

*А.С. Мартьянов^{1,2}, Ф.В. Моисеенко³, А.С. Жабина³, Т.Н. Соколова^{1,4}, С.А. Белухин³,
Т.А. Лайдус^{1,2}, М.М. Холматов^{1,2}, В.И. Тюрин^{1,2}, Н.М. Волков³, Е.Ш. Кулигина^{1,2}, Г.А. Янус^{1,2}*

Изменения концентрации циркулирующей в плазме опухолевой ДНК в первые часы таргетной терапии позволяют прогнозировать ответ опухоли у пациентов с EGFR-зависимым раком легкого

¹ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России, Санкт-Петербург

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России

³ ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)

Развитие современных высокочувствительных методов детекции мутаций позволило «жидкостной» биопсии стать полноценной альтернативой стандартной «тканевой» биопсии и войти в клиническую практику для неинвазивного анализа злокачественных новообразований. Чрезвычайно значимым приложением «жидкостной» биопсии стал мониторинг течения заболевания в ходе терапии. Целью данного исследования являлся анализ изменений циркулирующей в плазме свободной ДНК (цДНК), происходящих в первые часы после начала терапии ингибиторами тирозинкиназы EGFR (EGFR-TKI). В исследование было включено 30 больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), связанным с мутациями в гене EGFR. От каждого пациента получали серийные образцы плазмы: непосредственно перед приемом первой таблетки и через 0,5, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 36 и 48 ч после начала терапии. Концентрацию мутантных аллелей EGFR в плазме измеряли с помощью цифровой-капельной ДНК (ddPCR). Копии цДНК, содержащие EGFR мутации, были обнаружены в стартовой точке у 25 из 30 (83%) участников исследования. Применение таргетного препарата ингибитора EGFR приводило к немедленным колебаниям концентрации циркулирующих фрагментов, причем обнаруженные «паттерны» динамики можно было условно отнести к трем категориям: а) постепенное снижение уровня цДНК; б) продолжающееся увеличение количества мутантных копий EGFR; в) чередующиеся всплески и падения концентрации цДНК. В качестве единого контрольного пункта для измерения динамики цДНК была выбрана точка «48 часов» после начала приема препарата. Двенадцать (50%) из 24 информативных пациентов показали снижение содержания цДНК

за этот период более чем на 25%; у всех этих пациентов рентгенологические исследования подтвердили стабилизацию (SD) или частичный регресс (PR) опухолевого процесса («контроль заболевания») в течение 8–12 следующих недель. У остальных 12 человек уровень EGFR-мутантной цДНК либо возрос ($n=7$), либо остался неизменным ($n=5$). 10 из 12 пациентов с повышенным или стабильным уровнем цДНК достигли объективного ответа опухоли через 4 нед, но только 5 из них по-прежнему демонстрировали «контроль заболевания» через 8–12 нед ($p=0,014$ по сравнению с группой со снижением цДНК). Падение количества циркулирующих мутантных копий EGFR также коррелировало с более длительной выживаемостью без прогрессирования (ВВП; 14,7 мес против 8,5 мес, $p=0,013$). Полученные данные свидетельствуют о том, что мониторинг концентрации ДНК с EGFR-мутацией в плазме в течение первых часов терапии TKI может использоваться в качестве непосредственного (предиктора) ответа опухоли на лечение.

Ключевые слова: НМРЛ; EGFR; циркулирующая опухолевая ДНК; терапия TKI; опухолевый ответ

Введение

Периферическая кровь, полученная от онкологического больного, как правило, содержит свободно циркулирующие злокачественные клетки, а также их фрагменты — тканеспецифические белки и нуклеиновые кислоты. Анализ циркулирующей опухолевой ДНК (цДНК) является чрезвычайно перспективным направлением, поскольку она содержит в точности те же генетические и эпигенетические альтерации, что и «материнская» опухоль. Ключевое ограниче-

ние «жидкостной биопсии» — это малая концентрация опухолевой ДНК в пуле растворенных в плазме разнообразных «нормальных» нуклеиновых кислот. Современные аналитические методы способны преодолеть эти трудности и детектировать даже единичные мутантные молекулы на фоне избытка фрагментов неопухолевого происхождения (Bettegowda и соавт., 2014; Gobbinì и соавт., 2020). Энергичные усилия направлены на адаптацию “жидкостной биопсии” для ранней диагностики и мониторинга опухолевых заболеваний (Akhoundova и соавт., 2020; Charo и соавт., 2021). Полагают, что концентрация цоДНК в плазме пропорциональна общей массе опухоли (Abbosh и соавт., 2017; Strijker и соавт., 2020), таким образом, вполне закономерен тот факт, что цоДНК относительно легко обнаруживается у пациентов с распространенным опухолевым заболеванием, а уменьшение опухолевой массы в результате терапевтического воздействия, как правило, приводит к падению уровня цоДНК в периферической крови (Anagnostou и соавт., 2019; Ebert и соавт., 2020).

Уменьшение размера опухоли под действием терапии объясняется несколькими биологическими эффектами. Классическая химиотерапия и таргетные препараты обладают цитостатическим действием, то есть предотвращают пролиферацию неопластических клеток (Serkova и Eckhardt, 2016). Кроме того, данные категории препаратов вызывают регресс опухоли за счет активации запрограммированной клеточной гибели (апоптоза или аутофагии) (Jiang и соавт., 2020). Терапевтический эффект, который часто достигается после нескольких недель или месяцев системной терапии, почти всегда сопровождается снижением концентрации циркулирующих маркеров, будь то опухолеспецифические белки или цоДНК (Reese и соавт., 2019; Fukuhara и соавт., 2020). Что же касается событий, происходящих в неопластических очагах в первые часы после получения противоопухолевого препарата, то они до сих пор остаются практически недоступными для изучения. В этой связи весьма перспективной представляется идея использования преимуществ «жидкостной биопсии» (в частности, анализ концентрации фрагментов ДНК с опухолевой мутацией в плазме), для неинвазивного раннего мониторинга краткосрочных эффектов EGFR-ТКИ. В качестве модели для такого эксперимента мы выбрали EGFR-зависимый немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ).

