDRP stanowi doskonały punkt odniesienia dla określenia tych cech w stosunku do innych leków ukierunkowanych molekularnie oraz dla innych nowotworów.

Przykładowo, jednym z bardzo atrakcyjnych nowych celów molekularnych jest receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (IGF1R) [92]. Receptor ten jest heterodimerem składającym się z dwóch łańcuchów α posiadających miejsce wiążące ligand i dwóch łańcuchów β posiadających aktywność kinazy tyrozynowej

oraz możliwość przekazywania sygnału aktywującego proces proliferacji oraz hamującego proces apoptozy. Jego ligandy – IGF1 i IGF2 – pozostają pod kontrolą sześciu białek wiążących (IGFBP1–6) oraz hormonu wzrostu. Szlak insulinopodobnego czynnika wzrostu odgrywa istotną rolę w patogenezie wielu nowotworów złośliwych, w tym raka płuca, mięsaków oraz nowotworów neuroendokrynnych. Receptor ten ma możliwość heterodimeryzacji z kilkoma innymi receptorami powierzchniowymi, w tym receptorami dla insuliny oraz receptorem EGFR. Heterodimeryzacja z receptorem EGFR stanowi dobrze udokumentowany mechanizm oporności na inhibitory EGFR [93;94]. Leki hamujące IGF1R należą do klasy przeciwciał monoklonalnych lub do klasy drobnocząsteczkowych inhibitorów kinazy tyrozynowej. Preparaty te są na zaawansowanych etapach badań klinicznych I–III fazy w NDRP, zarówno w skojarzeniu z chemioterapią jak i w skojarzeniu z inhibitorami EGFR. Jak dotąd brak jest doniesień poświęconych cechom molekularnym odpowiadającym za wrażliwość na inhibitory IGF1R. Przedmiotem obecnych badań prowadzonych z udziałem autora niniejszej rozprawy jest opracowanie testów molekularnych, które mogą stanowić wskaźniki korzyści klinicznej z zastosowania inhibitorów IGF1R w leczeniu raka płuca [95;96]. Wartość tych testów zostanie zweryfikowana na podstawie analizy molekularnej wycinków z guzów od chorych, którzy uczestniczą w obecnie realizowanych badaniach klinicznych. Na rycinie 1 przedstawiono przykładowe zdjęcia mikroskopowe barwienia immunohistochemicznego na obecność białka IGF1R oraz analizy liczby kopii genu *IGF1R* za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ w wycinkach NDRP od chorych operowanych w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.



Ryc. 1. Przykłady barwienia immunohistochemicznego na obecność białka IGF1R (A, barwienie ujemne, x100; B, barwienie silnie dodatnie, x200) oraz analizy liczby kopii genu *IGF1R* za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (C, disomia genu *IGF1R*, x1000; D, amplifikacja genu *IGF1R*, x10000). Badania wykonano we współpracy z Uniwersytetem w Kolorado [95]

4. WNIOSKI

U chorych na zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca:

- I. Liczba kopii genu *EGFR* oceniona za pomocą metody FISH w wycinkach guza jest najlepszym czynnikiem predykcyjnym w ocenie korzyści klinicznej związanej ze stosowaniem gefitynibu w drugiej lub trzeciej linii leczenia, natomiast oceniona immunohistochemicznie nieobecność białka EGFR stanowi negatywny czynnik predykcyjny.
- II. U chorych otrzymujących chemioterapię zarówno liczba kopii genu *EGFR* w badaniu FISH, jak i oceniona immunohistochemicznie obecność białka EGFR w wycinkach guza nie posiadają wartości rokowniczej.
- III. Liczba kopii genu *EGFR* oceniona za pomocą ilościowej reakcji PCR w wycinkach z guza nie jest związane z efektem leczenia gefitynibem. Wyniki otrzymane za pomocą tej metody oraz FISH nie są porównywalne i metody te nie powinny być stosowane zamiennie. Ekspresja mRNA genu *EGFR* oceniona metodą ilościowej reakcji PCR poprzedzonej odwrotną transkrypcją jest obiecującym czynnikiem predykcyjnym w odniesieniu do czasu do progresji chorych leczonych gefitynibem.
- IV. W ocenie immunohistochemicznej na obecność białka EGFR w wycinkach z guzów, punktem odcięcia o najlepszej wartości predykcyjnej dla czasu przeżycia po zastosowaniu gefitynibu jest 10% komórek nowotworowych wykazujących obecność produktu reakcji barwnej. Ocena za pomocą zestawu PharmDx (DAKO) i odsetka komórek wykazujących barwienie posiada większą wartość predykcyjną niż ocena za pomocą przeciwciała 31G7 (Zymed) oraz wskaźnika reakcji barwnej.
- V. U chorych leczonych erlotynibem po zakończeniu pierwszorazowej chemioterapii wysoka liczba kopii genu *EGFR* w komórkach guza związana jest z dłuższym czasem do progresji.
- VI. Indywidualna ocena molekularnych cech nowotworu pozwala na racjonalny dobór chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca do leczenia inhibitarami EGFR.

