

П. А. Черненко^{1*}, А. Р. Зарецкий^{2, 3*}, Д. А. Шагин², В. В. Бредер¹, К. К. Лактионов¹

Неинвазивный мониторинг мутаций в гене EGFR у пациентов с немелкоклеточным раком легкого в процессе таргетной терапии: состояние проблемы и собственный опыт

¹ ФГБУН «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН;

² ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н. И. Пирогова» Минздрава России;

³ ООО «Евроген Лаб», Москва

* – авторы внесли равный вклад в работу

«Жидкостная биопсия» — перспективное направление в области молекулярного тестирования злокачественных опухолей в контексте использования таргетных препаратов. В ходе пилотного исследования нами была протестирована высокочувствительная методика детекции мутаций опухолевого происхождения в циркулирующей ДНК плазмы крови на примере пациентов с EGFR-позитивным немелкоклеточным раком легкого, получающих терапию тирозинкиназными ингибиторами. Показана применимость данной методики для динамического мониторинга в процессе таргетной терапии, а также для выявления мутаций, ассоциированных с приобретенной лекарственной резистентностью.

Ключевые слова: мутации EGFR, мутация T790M, немелкоклеточный рак легкого, таргетная терапия, циркулирующая ДНК, «жидкостная биопсия»

Тирозинкиназные ингибиторы белка EGFR (EGFR-ТКИ) являются на сегодняшний день наиболее успешным примером таргетной терапии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ): они позволяют при минимальной токсичности добиться существенных противоопухолевых ответов и увеличить выживаемость без прогрессирования (ВБП) и общую выживаемость (ОВ) — но только у пациентов, имеющих активирующие мутации в гене EGFR [15]. В настоящее время мутации гена EGFR являются стандартными биомаркерами для отбора больных НМРЛ на лечение EGFR-ТКИ [17].

К сожалению, несмотря на впечатляющие ответы и существенное влияние терапии ТКИ-EGFR на выживаемость пациентов с мутациями в гене EGFR, длительность ответа на эту терапию, как правило, не превышает 20 месяцев, после чего практически у всех больных формируется резистентность к терапии ТКИ-EGFR

и происходит прогрессирование заболевания. Описаны различные механизмы формирования устойчивости клеток НМРЛ к ТКИ-EGFR, но чаще всего (в 30-60% случаев) «ответственной» за приобретенную устойчивость к ТКИ-EGFR оказывается вторичная мутация T790M в экзоне 20 гена EGFR [6]. В настоящее время формируется арсенал таргетных препаратов второй и последующих линий [19], в связи с чем, вопрос о молекулярном профилировании приобретенной устойчивости опухоли к ТКИ-EGFR приобретает не только научную, но и клиническую актуальность [8].

В рутинной практике для поиска мутаций в гене EGFR чаще всего используется опухолевая ткань, полученная в результате оперативного вмешательства или биопсии. Тем не менее, оценка мутационного статуса EGFR в опухолевой ткани имеет целый ряд ограничений. Во-первых, даже в крупных хорошо спланированных клинических исследованиях достаточное количество опухолевого материала, пригодного для проведения молекулярной диагностики, удается получить лишь у 20-50% больных НМРЛ, которым не показано оперативное лечение [1]. Во-вторых, эндоскопические и хирургические процедуры могут сопровождаться разного рода осложнениями (их частота может превышать 17% [11]). В-третьих, часть пациентов с распространенным НМРЛ имеет противопоказания к проведению эндоскопических или хирургических вмешательств, в связи с неудовлетворительным соматическим статусом или сопутствующими заболеваниями. В-четвертых, перечисленные выше сложности усугубляются в контексте современного этапа развития таргетной терапии, поскольку появление нескольких возможных линий таргетного лечения делает необходимым неоднократные повторные биопсии опухолевых очагов. Наконец, в-пятых, результат генетического исследования единичного биоптата

может иметь недостаточную прогностическую ценность ввиду внутриопухолевой клональной гетерогенности, которая особенно часто обнаруживается при метастатических опухолях и после воздействия цитостатиков или таргетных препаратов [5].