Ингибиторы тирозинкиназы EGFR (EGFR-ТКИ; gefitinib, erlotinib, afatinib, osimertinib и др.) высокоэффективны при НМРЛ, несущем активирующую мутацию в экзонах 19 или 21 гена *EGFR* (Sequist и соавт., 2013). Применение EGFR-ТКИ в этих случаях почти всегда

сопровождается объективным ответом опухоли или стабилизацией заболевания. Существуют примеры немедленного облегчения симптомов в течение первых же часов после введения препарата — так называемый «эффект Лазаря» (Conci и соавт., 2020). Эти факты говорят о практически мгновенном запуске соответствующих сигнальных каскадов и противоопухолевых процессов. Краткосрочные последствия EGFR-ТКИ на уровне цоДНК до сих пор не анализировались. Задачей данного исследования было изучить, каким образом введение EGFR-ТКИ влияет на концентрацию цоДНК в плазме в течение первых часов после приема препарата, и имеют ли эти изменения значение при прогнозе долгосрочных эффектов таргетной терапии.

Материалы и методы

В исследование приглашали пациентов с локализованным или метастатическим EGFR-позитивным НМРЛ, проходивших лечение в Санкт-Петербургском городском онкологическом центре в период с августа 2018 г. по март 2020 г., ранее не получавших таргетной терапии. Тестирование мутации *EGFR* в опухолевой ткани проводилось, как описано Moiseyenko и соавт. (2010). Все пациенты дали информированное согласие на участие в эксперименте. Исследование было одобрено местным этическим комитетом.

Характеристики 30 пациентов, включенных в работу, представлены в табл. 1. От каждого больного получали 10 серийных образцов плазмы: перед приемом первой таблетки («нулевая точка») и через 0,5, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 36 и 48 ч после начала терапии (рисунок 1). Кроме того, всем пациентам было предложено сдать кровь на 14-й и 28-й день лечения. EGFR-ТКИ назначали в обычных суточных дозах (gefitinib: 250 мг; erlotinib: 150 мг; afatinib: 40 мг; osimertinib: 80 мг). Оценка раннего ответа проводилась с помощью компьютерной томографии (КТ) на 4-й неделе, а затем в течение 8–12 нед после начала терапии. Объем опухоли рассчитывали с помощью RadiAnt DICOM Viewer V.4.5.9.18463.

Анализ цоДНК. Образцы крови (10 мл) собирали в пробирки cf-DNA/cf-RNA Preservative Tubes (Norgen), и отделяли плазму от остальной части образца с помощью двухэтапного центрифугирования (400 g в течение 10 мин при комнатной температуре с последующим 14400 g в течение 10 мин при 4 °C). Внеклеточную (cell-free) ДНК экстрагировали с помощью набора QIAamp Circulating Nucleic Acid kit из 3–5 мл плазмы в соответствии с инструкциями производителя и растворяли в 50 мкл стерильной воды.

Содержание фрагментов ДНК с мутацией EGFR (делеции 19 экзона или замены L858R) измеряли с помощью цифровой капельной ПЦР (ddPCR) с использованием системы QX100 Bio-Rad. Реакции ddPCR проводили в трех повторах для каждого образца. Реакционная смесь включала 2X ddPCR Supermix for Probes (no UTP, Bio-Rad), мутант-специфические олигонуклеотиды и 2–3 мкл матричной ДНК в общем объеме реакции 22–23 мкл. Анализ данных проводился с помощью программного обеспечения QuantaSoft версии 1.7.4 в соответствии с рекомендациями производителя. Все реакции ddPCR, в результате которых было получено 10 или более капель с таргетной молекулой ДНК, считались информативными. Абсолютное количество “мутантных” копий ДНК опухолевого происхождения в 1 мл плазмы (Cmut) рассчитывали по формуле:

Таблица 1. Пациенты с НМРЛ, вызванным мутациями в гене EGFR, включенные в исследование

		N	%
Пол	Ж	26	87%
	М	4	13%
Средний возраст (min — max)		68,4 (52–81)	
Мутация EGFR	ex19del	20	67%
	L858R	10	33%
Метастазы в легких		16	53%
Метастазы в печени		3	10%
Вовлечение плевры		6	20%
Метастазы в надпочечниках		2	7%
Метастазы в костях		10	33%
Метастазы в лимфоузлах		6	20%
Метастазы в мозг в стартовой точке		7	25%
Среднее число метастатических очагов (min-max)		1,7 (1–4)	
ECOG	0	1	3%
	1	25	83%
	2	2	7%
	3	2	7%
	4	0	0
Средний суммарный объем поражения (мм ³)		60 841 (23 — 490 590)	
Средний объем наибольшего поражения (мм ³)		54 833 (14 — 490 509)	
Лекарственное средство	Гефитиниб	20	67%
	Эрлотиниб	5	17%
	Афатиниб	3	10%
	Осимертиниб	2	7%