5. STRESZCZENIE

Niniejsza rozprawa obejmuje cykl pięciu oryginalnych doniesień naukowych, których wspólnym celem było poszukiwanie molekularnych czynników predykcyjnych związanych z korzyścią kliniczną z zastosowania gefitynibu lub erlotynibu - inhibitorów receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) stosowanych w leczeniu chorych na zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP).

Pierwsza praca stanowi analizę molekularną wycinków z guza od 382 chorych uczestniczących w międzynarodowym badaniu klinicznym III fazy, oceniającym skuteczność gefitynibu w drugiej lub trzeciej linii leczenia chorych na zaawansowanego NDRP (badanie ISEL). Oceniono następujące zaburzenia molekularne: liczbę kopii genu *EGFR* (fluorescencyjna hybrydyzacja in situ, FISH), mutacje genów *EGFR*, *K-ras* i *BRAF* (sekwencjonowane i metoda łańcuchowej reakcji polimerazy specyficzna dla analizowanego allelu – ARMS) oraz ekspresję białka EGFR i fosforylowanego białka Akt (p-Akt, immunohistochemia). Wykazano przydatność kliniczną oceny liczby kopii genu *EGFR* (współczynnik ryzyka [HR] zgonu dla chorych leczonych gefitynibem *versus* placebo w grupie z wysoką liczbą kopii genu *EGFR* 0,61; 95% zakres ufności [ZU] 0,36–1,04; test interakcji $P=0,045$) oraz ekspresji białka EGFR (HR zgonu dla gefitynibu *versus* placebo w grupie z dodatnim barwieniem EGFR 0,77; 95% ZU: 0,56–1,08; test interakcji $P=0,049$). Nie stwierdzono przydatności klinicznej pozostałych analizowanych zaburzeń molekularnych.

Przedmiotem kolejnej pracy była ocena wartości rokowniczej liczby kopii genu *EGFR* (metoda FISH) i ekspresji białka EGFR (immunohistochemia) w guzach 82 chorych na zaawansowanego NDRP otrzymujących wyłącznie chemioterapię. Stosując opracowane wcześniej punkty odcięcia, wykazano brak wartości rokowniczej tych markerów. Czas przeżycia wolnego od progresji oraz całkowity czas przeżycia nie różnił się w grupie chorych z dodatnim lub ujemnym testem FISH EGFR (odpowiednio $P=0,76$ i $P=0,82$) czy dodatnim lub ujemnym badaniem immunohistochemicznym na obecność białka EGFR (odpowiednio $P=0,67$ i $P=0,62$). Wyniki te zostały potwierdzone w analizie wieloczynnikowej. Udział chorych, u których uzyskano odpowiedź na chemioterapię nie różnił się znamienne w zależności od wyniku testu EGFR FISH czy wyniku barwienia immunohistochemicznego (odpowiednio $P=0,39$ i $P=1,00$).

