

Az epidermalis növekedési faktor receptorának molekuláris diagnosztikája nem kissejtes tüdőrákban

Tímár József, Ostoros Gyula

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

A nem kissejtes tüdőrák egyik kitüntetett markere az epidermalis növekedési faktor receptorfehérjéjének (EGFR) expressziója. Újabban vált ismertté, hogy az EGFR-gén amplifikált lehet, de mutálódhat is nem kissejtes tüdőrákban, ami ideális célponttá teszi az úgynevezett molekulárisan célzott terápiák számára. A nem kissejtes tüdőrák terápiájában mérföldkövet jelent a molekulárisan célzott kezelések integrálása a klinikai gyakorlatba. Ugyanakkor igen keveset tudunk azokról a prognosztikus és prediktív tényezőkről, amelyek meghatározzák az EGFR-ellenes terápia hatékonyságát. A klinikai gyakorlatban egyelőre sokkal megbízhatóbb prediktív markerek a beteg és daganatának általános jellemzői (dohányzási szokások, nem, szövettani típus), mint azok a finom molekuláris sajátosságok, amelyek közvetlenül befolyásolhatják a terápiás választ. Az anti-EGFR-terápia hazai indikációjának alapja az EGFR-protein immunhisztokémiai kimutatása, ezért fontos ezeknek a vizsgálatoknak a lehető legmegbízhatóbb elvégzése. Másrészt az EGFR-gén esetleges hibái rezisztenssé vagy éppen különösen érzékennyé tehetik a daganatot az EGFR-gátló kezelésekkel szemben. Diagnosztikus és terápiás költséghatékonysági szempontokból nagy jelentősége van a fenti vizsgálatok elvégzési sorrendjének.

One of the most useful markers of non-small cell lung cancer is epidermal growth factor receptor (EGFR) protein expression. Recently it was found that the EGFR gene may be amplified or mutated in non-small cell lung cancer rendering this gene product an ideal target for therapy. The introduction of molecularly targeted therapy into the clinical practice represents a milestone in the management of non-small cell lung cancer. However, our knowledge on the prognostic and predictive factors that will define the efficiency of anti-EGFR therapy is limited. In clinical practice, some common patient and disease features (e. g., smoking habit, gender, histological type) are still more dependable predictors than the fine molecular properties that may directly affect therapeutic response. The indication of anti-EGFR therapy in Hungary is based on the immunohistochemical detection of the EGFR protein, therefore, it is important that these tests are performed as reliably as possible. On the other hand, mutations in the EGFR gene may render the tumour resistant or, in contrary, especially sensitive to EGFR inhibitor therapy. The sequence of the diagnostic steps to define the genotype and phenotype of non-small cell lung cancer has a great importance in terms of cost-efficiency of the therapy.

**nem kissejtes tüdőrák,
epidermalis növekedési faktor receptor,
molekuláris diagnosztika**

**non-small cell lung cancer,
epidermal growth factor receptor,
molecular diagnostics**

dr. Tímár József (levelező szerző/correspondent): Országos Onkológiai Intézet,
Tumor Progressziós Osztály/National Institute of Oncology, Department of Tumor Progression;
H-1122 Budapest, Ráth Gy. u. 7–9. E-mail: jtimar@oncol.hu
dr. Ostoros Gyula: Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet/
National Institute of Tuberculosis and Pulmonology; Budapest

Érkezett: 2007. augusztus 27. Elfogadva: 2007. szeptember 11.

A tüdőrák hazánkban megkérdőjelezhetetlenül a leggyakoribb és legnagyobb mortalitású rosszindulatú daganat, amelynek kialakulásához az igen széles körben elterjedt dohányzás jelentősen hozzájárul, de nem az egyetlen tényező. Sajnálatos módon korai diagnózis és sikeres sebészi ellátás nélkül alig van esély a túlélés jelentős meghosszabbítására, mert a daganat, más rosszindulatú daganatokhoz képest, meglehetősen rezisztens a kemoterápiás szerekkel szemben.

Patológiai értelemben már régen nem lehet „tüdőrákról” beszélni: a jelenleg érvényben lévő WHO-beosztás nyolc variánst különít el, amelyek közül a leggyakoribb a laphámrák, az adenocarcinoma, a kissejtes tüdőrák és a nagysejtes variáns (1. táblázat). Ezek a daganatok morfológiailag és biológiailag is eltérő viselkedésűek, aminek hátterében eltérő genetikai mintázatuk áll. Az adott daganat genetikai jellemzőinek feltárása mind a diagnosztikai, mind a terápiás folyamatot befolyásolja, így fontos költséghatékonyasági tényező.

A nem kissejtes tüdőrák molekuláris patológiája

Az ismert genetikai hibák a B-RAF és a K-RAS onkogének aktiváló mutációi, valamint az FHIT onkoszuppresszor inaktivációja (amelyet gyakran kíséri másik két onkoszuppresszor, a p16/INK4 és a retinoblastoma-gén elvesztése és a p53 inaktivációja mutáció révén). Ezek a genetikai károsodások a különböző típusú tüdőrákokban eltérő gyakoriságúak, a K-RAS-mutáció az adenocarcinómákra jellemző, míg a retinoblastoma-mutáció inkább a kissejtes tüdőrákokra. A nem kissejtes tüdőrákok közös jellemzője az *epidermalis növekedési faktor receptor* (EGFR) géncsalád fokozott expressziója, amelyhez az adenocarcinómák esetében a család egy másik tagjának, a HER2 onkogénnek fokozott expressziója is társul (1).