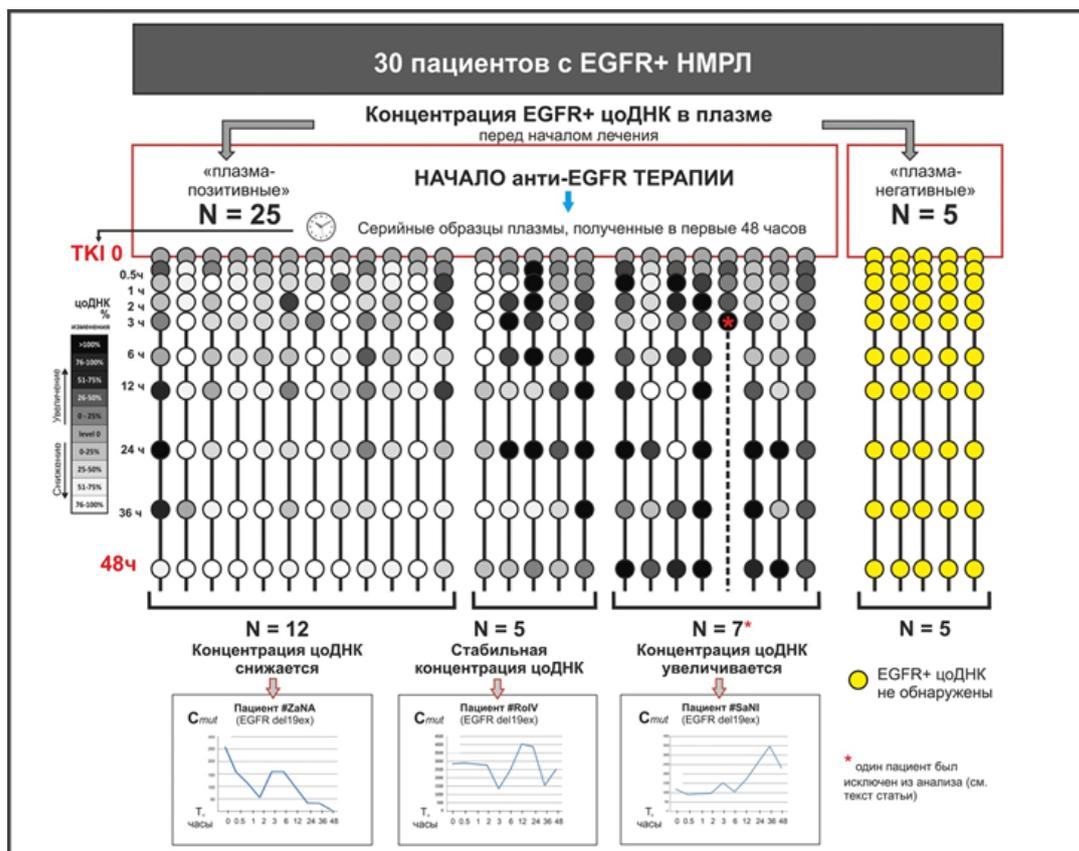


Рис. 1. Схема исследования

$N \text{ mut copies}/1\text{mL plasma}$

$$= \frac{\text{Concentration} \left(\frac{\text{copies}}{\mu\text{L}} - \text{cfDNA} \right) \times V_{\text{template}} \times V_{\text{dilution}}}{V_{\text{plasma}}}$$

где: concentration — число «мутантных» капель на 1 мкл ddPCR реакции; V_{template} — объем образца (аликвоты) цоДНК, взятой в ddPCR, мкл; V_{dilution} — общий объем образца цоДНК, полученной из плазмы, мкл; V_{plasma} — объем плазмы, из которого получили цоДНК, мл.

Статистическая обработка. Количественные данные были представлены в виде медианных значений/размаха или средних значений с доверительным интервалом $\pm 95\%$ (1.960σх). Для сравнения медиан использовались непараметрический критерий знаковых рангов Вилкоксона и U-критерий Манна-Уитни. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Все расчеты проводились с использованием программного пакета IBM SPSS v.23.

Результаты

Включенным в исследование пациентам провели КТ-исследование после 4 нед применения ингибиторов тирокиназы (ТКИ). В 25 случаях задокументирован частичный ответ опухоли (PR), у 3 пациентов достигнута стабилизация опухолевого процесса (SD) и двое прогрессировали (PD) на фоне лечения (табл. 2). 29 пациентов продолжили терапию ТКИ (28 случаев с «контролем заболевания» (SD+PR) и 1 случай с PD). 25 пациентам повторно было произведено КТ обследование через 8–12 нед после начала лечения; 5 человек выбыли по следующим причинам: 3 пациентов перенесли циторедуктивную операцию, 1 больной отказался от обследования из-за мер предосторожности против COVID-19, и 1 пациент умер на 6-й неделе лечения после внезапного ухудшения состояния.

Все включенные в исследование пациенты были подвергнуты анализу цоДНК в «нулевой точке», перед началом приема препарата. EGFR-мутантная (EGFR+) ДНК была обнаружена в плазме у 25/30 (83%) субъектов (см. табл. 2, рис. 1). «Плазма-негативными» считали те образцы, в которых количество мутантных копий, циркулирующих в 1 мл плазмы, не превышало 5. Как и ожидалось, общий объем опухолевых поражений был явно выше у пациентов с достоверным уровнем EGFR+цоДНК в плазме (здесь и далее — «плазма-позитивных») по сравнению с «плазма-негативными» пациентами, однако эти различия не достигли статистической значимости (29463 мм³ vs. 9963 мм³, $p=0,552$). Вероятность обнаружения EGFR+цоДНК в «нулевой точке» не коррелировала с возрастом или полом пациента, количеством метастатических зон или типом мутации EGFR (см. табл. 2). Первая КТ-оценка ответа опухоли на 4-й неделе после начала терапии зафиксировала тенденцию к более выраженному уменьшению объема опухоли в группе «плазма-позитивных» пациентов по сравнению с «плазма-негативными» (–61% vs.

–18,5%, $p=0,208$). Эта тенденция не сохранилась после 8–12 нед лечения (см. табл. 2). Пациенты с изначально детектируемой в плазме мутацией EGFR имели более короткий показатель выживаемости без прогрессии (ВБП), чем «плазма-негативные» больные [11,4 мес vs. 21,0 мес, $p=0,238$].