Ze względu na znaczny koszt i nakład pracy przy ocenie liczby kopii genu *EGFR* metodą FISH, w kolejnej pracy porównano tę technikę z techniką ilościowej reakcji PCR w utrwalonym materiale tkankowym pochodzącym od 64 chorych na zaawansowanego NDRP leczonych gefitynibem w ramach programu rozszerzonego dostępu. Wykazano brak związku pomiędzy wynikami tych testów ($P=0,15$), co nie pozwala na ich zamienne stosowanie. Nie potwierdzono wartości predykcyjnej liczby kopii genu *EGFR* w metodzie PCR dla czasu przeżycia wolnego od progresji ($P=0,73$) oraz dla całkowitego czasu przeżycia ($P=0,89$). W tej samej pracy stwierdzono jednak obiecującą wartość ekspresji mRNA *EGFR* w ilościowej reakcji RT-PCR, jako czynnika predykcyjnego w odniesieniu do prawdopodobieństwa odpowiedzi i czasu do progresji w grupie 82 chorych leczonych gefitynibem (odsetek odpowiedzi w grupie chorych z dodatnim *versus* ujemnym wynikiem testu FISH wynosił odpowiednio 43% i 8%, $P=0,006$; a mediana czasu do progresji - 5,3 *versus* 2,8 miesięcy, $P=0,028$).

W badaniu ISEL, półilościowa ocena immunohistochemiczna ekspresji białka *EGFR* w komórkach guza została dokonana na podstawie przyjętego *a priori* punktu odcięcia. W kolejnej pracy, w której wykorzystano wycinki tkanek guza od chorych uczestniczących w tym badaniu, analizie poddano różne punkty odcięcia w ocenie reakcji barwnej za pomocą dwóch różnych przeciwciał (zestaw PharmDx firmy DAKO – 379 chorych i przeciwciało 31G7 firmy Zymed – 357 chorych) i dwóch metod oceny półilościowej. W pracy wykazano, że pierwotnie przyjęty punkt odcięcia 10% komórek wykazujących dodatni produkt reakcji barwnej w ocenie przeciwciałem firmy DAKO posiada najlepszą wartość predykcyjną (współczynniki ryzyka zgonu chorych w grupach z dodatnim i ujemnym barwieniem porównujące gefitynib *versus* placebo wynosiły odpowiednio 0,77 i 1,57, test interakcji $P=0,049$). Dla innych punktów odcięcia z wykorzystaniem zestawu DAKO i dla wszystkich punktów odcięcia z wykorzystaniem przeciwciała 31G7 firmy Zymed współczynniki ryzyka zgonu nie różniły się.

Przedmiotem międzynarodowego badania klinicznego III fazy TRIBUTE z placebo w grupie kontrolnej była ocena skuteczności erlotynibu w skojarzeniu z paklitakselem i cisplatyną w leczeniu I linii, a następnie ocena skuteczności tego leku jako leczenia podtrzymującego. W dostępnym reprezentatywnym materiale tkankowym pochodzącym od 275 uczestników tego badania określono liczbę kopii genu *EGFR* metodą FISH. Stwierdzono wydłużenie czasu do progresji pod wpływem leczenia erlotynibem w podgrupie chorych z wysoką liczbą kopii genu *EGFR* (HR dla czasu do

progresji 0,59; 95% ZU 0,35–0,99, $P=0,043$). Krzywe czasu do progresji w grupach chorych otrzymujących erlotynib lub placebo uległy separacji po zakończeniu leczenia skojarzonego z udziałem chemioterapii, co sugeruje skuteczność leczenia podtrzymującego erlotynibem w tej grupie chorych. Jednocześnie u chorych z wysoką liczbą kopii genu *EGFR* w guzie stwierdzono znamienne niższy odsetek odpowiedzi w przypadku leczenia skojarzonego, w porównaniu do wyłącznej chemioterapii (11,6% i 21,8%, $P=0,0495$), co wskazuje na negatywną interakcję pomiędzy erlotynibem i chemioterapią w tej grupie chorych.

Wyniki powyższych badań pozwalają na racjonalny dobór chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca do leczenia inhibitorami EGFR na podstawie indywidualnej oceny molekularnych cech nowotworu.

6. SUMMARY

Molecular predictive factors for clinical benefit from epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors in patients with non-small-cell lung cancer

Present thesis is based on five original publications addressing predictive value of molecular tumor features for the clinical benefit from treatment with epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors, gefitinib and erlotinib, in patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC). A monograph chapter presenting the rationale and current state of the art was added as an introduction.

