

Прогностическое и предиктивное значение различных мутаций гена EGFR и новые решения таргетной терапии

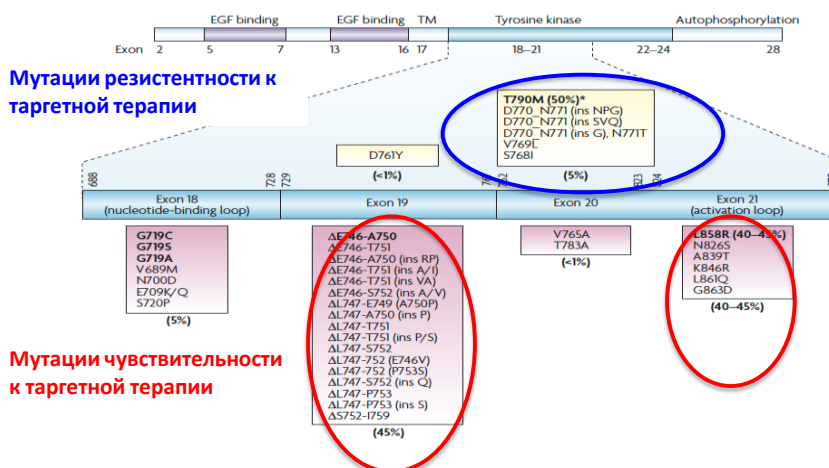
Демидова И.А., лаборатория молекулярной
диагностики МГОб №62
Москва

Современные рекомендации (CAP-IASLC-AMP 2013,
аналогично- рекомендации ESMO и RUSSCO) по
исследованию мутаций гена EGFR и перестроек ALK

- Рекомендовано обследование всех больных с неплоскоклеточным НМРЛ без учета клинических и демографических данных
- Анализ назначается пациентам с распространенными формами болезни или при прогрессировании
- При выявлении мутаций таргетные препараты должны быть назначены в первой линии терапии
- Исследование мутаций гена EGFR должно иметь приоритет перед всеми остальными генетическими маркерами при НМРЛ (доказательность I степени, или уровень A)

Lindeman et al, J Thor Oncol Feb 2013

Мутации гена EGFR при НМРЛ



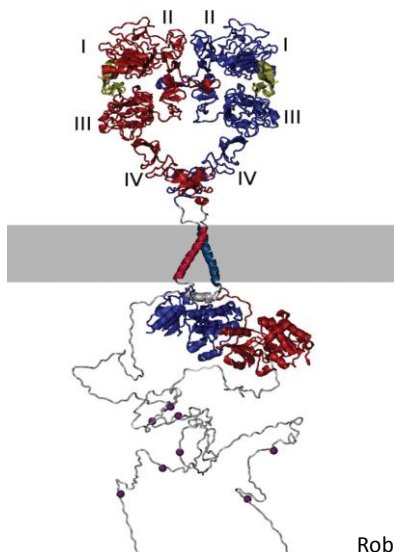
Paez et al., Science 2004; Lynch et al., NEJM 2004; Pao et al., PNAS 2004

Что еще мы знаем о них, но редко вспоминаем?

- В различных базах данных зарегистрировано более 250 видов мутаций 18-21 экзонов EGFR при НМРЛ. Более 60% из них обнаруживались однократно (артефакты?)
- Сложные мутации (сочетание двух и более мутаций 18-21 экзонов) довольно редки (не более 5%), эффект ингибиторов изучен плохо (кроме сочетаний с T790M)
- Известны также принципиально другие типы мутаций, встречающиеся в том числе и при НМРЛ – делеции 2-7 экзонов EGFR (EGFR viii) (практически нечувствительны к ингибиторам) и делеции 25-27 экзонов (EGFR-CTD deletions) (чувствительны к анти-EGFR Mabs).