Számos genomikai tanulmány, közöttük Garber és munkatársainak (2) vizsgálatai bemutatták, hogy a tüdőrákok legalább négy eltérő genotípusú csoportra oszthatók. Ezek a laphámrák, a kissejtes tüdőrák, a nagysejtes tüdőrák, illetve az adenocarcinoma. Továbbmenve, a mikrocip-technológia azt is igazolta, hogy az adenocarcinómák is három csoportra bonthatók, ezek közül az egyik elsősorban a laphámrákokkal, a másik inkább a neuroendokrin daganatokkal mutat hasonlóságot genetikailag (1). Laphámrákok esetében érdekes az arachidonsav-metabolizmus enzimeinek (COX-2, LT6-4 dehidrogenáz) expressziója. Az adenocarcinómák prognosztikailag három kategóriába esnek, jó, rossz és intermediér kimenetelű tumorokra, amelyek szintén eltérő génextpressziós profillal rendelkeznek. A jobb prognózisú kategóriában az alveolaris II. típusú pneumocyták által termelt „surfactans” expresz-

Patológiai értelemben már régen nem lehet „tüdőrákról” beszélni: a jelenleg érvényben lévő WHO-beosztás nyolc variánst különít el.

1. TÁBLÁZAT

A tüdőrákok WHO-felosztása

Elszarusodó laphámrák

- Variánsok.
- Papilláris.
- Világos sejtes.
- Kissejtes.
- Basaloid-2.

Kissejtes rák

- Egyszerű.
- Kevert.

Adenocarcinoma

- Acinaris.
- Papilláris.
- Bronchioloalveolaris.
- Nem mucinosus (Clara/pneumocyte type II).
- Mucinosus.
- Kevert mucinosus és nem mucinosus vagy intermediater.
- Szolid adenocarcinoma mucinnal.

Adenocarcinoma (kevert)

- Jól differenciált fetális adenocarcinoma.
- Mucinosus („colloid”) adenocarcinoma.
- Mucinosus cystadenocarcinoma.
- Signet-ring adenocarcinoma.
- Világos sejtes adenocarcinoma.

Nagysejtes carcinoma

- Variánsok.
- Neuroendokrin carcinoma.
- Kevert neuroendokrin carcinoma.
- Basaloid carcinoma.
- Lymphoepitheliomaszerű carcinoma.
- Világos sejtes carcinoma.
- Rhabdoid típus.

Adenosquamous carcinoma

- Pleomorph carcinoma.
- Orsósejtes carcinoma.
- Óriássejtes carcinoma.
- Carcinosarcoma.
- Tüdőblastoma.
- Egyéb.

Carcinoid tumor

- Típusos carcinoid.
- Atípusos carcinoma.

Nyálmirigy típusú

- Mucoepidermoid carcinoma.
- Adenoid cysticus carcinoma.
- Egyéb.

Nem osztályozható rák

szióját lehetett észlelni, amihez e sejtek jellegzetes transzkripciós faktora, a TTF1 társul. A rossz prognózisú adenocarcinómák esetében expresszálódik a VEGF-C (vascularis endothelialis növekedési faktor-C), amely a lymphangiogenesisért felelős citokin, valamint a mátrixbontásban fontos katepszin L ciszteín- és a plazminogénaktivátor szerinproteáz.

Az epidermalis növekedési faktor receptorának jellemzői nem kissejtes tüdőrákban

Az EGF-receptor három doménből áll (1. ábra): egy nagy extracelluláris domén, majd egy transzmembrán szakaszt követően két intracelluláris domén alkotja. Az extracelluláris doménban két szakasz is úgynevezett ligandkötő szakasz (EGF, TGF- α és citokinek számára). A receptor citoplazmatikus szakasza két részből áll, egy úgynevezett kinázdoménből, és az ezt követő szakaszból, ahol azok a foszforilációs helyek találhatóak, amelyek a receptor jelátviteli funkciójához szükségesek. (Ez esetben egy olyan kinázról van szó, amely magát az EGFR-protein citoplazmatikus részét foszforilálja, úgynevezett autofoszforiláció révén.) Tehát ha a receptor aktív, akkor legalább egy autofoszforilációs helyen foszforilált formában kell lennie az adott aminosavnak. Az EGFR-gén expresszióját az 1. intron citozin-adenin ismétlődéseinek polimorfizmusa szabályozza, azok hosszával csökken az expressziós szintje (negatív reguláció).

Régóta ismert, hogy nem kissejtes tüdőrákban (NSCLC: non small cell lung cancer) az EGFR-protein fokozottan expresszálódik (3). Laphámrákokban, hasonlóan más szervek laphámrákjaihoz, szinte általános a fokozott membránexpresszió. Ehhez képest sokkal heterogénebb az EGFR-protein expressziója az adenocarcinómákban és a nagysejtes rákban. Az EGFR-protein expressziós szintjének klinikai jelentősége nem egyértelmű. Ez a helyzet gyökeresen megváltozott azzal, hogy megjelentek az EGFR-t célzó molekuláris terápiák, amelyeket NSCLC-ben is kipróbáltak. E vizsgálatok során derült ki, hogy NSCLC-ben az EGFR-gén hibás lehet (4).

