

# Méně časté mutace *EGFR* v kontextu léčby nemalobuněčného karcinomu plic

## Uncommon *EGFR* Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Impact on the Treatment

Bílek O.<sup>1,2</sup>, Holánek M.<sup>1</sup>, Berkovcová J.<sup>3</sup>, Horký O.<sup>3</sup>, Kazda T.<sup>4</sup>, Čoupková H.<sup>1</sup>, Špelda S.<sup>1</sup>, Kristková L.<sup>1</sup>, Zvaríková M.<sup>1</sup>, Podhorec J.<sup>1,2</sup>, Bořilová S.<sup>1</sup>, Bohovicová L.<sup>1</sup>, Zdražilová Dubská L.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Klinika komplexní onkologické péče, LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup>Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>3</sup>Oddělení onkologické patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>4</sup>Klinika radiační onkologie, LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Mutace genu pro receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor – EGFR) hrají důležitou roli v patogenezi nemalobuněčného karcinomu plic. Protože se jedná o alterace často ovlivnitelné cílenou léčbou, představuje jejich detekce součást běžné klinické praxe. U pacientů s aktivačními mutacemi *EGFR* bylo dosaženo výrazného zlepšení léčebných výsledků pomocí cílené léčby tyrozinkinázovými inhibitory. Diagnostickým standardem mutací *EGFR* jsou v současné době metody založené na polymerázové řetězové reakci, zejména kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase. V posledních letech roste význam sekvenování nové generace. *EGFR* obsahuje čtyři domény: extracelulární s vazebným místem ligandu, transmembránovou doménu, cytoplazmatickou tyrozinkinázovou katalytickou doménu a C-terminální doménu. Klíčové struktury tyrozinkinázové domény zodpovědné za aktivaci a přenos signálu jsou kódovány v rámci exonů 18–21 na 7. chromozomu. Mutace *EGFR* jsou vysoce heterogenní. Asi 90 % mutací *EGFR* tvoří delece exonu 19 a bodová mutace L858R v exonu 21. Jsou označovány za „klasické“ mutace. Přibližně 10% podíl z celkového počtu mutací připadá na méně časté alterace genu pro *EGFR*. Vzhledem k nízké incidenci nemalobuněčného karcinomu plic s méně častými mutacemi je stále třeba nových informací o jejich prediktivním významu. Většinu dosavadních dat o méně častých mutacích tvoří retrospektivní analýzy a hodnocení menších souborů. **Cíl:** Cílem tohoto přehledového článku je shrnout možnosti diagnostiky a léčby nemalobuněčného karcinomu plic s méně častými mutacemi *EGFR*.

### Klíčová slova

nemalobuněčný karcinom plic – receptor pro epidermální růstový faktor – tyrozinkinázové inhibitory – cílená léčba – mutace *EGFR*

Práce byla podpořena MŠMT – NPU I – LO1413 a MZ ČR – RVO (MOU, 00209805).

This work was supported by the MEYS – NPS I – LO1413 and MH CR – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. RNDr. Lenka Zdražilová-Dubská, Ph.D.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53  
e-mail: dubska@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 2. 6. 2019

Přijato/Accepted: 26. 8. 2019

doi: 10.14735/amko2019356

## Summary

**Background:** Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations play an important role in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. Because these alterations are so-called targetable mutations, their identification is important in daily clinical practice. The diagnostic standard of *EGFR* mutations is currently based on polymerase chain reaction methods, particularly the quantitative real-time polymerase chain reaction. In recent years, new generation sequencing has become increasingly important. In patients with *EGFR* mutations, a significant improvement in therapeutic outcomes was achieved with the administration of targeted therapy using tyrosine kinase inhibitors. EGFR is composed of four domains: extracellular with a ligand binding site, a transmembrane domain, a cytoplasmic tyrosine kinase catalytic domain, and a C-terminal domain. The key structures of the tyrosine kinase domain responsible for signal activation and transmission are encoded within exons 18–21 on chromosome 7. *EGFR* mutations are highly heterogeneous. About 90% of *EGFR* mutations are deletions of exon 19 and point mutation L858R in exon 21. These are referred to as 'classic' mutations. Approximately 10% of the total number of *EGFR* mutations is attributable to less frequent alterations in the *EGFR* gene. Due to the low incidence of non-small cell lung cancer with less frequent *EGFR* mutations, information on their predictive significance is still incomplete. Most of the data for the treatment of cases with uncommon mutations were gathered from retrospective analyses and evaluations of small cohorts. **Purpose:** The aim of this review is to summarise the current options for diagnosing and treating non-small cell lung cancer patients with uncommon *EGFR* mutations.

## Key words

non-small cell lung cancer – epidermal growth factor receptor – tyrosine kinase inhibitors – molecular targeted therapy – *EGFR* mutations

## Úvod

Incidence bronhogenního karcinomu v ČR je 49,2/100 000 žen a 82,6/100 000 mužů. Nemalobuněčný karcinom plic (non-small cell lung cancer – NSCLC) tvoří převážnou většinu (85 %) těchto závažných plicních malignit [1]. Nejvýznamnějším rizikovým faktorem je kouření. Endogenní rizikové faktory jsou méně časté [2]. Významný onkogenní potenciál mají specifické řídicí genové mutace (driver mutations – mutace přímo poskytující buňce selektivní růstovou výhodu), které dělí NSCLC na molekulárně definované podjednotky a svědčí o vysoké heterogenitě onemocnění. S tím souvisí dramatický rozvoj možností systémové léčby v posledním desetiletí, protože se často jedná o alterace ovlivnitelné cílenou léčbou (targetable mutations). U pacientů s aktivními mutacemi genu pro receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor – EGFR) nebo přestavbou *ALK* či *ROS1* bylo dosaženo výrazného zlepšení léčebných výsledků [3,4]. Mezi další terapeutické cíle patří B-RAF, c-met, RET a další [5–7]. Základní přínos znamenalo zařazení imuniterapie do léčby NSCLC, zejména inhibitory PD-1 a PD-L1 [8].