Учитывая эти ограничения, необходимо найти и отработать более удобные, экономически выгодные и менее инвазивные методы для молекулярного профилирования НМРЛ. Возможной альтернативой традиционной биопсии в данном контексте может оказаться стратегия так называемой «жидкой биопсии» (liquid biopsy) – поиск и анализ молекулярных нарушений опухолевого происхождения в биологических жидкостях пациентов. В большинстве современных исследований под «жидкой биопсией» понимают анализ свободно циркулирующих ДНК в плазме или сыворотке крови.

Внеклеточная опухолевая ДНК (воДНК) в плазме является своего рода свежим образцом, полученным в режиме реального времени. В ряде исследований была продемонстрирована перспективность применения воДНК для обнаружения сенсibiliзирующих мутаций EGFR [21]. Кроме того, динамические изменения мутационного статуса EGFR в воДНК могут предсказывать клинический исход таргетной терапии [10].

Однако, исследование циркулирующих ДНК сопряжено с рядом серьезных методических проблем. С одной стороны, воДНК отличается достаточно низкой абсолютной и крайне низкой относительной концентрацией; кроме того, у части пациентов опухолевая ДНК, скорее всего, просто отсутствует в циркуляции и не может быть обнаружена даже самыми высокочувствительными методами. С другой стороны, исследование «минорных» мутаций чревато не только ложноотрицательными, но и ложноположительными результатами, поскольку процент мутантной ДНК в плазме крови большинства пациентов незначительно превышает уровень технического «шума», генерируемого многими методами молекулярного тестирования.

При углубленном анализе данных литературы было показано, что чувствительность «жидкой биопсии» для анализа мутаций EGFR при НМРЛ колеблется в широких пределах от 17,1% до 100% [18]. При этом уровень совпадения между воДНК и опухолевой тканью также колебался от 27,5% до 100%. Для решения этих проблем были проведены два метаанализа [9,13] с целью сравнения воДНК и опухолевой ткани с точки зрения диагностической точности в отношении обнаружения мутаций EGFR. Суммарная чувствительность анализа воДНК в этих двух ра-

ботах составила 67,4% и 62% при специфичности 93,5% и 95,9%, соответственно. Эти данные подтверждают, что оценка мутаций гена EGFR в воДНК имеет достаточную диагностическую точность.

Отдельно следует остановиться на проблеме анализа мутации T790M в гене EGFR, ассоциированной с приобретенной резистентностью к ТКИ-EGFR.

Актуальность данной проблемы не вызывает сомнений. Наличие мутации T790M в гене EGFR однозначно ассоциировано с устойчивостью к гефитинибу, эрлотинибу и афатинибу и с чувствительностью к ТКИ-EGFR 3-го поколения, таким как осимертиниб и роцилети-ниб. При этом оптимальная стратегия ведения пациентов с этой мутацией до сих пор окончательно не определена. Помимо ТКИ-EGFR 3-го поколения, опухолевые клетки с мутацией T790M, по-видимому, обладают потенциальной чувствительностью к комбинациям афатиниба с цетуксимабом и эрлотиниба с паклитаксолом и, кроме того, способны элиминироваться в отсутствие давления отбора в виде терапии ТКИ-EGFR 1-2 поколений [2]. Не установлена окончательно и прогностическая значимость данной мутации. Так, в исследовании Z. Wang с соавт. было показано, что у больных с *de novo* мутацией T790M по сравнению с пациентами без T790M ниже медиана выживаемости без прогрессирования (8,9 против 12,1 мес., $p=0,007$) и медиана общей выживаемости (19,3 против 31,9 мес., $p=0,001$), независимо от наличия при этом сенсibiliзирующей мутации EGFR [20]. Однако, по данным нескольких других исследований появление в опухолевых клетках мутации T790M было связано с улучшением прогноза после терапии ТКИ-EGFR по сравнению с пациентами без T790M [12]. Опухолевые клетки с мутацией T790M характеризуются не только устойчивостью к терапии ТКИ-EGFR, но также и относительно медленной скоростью пролиферации [2]. В связи с этим можно предположить, что *de novo* мутация T790M определяет плохой прогноз при лечении ТКИ-EGFR, тогда как приобретенная T790M ответственна за относительное улучшение прогноза.

