

非小细胞肺癌患者外周血表皮生长因子受体 T790M 检测与奥希替尼疗效的相关性研究

龚磊^{1,2}, 潘志文¹, 覃晶^{1,2}, 谢发君^{1,2}, 韩娜^{1,2}, 卢红阳^{1,2}

(1. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022; 2. 浙江省胸部肿瘤(食管、肺)诊治技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 评估非小细胞肺癌患者第一代表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)获得性耐药后外周血 EGFR T790M 突变的阳性率和用外周血 T790M 检测结果预测奥希替尼疗效的可靠性。[方法] 回顾性分析 2017 年 3 月至 2018 年 6 月经第一代 EGFR-TKI 治疗后获得性耐药且使用超扩增阻滞突变系统(ultra-amplification refractory mutation system, Ultra-ARMS)进行外周血 EGFR T790M 检测的原发性非小细胞肺癌患者。评估血 T790M 阳性患者使用奥希替尼的疗效。[结果] 共有 103 例符合标准的第一代 EGFR-TKI 获得性耐药患者, 其中 28 例(27.2%, 28/103)血 T790M 阳性, 75 例(72.8%, 75/103)血 T790M 阴性。血 T790M 阳性患者中, 接受奥希替尼治疗有 23 例: 部分缓解(partial response, PR) 15 例, 疾病稳定(stable disease, SD) 6 例, 疾病进展(progression of disease, PD) 2 例。疾病控制率(disease control rate, DCR) 91.3%, 客观有效率(objective response rate, ORR) 65.2%。奥希替尼治疗的中位无进展生存时间(progression free survival, PFS) 12.5 个月(95%CI: 11.2~13.8)。有 9 例血 T790M 阴性患者后续进行了组织检测, 3 例在组织中检测到 T790M 突变。有 6 例血 T790M 阴性的患者虽未再行组织检测, 但要求试用奥希替尼靶向治疗, 1 例患者获得了 PR, 1 例 SD(PFS 超过 5 个月)。[结论] 对第一代 EGFR-TKI 获得性耐药后未能再次行组织活检的非小细胞肺癌患者, Ultra-ARMS 方法检测血 T790M 阳性可预测奥希替尼疗效。血 T790M 检测阴性的患者建议再次取组织进行 T790M 检测以排除假阴性。组织检测是 T790M 检测的金标准, 血 T790M 检测可作为补充。

关键词: 奥希替尼; 表皮生长因子受体; 酪氨酸激酶抑制剂; 非小细胞肺癌

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2019)03-0234-06

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2019.03.A013

Epidermal Growth Factor Receptor T790M Detection in Predicting Efficacy of Osimertinib in Patients with Non-small Cell Lung Cancer

GONG Lei^{1,2}, PAN Zhi-wen¹, QIN Jing^{1,2}, XIE Fa-jun^{1,2}, HAN Na^{1,2}, LU Hong-yang^{1,2}

(1. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Diagnosis & Treatment Technology on Thoracic Oncology (Lung and Esophagus), Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To detect epidermal growth factor receptor (EGFR) p.Thr790Met point mutation (T790M) in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and to investigate the correlation between T790M detection and the efficacy of osimertinib. [Methods] One hundred and three NSCLC patients, who developed resistance to first generation EGFR-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) and admitted in Zhejiang Cancer Hospital from March 2017 to June 2018, were enrolled in the study. Plasma EGFR T790M was tested by ultra-amplification refractory mutation system (Ultra-ARMS). The efficacy of osimertinib in T790M-positive NSCLC patients was analyzed. [Results] Among 103 EGFR-TKI resistant NSCLC patients, plasma T790M was positive in 28 cases (27.2%) and negative in 75 cases (72.8%). In 23 plasma T790M-positive patients receiving osimertinib treatment, there were partial response (PR) in 15 cases, stable disease (SD) in 6 cases and progression of disease (PD) in 2 cases. The disease control rate (DCR) was 91.3%, and the objective response rate (ORR) was 65.2%. The median progression free survival (PFS) of osimertinib was 12.5 (95%CI: 11.2~13.8) months. Nine plasma T790M-negative patients were subsequently examined with tissue specimens, and 3 of them were T790M-positive. Six plasma T790M-negative patients without tissue tests were treated with osimertinib, among whom 1 achieved PR, and 1 achieved SD (PFS was longer than 5 months). [Conclusion] Plasma T790M detec-

收稿日期: 2018-09-25; 修回日期: 2018-11-24

基金项目: 浙江省医药卫生科技面上项目课题资助(2018KY313)

通信作者: 卢红阳, E-mail: luhyy@zjcc.org.cn

tion can predict the efficacy of osimertinib in NSCLC patients with first-generation EGFR-TKI resistance. Patients with plasma negative T790M are suggested to perform tissue T790M test to exclude false negative results.