V roce 2003 byly publikovány první práce popisující léčebný efekt inhibice EGFR tyrozinkinázovými inhibitory (TKI) [9,10]. Význam mutací *EGFR* jako prediktoru dobré odpovědi na léčbu TKI byl popsán Lynchem et al a Paezem et al

v roce 2004 [11,12]. Studie fáze III Iressa Pan-Asia Study publikovaná v roce 2009 prokázala mimořádný klinický benefit gefitinibu (léčebná odpověď (response rate – RR) 72,1 vs. 1,1 %) u pacientů s mutací *EGFR* [13]. Následně studie EURTAC přinesla podobné léčebné výsledky u erlotinibu [14]. Četnost mutací *EGFR* u adenokarcinomů je v kavkazské populaci udávána 10–15 %, u asijských pacientů až 50 %. Častější výskyt je u žen a nekuřáků. Asi 90 % mutací *EGFR* tvoří delece exonu 19 (del19) a bodová mutace L858R v exonu 21. Jsou označovány jako „klasické“ mutace [15,16].

Pacienti s *EGFR* mutovaným NSCLC v klinickém stadiu IIIB, IV jsou standardně léčeni TKI 1. generace (gefitinib, erlotinib) či 2. generace (afatinib). Klinické studie fáze III prokázaly zlepšení doby dogrese (progression-free survival – PFS) a objektivní odpovědi na léčbu (overall response rate – ORR) [17–24]. V souhrnné analýze studií Lux-Lung 3 a Lux-Lung 6 bylo navíc prokázáno prodloužení celkového přežití (overall survival – OS) pacientů s del19 léčených afatinibem [25]. Léčba je nicméně komplikována rozvojem sekundární rezistence k léčbě TKI 1. a 2. generace, která je ve více než 50 % případů spojena s výskytem bodové mutace T790M v exonu 20. Rezistenci mutace T790M překonává TKI 3. generace osimertinib [26,27]. Přibývají informace osvětlující další mechanismy poskytující nové léčebné cíle, zejména rezistentní mutace C797S v exonu 20,

dále mutace *PI3KCA*, *KRAS*, *BRAF* amplifikace *MET*, fúze *RET* či *FGFR* [28]. Další příčinou rezistence se ukazují být epigenetické změny. Podle preklinických studií vykazovaly buněčné linie s hypermetylací promotoru *EGFR* nižší citlivost ke gefitinibu. Tato oblast zůstává předmětem výzkumu [29].

Mutace *EGFR* jsou vysoce heterogenní. Vzhledem k nízké incidenci NSCLC s méně častými mutacemi je stále třeba nových informací o jejich prediktivním významu. Klinické studie zpravidla randomizovaly či primárně hodnotily pouze pacienty s klasickými mutacemi. Většinu dosavadních dat o méně častých mutacích tedy tvoří retrospektivní analýzy a hodnocení malých souborů. Pouze čtyři velké prospektivní studie zahrnovaly i pacienty s primárně diagnostikovanými méně častými mutacemi definovanými jako všechny mutace s výjimkou del19 a L858R. V těchto studiích představovaly přibližně 10% podíl z celkového počtu mutací *EGFR* [17,18,23,24]. Cílem tohoto přehledového článku je shrnout možnosti diagnostiky a léčby NSCLC pacientů s méně častými mutacemi *EGFR*.

## Aktivace EGFR a mechanismus účinku TKI

Receptor pro epidermální růstový faktor obsahuje čtyři domény: extracelulární s vazebným místem ligandu, transmembránovou doménu (alpha helix), cytoplazmatickou tyrozinkinázovou (TK)