При исследовании мутации T790M в ДНК плазмы крови возникают две дополнительные трудности, отсутствующие в случае анализа многих других распространенных мутаций в онкогенах.

Во-первых, не совсем ясно, является ли эта мутаций приобретенной или присутствует в части опухолевых клеток изначально. Если раньше мутация T790M рассматривалась как вторичная мутация, приобретенная в результате

длительной терапии, в последнее время имеется все больше данных, позволяющих предположить, что T790M может с низкой частотой присутствовать в образцах опухоли до терапии ТКИ-EGFR [16]. При этом, благодаря использованию высокочувствительных методов тестирования, в ряде исследований частота мутации T790M колебалась от 40% до 79% в образцах больных НМРЛ с наличием сенсibiliзирующей мутации гена EGFR, которые ранее не получали терапию ТКИ-EGFR [14]. В связи с этим не совсем понятно, как следует клинически интерпретировать положительный результат теста воДНК на мутацию T790M.

Во-вторых, структурные особенности исследуемого микрорегиона гена EGFR (кодон 790) способствуют появлению ложнопозитивных результатов при тестировании на мутацию T790M. Эта мутация на уровне ДНК является заменой цитозина на тимин в положении перед гуанином (ACG>ATG), а такая замена представляет собой «горячую точку» для спонтанного повреждения ДНК путем дезаминирования [4]. В связи с этим практически в любом образце ДНК можно обнаружить небольшую фракцию молекул с подобным повреждением ДНК, которое большинство современных тест-систем будет «прочитывать» как мутацию T790M; в особенности это касается ДНК из фиксированных формалином образцов, а также образцов ДНК после длительного хранения или воздействия высоких температур. Данная особенность объясняет описанный в научной литературе факт не совсем удовлетворительной работы некоторых тест-систем на мутацию T790M при их использовании на клиническом материале [3]; можно предположить, что она вносит некоторый вклад и в полученные рядом авторов данные о присутствии мутации T790M более чем в половине образцов НМРЛ до начала таргетной терапии.

Тем не менее, имеются работы высокого методического уровня, в которых тестирование ДНК плазмы крови пациентов с НМРЛ на мутацию T790M в гене EGFR оказывается надежным биомаркером. Так, в работе Z. Wang с соавт. [15] частота мутации T790M при исследовании воДНК плазмы составила 31% у ранее не леченных больных (de novo) и 43% – у получавших терапию ТКИ-EGFR, что соответствовало значениям, полученным при тестировании образцов опухоли. В этой работе мутация T790M была также проанализирована в 11 парных образцах опухоли и плазмы, при этом конкордантность составила 64%, а специфичность – 100%. В другом исследовании было продемонстрировано, что частота соответствия выявляемой мутации T790M между ДНК опухолевой ткани и плазмы

после терапии ТКИ-EGFR составила 63% и 71% при использовании технологии Cobas и секвенирования ДНК, соответственно [7].

Принимая во внимание эти данные, можно заключить, что использование плазмы крови для детекции мутации T790M в гене EGFR в воДНК плазмы представляет собой многообещающий подход, который может быть инкорпорирован в стратегию ведения пациентов с НМРЛ, получающих терапию ТКИ-EGFR.

Материалы и методы

В исследование включали пациентов с распространенным EGFR-позитивным НМРЛ, получающих терапию ТКИ-EGFR.