The first study presents the results of molecular analysis of several molecular features from archival tumor material from 382 participants of the ISEL placebo-controlled phase III clinical trial assessing the value of gefitinib in NSCLC patients who failed one or two lines of chemotherapy. The following molecular features were analyzed: *EGFR* gene copy number (by fluorescence in-situ hybridization, FISH), *EGFR*, *K-ras* and *BRAF* gene mutations (sequencing and allele-specific polymerase chain reaction [ARMS, amplification refractory mutation system]), EGFR and phospho-Akt protein expression (immunohistochemistry). This study demonstrated the clinical value of *EGFR* gene copy number and EGFR protein expression. Survival hazard ratios (HR) for gefitinib *versus* placebo in patients with high *EGFR* gene copy number were 0.61 (95% confidence interval, CI: 0.36–1.04, interaction test $P=0.045$) and in patients with positive EGFR immunostaining – 0.77 (95% CI: 0.56–1.08, interaction test $P=0.049$). Other analyzed molecular features did not predict for the clinical benefit from gefitinib.

The prognostic value of *EGFR* gene copy number by FISH and EGFR protein expression by immunohistochemistry was analyzed in a series of 82 advanced NSCLC patients treated exclusively with chemotherapy in Copenhagen University Hospital. Using previously established cut-off points, the study demonstrated no prognostic value of these features. Progression-free survival and overall survival did not differ according to the result of EGFR FISH test ($P=0.76$ and $P=0.82$, respectively) and according to EGFR protein expression ($P=0.67$ and $P=0.62$, respectively). The proportion of patients responding to chemotherapy did not differ in patients

grouped as EGFR FISH positive or negative ($P=0.39$) or grouped as EGFR protein positive or negative ($P=1.00$).

EGFR gene copy number assessment is laborious and time consuming. In the next study, a comparison between *EGFR* gene copy number assessment by FISH and quantitative PCR was performed in archival tumor material from 64 patients treated with gefitinib on expanded access protocol. This study demonstrated no association between the results of *EGFR* gene copy number assessment with both tests ($P=0.15$). No predictive value of PCR-based gene copy number for progression-free survival ($P=0.73$) or overall survival ($P=0.89$) was shown, precluding interchangeable use of both techniques. In the same study, promising predictive value for time to progression in 82 patients treated with gefitinib was found for EGFR mRNA expression by quantitative RT-PCR. The proportion of patients who responded to gefitinib was 43% in the group with high EGFR expression *versus* 8% with low EGFR expression ($P=0.006$) and median progression-free survival times were 5.3 and 2.8 months, respectively ($P=0.028$).

In the ISEL study with gefitinib, protein expression was evaluated using predefined cut-off point. In the subsequent study, different cut-off points to define positivity with two antibodies for EGFR staining (DAKO PharmDx kit, 379 patients and Zymed 31G7 antibody, 357 patients) were assessed in archival tumor samples from the patients participating in the ISEL trial. Originally predefined cut-off point of 10% of cells with staining of any intensity with DAKO PharmDx kit gave the best predictive value for survival (HR of 0.77 in EGFR-positive patients *versus* 1.57 in EGFR negative patients, interaction test $P=0.049$), demonstrating that this cut-off point should be used in clinical practice. Other cut-off points with PharmDx kit (DAKO) and all cut-off points with clone 31G7 antibody (Zymed) were not associated with differences in outcome of gefitinib treated patients (interaction P values were not significant).

International, placebo-controlled phase III TRIBUTE study evaluated efficacy of erlotinib added to paclitaxel and carboplatin in front-line treatment of NSCLC, followed by erlotinib maintenance. *EGFR* gene copy number by FISH was assessed in tumor biopsies from 275 patients and yielded satisfactory hybridization leading to informative results in 245 patients. Subset of patients with high *EGFR* gene copy number had superior time to progression when treated with erlotinib, and the difference emerged at the commencement of maintenance treatment phase (HR 0.59; 95% CI 0.35–0.99). EGFR tyrosine kinase inhibitor maintenance strategy after chemotherapy

may thus be effective in EGFR FISH positive subset of patients. In this subset, there were fewer objective responses in the erlotinib and chemotherapy treated patients *versus* those receiving placebo and chemotherapy (11.6% and 21.8%, respectively, $P=0.0495$), indicating antagonistic association between erlotinib and chemotherapy.