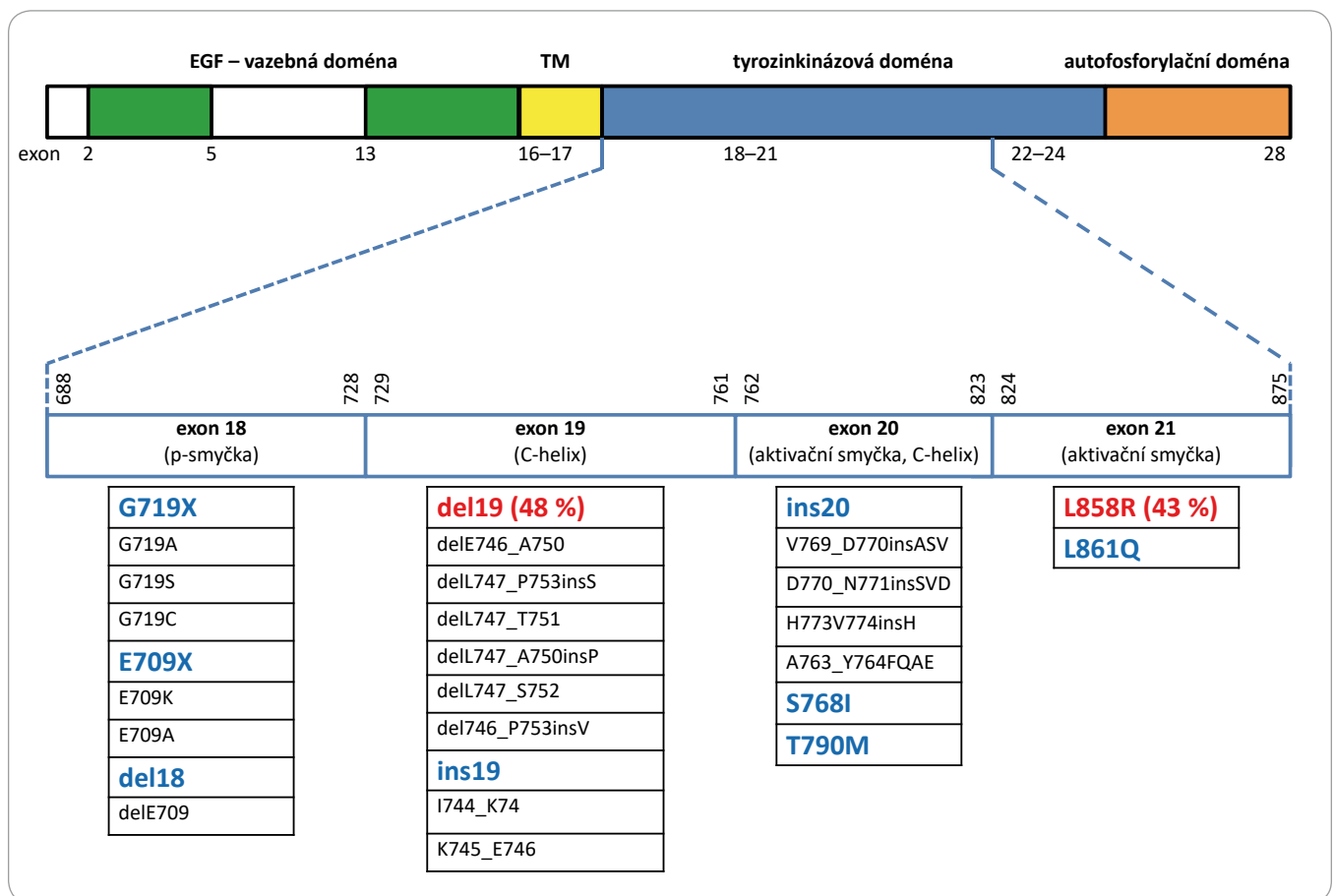


Schéma 1. Schéma shrnující nejčastěji detekované mutace genu EGFR u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. Červeně jsou vyznačeny „klasické“ mutace.

TM – transmembránová doména

katalytickou doménu a C-terminální doménu zodpovědnou za další přenos signálu [30]. Kinázová aktivita je regulována konformací katalytické domény. Aktivovaná kináza je schopna transportovat fosfát z ATP na peptidový substrát C-terminálního konce a umožnit tak přenos signálu. Za vytvoření či zrušení těchto podmínek jsou zodpovědné klíčové struktury TK domény, jako je aktivační smyčka (activation loop) či C-helix. V případě aktivované kinázové domény je aktivační smyčka extendována z vazebné štěrbiny ATP (cleft) a umožní navázání peptidového substrátu, zatímco katalytické glutamátové reziduum C-helixu zformuje iontovou interakci s lizinovými rezidui, která koordinují  $\alpha$  a  $\beta$  fosfáty ATP. V inaktivní formě aktivační smyčka dramaticky mění svou konformaci, aby zabránila navázání peptidového substrátu, zatímco C-helix je odtažen glutamátovými

vými rezidui [31]. Navázání ligandu epidermálního růstového faktoru (EGF) umožní vznik asymetrické dimerizace dvou kináz. Následná autofosforylace tyrozinových zbytků v intracelulárním konci EGFR iniciuje tvorbu proteinových komplexů zodpovědných za transdukcii signálu prostřednictvím signálních drah, zejména RAS/MAPK a PI3K/AKT, a dalších. Výsledkem je ovlivnění exprese genů podporujících buněčnou proliferaci, přežití a migraci [32]. V případě mutované kinázy se dimerizace jako primární mechanismus aktivace nejeví. Je upřednostněn trvale aktivní stav domény, což vede ke zvýšené aktivitě receptoru a zvýšení onkogenního rizika.

Klíčové struktury TK domény zodpovědné za aktivaci a přenos signálu jsou kódovány v rámci exonů 18–21 na 7. chromozomu. Mutace detekované v těchto exonech představují 98 % mu-

tací v EGFR a mohou vést k aktivaci TK domény bez přítomnosti ligandu [16]. Vyskytují se ve formě: a) krátkých delecí, zejména v rámci exonu 19; b) bodových substitucí nukleotidů; c) inzercí, popř. duplikací [33]. Je možný komplexní výskyt více než jedné mutace v různých exonech [34]. V posledních letech byly rovněž popsány případy chromozomálních aberací ve smyslu duplikací či fúzních translokací, které se ukazují být využitelné jako terapeutické cíle [35,36].