Молекулярно-генетические исследования проводили в соответствии с инструкциями производителей наборов реагентов и собственными протоколами ООО «Евроген Лаб». Методики мутационного анализа предварительно валидировались на референсных смесях ДНК с известным процентным соотношением мутаций (Tru-Q, Horizon Dx, США), а также на образцах ДНК, выделенной из опухолевой ткани пациентов с известными мутациями в гене EGFR и из плазмы крови здоровых доноров.

Кровь для молекулярного анализа забирали однократно в объеме 18 мл. В качестве консерванта для цельной крови использовали реагент «Плазма ПротектДНК» (ЗАО «Евроген», Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Плазму крови отделяли от клеток крови по стандартным протоколам не позднее 5 суток с момента забора крови.

ДНК из плазмы крови выделяли с помощью набора реагентов «QiaAMP Circulating NA Kit» (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и качество выделенной ДНК оценивали методом ПЦР-РВ с помощью набора реагентов «Квантум ДНК» (ЗАО «Евроген», Москва) с длиной продукта ПЦР 91 п. о.

Наиболее часто встречающиеся мутации в «горячих точках» 18-го, 20-го и 21-го экзонов гена EGFR исследовали либо методом цифровой аллель-специфической ПЦР с флуоресцентной детекцией по «конечной точке», либо методом мутационно-специфической ПЦР в режиме реального времени. В первом случае использовали прибор QuantStudio 3D и реагенты серии TaqMan SNP Genotyping Reagents, во втором случае – прибор ABI 7500 и наборы реагентов серии TaqMan Mutation Detection Assays (все – Life Technologies, США).

Результаты и обсуждение

По итогам предварительной валидации, используемые методики детекции 25 основных мутаций в гене EGFR (G719C, G719S и G719A в 18-м экзоне; 19 вариантов делеций в 19-м экзоне; T790M в 20-м экзоне; L858R и L861Q в 21-м экзоне) были признаны пригодными для достоверного анализа циркулирующей ДНК. Чувствительность методик составила 7-10 копий ДНК с мутацией, частота ложноположительных и ложноотрицательных результатов – менее 0,05%. Избирательность мутационного анализа составила 1 : 2 000 для делеций, 1 : 1 000 для мутаций G719C, G719A и L861Q и 1 : 250

для мутаций G719S, T790M и L858R. Методы цифровой ПЦР и аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени продемонстрировали полностью сопоставимые показатели.

В исследование было включено 85 больных распространенным НМРЛ с активирующими мутациями в гене EGFR, получающих терапию низкомолекулярными ингибиторами белка EGFR – гефитинибом, эрлотинибом или афатинибом. Основные характеристики сформированной группы достаточно адекватно отражают характеристики российской популяции пациентов с EGFR-позитивным НМРЛ (табл. 1). Средний возраст пациентов составил 61,4 года, среди них преобладали женщины (n = 76) и некурящие пациенты (n = 73). У всех пациентов гистологически была верифицирована аденокарцинома. Среди мутаций в первичной опухоли преобладали делеции в 19-м экзоне (n = 55) и мутация L858R (n = 21).

У каждого пациента производили однократный забор периферической крови для мутационного анализа циркулирующей ДНК. Медиана времени от начала приема таргетного препарата до забора крови составила 57 недель (диапазон 9 – 207). Всем больным была проведена оценка опухолевого ответа по шкале RECIST. По результатам этой оценки на момент забора крови у 16 пациентов был констатирован контроль заболевания (частичная регрессия опухоли или

стабилизация), у 42 – рентгенологические признаки прогрессирования и у 27 – клинические и рентгенологические признаки опухолевой прогрессии. Случаев бурного прогрессирования и висцерального криза зафиксировано не было.