Key words: osimertinib; epidermal growth factor receptor; tyrosine kinase inhibitor; non-small cell lung cancer

表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI)是表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)基因敏感突变的晚期肺癌患者一线治疗方案^[1-4]。虽然对EGFR-TKI的最初反应率很高,中位无进展生存期(progression free survival, PFS)为10~14个月,但几乎所有患者最终会发生耐药。EGFR-TKI获得性耐药的最常见机制是*EGFR* T790M点突变,50%~60%的获得性耐药患者T790M检测阳性。T790M突变导致*EGFR*基因20号外显子第790位点上的甲硫氨酸取代苏氨酸,从而导致耐药^[5,6]。2017年3月24日国家食品药品监督管理总局批准上市肺癌新药奥希替尼片(AZD9291)。奥希替尼是第三代不可逆的选择性*EGFR*突变抑制剂,适用于第一代EGFR-TKI耐药后T790M阳性的局部晚期或转移性非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者^[7]。

*EGFR*突变检测目前仍以组织标本检测为金标准,但是在临床工作中,由于再活检依从性较差,缺乏可再活检部位等原因,使得可供基因检测的肿瘤组织标本往往难以获取^[8]。外周血中存在来自肿瘤细胞坏死、凋亡释放的循环游离DNA(circulating free DNA, cfDNA),这些cfDNA承载了肿瘤的生物信息^[9]。外周血基因检测在NSCLC患者*EGFR*基因突变检测中有很大潜力。目前血*EGFR* T790M突变检测方法有多种,如BEAMing、Cobas、扩增阻滞突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)、ddPCR、NGS等,其中ARMS法是最常用、最成熟的外周血*EGFR*基因突变检测的方法。这些检测方法的敏感性和特异性有所差异,用于预测奥希替尼疗效孰优孰劣目前还没有定论^[10-13]。

Ultra-ARMS方法基于实时荧光定量PCR平台,利用突变特异扩增PCR和熔解曲线分析结合检测基因特定突变。该技术以ARMS为主,融合了熔解曲线(melting curve)和野生型DNA阻滞序列野生型

阻滞探针两种技术,荧光PCR检测体系中所用指示剂为Evagreen荧光染料。ARMS引物与野生型阻滞探针保证PCR反应特异扩增突变DNA,而野生型背景DNA不被扩增;Evagreen染料收集突变扩增信号和熔解信号;熔解曲线区分非特异性扩增片段,进一步提高荧光PCR检测的敏感性和特异性。因此,Ultra-ARMS法是传统ARMS法的改进。

由于奥希替尼在国内上市时间较短,中国患者真实世界中外周血*EGFR* T790M检测与奥希替尼疗效的相关性尚未见报道。我们回顾性分析了浙江省肿瘤医院使用Ultra-ARMS方法检测第一代EGFR-TKI获得性耐药患者外周血*EGFR* T790M突变的阳性率,以及基于该方法的检测结果使用奥希替尼治疗NSCLC的可靠性。