Az EGFR a hetedik kromoszóma rövid karján (12.3) helyezkedik el. Egyes rákokban, így NSCLC-ben is gyakori az aneuploidia, és ez a hetedik kromoszóma esetleges megszorozódásához is vezethet, ezért megnő az EGFR-gén kópiaszáma. A hét kromoszóma polysomiájának klinikopatológiai jelentősége NSCLC-ben nem ismert. Ugyanakkor az EGFR-gén polimorf, gyakori természetes variánsa a vIII, amely az extracelluláris domén két ligandkötő szakaszának hiányával jár, ez pedig az EGFR-hez kötött jelátviteli pálya fokozott aktivitását eredményezi. NSCLC-ben ennek a vIII variánsnak az előfordulási gyakorisága 5% (5). Ezenfelül az EGFR-gén amplifikációja is fellelhető NSCLC-ben, aminek pontos gyakoriságáról nincsenek adatok, de az ismert, hogy EGFR-vIII-polimorfizmussal gyakran szövődik.

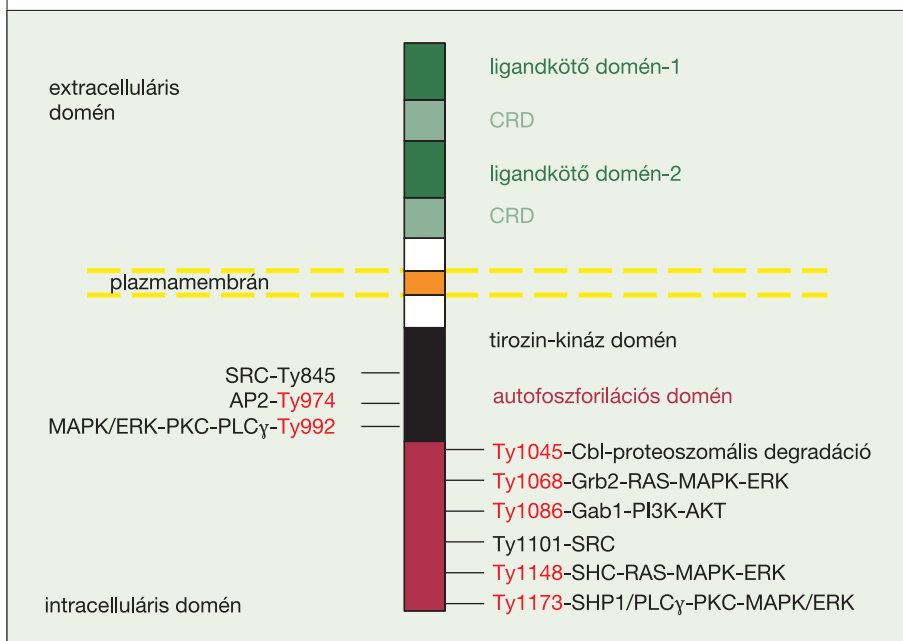
NSCLC-ben az EGFR-gén mutált is lehet, ez a tirozin-kinázt kódoló régióban a 19-es, 20-as, 21-es exonokat érintheti: klinikai jelentősége a 19. és 21. exonok aktiváló mutációinak, illetve a 20. exon rezisztenciamutációjának van (4, 6, 7). A 19. exonban deletiós mutációk fordulnak elő (E746-A750del), míg a 20. és 21. exonban pontmutációk (T790M, L858R). Fontos megfigyelés, hogy az EGFR-mutáció gyakorlatilag az adenocarcinoma-csoport jellemzője, más szövettani típusokban extrém ritka. Az EGFR-mutációk gyakorisága NSCLC-ben a világ különböző tájain igen eltérő: míg Ázsiában (Dél-Korea, Japán) eléri, sőt, meghaladhatja az 50%-ot, addig az Egyesült Államokban 10% körüli. Európában Olaszországról vannak megbízható adatok, amelyek szerint az EGFR-mutáció gyakorisága közelíti a 30%-ot (4). Hazánkban *Peták* felmérése szerint (8) 20% körül lehet, de figyelembe kell venni, hogy a rákok EGFR-mutáció-analízise nem véletlenszerűen kiválasztott egyéneken történik, hanem az ismert prediszponáló tényezők alapján szelektált betegcsoporton. Különböző országokban végzett felmérések szerint az EGFR-mutáció az adenocarcinoma szövettani típussal (ezen belül is a bronchoalveolaris formával), a nemdohányzó-anamnézissel és a női nemmel kapcsolódik (4, 9).

A diagnosztika módszerei és az eredmények értékelése

Két rosszindulatú daganat esetében az a feltétele a hazánkban törzskönyvezett EGFR-ellenes gyógyszer al-

1. ÁBRA

Az EGFR-fehérje doménszerkezete és foszforilációs helyei



CRD: ciszteinben gazdag domén; Ty: tirozin aminosav; SRC: SRC onkogén. Piros szímmel: autofoszforilációs helyek, fekete szímmel: transzfoszforilációs helyek. Az adott számú aminosav jele mellett a kapcsolódó jelátviteli pálya egyszerűsített útvonalát tüntettük fel.

kalmazásának, hogy a tumor meglehetősen alacsony szinten (a daganatsejtek minimum 1–10%-a) expresszálja az EGFR-t. Az anti-EGFR-antitest colorectalis rákban történő alkalmazásának feltétele legalább 1% EGFR-t expresszáló daganatsejt jelenléte, míg a tüdőrák EGFR-tirozin-kináz-gátló erlotinibkezelésének indikációja a tumorban lévő daganatsejtek több mint 10%-ának EGFR-receptor-pozitivitása (10). Ez az alacsony diagnosztikus határ ellentétben áll egy másik célzott terápia esetében meghatározott diagnosztikus határértékkel, amit az anti-HER2-antitest-terápia esetén alkalmaznak: ennél előfeltétel az intenzív HER2-protein-expresszió (++, +++ intenzitás, illetve a HER2 gén amplifikációjának kimutatása).