Ни у одного из 5 пациентов, «плазма-негативных» на старте, циркулирующая мутация так и не появилась на фоне анти-EGFR терапии. Остальные 25 субъектов продемонстрировали разнонаправленные изменения в количестве цоДНК (см. табл. 2, 3, рис. 1). У одного из этих субъектов, пациента #ПрОД, в 1-й день лечения случился перелом бедренной кости на месте метастатического поражения; травма вызвала резкое увеличение концентрации EGFR+ ДНК в плазме; этот пациент был сочтен неинформативным для дальнейшего анализа. В остальных случаях анализ изменений концентраций цоДНК, происходящих в течение первых 48 ч лечения, выявил несколько типов динамических паттернов (см. табл. 2, 3). Некоторые пациенты демонстрировали более или менее плавное снижение содержания цоДНК в течение первых двух дней терапии (#ДаАА, #ЗаНА, #ИгВС). У других (#ОгЛФ, #ЗаНИ) наблюдалась тенденция к постепенному увеличению количества циркулирующих EGFR-мутантных копий. В одном случае был зафиксирован относительно стабильный уровень цоДНК в течение всего периода наблюдения (#РоИВ). У большинства пациентов наблюдались менее последовательные вариации в содержании цоДНК, представленные рядом скачков и падений (#СуГИ, #ВаОГ, #СеЕК, #БеСН и т. д.). Очевидно, что не все исследованные нами временные точки в период от 0 до 48 ч являлись одинаково информативным для оценки общего вектора динамики цоДНК. Мы определили, что колебания уровня цоДНК, зафиксированные на 48-м часу от начала терапии, наилучшим образом коррелируют с клинико-патологическими параметрами, в частности с ВБП. Разница в 25% между исходным и конечным измерением расценивалась нами как достоверное снижение или увеличение уровня цоДНК.

Двенадцать (50%) из 24 информативных пациентов показали снижение концентрации цоДНК в плазме более чем на 25% (среднее снижение: –85%; диапазон: от –100% до –49%) через 48 ч после начала лечения. У всех этих пациентов документирована стабилизация или регресс заболевания по данным контрольных КТ через 4 и 8–12 нед терапии (см. табл. 2, 3). Примечательно, что у одного из двух пациентов, перенесших операцию в период наблюдения, отмечен полный патологический (положительный) ответ опухоли.

Таблица 2. Клинико-патологические характеристики больных НМРЛ в зависимости от изменения уровня EGFR+цодНК на фоне анти-EGFR терапии

	«Плазма-позитивные» (в стартовой точке)*	«Плазма-негативные» (в стартовой точке)*	P value позитивные vs. негативные	Группы пациентов с разными паттернами динамики EGFR+цодНК в плазме				
				«↓» (n=12)	«↑/=» (n=12)**	P-value «↓» vs. «↑/=»	«↑» (n=7)	«=» (n=5)
ctDNA, Cmut *** Base-line: Медиана [min — max]	161 [16 to 4351]	0 [0]	–	299 [7 to 2071]	117 [6 to 4093]	NS (Mann-Whitney U test)	114 [27 — 4093]	127 [6 — 2841]
цодНК, **** Процент изменения (%) Cmut (0h) to Cmut (48h) Медиана [min — max]	–45 [–100 to 254,5]	–	–	–85 [–100,0 to –48,7]	37 [–21,4 to 276,3]	–	95 [35,6 — 276,3]	–11 [–21,4 to 16,7]
Пол								
Мужчины	3 (12%)	1 (20%)	NS (Fisher exact test)	2	1	NS (Fisher exact test)	1	0
Женщины	22 (88%)	4 (80%)		10	11		6	5
Возраст, лет Медиана [min — max]	70 [52 to 82]	67 [59 to 81]	NS (Mann-Whitney U test)	70 [63 to 79]	69,5 [52 to 82]	NS (Mann-Whitney U test)	70 [52 to 82]	66 [61 — 70]
Отдаленные Mts (M)								
M1	20 (80%)	4 (75%)	NS (Fisher exact test)	11	8	0,312 (Fisher exact test)	4	4
M0	5 (20%)	1 (25%)		1	4		3	1
Число метастатических очагов Медиана [min — max]	2 [0 to 4]	1 [0 to 4]	NS (Fisher exact test)	1 [1 to 3]	2 [0 to 4]	NS (Fisher exact test)	2 [0 to 4]	2,5 [0 to 3]
EGFR мутация								
ex19del	16 (64%)	4 (80%)	NS (Fisher exact test)	7	8	NS (Fisher exact test)	5	3
L858R	9 (36%)	1 (20%)		5	4		2	2
EGFR-TKI								
Gefitinib	16 (64%)	4 (80%)	N (Chi-Square test)	8	7	0,254 (Chi-Square test)	6	1
Erlotinib	4 (16%)	1 (20%)		3	1		0	1
Afatinib	3 (12%)	0		0	3		1	2
Osimertinib	2 (8%)	0		1	1		0	1
Base-line: Суммарный объем опухоли, V (мм ³). Медиана [min — max]	29463 [23 to 490590]	9963 [37 to 175455]	0,552 (Mann-Whitney U test)	34527,5 [23 to 159943]	23575 [37 to 490590]	NS (Mann-Whitney U test)	24360 [166 to 111270]	4875 [37 — 490590]
4-я неделя: 1-й RECIST ответ								
Всего, n	25 (100%)	5 (100%)		12 (100%)	12 (100%)		7 (100%)	5 (100%)
CR	0	0	0,045 (Fisher exact test)	0	0	NS (Fisher exact test)	0	0
PR	22 (88%)	3 (63%)		11 (92%)	10 (83%)		7 (100%)	3 (60%)
SD	1 (4%)	2 (25%)		1 (8%)	0		0	0
PD	2 (8%)	0		0	2 (17%)		0	2 (40%)
DCR (CR+PR+SD), n (%)	23 (92%)	5 (100%)	NS (Fisher exact test)	12 (100%)	10 (83%)	NS (Fisher exact test)	7 (100%)	3 (60%)
4-я неделя: Изменения объема опухоли (%) **** Медиана [min — max]	–61,1 [–95,0 to 27,3]	–18,5 [–97,5 to 0,89]	0,214 (Mann-Whitney U test)	–62,1 [–86,9 to 8,4]	–65,7 [–95,0 to 0,02]	NS (Mann-Whitney U test)	–61,1 [–95,0 to –43,9]	–81,4 [–91,4 to 27,30]