7. PIŚMIENNICTWO

- [1] epid.coi.waw.pl/krn; dane uzyskano 30.11.2008.
- [2] Jassem J, Skokowski J, Dziadziuszko R et al. Results of surgical treatment of non-small cell lung cancer: validation of the new postoperative pathologic TNM classification. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119:1141-1146.
- [3] Albain KS, Swan RS, Rusch VR et al. Phase III study of concurrent chemotherapy and radiotherapy (CT/RT) vs CT/RT followed by surgical resection for stage IIIA (pN2) non-small cell lung cancer (NSCLC): Outcomes update of North American Intergroup 0139 (RTOG 9309). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005; 23 (Suppl. 16S):7014.
- [4] Baumann M, Herrmann T, Koch R et al. Continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy - weekend less (CHARTWEL) versus conventionally fractionated (CF) radiotherapy in non-small-cell lung cancer (NSCLC): first results of a phase III randomised multicentre trial (ARO 97-1). *Eur J Cancer* 2005; Suppl. 3:322.
- [5] Furuse K, Fukuoka M, Kawahara M et al. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:2692-2699.
- [6] Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M et al. Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20:4285-4291.
- [7] Schiller JH, Harrington D, Belani CP et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346:92-98.

- [8] Zatloukal P, Petruzalka L, Zemanova M et al. Concurrent versus sequential chemoradiotherapy with cisplatin and vinorelbine in locally advanced non-small cell lung cancer: a randomized study. *Lung Cancer* 2004; 46:87-98.
- [9] Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *BMJ* 1995; 311:899-909.
- [10] Fossella FV, DeVore R, Kerr RN et al. Randomized phase III trial of docetaxel versus vinorelbine or ifosfamide in patients with advanced non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens. The TAX 320 Non-Small Cell Lung Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 2000; 18:2354-2362.
- [11] Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18:2095-2103.
- [12] Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22:1589-1597.
- [13] Arriagada R, Bergman B, Dunant A et al. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:351-360.
- [14] Douillard JY, Rosell R, De Lena M et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2006; 7:719-727.
- [15] Winton T, Livingston R, Johnson D et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 352:2589-2597.

- [16] Hochhaus A. First-Line management of CML: a state of the art review. *J Natl Compr Canc Netw* 2008; 6 Suppl 2:S1-S10.
- [17] Siddiqui MA, Scott LJ. Imatinib: a review of its use in the management of gastrointestinal stromal tumours. *Drugs* 2007; 67:805-820.
- [18] Marchetti A, Martella C, Felicioni L et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23:857-865.
- [19] Shigematsu H, Lin L, Takahashi T et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:339-346.
- [20] Finberg KE, Sequist LV, Joshi VA et al. Mucinous Differentiation Correlates with Absence of EGFR Mutation and Presence of KRAS Mutation in Lung Adenocarcinomas with Bronchioloalveolar Features. *J Mol Diagn* 2007; 9:320-326.
- [21] Miller VA, Zakowski M, Riely GJ et al. EGFR mutation and copy number, EGFR protein expression and KRAS mutation as predictors of outcome with erlotinib in bronchioalveolar cell carcinoma (BAC): Results of a prospective phase II trial. *J Clin Oncol* 2006; 24 (18S):364s.
- [22] Paez JG, Janne PA, Lee JC et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304:1497-1500.
- [23] Sordella R, Bell DW, Haber DA et al. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 2004; 305:1163-1167.
- [24] Helfrich BA, Raben D, Varella-Garcia M et al. Antitumor activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839, Iressa) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with gene copy number and EGFR mutations but not EGFR protein levels. *Clin Cancer Res* 2006; 12:7117-7125.