Az EGFR-protein daganatokból történő kimutatására számos immunhisztokémiai (IHC) eljárást vezettek be. A kitek közül az EGFR PharmDX (11), a Comfirm (12) és a 31g7 anti-EGFR-antitestet a leggyakrabban használták (13). Az EGFR PharmDX kitet az FDA engedélyezte, ami természetesen csak az egyesült

államokbeli alkalmazásnak kötelező feltétele. Európában nincsenek ilyen restriktciók, bármelyik validált módszer lehet használni.

Miután a diagnosztikus eljárás arra irányul, hogy azt a betegcsoportot definiálja pontosan, amely nem részesülhet ebben az új és költséges terápiában, nagyon fontos az egyes alkalmazott immunhisztokémiai protokollok érzékenységének a meghatározása. Nagyszámú tüdő-adenocarcinómán megvizsgálták a legszélesebb körben alkalmazott EGFR-kimutató kit (PharmDX) diagnosztikus érzékenységét, különböző protokollmódosítások esetén (14). Az adenocarcinómák 10%-a EGFR-negatívnak bizonyult a diagnosztikus protokoll alkalmazásával. Amikor megváltoztatták az eredeti PharmDX kit protokollját, amelynek értelmében meghosszabbították a primer antitesttel történő inkubáció idejét, a negatív esetek 50%-ában több mint 10%-os EGFR-pozitivitást kaptunk (14). Ez az eredmény arra utalt, hogy a fixálási procedúra során károsodott

antigénepitopok kimutatási sikere jelentősen javítható a primer antitesttel történő inkubáció meghosszabbításával. Az eredmények azt is mutatják, hogy a diagnosztikában használt protokollokat az adott laboratórium fixálási, beágyazási sajátosságainak megfelelően kell hangolni, miután a betegek kezelésének meghatározásához elengedhetetlenül szükséges a megbízható EGFR-diagnosztika.

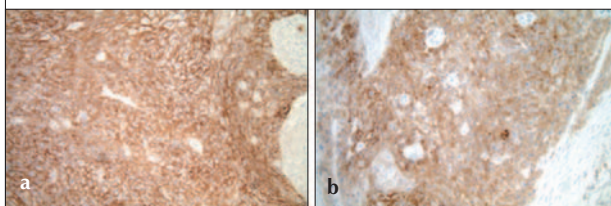
Hasonló vizsgálatokat végeztünk egy másik széles körben használt EGFR immunhisztokémiai kittel, a Comfirm kittel (12) is, amely a korábbi vizsgálatokban az egyik legérzékenyebb EGFR-kimutatói módszernek bizonyult (15). Az elemzés során a PharmDX kittel EGFR-negatívnak bizonyult tüdő-adenocarcinómákat használtunk. A korábbi összehasonlító tesztekben a PharmDX, a Zymed és a Comfirm eljárások EGFR-kimutatói sikere nem az intenzív EGFR-expressziót mutató tumorok esetében volt eltérő, hanem a negatív vagy gyengén pozitív tumorok esetében, ami felvetette annak lehetőségét, hogy a terápiára nem alkalmas daganatok meghatározásának érzékenysége eltérő az egyes kitek alkalmazása esetén. Amikor az eredetileg EGFR-negatívnak bizonyult tüdő-adenocarcinómákat újrazvizsgáltuk a Comfirm-módszerrel, az esetek egyharmadában igazolódott 10%-nál nagyobb EGFR-expressziós szint (16). A Comfirm kit esetében az eredetileg alkalmazott antigén-feltárási eljárás módosítása (a proteáz-K felcserélése mikrohullámú feltárással) jelentősen megváltoztatta az EGFR-kimutatói sikerességét: az esetek többségében a mikrohullámú feltárási eljárás jelentősen fokozta a pozitivitást a daganatszövetben, amely a 10%-os szintről 50%-os, sőt, egyes esetekben 100%-os szintig terjedt (16). Megfigyelésünk szerint a protokollok sajátosságai csak a gyárilag alkalmazott pozitív kontrollokon működnek a forgalmazó által megadott minőségi keretek között, és amennyiben a fixálási és beágyazási körülmények nem ismertek pontosan, a kapott negatív reakciókat fenntartással kell kezelni: vagy az adott protokoll finom hangolásával kell meggyőződni, hogy ténylegesen negativitásról van szó, vagy más alternatív módszerrel is ellenőrizni kell a negatív eredményt. A diagnosztikus eljárás tétje nagy: ki kell mutatnia, hogy az adott tüdőrákos beteg esetében fennállnak-e az igen költséges terápiás szer hazai alkalmazási előírásainak feltételei (17).