	«Плазма-позитивные» (в стартовой точке)*	«Плазма-негативные» (в стартовой точке)*		Группы пациентов с разными паттернами динамики EGFR+цДНК в плазме				
8–12-я неделя: 2-й RECIST ответ								
Не доступны*****	4	1		2	2		0	2
Total, n	21 (100%)	4 (100%)		10 (100%)	10 (100%)		7 (100%)	3 (100%)
CR	0	0	0,173 (Fisher exact test)	0	0	0,017 (Fisher exact test)	0	0
PR	14 (67%)	2 (50%)		8 (80%)	5 (50%)		3 (43%)	2 (67%)
SD	2 (10%)	2 (50%)		2 (20%)	0		0	0
PD	5 (24%)	0		0	5 (50%)		4 (57%)	1 (33%)
DCR (CR+PR+SD), n (%)	16 (76%)	4 (100%)	NS (Fisher exact test)	10 (100%)	5 (50%)	0,032 (Fisher exact test)	3 (43%)	2 (67%)
8–12-я неделя: Изменения объема опухоли (%) **** Медиана [min — max]	0,0 [–99,4 to 2661,1]	–2,64 [–42,8 to 19,0]	NS (Mann–Whitney U test)	0 [–70,6 to 108,8]	–6,7 [–99,4 to 2622,1]	NS (Mann–Whitney U test)	41,0 [–75,4 to 2660,1]	–6,7 [–99,4 to 153,2]
Продолжение снижение опухолевого объема (с 4-й по 8-ю неделю EGFR-TKI терапии)								
Да	8 (38%)	2 (50%)	NS (Fisher exact test)	4	4	Ns (Fisher exact test)	3	1
Нет	13 (62%)	2 (50%)		6	6		4	2
ВБП, мес, [95% CI] Kaplan–Meier method	11,37 [11,24–11,70]	21,03 [na]	0,238 (Breslow test)	14,7 [10,33–15,81]	8,5 [6,27–8,07]	0,013 (Breslow test)	9,2 [5,57–12,87]	6,1 [4,07–8,19]
Прогрессия *****								
Да	18 (72%)	2 (40%)	0,300 (Fisher exact test)	8 (67%)	9 (75%)	Ns (Fisher exact test)	6 (86%)	3 (60%)
Нет	7 (28%)	3 (60%)		4 (33%)	3 (25%)		1 (14%)	2 (40%)

Примечание. NS — недостоверные различия (P value >>0,05); ВБП — время без прогрессирования; RECIST: CR — полный ответ, PR — частичный ответ, SD — стабилизация, PD — прогрессирование, DCR — «контроль заболевания», disease control rate (CR+PR+SD).

* «Плазма-позитивными» считали пациентов, у которых количество мутантных копий, циркулирующих в 1 мл плазмы, было более 5; ** пациент #PrOD исключен из анализа динамики цДНК из-за травмы (см. текст); *** *Stut* — число мутантных копий EGFR на 1 мл плазмы; **** процент изменения (Percentage change)=(New Value — Initial Value)/(Initial Value) × 100%; ***** 5 пациентов не прошли второго КТ-исследования на 8–12-й неделе терапии (см. текст); ***** статус на 20 июля, 2020.

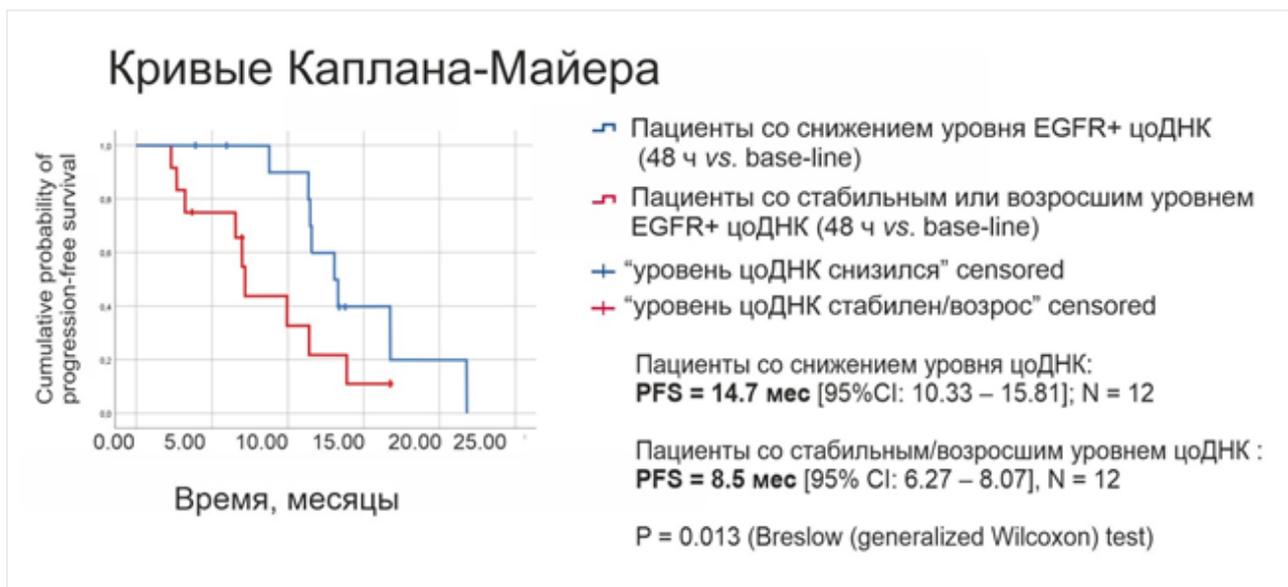


Рис. 2. Анализ параметра ВБП в группах пациентов с разной динамикой EGFR+цДНК в первые часы анти-EGFR терапии

Таблица 3. Серийные измерения концентрации EGFR+цодНК в плазме крови больных НМРЛ на фоне первых часов анти-EGFR терапии