Результаты мутационного анализа циркулирующей ДНК плазмы крови суммированы в табл. 2. Драйверные мутации в гене EGFR были выявлены в циркулирующей ДНК 48 пациентов, т. е. клиническая чувствительность метода составила 56,5%. Следует отметить, что более чем в трети случаев (n = 20) относительная концентрация мутантной ДНК в плазме крови составила менее 1%, что ниже порога избирательности классических вариантов ПЦР-анализа – т. е. в этих случаях нам удалось выявить мутацию опухолевого происхождения именно благодаря использованию методик с повышенной избирательностью.

Частота выявления мутаций в плазме коррелировала с типом опухолевого ответа на момент забора крови: так, мутации обнаруживались у 20 из 27 пациентов (74%) с клиническими и рентгенологическими признаками прогрессирования, тогда как в подгруппе группы пациентов с контролем заболевания мутации удалось выявить всего в 5 случаях из 16 (31%; p = 0,011, 2-сторонний критерий Фишера). Связь частоты выявления мутаций в плазме с другими клиническими и молекулярными факторами выяв-

Таблица 1.

Характеристика пациентов, включенных в исследование
(n = 85)

Характеристики	Значения
Возраст, лет Среднее значение Диапазон	61,4 28 – 82
Пол, n (%) Мужчины Женщины	9 (10,6) 76 (89,4)
Статус курения, n (%) Курящие Не курящие	12 (14,1) 73 (85,9)
Гистологический тип опухоли, n (%) Аденокарцинома	85 (100)
Исходный мутационный статус гена EGFR в ткани первичной опухоли, n (%) Делеции в 19-м экзоне Мутация L858R Мутация G719X Мутация G719X + E709A Мутация G719X + L861Q Неизвестно	55 (64,7) 21 (24,7) 1 (1,2) 1 (1,2) 2 (2,3) 5 (5,9)
Применяемый таргетный препарат, n (%) Гефитиниб (Иресса) Эрлотиниб (Тарцева) Афатиниб (Гиотриф)	47 (55,3) 13 (15,3) 25 (29,4)
Эффект таргетной терапии на момент забора крови, n (%) Контроль заболевания Рентгенологические признаки прогрессирования Клинические и рентгенологические признаки прогрессирования	27 (31,8) 42 (49,4) 16 (18,8)

Таблица 2.

Распределение больных по мутационному статусу EGFR в ДНК плазмы крови

Эффект таргетной терапии на момент забора крови	Мутационный статус ДНК плазмы крови			
	Исходная мутация выявлена мутация T790M не выявлена	Исходная мутация выявлена мутация T790M выявлена	Исходная мутация не выявлена мутация T790M выявлена	Исходная мутация не выявлена мутация T790M не выявлена
Прогрессирование (клинические и рентгенологические признаки)	9	11	2	5
Прогрессирование (только рентгенологические признаки)	18	5	3	16
Контроль заболевания	3	2	1	10

лена не была. В частности, вопреки гипотезе, выдвинутой по итогам исследования ASSESS (Normanno et al., AACR 2016), наши данные демонстрируют одинаковую частоту выявления мутаций у пациентов в возрасте до 65 лет и старше (58% vs 56%). Также не прослеживается связь между частотой выявления мутаций в плазме крови и типом мутации. Так, две самых частых разновидности мутаций EGFR – делеции в 19-м экзоне и мутация L858R – несмотря на их различный биологический эффект и абсолютно разные методические особенности детекции в циркулирующей ДНК, в нашей выборке были выявлены в плазме крови 60% и 62% пациентов, соответственно.