Az NSCLC-k egy részében olyan EGFR-protein expresszálódik, amelynek a külső extracelluláris szakaszából hiányzik az a rész, amelyiket az anti-EGFR-antitest-terápia és/vagy az EGFR-diagnosztikus eljárás során alkalmazott antitest vagy antitestek ismernek fel (EGFR-vIII). Ebből a szempontból tanulságos, hogy a leggyakrabban használt három kit esetében (PharmDX, Comfirm és a Zymed kit) az antitestek mindegyike az EGFR membránközeli régióját detektálja, és egyik sem ad választ arra, hogy az EGFR-protein csonkolt formája expresszálódik-e a tumorban. Ezt csak olyan antitesttel lehet megállapítani, amely az EGFR citoplazmatikus szakaszát ismeri fel (2. ábra). Egy, az EGFR C-terminális szakasza elleni antipeptid-

A terápiára nem alkalmas daganatok meghatározásának érzékenysége eltérő az egyes kitek alkalmazása esetén.

2. ÁBRA

Az EGFR-fehérje kimutatása immunhisztokémiai módszerrel nem kissejtes tüdőrákban. a) Az EGFR extracelluláris szakaszának detektálása (PharmDTM kit). A daganatsejtek döntő többségének membránjában intenzív jelölődés látható. b) Az EGFR citoplazmatikus végének kimutatása antipeptid-antitesttel (Biogenex). A daganatsejtek kisebb hányadának membránjában figyelhető meg intenzív jelölődés



antitesttel (például Biogenex) végzett immunreakció hasonló gyakoriságú és intenzitású reakciót kell, hogy mutasson a vad típusú EGFR expressziója esetében, míg a VIII-variáns esetén eltérés mutatkozik az EGFR extracelluláris szakaszát felismerő antitesttel végzett reakció (negatív) és az EGFR C-terminális szakasza elleni antitesttel végzett reakció (pozitivitás) között. Természetesen az EGFR-vIII formájának expresszióját megfelelő genetikai analízissel is ki lehet mutatni, de miután az úgynevezett „splice variánsról” van szó, mRNS-szinten kell végezni a vizsgálatot.

Prediktív patológia

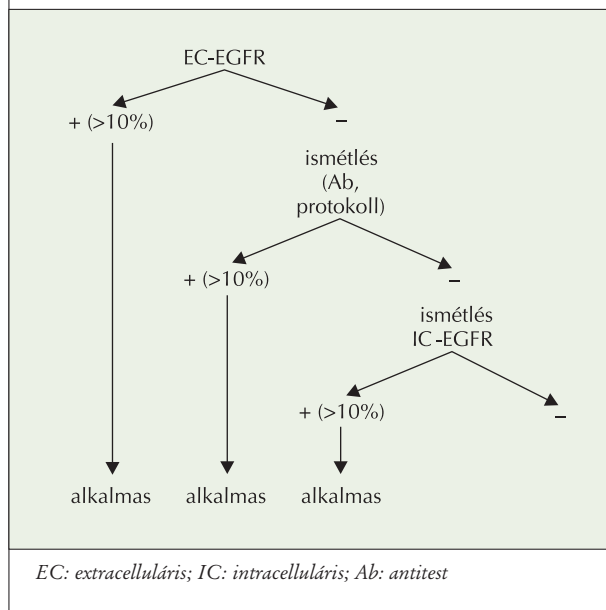
Bár az tűnik triviálisnak, hogy az EGFR elleni terápiák szempontjából a legfontosabb prediktív tényező az EGFR fokozott expressziója NSCLC-ben, a klinikai és patológiai tapasztalatok nem egészen ezt mutatják (4, 7, 17). Az erlotinib törzskönyvezési vizsgálatában a beválasztási kritérium 10%-os immunhisztokémiai pozitivitás volt, és ekkor lehetett az EGFR-tirozin-kináz-inhibitor-kezeléssel 8,9%-os válaszadási arányt elérni (4). Ugyanakkor az adenocarcinoma-csoportban ez már 14% volt, míg a nemdohányzó-csoportban 25%, ami arra utal, hogy az EGFR-protein-expresszió mellett egyéb klinikopatológiai tényezők nagyobb szerepet töltenek be a terápiás válaszban, mint magának a „célpontnak” a jelenléte. (A kimutatás problematikájáról l. fentebb!)

Az EGFR-tirozin-kináz-inhibitor-kezelésekre adott válaszok szempontjából meghatározó jelentősége van a 19., 20. és 21. exonok mutációinak: nagy szériákon végzett tanulmányok szerint a reagáló NSCLC-csoportban a mutációgyakoriság 80%, míg a refrakter tumorokban gyakorlatilag nem fordul elő ilyen mutáció. A nem dohányzó státus szintén erős prediktora a daganat EGFR-mutációjának és a terápiás válasznak is: 40–50%-os mutációgyakoriságot észleltek a nemdohányzóknál, szemben a dohányzók 4–10%-ával. A terápiás válasz szempontjából kedvezőbb a 19. exon deletiója, mint a 21. pontmutáció. Az EGFR-gén amplifikációja (és talán még polysomiája is) erős pozitív prediktív tényező, különösen, ha EGFR-mutációval párosul. Megjegyzendő, hogy az EGFR-amplifikáció nem függ össze az NSCLC szövettani típusával, a beteg dohányzási szokásaival és nemi hovatartozásával. Az egyes vizsgálatokban az amplifikált EGFR esetében a válaszadási arány 29–45% között változott, szemben a nem amplifikált EGFR-sajátosságú betegek 3–9%-ával (4, 7, 18–20).