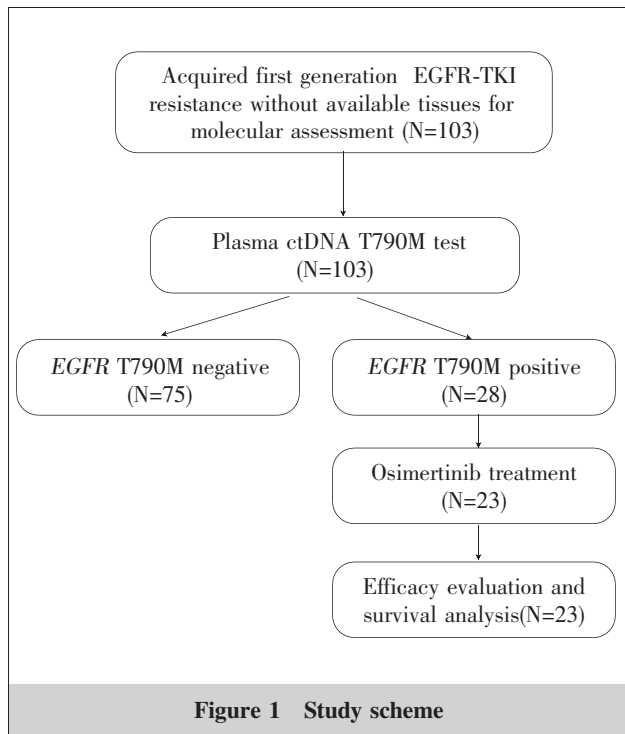
1 资料与方法

1.1 研究资料收集

回顾性分析浙江省肿瘤医院2017年3月至2018年7月经第一代EGFR-TKI治疗后获得性耐药且行外周血*EGFR* T790M检测的原发性NSCLC患者。纳入标准:①存在*EGFR*敏感突变的原发性NSCLC患者;②根据RECIST 1.1版标准有可评价病灶;③既往临床受益于第一代EGFR-TKI单药治疗(吉非替尼、埃克替尼、厄洛替尼),包括完全缓解、部分缓解或超过6个月的疾病稳定;④第一代EGFR-TKI药物维持治疗后最终疾病进展;⑤耐药后行血*EGFR* T790M检测;⑥血*EGFR* T790M检测前未接受其他全身治疗。排除标准:①任何因素造成的样本污染;②在开始奥希替尼治疗之后进行血*EGFR* T790M检测。符合入组标准,不符合排除标准的患者共103例。研究流程见图1(Figure 1)。

1.2 血浆标本采集与血浆循环DNA提取

经静脉采集外周血液5ml,置入EDTA抗凝离



心管,2000r/min 离心 10min, 吸取上清血浆转移至 1.5ml 离心管中,12 000r/min 离心 10min, 取上清置于 1.5ml 离心管,离心管保存于-30℃冰箱。解冻后按 QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen 公司)操作说明提取游离 DNA,DNA 溶于 60μl 双蒸水中。提取的血浆 DNA 样本可直接上机进行 PCR 扩增。

1.3 检验方法

采用苏州为真公司 EGFR 基因突变检测试剂盒(国械注准 20153401032)。每次 PCR 反应中,每份样品和阳性质控、无模板对照同时分析。

①纯化水用途:作为反应体系的缓冲液;无模板对照的模板;作为 DNA 样本稀释液。

②血浆样本游离 DNA 可直接检测。将 2×检测反应混合液、阳性质控、纯化水以及稀释成同一浓度的待测组织样本基因组 DNA 或外周血游离 DNA 插入冰盒中,恢复全室温,快速离心,将 DNA 聚合酶快速离心后置于冰上,不需要混匀。

③在反应体系加入各种成分,每个反应体系总体积为 20μl:2×检测反应混合液 10μl,样品 DNA/阳性质控/纯化水 5μl,DNA 聚合酶 2μl,纯化水补足至 20μl。

④加样完成后,充分混匀后离心,放入 PCR 仪中。

⑤打开仪器窗口,按照说明书指定扩增、熔解、冷却、荧光检测反应程序进行设置。

1.4 阳性判断值

Ct 值临界值:T790M 阳性: <44,ΔCt 值 11; T790M 阴性为 ≥44。

阳性质控:阳性质控 Ct 值 <45 且峰型正常。

阳性标本:在某个位点有典型 S 型扩增曲线,且这位点的熔解峰型 T_m 值与阳性质控该位点熔解峰型的 T_m 值的差值绝对值小于或等于 1。

1.5 临床疗效评估方法

奥希替尼用法为 80mg,1 次/d,持续服用直至病情进展或毒性不可耐受。疗效评估:近期疗效采用实体瘤疗效评价标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors,RECIST) 1.1 版分为完全缓解(complete remission,CR)、部分缓解(partial response,PR)、疾病稳定(stable disease,SD)和疾病进展(progression of disease,PD),获得 CR 或 PR 的患者 4 周后再确认疗效。疾病控制率(disease control rate,DCR)=(CR+PR+SD)病例数/总病例数,客观有效率(objective response rate,ORR)=(CR+PR) 病例数/总病例数。远期疗效为 PFS。PFS 定义为从奥希替尼治疗开始至疾病进展或任何原因导致死亡的时间。

1.6 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行数据分析。EGFR 突变状态与 PFS 的关系采用 Kaplan-Meier 法分析,Log-rank 检测差异有无统计学意义。率的比较采用卡方检测。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 入组病例一般情况