Мутация T790M в 20-м экзоне гена EGFR, преимущественно ассоциированная с приобретенной резистентностью к тирозинкиназным ингибиторам 1-2 поколений, была выявлена в плазме крови 24 пациентов (28%). Как и следовало ожидать, большинство этих случаев ($n = 21$) пришлось на пациентов с зарегистрированным прогрессированием опухолевого процесса. Тем не менее можно отметить две особенности: во-первых, в 3 случаях мутация T790M была детектирована у пациентов с контролем заболевания, а во-вторых, у 6 пациентов в ДНК плазмы крови была выявлена мутация T790M, но не первичная мутация. Подобные случаи могут объясняться, соответственно, относительно низкой скоростью пролиферации опухолевых клеток с мутацией T790M и сосуществованием в опухоли клеток с различным профилем молекулярных нарушений (внутриопухолевой гетерогенностью). Окончательный ответ на вопрос о частоте и клинической значимости такого рода явлений может быть получен только в ходе дальнейших исследований. В настоящий момент ситуация осложняется тем, что тестирование на мутацию T790M пока не включено в список тестов, рутинно проводимых на материале первичной опухоли, и поэтому сопоставление результатов тестирования опухолевой ткани и циркулирующей ДНК не всегда технически осуществимо. Что касается участников нашего исследования, то 6 пациентов, у которых было выявлено прогрессирование заболевания и детектирована мутация T790M в плазме крови, впоследствии приняли участие в клиническом исследовании AURA 3, в ходе которого им была выполнена биопсия одного из прогрессирующих очагов и наличие мутации T790M было подтверждено анализом биопсийного материала в центральной лаборатории. Эти данные показывают потенциальную пригодность используемой нами методики для коррекции таргетной терапии у пациентов с EGFR-позитивным НМРЛ «в режиме реального времени».

Выводы

В ходе проведенного пилотного исследования показана техническая выполнимость анализа мутаций в гене EGFR в циркулирующей ДНК пациентов с НМРЛ в процессе терапии низкомолекулярными ингибиторами EGFR – «жидкой биопсии». Аналитическая чувствительность применяемого нами метода позволяет достоверно детектировать «минорные» мутации, присутствующие в циркулирующей ДНК в относительной концентрации менее 1%. Клиническая чувствительность метода зависит от ответа опухоли на терапию. Полученные результаты в целом соответствуют данным литературы.

Также показана возможность достоверного выявления в плазме крови пациентов, получающих терапию ТКИ-EGFR 1-2 поколений, мутации EGFR T790M, ассоциированной с приобретенной резистентностью к этим препаратам, в том числе до начала прогрессирования болезни.

С учетом существенных преимуществ «жидкой биопсии», таких как минимально инвазивный характер теста, быстрый срок исполнения и возможность регулярного мониторинга «мутационной нагрузки», а также неизбежных ограничений метода, главным из которых является клиническая чувствительность порядка 50-70%, необходимо проведение дальнейших проспективных клинических исследований с целью определения места данного метода в алгоритмах ведения пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-35-00105.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brugger W., Triller N., Blasinska-Morawiec M., et al. Prospective molecular marker analyses of EGFR and KRAS from a randomized, placebo-controlled study of erlotinib maintenance therapy in advanced non-small-cell lung cancer // J Clin Oncol. – 2011. – Vol. 29 (31). – P. 4113–4120.
2. Chmielecki J., Foo J., Oxnard GR. et al. Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling // Sci Transl Med. – 2011. – Vol. 6 (90):90ra59. doi: 10.1126/scitranslmed.3002356.
3. Cushman-Vokoun A. M. et al. Comparison study of the performance of the QIAGEN EGFR RGQ and EGFR pyro assays for mutation analysis in non-small cell lung cancer // Am J Clin Pathol. – 2013. – Vol. 140 (1). – P. 7–19.
4. Do H., et al. Reducing sequence artifacts in amplicon-based massively parallel sequencing of formalin-fixed paraffin-embedded DNA by enzymatic depletion of uracil-containing templates // Clin Chem. – 2013. – Vol. 59 (9). – P. 1376–1383.
5. Hata, A., et al. Spatiotemporal T790M Heterogeneity in Individual Patients with EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer after Acquired Resistance to EGFR-TKI // J Thorac Oncol. – 2015. – Vol. 10 (11). – P. 1553–1559.