Az EGFR-amplifikáció, aktiváló mutáció vagy a fokozott proteinexpresszió természetesen csak biokémiaileg aktív EGFR esetében képez „molekuláris” célpontot az anti-EGFR-kezelésekre, azonban annak megállapítása, hogy az adott receptor aktív-e, klinikai mintában igencsak problematikus. Számptalan eljárást teszteltek, de eddig egyik sem bizonyult megfelelően érzékenynek és specifikusnak; ezek között az EGFR-jelátviteli pálya végén szereplő célfehérjék foszforilá-

3. ÁBRA

Algoritmus az EGFR-tirozin-kináz-gátló kezelésre való alkalmasság megállapításához immunhisztokémiai módszerrel



ciós státusa gyakran szerepelt. Ezek közül a foszfo-AKT-meghatározást használják gyakran, de a klinikai eredmények ellentmondásosak. Kézenfekvőnek tűnhet az EGFR-fehérje foszforilált állapotának kimutatása, de ahogy azt az 1. ábrán látni lehet, számos ponton foszforilálódhat a fehérje, és az EGFR tirozin-kinázának aktivitása csak az autofoszforilációs helyeken mérhető, azonban az egyes daganatokban a biokémiai mikrokörnyezet különböző volta miatt ezeket eltérően veszik igénybe a sejtek, tehát nem elég csak egy foszforilációs helyet vizsgálni. Olyan immunhisztokémiai eljárások, amelyek ezekre a foszforilációs helyekre specifikusak, még nem kerültek rutinalkalmazásra, pedig egyfajta funkcionális tesztet jelenthetnének.

Az NSCLC molekuláris genetikája szempontjából ugyancsak fontos, hogy a K-RAS-mutáns tüdőrákokban nem fordul elő EGFR-génmutáció (4, 21). Ez a génhiba (RAS-mutáció) a dohányzás hatására keletkezik, és elsősorban az adenocarcinomákra jellemző (1).

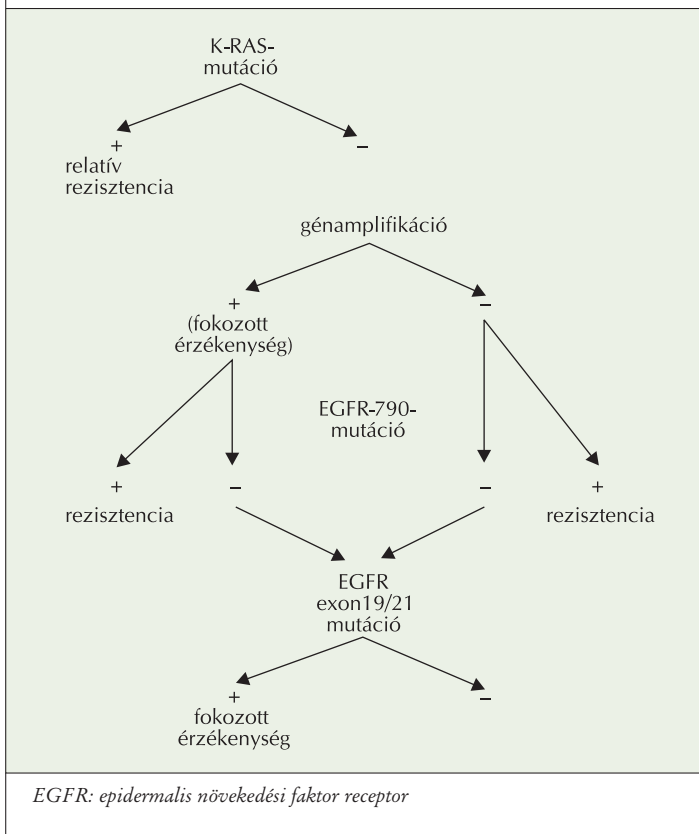
Maga a K-RAS-mutáns státus negatív prediktív tényező az EGFR-tirozin-kináz-inhibitor-terápia szempontjából. Ugyanakkor újabb adatok szerint az ilyen genetikai jellemzőkkel rendelkező NSCLC a klasszikus kemoterápiára is rezisztensebb.

Egyéb genetikai tényezőknek is jelentőségük lehet az EGFR elleni terápia sikere szempontjából. Erre az

A diagnosztikus eljárás tétje nagy: ki kell mutatnia, hogy az adott tüdőrákos beteg esetében fennállnak-e az igen költséges terápiás szer hazai alkalmazási előírásainak feltételei.

4. ÁBRA

Az EGFR-tirozin-kináz-gátló kezelés iránti érzékenység genetikai hátterére vonatkozó vizsgálatok javasolt algoritmus



az újabb megfigyelés utal, hogy az EGFR-tirozin-kináz-inhibitor gefitinib iránt rezisztens, de máskülönben mutáns EGFR-t hordozó tüdőrákokban a c-MET onkogén amplifikációját lehet kimutatni, ami ezek szerint szintén negatív prediktív tényező lehet az EGFR-gátló kezelések szempontjából (22).

Diagnosztikus algoritmusok

Az EGFR-tirozin-kináz-inhibitor-kezelés szempontjából az EGFR-protein jelenléte meghatározónak tűnik, ha a meghatározás megfelelő kontroll mellett történt (minimum 10% pozitív daganatsejt), és az erlotinib-terápia hazai törzskönyvi leiratában ez a megszabott feltétel. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat azonban a 3. ábra algoritmusának megfelelően kell elvégezni, hogy nagy biztonsággal lehessen kialakítani azoknak a betegeknek a körét, akik megfelelnek a beválasztási kritériumoknak, ezért az esetleges negatív eredményeket többféle módon is ellenőrizni kell.