Klasické mutace EGFR (del19 a L858R) snižují afinitu kinázy k ATP, čímž je zajištěna vyšší afinita k TKI [37]. TKI 1. generace, gefitinib a erlotinib, se reverzibilně vážou na vazebné místo ATP a blokují fosforylacii mutované i nemutované kinázy [38]. Vyšší afinita TKI k mutované kináze je příčinou vysoké léčebné odpovědi. TKI 2. generace afatinib se ireverzibilně váže na vazebné místo ATP

receptoru *EGFR*, Her-2 a Her-4 [39]. Přibližně v 50 % případů dochází k rozvoji sekundární mutace T790M, která obnovuje preferenční afinitu kinázy k ATP, což je příčinou nižší účinnosti a rezistence TKI 1. generace [40]. Afatinib v preklinických modelech vykazoval jistou míru účinku i za přítomnosti T790M, bylo však zapotřebí vysokých dávek, kterých nelze z ohledem na související toxicitu v klinické praxi dosáhnout [41]. Osimertinib, ireverzibilní inhibitor *EGFR*, Her-2 a Her-4, strukturálně překonává rezistenci T790M a obnovuje afinitu k vazebné štěrbině ATP ve srovnání s nemutovaným *EGFR* [42]. Další molekuly TKI 3. generace jsou ve fázi klinického zkoušení [43]. Schéma 1 znázorňuje přehled mutací exonu 18–21 genu *EGFR*.

### Diagnostika mutací *EGFR*

Detekce mutace *EGFR*, přestavby genu *ALK*, *ROS1*, exprese PD-L1 jsou součástí standardní diagnostiky NSCLC. Mutaci *EGFR* lze diagnostikovat z formalínem fixované, parafinizované tkáně nebo z cytologických preparátů, popř. izolací volné cirkulující DNA (cfDNA) z periferní krve [44].

V minulosti se využívalo Sangerovo sekvenování exonů 18–21, metoda je vysoce specifická, s možností záchytu nových mutací, je však limitována nízkou senzitivitou s potřebou minimálně 20% zastoupení mutovaných nádorových buněk v analyzovaném vzorku [45]. Neprovádí se ani imunohistochemické testování specifickými protilátkami kvůli nižší detekční výkonnosti ve srovnání s jinými metodami [46].

V současné době jsou standardem metody založené na polymerázové řetězové reakci (polymerase chain reaction – PCR), zejména kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) vyznačující se výrazně vyšší senzitivitou, řádově je nutné pouze 1% zastoupení mutované alely ve vzorku [44]. Jsou však detekovány pouze mutace, pro které byl navržen příslušný test. V Masarykově onkologickém ústavu je využíván diagnostický kit cobas® *EGFR* Mutation Test v2 (Roche, Basilej, Švýcarsko). Test detekuje bodové mutace G719X v exonu 18, del19, inserce v exonu 20 (ins20), bodové mutace S768I a T790M v exonu 20 a bodové

mutace L858R a L861Q v exonu 21. Průměrnou mezí detekce metody jsou 4 % nádorových buněk s mutací *EGFR*. Není-li k dispozici histologický materiál, je možné stanovení z tekuté biopsie (liquid biopsy) izolací extrabuněčné nádorové DNA (cfDNA) z odběru krve [47]. Mutační analýza cfDNA může být provedena rovněž pomocí qPCR, vhodnější je však použití tzv. digitální PCR. Digitální PCR umožňuje absolutní kvantifikaci, protože porovnává skutečné množství templátové DNA, jejíž každá molekula je v jedné kapénce, ve které probíhá samostatná PCR reakce. Metoda je minimálně o řád senzitivnější než qPCR a umožňuje rovněž kvantifikaci amplifikovatelné DNA [48]. Nejčastějším využitím mutační analýzy z tekutých biopsií je detekce rezistentní mutace T790M ve vzorku. To, jestli detekujeme i původní aktivační mutaci, zároveň slouží jako vnitřní kontrola reprezentativnosti získaného vzorku.

V posledních letech roste význam sekvenování nové generace, které je využitelné k detekci bodových mutací, amplifikací i chromozomálních přestavb v rámci celého genomu [49]. Citlivost detekce frekvencí mutovaných alel dosahuje až 0,1 % v závislosti na hloubce sekvenace [50].

### Léčba NSCLC s méně častou mutací *EGFR*

#### Inserce exonu 20

Ins20 představují největší podíl méně častých mutací. Vyskytují se pouze u 1,5–2,5 % všech NSCLC, ale představují přibližně 10 % (1–17 %) pacientů s mutací *EGFR*. Podobně jako u klasických mutací jsou ins20 diagnostikovány zejména u žen, nekuřáků a asijské populace. Nejčastěji detekované mutace zahrnují D770\_N771insNPG, V769\_D770insASV, D770\_N771insSVD, H773\_V774insH a další [51].

Ins20 strukturálně ovlivňují aktivační smyčku (activation loop) a navazující C-terminální konec C-helixu. Výsledkem inserce je nejčastěji fixace C-helixu „klínem“, kterým je zabráněno vytvoření zevní deaktivující konformace kinázy a je trvale upřednostněn aktivovaný stav. Na rozdíl od klasických mutací však zpravidla nedochází ke snížení afi-

nity k ATP, vazebná afinita k TKI je tedy v těchto případech podobná nemutovanému *EGFR* a výsledkem je primární rezistence k současně používaným TKI [37].

Je k dispozici řada retrospektivních studií hodnotících menší soubory pacientů léčených TKI 1. a 2. generace [52–54]. Jediná prospektivní data vyplývají z post hoc analýzy studií Lux-Lung 2, Lux-Lung 3 a Lux-Lung 6, která ukázala, že u 23 pacientů s ins20 genu *EGFR* byla ORR na afatinib pouze 8,7 %, medián času do progresu (mPFS) 2,7 měsíce a medián celkového přežití (mOS) 9,2 měsíce. U těchto pacientů byly zaznamenány lepší výsledky léčby chemoterapií [55]. Vyšší míra odpovědi na chemoterapii byla pozorována také v dalších retrospektivních studiích [56].