Murray S et al, J Thor Oncol, 2008, Weeler et al, Oncogene 2010, Park et al Oncotarget 2015

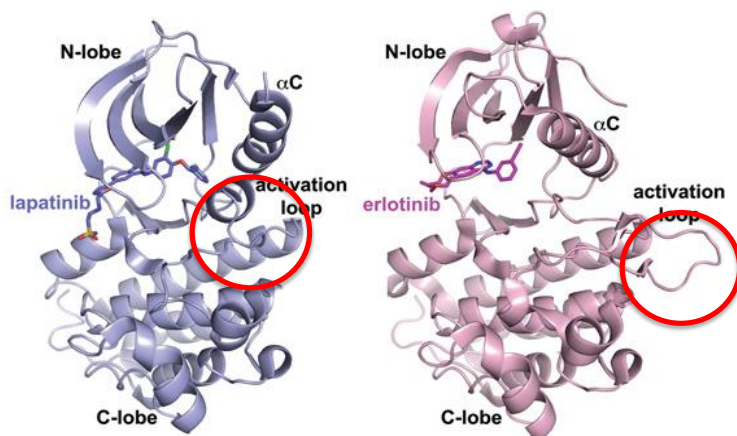
Структура рецепторов семейства ERBB - ERBB1(EGFR)



- EGFR (ERBB1) представляет собой протеин размером 170kDa (1186 аминокислот)
- Внеклеточная часть домена состоит из 4 субдоменов, участвующих в связывании лиганда и димеризации (процессы для EGFR автономны)
- Трансмембранная часть также участвует в димеризации
- Тирозинкиназный домен расположен внутриклеточно и его функция – связывание АТФ и дальнейшая передача сигнала белкам субстрата

Roberts K, Biochem Soc Trans 2012 Kumar,A, JCO 2008

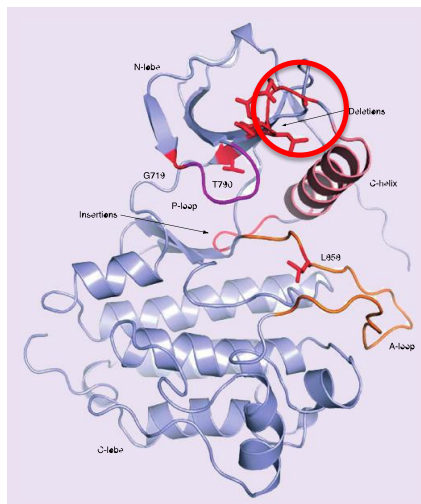
Как активируется протеин в норме?



Присоединение активирующего субстрата (лиганда) изменяет конформацию протеина, освобождая «активирующую петлю» и делает возможным связывание энергетической молекулы (АТФ) со структурами связывающего кармана

Yasuda et al *Lancet Oncol* 2012; 13: e23–31

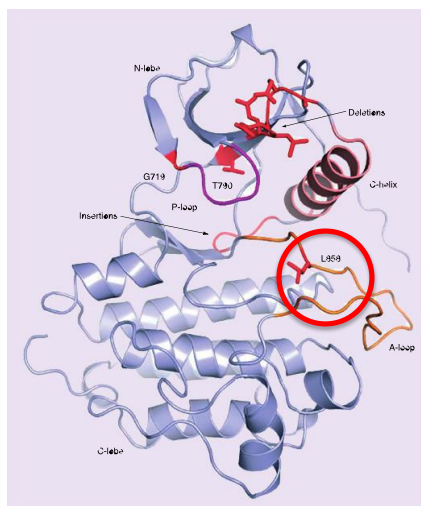
Каким образом мутации активируют протеин?



- Делеции 19 экзона убирают 3-9 аминокислот в α -петле вблизи АТФ-связывающего кармана, меняя его конфигурацию на приближенную к активированной и приводя к предпочтительному связыванию с ИТК, а не с АТФ, при этом K_M АТФ самая высокая
- Разная чувствительность разных делеций (разная степень фосфорилирования Y1092)?