A következő lépésben az EGFR-protein-pozitív daganatos betegek körében célszerű elvégezni az EGFR-tirozin-kináz-inhibitor iránti érzékenység genetikai analizését. A költséges vizsgálatok racionális algoritmusára tett javaslatot mutatja a 4. ábra. Az adenocarcinomás betegcsoportban értelme van a teljes mutációk

spektrum analizésének, amennyiben a beteg nem dohányzó és daganata nem hordoz K-RAS-mutációt. Első lépésben a rezisztenciamutáció meghatározását kell elvégezni, mert ezzel ki lehet zárni azok körét, akik genetikailag rezisztensek az ilyen típusú kezelésekre. Amennyiben ez a vizsgálat negatív, akkor van értelme az úgynevezett érzékenységi mutációk meghatározásának, amely a legköltségesebb része a vizsgálat sorozatnak. Megjegyzendő, hogy NSCLC esetében az EGFR-amplifikáció meghatározásának valamennyi szövettani altípus esetében van értelme, mert bár ritkán (5-10%), de laphámrákban és nagysejtes rákban is előfordulhat, és fokozott EGFR-gátló érzékenységhez vezet. A fenti diagnosztikus algoritmusokkal az NSCLC prognózisára és esetleges terápiás érzékenységére nézve lehet fontos adatokat nyerni. A javasolt algoritmus igyekszik figyelembe venni azt, hogy első lépésben olyan genetikai vizsgálatok történjenek, amelyek egyértelmű kategóriákat határoznak meg, és minden további lépés ezen alapinformációkra épül. Ennek révén a költséges vizsgálatok a legkisebb ráfordítással nyújtanak maximális információt a daganatról.

Gyakorlati következtetések

Jelenleg nincs olyan, evidenciaértékű, prognosztikus biomarker a nem kissejtes tüdőrák EGFR-tirozin-kináz-inhibitor-kezelésével kapcsolatban, amelynek segítségével megjósolhatnánk a túlélésre gyakorolt hatást. Emiatt nyilvánvaló, hogy vak, randomizált, többkarú vizsgálatok szükségesek biomarker-analízissel. Jelenleg csak előrehaladott kutatások és elképzelések vannak, ezek eredményei részben már néhány héten belül (MERIT: Market Identification Trial), illetve jövő év végére (SATURN: Sequential Tarceva in Unresectable NSCLC) várhatók. A MERIT egykarú vizsgálat, amelynek során a részletes biomarker-analízis ismeretében (amelynek része az EGFR immunhisztokémiai meghatározása is) III/B-IV-es stádiumú betegeknél a fenntartó erlotinibkezelés hatékonyságát elemzik a biomarkerek függvényében. A SATURN vizsgálat már kétkarú, ebben hasonló kautélák mellett nem progrediáló betegeknél erlotinibet, illetve placebo alkalmaznak. Az erlotinibbel kezelt, NSCLC-ben szenvedő betegek ezreit elemző utánvizsgálat a TRUST. Sajnos ez is egykarú vizsgálat volt, így a prognosztikus, illetve a prediktív elemek nem választhatók el egymástól. Szintén biomarkerek elemzésével történik a RADIANT (adjuváns erlotinib) vizsgálat. Ebben I/B-III-as stádiumú, ablasticusan reszekált NSCLC-s betegeken placebokontroll mellett figyelik az erlotinib hatását a betegségmentes és a teljes túlélésre.

Az EGFR-mutáció és az EGFR-tirozin-kináz-inhibitorra adott terápiás válasz összefüggése már bizonyítottan tekinthető, azonban mivel az EGFR-mutáció (19., 21. exon) és a betegség prognózisa között az összefüggés egyértelmű (lényegesen jobb prognózisú a mutáns tüdőrák), még nem meggyőzően bizonyított az erlotinibkezelés teljes túlélésre gyakorolt ha-

tása e betegek esetén. Erre közvetve talán választ ad majd a GECP 06/01-es vizsgálat, amely mutáns daganatokban (III/B és IV-es stádium) az egyik karon első vonalban erlotinibet, a másik karon platinabázisú, kettős kombinációjú kemoterápiát alkalmaz, és ez progresszió esetén átfordul.

A soha nem dohányzottak tüdőrákjának eltérő genetikájára alapozva az EGFR-kezelés hatékonyságának esélye nyilvánvalóan magasabb. Ugyanakkor ismert a dohányzás abbahagyásának időtartama és az EGFR-mutáció közötti pozitív összefüggés. Másrészt, számos klinikai adat (így a Br 21-es vizsgálat is) azt bizonyítja, hogy a valaha dohányzó betegek esetében is elérhető klinikai eredmény az EGFR-tirozin-kináz-kezelés révén. Jelenleg második és harmadik vonalban alkalmazható az erlotinibterápia hazánkban. Másodvonalbeli terápia esetén mérlegelendők az alábbiak:

– Az erlotinibkezelés indokolt lehet, ha az első vonalbeli, platinabázisú citotoxikus kemoterápiát a beteg rosszul tolerálta (mellékhatások, toxicitás, a beteg preferenciája).

– Figyelembe veendő a beteg dohányzási anamnézise is, de nem kizárólagossággal (például láncdohányos, laphámrákos férfi esetén biztosan megfontolandó az erlotinibterápia).