Podobně jako del19 jsou také ins20 vysoce heterogenní. Ukázalo se, že proximální lokalizace inserce může ovlivnit vazebnou kinetiku léčiva a ATP. Yasuda et al studovali strukturu široké skupiny inserčních mutací exonu 20 a *in vitro* citlivost k TKI 1. generace. Naprostá většina ins20 vykazovala rezistenci k TKI. Výjimku tvořila proximální inserce A763\_Y764insFQEA, která vykazovala vysokou citlivost k erlotinibu. Tato inserce strukturálně posouvá C-helix v N koncovém směru. Zdá se, že ins20 mezi kodony 769–775 neindukují tvorbu klínu na C-terminálním konci C-helixu a není zvýšena vazebná afinita ATP. Předpokládá se, že proximální inserce vedou k podobným strukturálním změnám ve vazebné štěrbině ATP jako v případě klasické mutace L858R [53].

Prediktivní význam dobré léčebné odpovědi inserce A763\_Y764insFQEA byl opakovaně popsán v klinické praxi. Klughmmera et al popsali částečnou regresi onemocnění ve druhé linii léčby erlotinibem trvající 17,5 měsíce a OS 24 měsíců [57]. Dále byl zaznamenán léčebný efekt v případě inserce V769\_D770insASV (PFS 19,8 měsíce, OS 24 měsíců) a N771delinsKPP (PFS 8 měsíců a OS 10 měsíců) [52,56]. Jsou k dispozici i data léčby NSCLC s ins20 osimertinibem, van Veggel et al prezentovali retrospektivní analýzu 18 pacientů, ORR 5,6 %, mPFS 3,6 měsíce [58]. Jsou zkoušeny nové molekuly cílící na překonání rezistence ins20. Příkladem je inhibitor

HSP90 (heat shock protein 90) luminespib, který v rámci studie fáze II u méně předléčených pacientů dosáhl ORR 21 % a mPFS 5,1 měsíce [59]. Nejen u NSCLC přináší slibné výsledky *EGFR*-TKI 3. generace poziotinib, probíhá studie fáze II (NCT03066206).

#### Bodové mutace exonu 20

Další mutací je S768I, tvoří cca 1 % mutací *EGFR*. Často se objevuje v kombinaci s jinou mutací, zejména L858R a G719X [51]. V retrospektivních studiích s TKI 1. generace byla zaznamenána částečná odpověď s ORR 20–33 % v případě samostatného výskytu S768I, výrazně lepší výsledky byly u komplexních mutací. Chen et al uvádějí mPFS 2,7 měsíce [60,61]. V post hoc analýze Lux-Lung 2, Lux-Lung 3 a Lux-Lung 6 byla zaznamenána 100% odpověď na léčbu afatinibem, PFS 14,7 měsíce, avšak u 7 z 8 pacientů byla zachycena komplexní mutace s L858R a G719X [55]. Jsou k dispozici i data s osimertinibem, ve studii fáze II byla u 8 pacientů s S768I zaznamenána ORR 37,5 %, ve 2 případech se jednalo o kombinovanou mutaci [62].

Bodová mutace T790M je cca v 50 % případů příčinou sekundární rezistence po léčbě TKI 1. a 2. generace. Primární výskyt se odhaduje na 1 % mutací *EGFR*. V analýze studií Lux-Lung u pacientů léčených afatinibem bylo dosaženo ORR 14,3 %, mPFS 2,9 měsíce a mOS 9,2 měsíce [55]. V současné době je v případě primární či sekundární detekce T790M indikována léčba TKI 3. generace osimertinibem, ORR ve 2. linii léčby 71 %, v 1. linii 80 % [26,27].

Byla popsána řada dalších velmi vzácných mutací exonu 20. U některých byly zaznamenány odpovědi na TKI, např. V765A, V774A či T783A, PFS však byl krátký [63].

#### Bodové mutace exonu 18

Mutace exonu 18 představují 3–4 % mutací *EGFR* [51]. Strukturálně ovlivňují p-smyčku TK domény (p-loop) [37]. Nejčastěji se jedná o Gly719X, záměnu glycinu za serin, alanin nebo cystein. Většina informací o výskytu pochází z malých retrospektivních studií a kazuistik [52,64,65]. Častý je výskyt v rámci komplexní mutace. Chiu et al publiko-

vali soubor 76 pacientů s G719X léčených TKI 1. generace, bylo dosaženo ORR 36,8 % a mPFS 6,3 měsíce. Výrazně lepších výsledků bylo dosaženo u kombinovaných mutací, zejména G719X + S768I (ORR 50 %) a G719X + L819Q (ORR 89 %) [66]. Analýza studií Lux-Lung prokázala výrazný benefit afatinibu s ORR mPFS 13,8 měsíce a mOS 26 měsíců, avšak více než polovina pacientů měla komplexní mutaci [55]. V rámci retrospektivní jednoramenné studie bylo hodnoceno 19 pacientů léčených osimertinibem, ORR 52,6 %, 6měsíční PFS 72,4 %, ve 4 případech se jednalo o komplexní mutaci s del19 nebo L858R [62].

Další velmi vzácnou bodovou mutací exonu 18 je E709X. Wu et al publikovali soubor 18 pacientů léčených TKI 1. generace, ORR 50 %, mPFS 6,2 měsíce. U většiny pacientů byla zachycena komplexní mutace, u těchto byla zaznamenána dobrá léčebná odpověď. U 5 pacientů se samostatnou mutací E709 léčebná odpověď nebyla [67]. Byl zaznamenán dobrý efekt léčby afatinibem s mediánem doby do selhání léčby delším než 12 měsíců, jednalo se však pouze o 4 pacienty s komplexní mutací L858R nebo G719A [68].