Код	EGFR	Концентрация EGFR+цодНК (Cmut*)												Изменения в цодНК (48ч vs. base-line**)	Ответ опухоли (4 нед)	Ответ опухоли (8–12 нед)	ВБП, мес
		0	30'	1 h	2 h	3 h	6 h	12 h	24 h	36h	48 h	2 wks	4 wks				
BaAG	<i>ex19del</i>	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	nd	nd	0	PR	PR	8,47
BaAU	<i>ex19del</i>	328	456	267	257	388	326	587	715	659	153	0	0	↓	PR	PR	11,47
BeSN	<i>L858R</i>	127	142	142	209	167	713	1273	636	360	129	8	nd	=	PD	na	2,30
VaOG	<i>L858R</i>	29	50	72	38	30	39	56	90	35	84	40	67	↑	PR	PD	2,67
GeRD	<i>ex19del</i>	114	67	52	80	53	65	0	193	100	157	0	0	↑	PR	PD	3,23
GuLB	<i>ex19del</i>	13	6	4	3	0	3	6	0	13	0	0	0	↓	PR	PR	21,80
DaAA	<i>L858R</i>	48	58	24	44	32	45	48	30	22	0	nd	nd	↓	PR	PR	13,77
ZaNA	<i>ex19del</i>	270	159	112	55	159	159	96	33	32	5	nd	nd	↓	PR	PR	11,37
ZaIV	<i>L858R</i>	14	0	0	0	0	0	11	11	0	11	nd	nd	=	PD	PD	7,00
IgVS	<i>ex19del</i>	1180	929	677	736	880	982	445	309	167	291	0	0	↓	PR	PR	13,07
IIGM	<i>ex19del</i>	479	392	305	785	437	395	498	266	435	199	0	0	↓	PR	na (pCR, MPR 4)***	13,37
KoVA	<i>ex19del</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SD	SD	3,23
LeLM	<i>L858R</i>	42	61	135	81	46	66	0	0	53	82	3	0	↑	PR	PD	11,43
LeNN	<i>ex19del</i>	1278	1340	593	2222	3168	2042	728	6798	400	1004	nd	nd	=	PR	PR	7,17
LyLK	<i>L858R</i>	7	0	4	0	8	0	0	0	0	0	0	nd	↓	PR	SD	8,77
MiAI	<i>ex19del</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	PR	na	21,03
MiND	<i>ex19del</i>	49	23	51	10	0	15	31	28	29	0	nd	nd	↓	PR	na (pPR, MPR 2)***	11,53
MuNP	<i>ex19del</i>	6	19	26	18	9	23	3	21	2	7	0	0	=	PR	na	3,70
NiGA	<i>L858R</i>	1584	1619	1100	924	1734	2033	1698	1910	859	730	nd	nd	↓	PR	PR	13,30
NoIE	<i>L858R</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	nd	0	PR	PR	15,77
OgLF	<i>ex19del</i>	4093	4093	6367	8318	5751	6352	15404	13408	29340	15404	nd	nd	↑	PR	PR	9,97
PrOD	<i>ex19del</i>	4351	6077	5023	5559	9949	18883	12576	11099	12115	18403	nd	nd	Исключен****	PR	PR	13,97
RoIV	<i>ex19del</i>	2841	2891	2828	2766	1340	2451	4035	3872	1545	2523	nd	nd	=	PR	PR	6,97
SaNI	<i>ex19del</i>	119	90	94	96	153	105	171	261	347	232	21	21	↑	PR	PR	13,90
SeEK	<i>ex19del</i>	27	24	26	13	19	23	15	67	21	78	0	0	↑	PR	PD	6,53
SmEI	<i>ex19del</i>	161	65	80	132	138	129	96	104	9	60	nd	nd	↓	SD	SD	3,9
TiNY	<i>L858R</i>	845	787	48	32	15	239	394	150	46	47	nd	nd	↓	PR	PR	16,76
FiZE	<i>ex19del</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	nd	0	SD	SD	9,40
CeIH	<i>ex19del</i>	3623	4819	4715	4094	4612	4129	4025	4911	4727	4911	3105	nd	↑	PR	PR	16,77
SuGI	<i>L858R</i>	2071	2074	3168	3014	3212	1141	3590	1672	781	1063	nd	nd	↓	PR	PR	5,97

Примечание. nd — нет данных; na — пациент не прошел КТ-обследование; BeSN — умер на 6-й неделе, IIGM, MiAI, MiND — перенесли циторедуктивную операцию в период между 4-й и 8–12-й неделями терапии, MuNP — не прошел КТ-обследование из-за эпидемиологической обстановки.

* Cmut — число мутантных копий EGFR на 1 мл плазмы (по данным ddPCR); ** изменения в концентрации EGFR+цодНК в точке «48 часов» по сравнению с «нулевой точкой» (base-line): «↓» — Cmut % change ≤ -25%; «↑» — Cmut % change >25%; «=» — Cmut % change ~ 0±25%; «0» — изначально «плазма-негативные» случаи; *** циторедуктивная операция / MPR — Major Pathological Response; **** пациент #PrOD исключен из анализа динамики цодНК из-за травмы (см. текст).

У остальных 12 человек к окончанию вторых суток применения EGFR-ТКИ содержание *EGFR+цодНК* либо осталось неизменным ($n=5$), либо увеличилось ($n=7$) (см. табл. 2, 3). Среднее увеличение уровня цодНК в последней группе составило 95% (диапазон: от 36% до 276%). 10 из 12 пациентов с повышенным или стабильным уровнем цодНК достигли объективного ответа через 4 нед, но только 5 из 10 прошедших КТ-контроль пациентов по-прежнему демонстрировали «контроль заболевания» через 8–12 нед лечения ($p=0,014$ по сравнению с группой с уменьшением цодНК); у остальных больных к этому времени уже началось прогрессирование заболевания (PD); еще один пациент умер до момента второго обследования (см. табл. 2, 3).

Снижение концентрации мутантных фрагментов в плазме к 48 часу приема EGFR-ТКИ было ассоциировано со значительно более длительным ВВП (14,7 мес в группе со снижением цодНК vs. 8,5 мес в группе без снижения цодНК, $p=0,013$; см. табл. 2; рис. 2).