6. Kobayashi S., Boggon T. J., Dayaram T. et al. (2005) EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib // *N Engl J Med.* – 2005. – Vol. 352. – P. 786–792.
7. Kuang Y., Rogers A., Yeap B. Y. M., et al. (2009) Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant nonsmall cell lung cancer // *Clin Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15. – P. 2630–2636.
8. Levy B. P., et al. Molecular Testing for Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: How to Implement Evidence-Based Recommendations // *Oncologist.* – 2015. – Vol. 20 (10). – P. 1175–1181.
9. Luo J., Shen L., Zheng D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis // *Sci Res.* – 2014-. – Vol. 4. – P. 6269.
10. Mok T., Wu Y. L., Lee J. S. et al. Detection and dynamic changes of EGFR mutations from circulating tumor DNA as a predictor of survival outcomes in NSCLC patients treated with first-line intercalated erlotinib and chemotherapy // *Clin Cancer Res.* 2015. – Vol. 15 (14). – P. 3196–3203.
11. Overman M. J., Modak J., Kopetz S. et al. Use of research biopsies in clinical trials: are risks and benefits adequately discussed? // *J Clin Oncol.* – 2013. – Vol. 31 (1). – P. 17–22.
12. Oxnard G. R., Arcila M. E., Sima C. S. et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation // *Clin Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1616–1622.
13. Qiu M., Wang J., Xu Y. et al. Circulating tumor DNA is effective for the detection of EGFR mutation in non-small cell lung cancer: a meta-analysis // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2015. – Vol. 24 (1). – P. 206–212.
14. Rosell R., Molina M. A., Costa C. et al. Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced nonsmall-cell lung cancer patients with EGFR mutations // *Clin Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1160–1168.
15. 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. Vol. 13. – P. 239–246.
16. Sequist L. V., Martins R. G., Spigel D. et al. Firstline gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations // *J Clin Oncol.* – 2008. – Vol. 26. – P. 2442–2449.
17. Sharma S. V., Bell D. W., Settleman J., Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer // *Nat Rev Cancer.* – 2007. – Vol. 7 (3). – P. 169–181.
18. Sun W., Yuan X., Tian Y. et al. Non-invasive approaches to monitor EGFR-TKI treatment in non-small-cell lung cancer // *J Hematol Oncol.* – 2015. – Vol. 8. – P. 95.
19. Wang, S., et al. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer // *J Hematol Oncol.* – 2016. – Vol. 12 (1). – P. 34.
20. Wang Z., Chen R., Wang S. et al. Quantification and dynamic monitoring of EGFR T790M in plasma cell-free DNA by digital PCR for prognosis of EGFR-TKI treatment in advanced NSCLC // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 18 (11). – P. 110780.
21. Yung T. K., Chan K. C., Mok T. S. et al. (2009) Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients // *Clin Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15. – P. 2076–2084.

Поступила в редакцию 06. 06. 2016 г.

P. A. Chernenko^{1}, A. R. Zaretsky^{2,3*}, D. A. Shagin²,
V. V. Breder¹, K. K. Laktionov¹*

Non-invasive monitoring of EGFR mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) during targeted therapy: State of the art and our experience

¹N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center

²N. I. Pirogov Russian National Research Medical University

³ Evrogen Lab LLC

Moscow

* – these authors contributed equally to the work

Liquid biopsy is a promising approach to molecular tumor testing in the context of targeted therapy. During this pilot study we applied a high-sensitivity protocol for detection of tumor-derived mutations in circulating plasma DNA of EGFR-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) patients during EGFR-TKI therapy. We showed that this protocol was well suited for dynamic monitoring during targeted therapy as well as for detection of acquired resistance mutations.

Key words: EGFR mutations, T790M mutation, NSCLC, targeted therapy, circulating DNA, liquid biopsy