#### Mutace L861Q v exonu 21

Předpokládá se, že bodová mutace L861Q na exonu 21 představuje 2 % mutací *EGFR* [51]. Podobně jako L858R kóduje oblast aktivační klíčky kinázy (activation loop) [31]. Mírou léčebného efektu se L861Q blíží klasickým mutacím. Chiu et al publikovali skupinu 54 pacientů léčených 1. generací TKI, bylo dosaženo ORR 40 % a PFS 8,1 měsíce [66]. Afatinib v analýze studií Lux-Lung dosáhl ORR 54 %, mPFS 8,2 měsíce, čtvrtina pacientů měla komplexní mutaci. Ahn et al prezentovali 9 pacientů léčených osimertinibem, ORR 77,8 %, 6měsíční PFS dosahovalo 74,1 měsíce, ve 2 případech se jednalo o komplexní mutaci s G519A v exonu 18 [62].

#### Komplexní mutace

Komplexní mutace tvoří až 14 % diagnostikovaných mutací *EGFR* [69]. Mutace mohou být v rámci tumoru zastoupeny heterogenně, proto se předpokládá význam dostatečného množství diagnostického materiálu [70]. Nej-

lepších léčebných výsledků bylo podle očekávání dosaženo v případě souběžného výskytu s klasickými mutacemi [34,64,71–73]. Wu et al popsali soubor 32 pacientů s komplexními mutacemi léčených TKI 1. generace. V této studii bylo dosaženo ORR 56 %, mPFS 3,5 měsíce a mOS 8,5 měsíce, lepší výsledky byly zaznamenány u pacientů s klasickou mutací [64]. Přínos léčby afatinibem hodnotila post hoc analýza studií Lux-Lung, nebyl zaznamenán rozdíl v léčebné odpovědi komplexních a jednotlivých mutací. Bylo dosaženo ORR 100 % a mPFS 14,7 měsíce, ale ve většině případů byla diagnostikována kombinace s klasickou mutací [55]. V případě kombinace T790M s citlivou mutací může být dosaženo léčebného efektu TKI 1. a 2. generace [55]. V současné době je však u těchto pacientů indikována léčba 3. generace TKI osimertinibem [27].

#### Závěr

Léčba TKI přináší výrazné zlepšení léčebných výsledků a kvality života u většiny pacientů s mutací *EGFR*. Je stále třeba nových dat týkajících se diagnostiky a léčby vzácných mutací. Mnohé z nich vykazují dobrou citlivost k léčbě TKI 1. a 2. generace, TKI 3. generace zatím mají pouze omezená data. Zejména mutace G719X, S768I a L861Q vykazovaly velmi dobrou citlivost k léčbě afatinibem. Naopak ins20 vykazuje v naprosté většině případů primární rezistenci k TKI, výjimkou se zdají být některé proximální inzerce, u nichž byl byla léčba TKI přínosná. Řada mutací je detekována velmi vzácně a léčebná odpověď byla publikována pouze na úrovni kazuistik. Zdokonaluje se diagnostika mutací, vedle standardní qPCR roste význam sekvenování nové generace, které se stává komerčně dostupné a umožňuje výrazně hlubší detekci využitelnou např. v rámci specifikace ins20. Mezi standardní detekční metody patří „tekutá biopsie“, zavedení digitální PCR výrazně zlepšuje její senzitivitu. Pokračují snahy o překonání primární a sekundární rezistence.

#### Literatura

1. Dušek L, Mužík J, Kubásek M et al. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. [online]. Dostupné z: <http://www.svod.cz>.