Обсуждение

EGFR-ТКИ характеризуются относительно быстрой абсорбцией, при этом пиковые концентрации в плазме достигаются в течение нескольких часов после приема таблетки (Nakamura и соавт., 2010). По данным экспериментов *in vitro* и *in vivo*, минимальные концентрации препарата, которые обладают достоверным противоопухолевым эффектом, значительно ниже, чем стандартные терапевтические дозы EGFR-ТКИ (Caussials и соавт., 2020). Следовательно, объяснимо, что некоторые пациенты испытывают явное облегчение симптомов в течение первых часов после начала лечения (Langer и соавт., 2009; Conci и соавт., 2020). Действительно, исследования ингибирования EGFR в клеточных линиях показали, что введение EGFR-ТКИ приводит к немедленным биологическим последствиям. Воздействие ТКИ вызывает снижение аутофосфорилирования рецептора EGFR с последующим подавлением ERK, AKT, STAT3 и других сигнальных белков; все эти события наблюдаются в течение 10–30 мин после добавления ТКИ в среду для культивирования клеток (Opo и соавт., 2004; Wu и соавт., 2013). Уменьшение массы опухоли после терапии EGFR-ТКИ, вероятно, связана как с прекращением пролиферации клеток, так и с индукцией апоптоза (Fung и соавт., 2012; Zhao и соавт., 2016). Некоторые данные показывают, что иммунные механизмы также могут способствовать уменьшению размеров опухоли (Ayeni и соавт., 2019). Использование магнитно-резо-

нансной томографии (МРТ) в экспериментах на животных выявило доказательства регрессии опухоли уже в течение 1–7 дней после введения ТКИ (Venugopalan и соавт., 2016; Jia и соавт., 2019). Следовательно, сам факт отмеченного нами немедленного изменения уровня EGFR-мутированной цодНК в плазме в ответ на поступление в опухоль препарата, согласуется с доклиническими наблюдениями.

Нам удалось обнаружить мутации *EGFR* в плазме у 25/30 (83%) пациентов в «нулевой» точке, что весьма близко к опубликованным данным (Normanno и соавт., 2017; Kim и соавт., 2020). Наши наблюдения также подтверждают выводы о том, что изначальное отсутствие *EGFR*-мутантных копий в плазме коррелирует с улучшением показателей безрецидивной выживаемости (Fukuhara и соавт., 2020; Molina-Vila и соавт., 2020). Так же как и другие исследователи (Riediger и соавт., 2016; Phallen и соавт., 2019), мы зафиксировали временное повышение уровня цодНК в течение первых часов лечения в некоторых, но не во всех случаях. Остается неизвестным, связаны ли эти изменения с массовым выделением опухолевых клеток в ответ на лекарство или другими причинами.

Настоящее исследование демонстрирует, что клинический ответ на ТКИ можно с определенной долей уверенности предсказать с помощью анализа немедленных изменений концентрации мутантной цодНК в плазме. Неясно, должны ли неблагоприятные результаты этого плазменного теста побудить клинициста к коррекции терапевтической схемы? В дальнейшем предстоит разобраться, какие именно дополнительные опции могут быть предложены пациентам с потенциально плохим ответом по данным «жидкостной биопсии». В этой связи представляют интерес исследования, подтверждающие перспективность комбинированного применения ингибиторов EGFR-ТКИ и антиангиогенных или цитотоксических препаратов (Yu и соавт., 2020).

Финансирование

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18-75-10070

ЛИТЕРАТУРА

1. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA. et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution // *Nature*. 2017;545(7655):446–451.
2. Akhoundova D, Mosquera Martinez J, Musmann LE et al. The Role of the Liquid Biopsy in Decision-Making for Patients with Non-Small Cell Lung Cancer // *Journal of clinical medicine*. 2020;9(11):3674.
3. Anagnostou V, Forde PM, White JR et al. Dynamics of tumor and immune responses during immune checkpoint