- [25] Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:4275-4283.
- [26] Soda M, Choi YL, Enomoto M et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; 448:561-566.
- [27] Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med* 2008; 359:1367-1380.
- [28] Dziadziuszko R, Jassem E, Jassem J. Clinical implications of molecular abnormalities in lung cancer. *Cancer Treat Rev* 1998; 24:317-330.
- [29] Jassem E, Niklinski J, Rosell R et al. Types and localisation of p53 gene mutations: a report on 332 non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2001; 34 Suppl 2:S47-S51.
- [30] Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA et al. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clin Lung Cancer* 2006; 8:30-38.
- [31] Jassem J, Jassem E, Jakobkiewicz-Banecka J et al. P53 and K-ras mutations are frequent events in microscopically negative surgical margins from patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004; 100:1951-1960.
- [32] Pratilas CA, Hanrahan AJ, Halilovic E et al. Genetic predictors of MEK dependence in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2008; 68:9375-9383.
- [33] Guo M, House MG, Hooker C et al. Promoter hypermethylation of resected bronchial margins: a field defect of changes? *Clin Cancer Res* 2004; 10:5131-5136.
- [34] Belinsky SA, Palmisano WA, Gilliland FD et al. Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Res* 2002; 62:2370-2377.
- [35] Belinsky SA, Liechty KC, Gentry FD et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res* 2006; 66:3338-3344.

- [36] Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:1118-1128.
- [37] Belinsky SA, Klinge DM, Stidley CA et al. Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Res* 2003; 63:7089-7093.
- [38] Keith RL, Miller YE, Gemmill RM et al. Angiogenic squamous dysplasia in bronchi of individuals at high risk for lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1616-1625.
- [39] Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006; 51:143-158.
- [40] Masuya D, Huang C, Liu D et al. The tumour-stromal interaction between intratumoral c-Met and stromal hepatocyte growth factor associated with tumour growth and prognosis in non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2004; 90:1555-1562.
- [41] Tsao MS, Yang Y, Marcus A et al. Hepatocyte growth factor is predominantly expressed by the carcinoma cells in non-small-cell lung cancer. *Hum Pathol* 2001; 32:57-65.
- [42] Sandler A, Gray R, Perry MC et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:2542-2550.
- [43] Hanrahan EO, Heymach JV. Vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors vandetanib (ZD6474) and AZD2171 in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13:s4617-s4622.
- [44] Dziadziuszko R, Hirsch FR. Advances in genomic and proteomic studies of non-small-cell lung cancer: clinical and translational research perspective. *Clin Lung Cancer* 2008; 9:78-84.
- [45] Cardoso F, van't Veer L, Rutgers E et al. Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial. *J Clin Oncol* 2008; 26:729-735.

- [46] Sparano JA, Paik S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 2008; 26:721-728.
- [47] Zujewski JA, Kamin L. Trial assessing individualized options for treatment for breast cancer: the TAILORx trial. *Future Oncol* 2008; 4:603-610.
- [48] Beer DG, Kardia SL, Huang CC et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002; 8:816-824.
- [49] Potti A, Mukherjee S, Petersen R et al. A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:570-580.
- [50] Raponi M, Zhang Y, Yu J et al. Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* 2006; 66:7466-7472.
- [51] Chen HY, Yu SL, Chen CH et al. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2007; 356:11-20.
- [52] Raz DJ, Ray MR, Kim JY et al. A multigene assay is prognostic of survival in patients with early-stage lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14:5565-5570.
- [53] Skrzypski M, Jassem E, Taron M et al. Three-gene expression signature predicts survival in early-stage squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* 2008; 14:4794-4799.
- [54] Markou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L et al. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin Chem* 2008; 54:1696-1704.
- [55] Yu SL, Chen HY, Chang GC et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell* 2008; 13:48-57.
- [56] Yanagisawa K, Tomida S, Shimada Y et al. A 25-signal proteomic signature and outcome for patients with resected non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:858-867.