Reguart and Remon Future Oncology 2015,
Carey Cancer Res 2008, Kaneda, Lung Cancer 2014

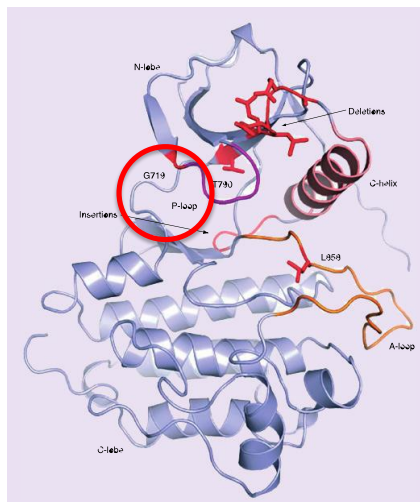
Каким образом мутации активируют протеин?



- Мутация L858R в 21 экзоне представляет собой замену маленького гидрофобного лейцина на крупный высокополяризованный аргинин, что приводит к нарушению конформации активационной петли, потере гидрофобной «оси» и нестабильности АТФ-связывающего кармана
- Степень дефосфорилирования на фоне ИТК ниже, чем при del19 (практически не снижается в Y845)

Reguart and Remon Future Oncology 2015

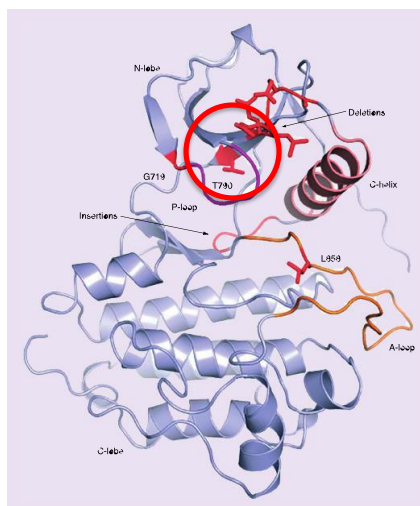
Каким образом мутации активируют протеин?



- Мутация G719X в 18 экзоне расположена в богатой глицином зоне (фосфат-связывающей петле), замена глицина на другую аминокислоту нарушает способность АТФ-связывающего кармана поддерживать неактивную конформацию
- Однако тропность к ИТК существенно меньше

Kumar et al, JCO 2008

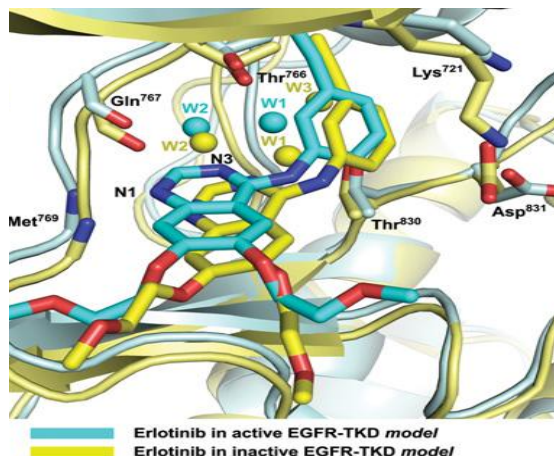
Каким образом мутации активируют протеин?



- Мутации 20 экзона отличаются большим разнообразием в зависимости от локализации
- T790M –gatekeeper -приводит к восстановлению аффинности к АТФ
- Инсерции, расположенные до Met766 потенциально чувствительны, их влияние похоже на L858R, расположенные далее – меняют конформацию киназы в конце С-петли, не влияя на АТФ-связывающий карман, поэтому нечувствительны к ИТК

Yasuda, Sci Transl Med 2013

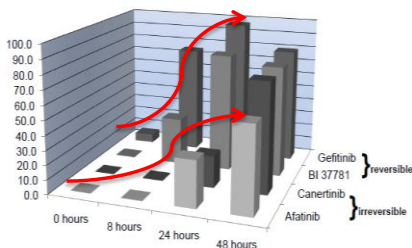
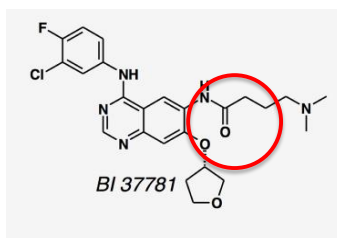
Возможно ли связывание ингибиторов I класса с рецептором без мутаций ТК домена (неактивным)?