2. Molina JR, Yang P, Cassivi SD et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(5): 584–594. doi: 10.4065/83.5.584.
3. Rosas G, Ruiz R, Araujo JM et al. ALK rearrangements: biology, detection and opportunities of therapy in non-small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2019; 136: 48–55. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.02.006.
4. Shaw AT, Riely GJ, Bang YJ et al. Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. *Ann Oncol* 2019; 131. doi: 10.1093/annonc/mdz131.
5. Planchard D, Smit EF, Groen HJ et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRA-FV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18(10): 1307–1316. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30679-4.
6. Wang W, Wang H, Lu P et al. Crizotinib with or without an EGFR-TKI in treating EGFR-mutant NSCLC patients with acquired MET amplification after failure of EGFR-TKI therapy: a multicenter retrospective study. *J Transl Med* 2019; 17(1): 52. doi: 10.1186/s12967-019-1803-9.
7. Bronte G, Ulivi P, Verlicchi A et al. Targeting RET-rearranged non-small-cell lung cancer: future prospects. *Lung Cancer (Auckl)* 2019; 10: 27–36. doi: 10.2147/LCTT.S192830.
8. Bilek O, Bohovicová L, Demlová R et al. Non-small cell lung cancer – from immunobiology to immunotherapy. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 4): 78–87. doi: 10.14735/amko20164578.
9. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol* 2003; 21(12): 2237–2246. doi: 10.1200/JCO.2003.10.038.
10. Kris MG, Natale RB, Herbst RS et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 2003; 290(16): 2149–2158. doi: 10.1001/jama.290.16.2149.
11. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350(21): 2129–2139. doi: 10.1056/NEJMoa040938.
12. Paez JG, Jänne PA, Lee JC et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304(5676): 1497–1500. doi: 10.1126/science.1099314.
13. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361(10): 947–957. doi: 10.1056/NEJMoa0810699.
14. Rosell R, Carcereny E, Gervais R et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(3): 239–246. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70393-X.
15. Fiala O, Pešek M, Fínek J et al. EGFR mutations in patients with advanced NSCLC. *Klin Onkol* 2012; 25(4): 267–273. doi: 10.14735/amko2012267.
16. Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci* 2007; 98(12): 1817–1824. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00607.x.
17. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361(10): 947–957. doi: 10.1056/NEJMoa0810699.
18. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010; 362(25): 2380–2388. doi: 10.1056/NEJMoa0909530.
19. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(2): 121–128. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70364-X.
20. Rosell R, Carcereny E, Gervais R et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(3): 239–246. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70393-X.
21. Zhou C, Wu YL, Chen G et al. Final overall survival results from a randomised, phase III study of erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment of EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802). *Ann Oncol* 2015; 26(9): 1877–1883. doi: 10.1093/annonc/mdv276.
22. Wu YL, Zhou C, Liang CK et al. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Ann Oncol* 2015; 26(9): 1883–1889. doi: 10.1093/annonc/mdv270.
23. Wu YL, Zhou C, Hu CP et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15(2): 213–222. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70604-1.
24. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* 2013; 31(27): 3327–3334. doi: 10.1200/JCO.2012.44.2806.
25. Yang JC, Wu YL, Schuler M et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol* 2015; 16(2): 141–151. doi: 10.1016/S1470-2045(14)71173-8.
26. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2017; 376(7): 629–640. doi: 10.1056/NEJMoa1612674.
27. Soría JC, Ohe Y, Vansteenkiste J et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018; 378(2): 113–125. doi: 10.1056/NEJMoa1713137.
28. Oxnard GR, Hu Y, Mileham KF et al. Assessment of resistance mechanisms and clinical implications in patients with EGFR T790M-positive lung cancer and acquired resistance to osimertinib. *JAMA Oncol* 2018; 4(11): 1527–1534. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.2969.
29. Li XY, Wu JZ, Cao HX et al. Blockade of DNA methylation enhances the therapeutic effect of gefitinib in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 2013; 29(5): 1975–1982. doi: 10.3892/or.2013.2298.
30. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31(6): 637–643. doi: 10.1016/S1357-2725(99)00015-1.
31. Kumar A, Petri ET, Halmos B et al. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(10): 1742–1751. doi: 10.1200/JCO.2007.12.1178.
32. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12(18): 5268–5272. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1554.
33. Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer* 2006; 118(2): 257–262. doi: 10.1002/ijc.21496.
34. Hata A, Yoshioka H, Fujita S et al. Complex mutations in the epidermal growth factor receptor gene in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010; 5(10): 1524–1528. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181e8b3c5.
35. Gallant JN, Sheehan JH, Shaver TM et al. EGFR kinase domain duplication (EGFR-KDD) is a novel oncogenic driver in lung cancer that is clinically responsive to afatinib. *Cancer Discov* 2015; 5(11): 1155–1163. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0654.
36. Konduri K, Gallant JN, Chae YK et al. EGFR fusions as novel therapeutic targets in lung cancer. *Cancer Discov* 2016; 6(6): 601–611. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0075.
37. Eck MJ, Yun CH. Structural and mechanistic underpinnings of the differential drug sensitivity of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804(3): 559–566. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.12.010.
38. Riely GJ, Politi KA, Miller VA et al. Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(24): 7232–7241. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0658.
39. Li D, Ambrogio L, Shimamura T et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 2008; 27(34): 4702–4711. doi: 10.1038/onc.2008.109.
40. Yu HA, Arcila ME, Hellmann MD et al. Poor response to erlotinib in patients with tumors containing baseline EGFR T790M mutations found by routine clinical molecular testing. *Ann Oncol* 2014; 25(2): 423–428. doi: 10.1093/annonc/mdt573.
41. Miller VA, Hirsh V, Cadranel J et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(5): 528–538. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70087-6.
42. Jänne PA, Yang JC, Kim DW et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(18): 1689–1699. doi: 10.1056/NEJMoa1411817.
43. Romero D. Poziotinib for uncommon ERBB mutations. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15(7): 404. doi: 10.1038/s41571-018-0038-7.
44. Sheikine Y, Rangachari D, McDonald DC et al. EGFR testing in advanced non-small-cell lung cancer, a mini-review. *Clin Lung Cancer* 2016; 17(6): 483–492. doi: 10.1016/j.clcl.2016.05.016.
45. Warth A, Penzel R, Brandt R et al. Optimized algorithm for Sanger sequencing-based EGFR mutation analyses in NSCLC biopsies. *Virchows Arch* 2012; 460(4): 407–414. doi: 10.1007/s00428-012-1219-x.
46. Ragazzi M, Tamagnini I, Bisagni A et al. Diamond: immunohistochemistry versus sequencing in EGFR analysis of lung adenocarcinomas. *J Clin Pathol* 2016; 69(5): 440–447. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203348.
47. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V et al. Circulating cell-free nucleic acids and platelets as a liquid biopsy in the provision of personalized therapy for lung cancer patients. *Lung Cancer* 2017; 107: 100–107. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.04.026.
48. Zhu G, Ye X, Dong Z et al. Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of EGFR-activating mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Mol Diagn* 2015; 17(3): 265–272. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.01.004.
49. Luthra R, Chen H, Roy-Chowdhuri S et al. Next-generation sequencing in clinical molecular diagnostics of cancer: advantages and challenges. *Cancers (Basel)* 2015; 7(4): 2023–2036. doi: 10.3390/cancers7040874.
50. Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA et al. Analytical and clinical validation of a digital sequencing panel for quantitative, highly accurate evaluation of cell-free circulating tumor DNA. *PLoS One* 2015; 10(10): e0140712. doi: 10.1371/journal.pone.0140712.