- blockade in non-small cell lung cancer // *Cancer research*. 2019;79(6):1214–1225.
4. Ayeni D, Miller B, Kuhlmann A et al. Tumor regression mediated by oncogene withdrawal or erlotinib stimulates infiltration of inflammatory immune cells in EGFR mutant lung tumors // *Journal for immunotherapy of cancer*. 2019;7(1):1–15.
 5. Bettegowda C, Sausen M, Leary R et al. Detection of circulating tumor DNA in early-and late-stage human malignancies // *Science translational medicine*. 2014;6(224):224ra24–224ra24.
 6. Cayssials E, Torregrosa-Diaz J, Gallego-Hernanz P et al. Low-dose tyrosine kinase inhibitors before treatment discontinuation do not impair treatment-free remission in chronic myeloid leukemia patients: Results of a retrospective study // *Cancer*. 2020;126(15):3438–3447.
 7. Charo LM, Eskander RN, Okamura R et al. Clinical implications of plasma circulating tumor DNA in gynecologic cancer patients // *Molecular Oncology*. 2021;15(1):67–79.
 8. Conci N, Dall'Olio FG, Comellini V et al. «Lazarus effect» in patient affected by lung adenocarcinoma carrying EGFR, CTNNB1, MET exon 11 and PIK3CA mutations treated with gefitinib // *Precision Cancer Medicine*. 2020;3(23):1–5.
 9. Ebert EBF, McCulloch T, Hansen KH et al. Clearing of circulating tumour DNA predicts clinical response to first line tyrosine kinase inhibitors in advanced epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer // *Lung Cancer*. 2020;141:37–43.
 10. Fukuhara T, Saito H, Furuya N et al. Evaluation of plasma EGFR mutation as an early predictor of response of erlotinib plus bevacizumab treatment in the NEJ026 study // *EBioMedicine*. 2020;57:102861.
 11. Fung C, Chen X, Grandis JR, Duvvuri U. EGFR tyrosine kinase inhibition induces autophagy in cancer cells // *Cancer biology & therapy*. 2012;13(14):1417–1424.
 12. Gobbi E, Swalduz A, Levra MG et al. Implementing ctDNA Analysis in the Clinic: Challenges and Opportunities in Non-Small Cell Lung Cancer // *Cancers*. 2020;12(11):3112.
 13. Yu HA, Schoenfeld AJ, Makhnin A et al. Effect of osimertinib and bevacizumab on progression-free survival for patients with metastatic EGFR-mutant lung cancers: a phase 1/2 single-group open-label trial // *JAMA oncology*. 2020;6(7):1048–1054.
 14. Jia Y, Li X, Jiang T et al. EGFR-targeted therapy alters the tumor microenvironment in EGFR-driven lung tumors: Implications for combination therapies // *International journal of cancer*. 2019;145(5):1432–1444.
 15. Jiang M, Gu DN, Dai JJ et al. Dark side of cytotoxic therapy: Chemoradiation-induced cell death and tumor repopulation // *Trends in cancer*. 2020;6(5):419–431.
 16. Kim JO, Shin JY, Kim SR et al. Evaluation of Two EGFR Mutation Tests on Tumor and Plasma from Patients with Non-Small Cell Lung Cancer // *Cancers*. 2020;12(4):785.
 17. Langer CJ. The «lazarus response» in treatment-naive, poor performance status patients with non-small-cell lung cancer and epidermal growth factor receptor mutation // *J Clin Oncol*. 2009;27(9):1350–1354.
 18. Moiseyenko VM, Procenko SA, Levchenko EV et al. High efficacy of first-line gefitinib in non-Asian patients with EGFR-mutated lung adenocarcinoma // *Oncology Research and Treatment*. 2010;33(5):231–238.
 19. Molina-Vila MA, Stahel RA, Dafni U et al. Evolution and clinical impact of EGFR mutations in circulating free DNA in the BELIEF trial // *Journal of Thoracic Oncology*. 2020;15(3):416–425.
 20. Nakamura Y, Sano K, Soda H et al. Pharmacokinetics of gefitinib predicts antitumor activity for advanced non-small cell lung cancer // *Journal of Thoracic Oncology*. 2010;5(9):1404–1409.
 21. Normanno N, Denis MG, Thress KS et al. Guide to detecting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in ctDNA of patients with advanced non-small-cell lung cancer // *Oncotarget*. 2017;8(7):12501.
 22. Ono M, Hirata A, Kometani T et al. Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation // *Molecular cancer therapeutics*. 2004;3(4):465–472.
 23. Phallen J, Leal A, Woodward BD et al. Early noninvasive detection of response to targeted therapy in non-small cell lung cancer // *Cancer research*. 2019;79(6):1204–1213.
 24. Reece M, Saluja H, Hollington P et al. The use of circulating tumor DNA to monitor and predict response to treatment in colorectal cancer // *Frontiers in genetics*. 2019;10:1118.
 25. Riediger AL, Dietz S, Schirmer U et al. Mutation analysis of circulating plasma DNA to determine response to EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy of lung adenocarcinoma patients // *Scientific reports*. 2016;6(1):1–8.
 26. 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 // *Journal of clinical oncology*. 2013;31(27):3327–3334.
 27. Serkova NJ, Eckhardt SG. Metabolic imaging to assess treatment response to cytotoxic and cytostatic agents // *Frontiers in oncology*. 2016;6:152.
 28. Strijker M, Soer EC, de Pastena M et al. Circulating tumor DNA quantity is related to tumor volume and both predict survival in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma // *International journal of cancer*. 2020;146(5):1445–1456.
 29. Venugopalan A, Lee M, Niu G et al. EGFR-targeted therapy results in dramatic early lung tumor regression accompanied by imaging response and immune infiltration in EGFR mutant transgenic mouse models // *Oncotarget*. 2016;7(34):54137.
 30. Wu K, Chang Q, Lu Y et al. Gefitinib resistance resulted from STAT3-mediated Akt activation in lung cancer cells // *Oncotarget*. 2013;4(12):2430.

Поступила в редакцию 26.04.2021 г.

*A.S. Martianov^{1,2}, F.V. Moiseenko³, A.S. Zhabina³,
T.N. Sokolova¹, S.A. Belukhin³, T.A. Laidus^{1,2},
M.M. Kholmatov^{1,2}, V.I. Turin^{1,2}, N.M. Volkov³,
E.S. Kuligina^{1,2}, G.A. Yanus^{1,2}*

Changes in the concentration of EGFR-mutated plasma DNA in the first hours of anti-EGFR therapy allow the prediction of tumor response in patients with EGFR-driven lung cancer

¹ N.N. Petrov National Medical Research Centre of Oncology, St Petersburg

² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, St Petersburg

³ Saint-Petersburg clinical scientific and practical center for specialised types of medical care (oncological), St Petersburg

This study aimed to analyze changes in the plasma concentration of *EGFR*-mutated DNA occurring immediately after the start of therapy with EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs). The study included 30 patients with *EGFR* mutation-driven non-small cell lung cancer (NSCLC). Serial plasma samples were collected before intake of the first tablet and

at 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 36 and 48 hours after the start of the therapy. EGFR-mutated plasma DNA (EGFR+ ctDNA) was detectable at diagnosis in 25 out of 30 study participants. There were different patterns of changes of the amount of circulating tumor DNA, i.e., the consistent decline of ctDNA content, or continuing increase of the number of circulating *EGFR* mutant copies, or alternating spikes and drops in the ctDNA concentration. Correlation with the disease outcome was observed only for the measurement performed at 48 hours. Twelve (50%) out of 24 informative patients showed >25% reduction of the ctDNA content at 48 h time point; all these patients demonstrated disease control after 4 and 8–12 weeks of therapy. The remaining 12 individuals showed either stable content of circulating EGFR+ DNA (n=5) or the elevation of ctDNA concentration (n=7). 10 of 12 patients with elevated or stable ctDNA level achieved an objective response at 4 weeks, but only 5 of 10 evaluable patients still demonstrated disease control at 8–12 weeks (p=0.014, when compared to the group with ctDNA decrease). The decline of the amount of circulating EGFR mutant copies also correlated with longer progression-free survival (PFS; 14.7 months vs. 8.5 months, p=0.013). Conclusion: Monitoring of plasma EGFR-M+ concentration within the first hours of the TKI therapy may be used as an immediate predictor of tumor response to the treatment.

Key words: NSCLC; EGFR; circulating tumor DNA; TKI therapy; tumor response