- Взаимодействие ИТК I с неактивным рецептором осуществляется с участием тех же T766, G767, T830
- Однако K_M для ИТКИ превышает K_M АТФ почти в 25 раз

Park Biochem J 2012

Чем отличается действие обратимых и необратимых ингибиторов?



J Pharm Med Ther 2012;34(2):143-150

- В результате добавления к молекуле ингибитора электрофильной группы возникает прочная нековалентная связь с цистеином 797 в АТ-связывающнм кармане. Гидролиз необратимого ингибитора происходит гораздо медленнее связь с рецептором сохраняется дольше

Solca et al J Pharmacology Exp Therapy 2012

Как различный механизм действия мутаций влияет на чувствительность к ингибиторам *in vitro*?

50% ингибирующие концентрации (IC_{50}) обратимых ингибиторов (гефитиниб, эрлотиниб) и необратимого ингибитора (афатиниб), необходимых для контроля роста клеток культур опухоли

Ингибитор	EGFR WT		EGFR L858R	EGFR L858R + T790M	EGFR del19	EGFR del19 + T790M
	LoVo	A431	H3255	H1975 T790M+	PC9	PC9 VanR T790M+
Афатиниб	15	28	0.9	22	0.6	3
Гефитиниб	59	73	11	3102	7	741
Эрлотиниб	91	250	9	6073	6	1262

Cross DA *Cancer Discov.* 4(9), 1046–1061 (2014)

Как результаты клинических исследований отражают различную активность мутаций?

Исследования III фазы при НМРЛ с частыми мутациями гена EGFR: выживаемость без прогрессирования в зависимости от мутации (лечение ИТК)

Исследование	Все частые мутации; n ВБП; HR; P-value	Del19; n; ВБП; HR; P-value	Exon 21; n ВБП; HR; P-value
IPASS	130 пациентов	66 пациентов	64 пациента
	Не представлено	11.0 мес. HR 0.38	9.2 мес. HR 0.55
EURTAC	86 пациентов	57 пациентов	29 пациентов
	9.7 мес. HR 0.37; P<0.0001	11.0 мес. HR 0.3; P<0.0001	8.4 мес. HR 0.55; P=0.0539
LUX-Lung 3 ^a	204 пациента	113 пациентов	91 пациент
	13.6 мес. HR 0.47; P=0.001	13.7 мес. HR 0.28; P=0.01	10.8 мес. HR 0.73; P=0.01
OPTIMAL	82 пациента	43 пациента	39 пациентов
	13.1 мес. HR 0.16; P<0.0001	15.3 мес. HR 0.13)	12.5 мес. HR 0.26
LUX-Lung 6 ^a	216 пациентов	124 пациента	92 пациента
	13.7 мес. HR 0.25	13.7 мес. HR 0.20	9.6 мес. HR 0.32
ENSURE	110 пациентов		
	11.0 мес. HR 0.34; P<0.0001	11.1 мес. HR 0.20	8.3 мес. HR 0.57