51. O'Kane GM, Bradbury PA, Feld R et al. Uncommon EGFR mutations in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2017; 109: 137–144. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.04.016.
52. Beau-Faller M, Prim N, Ruppert AM et al. Rare EGFR exon 18 and exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer on 10 117 patients: a multicentre observational study by the French ERMETIC-IFCT network. *Ann Oncol* 2014; 25(1): 126–131. doi: 10.1093/annonc/mdt418.
53. Yasuda H, Park E, Yun CH et al. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. *Sci Transl Med* 2013; 5(216): 216ra177. doi: 10.1126/scitranslmed.3007205.
54. Chen D, Song Z, Cheng G. Clinical efficacy of first-generation EGFR-TKIs in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR exon 20 mutations. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 4181–4186. doi: 10.2147/OTT.S108242.
55. Yang JC, Sequist LV, Geater SL et al. Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *Lancet Oncol* 2015; 16(7): 830–838. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00026-1.
56. Naidoo J, Sima CS, Rodriguez K et al. Epidermal growth factor receptor exon 20 insertions in advanced lung adenocarcinomas: clinical outcomes and response to erlotinib. *Cancer* 2015; 121(18): 3212–3220. doi: 10.1002/cncr.29493.
57. Klughammer B, Brugger W, Cappuzzo F et al. Examining treatment outcomes with erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer whose tumors harbor uncommon EGFR mutations. *J Thorac Oncol* 2016; 11(4): 545–555. doi: 10.1016/j.jtho.2015.12.107.
58. van Veggel B, van der Wekken A, Hashemi S et al. Osimertinib treatment for patients with EGFR exon 20 insertion positive non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2018; 29 (Suppl 8): 493–547. doi: 10.1093/annonc/mdy292.
59. Piotrowska Z, Costa DB, Oxnard GR et al. Activity of the Hsp90 inhibitor luminespib among non-small-cell lung cancers harboring EGFR exon 20 insertions. *Ann Oncol* 2018; 29(10): 2092–2097. doi: 10.1093/annonc/mdy336.
60. Chen D, Song Z, Cheng G. Clinical efficacy of first-generation EGFR-TKIs in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR exon 20 mutations. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 4181–4186. doi: 10.2147/OTT.S108242.
61. Chang MH, Ahn HK, Lee J et al. Clinical impact of amphiregulin expression in patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) wild-type nonsmall cell lung cancer treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Cancer* 2011; 117(1): 143–151. doi: 10.1002/cncr.25560.
62. Ahn MJ, Cho JH, Sun JM et al. An open-label, multicenter, phase II single arm trial of osimertinib in non-small cell lung cancer patients with uncommon EGFR mutation (KCSG-LU15-09). *J Clin Oncol* 2018; 36 (Suppl 15): 9050–9050. doi: 10.1200/JCO.2018.36.15\_suppl.9050.
63. Chou TY, Chiu CH, Li LH et al. Mutation in the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor is a predictive and prognostic factor for gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(10): 3750–3757. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1981.
64. Wu JY, Yu CJ, Chang YC et al. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on “uncommon” epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17(11): 3812–3821. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3408.
65. Čoupková H, Vyzula R. Afatinib in the treatment of advanced non-small cell lung cancer with rare EGFR (in exon 18-T179X) mutation – a case report. *Klin Onkol* 2018; 31(5): 380–383. doi: 10.14735/amko2018380.
66. Chiu CH, Yang CT, Shih JY et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor treatment response in advanced lung adenocarcinomas with G719X/L861Q/S768I mutations. *J Thorac Oncol* 2015; 10(5): 793–799. doi: 10.1097/JTO.0000000000000504.
67. Wu JY, Shih JY. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on uncommon E709X epidermal growth factor receptor mutations in non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 6137–6145. doi: 10.2147/OTT.S118071.
68. Heigener DF, Schumann C, Sebastian M et al. Afatinib in non-small cell lung cancer harboring uncommon EGFR mutations pretreated with reversible EGFR inhibitors. *Oncologist* 2015; 20(10): 1167–1174. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0073.
69. Kobayashi S, Canepa HM, Bailey AS et al. Compound EGFR mutations and response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *J Thorac Oncol* 2013; 8(1): 45–51. doi: 10.1097/JTO.0b013e3182781e35.
70. Peng L, Song ZG, Jiao SC. Efficacy analysis of tyrosine kinase inhibitors on rare non-small cell lung cancer patients harboring complex EGFR mutations. *Sci Rep* 2014; 4: 6104. doi: 10.1038/srep06104.
71. Baek JH, Sun JM, Min YJ et al. Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutated non-small cell lung cancer except both exon 19 deletion and exon 21 L858R: a retrospective analysis in Korea. *Lung Cancer* 2015; 87(2): 148–154. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.11.013.
72. Čapková L, Kalinová M, Tichá I et al. Detekce EGFR mutací v cirkulující nádorové DNA (ctDNA) v plazmě – mezilaboratorní porovnání referenčních laboratoří v České republice. *Klin Onkol* 2018; 31(5): 353–360. doi: 10.14735/amko2018392353.
73. Svatoň M, Pešek M, Baxa J et al. Pacientka se třemi EGFR mutacemi – postupný rozvoj rezistence na předchozí cílenou léčbu. *Klin Onkol* 2018; 31(1): 53–58. doi: 10.14735/amko201853.