– Mérlegelés tárgyát jelenti mind a patológiai típus, mind a nem, illetőleg a dohányzási anamnézis (doboz/év index, mikor hagyta abba a dohányzást stb.).

Az esetleges harmadvonalbeli erlotinibterápia már ki-

zárólagos lehetőség, alternatíva nélküli, így a fenti szempontok mellett a beteg általános állapotának, várható túlélési időtartamának a szempontjai kerülnek előtérbe.

Az erlotinibregisztrációs vizsgálatban (Br 21) végül is dohányzók, laphámrákos betegek, férfiak esetén is túlélési előny mutatkozott az erlotinibet szedők javára a placebokontrollhoz képest. Mivel ebben a vizsgálatban nem volt meg a túlélési előny az EGFR-expressziót nem mutató daganatok esetén, ezért az európai törzskönyvi előiratban leírják, hogy nem mutatkozott klinikai előny az EGFR-negatívak esetében. Hangsúlyozandó, hogy semmiféle kizárási instrukciót nem tartalmaz az európai törzskönyv, bár ezzel sugallja az immunhisztokémiai vizsgálat elvégzésének lehetőségét.

Összegzés

Magyarországon jelenleg az erlotinibkezelés finanszírozási alapja a lokálisan kiterjedt és kiterjedt nem kissejtes tüdőrák esetén az EGFR-protein-expresszió minimálisan 10%-os mértéke, amely a regisztrációs vizsgálat eredményein alapul. Ez a feltétel addig maradhat érvényben, amíg a biomarkerekkel kapcsolatos klinikai vizsgálatok eredményei evidenciaértékűvé válnak, ami feltehetőleg egy-másfél év múlva realizálódik. Addig az EGFR-protein-expresszió kimutatása megfelelően validált immunhisztokémiai eljárással a hazai gyakorlatban alapvető.

IRODALOM

- Kopper L, Tímár J. Genomics of lung cancer may change diagnosis, prognosis and therapy. *Pathol Oncol Res* 2005;11:5-10.
- Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Pacyna-Gengelbach Zs, van de Rijn M, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:13784-89.
- Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:2445-59.
- Rosell R, Taron M, Reguart N, Isla D, Moran T. Epidermal growth factor receptor activation: how exon 19 and 21 mutations changed our understanding of the pathway. *Clin Cancer Res* 2006;12:7222-31.
- Sasaki H, Kawano O, Endo K, Yukiue H, Yano M, Fujii Y. EGFRvIII mutation in lung cancer correlates with increased EGFR copy number. *Oncol Rep* 2007;17:319-23.
- Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, 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;23:857-65.
- Nomura M, Shigematsu H, Li L, Suzuki M, Takahashi T, Estess P, et al. Polymorphisms, mutations, and amplification of the EGFR gene in non-small cell lung cancers. *PLoS Med* 2007;4:e125.
- Schwab R, Peták I, Pintér F, Szabó E, Kánya M, Tamási A, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR): therapeutic target in the treatment of lung adenocarcinoma. *Orv Hetil* 2005;146:2335-42.
- Shepherd FA, Rosell R. Weighing tumor biology in treatment decisions for patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007;2(Suppl.2):S68-76.
- Tímár J. A tüdőrák prognosztikai faktorai. In: *Onco Uptade 2005. Bodoky Gy (ed.). Budapest: Melania Kiadó Kft.; 2006. p. 126-37.*
- <http://www.fda.gov/cdrh/mda/docs>, 2007. augusztus 1.
- <http://www.ventanamed.com/catalog/antibody>, 2007. július 6.
- Pii K, Andersen FG, Jensen S, Spaulding B. Characterization of a new monoclonal antibody, clone 2-18C9, for the measurement of epidermal growth factor receptor expression in solid tumor. *Proc. 95th AACR, Abst #5029*, 2004
- Derecskei K, Moldvay J, Bogos K, Tímár J. Protocol modifications influence the result of EGF receptor immunodetection by EGFR pharmDX in paraffin-embedded cancer tissues. *Pathol Oncol Res* 2006;12:243-6.
- Renault-Llorca F, Cayre A, Arnould L, et al. Is there an immunohistochemical technique definitively valid in epidermal growth factor receptor assessment? *Oncol Rep* 2006;16:1173-9.
- Orosz Zs, Sági Z, Szentimay Z, Tímár J, Tóth J. Paradigmaváltás a daganatok patológiai diagnosztikájában: molekuláris alapú differenciáldiagnosztika, prognosztikus és prediktív patológia. *Magyar Onkológia* 2007;51:103-12.
- Bunn PA Jr, Dziadziuszko R, Varella-Garcia M, et al. Biological markers for non-small cell lung cancer patient selection for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:3652-6.
- Bell DW, Lynch TJ, Hasserlat SM, Harris PL, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IEEAL/INTACT gefitinib trials. *J Clin Oncol* 2005; 23:8081-92.
- Riely GJ, Pao W, Pham D, Li AR, Rizvi N, Vankatraman ES, et al. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res* 2006;12:839-44.
- Takano T, Ohe Y, Sakamoto H, Tsuta K, Matsuno Y, Tateishi U, et al. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:6829-37.
- Sakamoto H, Shimizu J, Horio Y, Ueda R, Takahashi T, Mitsudomi T, et al. Disproportionate representation of KRAS gene mutation in atypical adenomatous hyperplasia, but even distribution of EGFR gene mutation from preinvasive to invasive adenocarcinomas. *J Pathol* 2007;212:287-94.
- Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039-43.