LUX-Lung 3 и 6: общая выживаемость в подгруппах пациентов с частыми мутациями

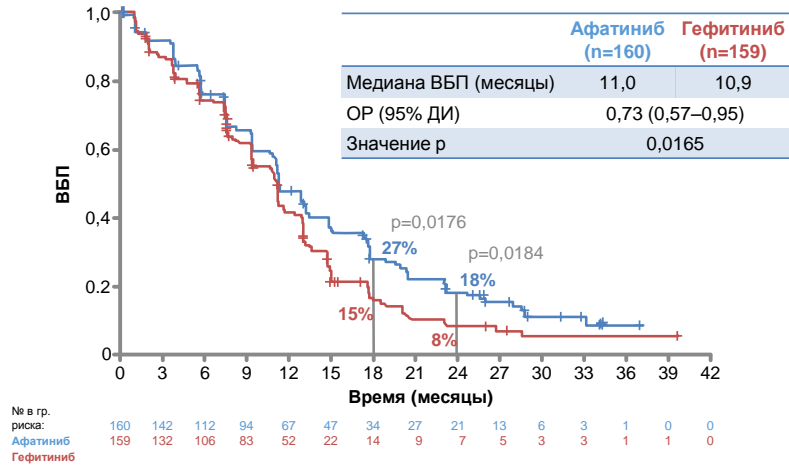
Factors	К-во пациентов	Медиана (мес)	HR
LUX-Lung 3			
Мутация гена EGFR			
Del19/L858R (в целом)	307	31.6 vs 28.2	0.78
Del19	169	33.3 vs 21.1	0.54
L858R	138	27.6 vs 30.3	1.30
LUX-Lung 6			
Мутация гена EGFR			
Del19/L858R (в целом)	324	23.6 vs 23.5	0.83
Del19	186	31.4 vs 18.4	0.64
L858R	138	19.6 vs 24.3	1.22
Объединённый анализ			
Мутация гена EGFR			
Del19/L858R (в целом)	631	27.3 vs 24.3	0.81
Del19	355	31.7 vs 20.7	0.59
L858R	276	22.1 vs 26.9	1.25

Yang et al. ASCO 2014. Abstract 8004.

← Преимущество Афатиниба | Преимущество ХТ →

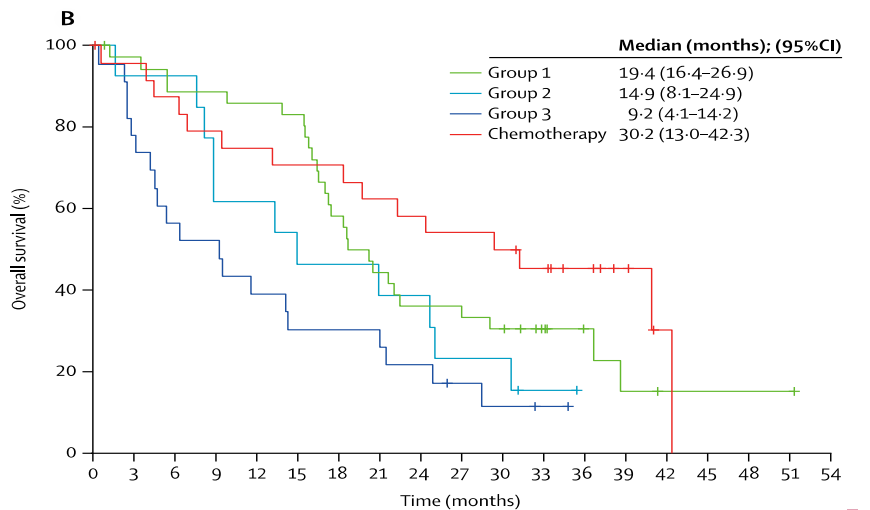
Но есть ли отличие при прямом сравнении обратимых и необратимых ингибиторов?

LUX Lung7 - ВБП: независимая оценка



Park et al. *Ann Oncol.* 2015;26: (suppl 9; abstract LBA2).

Как действует афатиниб на редкие мутации EGFR?



Yang et al, *Lancet* 2015

Насколько мы можем учесть другие биологические факторы?

- Наличие клона с первичной мутацией T790M или другими мутациями резистентности?
- Амплификация *EGFR* и *cMET*
- Экспрессия других генов, ассоциированных с резистентностью (*BRCA&BIM*)?
- Степень гетерогенности опухоли?

Какие можно сделать выводы?

- Как обратимые, так и необратимые ингибиторы тирозинкиназ эффективно работают при активирующих мутациях *EGFR*, повышающих чувствительность к ИТК
- Особенно эффективны препараты при делециях 19 экзона, особенности применения при мутации в 21 экзоне (L858R) требуют дальнейшего изучения
- Необратимый ингибитор афатиниб показал наилучшие результаты общей выживаемости для пациентов с делецией 19 экзона (медиана - более 30 месяцев) по результатам исследований LUX-Lung и 3 LUX-Lung-6

Спасибо за внимание!