- [57] Shedden K, Taylor JM, Enkemann SA et al. Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study. *Nat Med* 2008; 14:822-827.
- [58] Bell DW, Lynch TJ, Haserlat SM et al. Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials. *J Clin Oncol* 2005; 23:8081-8092.
- [59] Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 2005; 23:5900-5909.
- [60] Clark GM, Zborowski DM, Culbertson JL et al. Clinical utility of epidermal growth factor receptor expression for selecting patients with advanced non-small cell lung cancer for treatment with erlotinib. *J Thorac Oncol* 2006; 1:837-846.
- [61] Filipits M, Pirker R, Dunant A et al. Cell cycle regulators and outcome of adjuvant cisplatin-based chemotherapy in completely resected non-small-cell lung cancer: the International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program. *J Clin Oncol* 2007; 25:2735-2740.
- [62] Filipits M, Haddad V, Schmid K et al. Multidrug resistance proteins do not predict benefit of adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small cell lung cancer: International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program. *Clin Cancer Res* 2007; 13:3892-3898.
- [63] Olausson KA, Dunant A, Fouret P et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355:983-991.
- [64] Tsao MS, Aviel-Ronen S, Ding K et al. Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5240-5247.

- [65] Dziadziuszko R, Witta SE, Cappuzzo F et al. Epidermal growth factor receptor messenger RNA expression, gene dosage, and gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:3078-3084.
- [66] Dziadziuszko R, Holm B, Skov BG et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number and protein level are not associated with outcome of non-small-cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Ann Oncol* 2007; 18:447-452.
- [67] Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr. et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:5034-5042.
- [68] Hirsch FR, Dziadziuszko R, Thatcher N et al. Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry: comparison of antibodies and cutoff points to predict benefit from gefitinib in a phase 3 placebo-controlled study in advanced nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* 2008; 112:1114-1121.
- [69] Hirsch FR, Varella-Garcia M, Dziadziuszko R et al. Fluorescence in situ hybridization subgroup analysis of TRIBUTE, a phase III trial of erlotinib plus carboplatin and paclitaxel in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6317-6323.
- [70] Dziadziuszko R, Szostakiewicz B, Hirsch FR. Epidermal growth factor receptor targeted therapy - markers of sensitivity and response. Pandya KJ, Brahmer J, Hidalgo M, editors. *Lung Cancer - Translational and Emerging Therapies* Ed. I, str. 97-122. New York, Informa Healthcare, 2007.
- [71] Thatcher N, Chang A, Parikh P et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 2005; 366:1527-1537.
- [72] Dziadziuszko R, Holm B, Skov BG et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number and protein level are not associated with outcome of non-

small-cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Ann Oncol* 2006; 18:447-452.

- [73] Herbst RS, Prager D, Hermann R et al. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:5892-5899.
- [74] Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 2005; 353:133-144.
- [75] Zhu CQ, da Cunha SG, Ding K et al. Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol* 2008; 26:4268-4275.
- [76] Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol* 2007; 25:1545-1552.
- [77] Giaccone G, Herbst RS, Manegold C et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004; 22:777-784.
- [78] Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004; 22:785-794.
- [79] Davies AM, Ho C, Lara PN, Jr. et al. Pharmacodynamic separation of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and chemotherapy in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2006; 7:385-388.
- [80] Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L et al. SATURN: A double blind, randomized, phase III study of maintenance erlotinib versus placebo following non-progression with first-line platinum-based chemotherapy in patients with advanced NSCLC. *J Clin Oncol* 2009; 27:15s (suppl; abstr 8001).

- [81] Brugger W, Triller N, Blasinska-Morawiec M et al. Biomarker analyses from the phase III placebo-controlled SATURN study of maintenance erlotinib following first-line chemotherapy for advanced NSCLC . J Clin Oncol 2009; 27:15s (suppl; abstr 8020).
- [82] Cufer T, Vrdoljak E, Gaafar R et al. Phase II, open-label, randomized study (SIGN) of single-agent gefitinib (IRESSA) or docetaxel as second-line therapy in patients with advanced (stage IIIb or IV) non-small-cell lung cancer. Anti-cancer Drugs 2006; 17:401-409.
- [83] Kim ES, Hirsh V, Mok T et al. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. Lancet 2008; 372:1809-1818.
- [84] Niho S, Ichinose Y, Tamura T et al. Results of a randomized phase III study to compare the overall survival of gefitinib (IRESSA) versus docetaxel in Japanese patients with non-small-cell lung cancer who failed one or two chemotherapy regimens. J Clin Oncol, ASCO Annual Meeting Proceedings Part I Vol 25, No 18S (June 20 Supplement), 2007: 387s (LBA7509).
- [85] Mok T, et al. Phase III, randomised, open-label, first-line study of gefitinib vs carboplatin/paclitaxel (C/P) in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer . Paper presented at the 33rd European Society of Medical Oncology meeting, Stockholm, abstr. LBA2, 2008.
- [86] Asahina H, Yamazaki K, Kinoshita I et al. A phase II study of gefitinib as a first-line therapy for advanced non-small cell lung cancers with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations. J Clin Oncol 2006; 24:603s.
- [87] Inoue A, Suzuki T, Fukuhara T et al. Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. J Clin Oncol 2006; 24:3340-3346.
- [88] Paz-Ares M, Sanchez JM, Garcia-Velasco A et al. A prospective phase II trial of erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with

mutations in the tyrosine kinase (TK) domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). *J Clin Oncol* 2006; 24(18S):369s.

- [89] Sequist LV, Martins RG, Spigel D et al. iTARGET: A phase II trial to assess the response to gefitinib in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC) tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007; 25 (Suppl. 18S): 7504.
- [90] Kelly K. The role of targeted agents in adjuvant therapy for non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:5027s-5029s.
- [91] Janjigian B, Park BJ, Kris MG et al. Impact on disease-free survival of adjuvant erlotinib or gefitinib in patients with resected lung adenocarcinomas that harbor epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations. *J Clin Oncol* 27: 2009 (suppl; abstr 7523).
- [92] Dziadziuszko R, Camidge DR, Hirsch FR. The insulin-like growth factor pathway in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008; 3:815-818.
- [93] Morgillo F, Woo JK, Kim ES et al. Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res* 2006; 66:10100-10111.
- [94] Morgillo F, Kim WY, Kim ES et al. Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2795-2803.
- [95] Dziadziuszko R, Merrick DT, Witta SE et al. Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) protein expression, mRNA expression and gene copy number in operable non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 27: 2009 (suppl; abstr 7524).
- [96] Wynes M, Singh S, Dziadziuszko R et al. Analysis of IGF1R gene copy number by silver in situ hybridization (SISH) in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 27: 2009 (suppl; abstr 7525).

8. PRACE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY

- A. Dziadziuszko R, Szostakiewicz B, Hirsch FR. Epidermal growth factor receptor targeted therapy - markers of sensitivity and response. Podręcznik pod redakcją Pandya KJ, Brahmer J, Hidalgo M. "Lung Cancer - Translational and Emerging Therapies", wyd. 1; 2007: 97-122. New York, Informa Healthcare
- B. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Franklin WA, Dziadziuszko R, Thatcher N, Chang A, Parikh P, Pereira JR, Ciuleanu T, von Pawel J, Watkins C, Flannery A, Ellison G, Donald E, Knight L, Parums D, Botwood N, Holloway B. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2006; 24: 5034-5042
- C. Dziadziuszko R, Holm B, Skov BG, K, Sellers M, Franklin W, Bunn P, Jr., Varella-Garcia M, Hirsch FR. Epidermal growth factor receptor gene copy number and protein level are not associated with outcome of non-small-cell lung cancer patients treated with chemotherapy. Ann Oncol 2007; 18: 447-452
- D. Dziadziuszko R, Witta SE, Cappuzzo F, Park S, Tanaka K, Danenberg PV, Baron AE, Crino L, Franklin WA, Bunn PA, Jr., Varella-Garcia M, Danenberg KD, Hirsch FR. Epidermal growth factor receptor messenger RNA expression, gene dosage, and gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2006; 12: 3078-3084
- E. Hirsch FR, Dziadziuszko R, Thatcher N Mann H, Watkins C, Parums DV, Speake G, Holloway B, Bunn PA Jr, Franklin WA. Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry: comparison of antibodies and cutoff points to predict benefit from gefitinib in a phase 3 placebo-controlled study in advanced nonsmall-cell lung cancer. Cancer 2008; 112: 1114-1121
- F. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Dziadziuszko R, Xiao Y, Gajapathy S, Skokan M, Lin M, O'Neill V, Bunn PA. Fluorescence in situ hybridization subgroup analysis of TRIBUTE, a phase III trial of erlotinib plus carboplatin and paclitaxel in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2008; 14: 6317-6323