入组 103 例患者,按国际肺癌研究协会(IASLC)第 8 版 TNM 分期均为 IV 期。男性 25 例,女性 78 例;年龄范围 42~71 岁,中位年龄 59 岁;腺癌 92 例,腺鳞癌 2 例,低分化非小细胞癌 9 例;行为状态评分(PS)0~1 分 96 例,PS 2 分 7 例;吸烟 22 例,不吸烟 81 例。一线接受第一代 EGFR-TKI 治疗 76 例,二线或二线以上接受第一代 EGFR-TIK 治疗 27 例。EGFR 21 外显子 L858R 突变 56 例(54.4%),19 外显子 DEL 突变 47 例(45.6%)(Table 1)。

2.2 外周血 T790M 检测结果

在 103 例患者中,共检测到 28 例 T790M 阳性,75 例 T790M 阴性。T790M 阳性率 27.2%(28/103)。

Table 1 Baseline characteristics of study patients(N=103)

Characteristics	Cases	Proportion (%)
Age(years)		
≥60	71	68.9
<60	32	31.1
Gender		
Male	25	24.3
Female	78	75.7
WHO performance status		
0~1	96	93.2
2	7	6.8
Histology		
Adenocarcinoma	92	89.4
Adenosquamous carcinoma	2	1.9
Other	9	8.7
EGFR mutations before first generation TKI therapy		
L858R	56	54.4
19DEL	47	45.6
Prior treatment		
First generation EGFR-TKI as first line	76	73.8
First generation EGFR-TKI as second line or third line	27	26.2

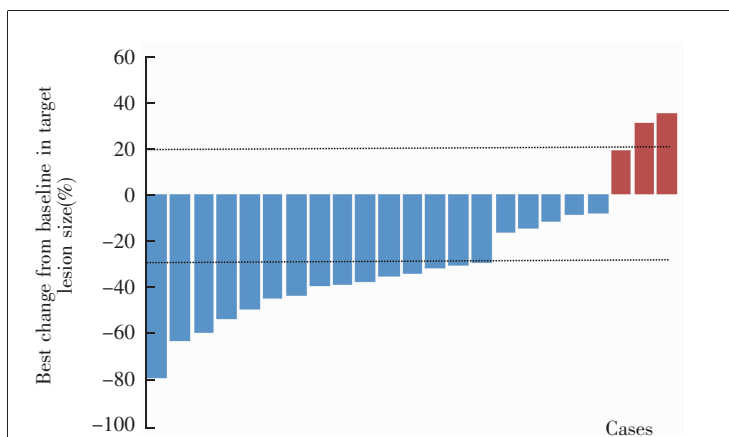


Figure 2 Best percentage change from baseline in target lesion size for patients with plasma T790M positive NSCLC receiving osimertinib therapy(N=23)

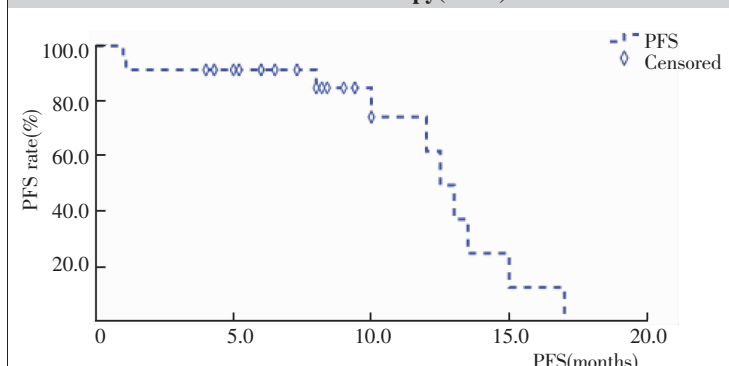


Figure 3 Progression free survival (PFS) for osimertinib therapy(N=23)

其中 19 外显子 DEL 突变的患者检测到 12 例患者 T790M 阳性,35 例 T790M 阴性;21 外显子 L858R 突变的患者检测到 16 例患者 T790M 阳性,40 例患者 T790M 阴性。T790M 阳性率分布在 19 外显子 DEL 突变和 21 外显子 L858R 突变患者中差异没有统计学意义($P=0.157$)。

有 9 例外周血 T790M 阴性患者后续进行了再次活检和组织检测,3 例在组织中检测到 T790M 突变。

2.3 奥希替尼靶向治疗疗效评估

外周血 T790M 阳性患者中有 23 例接受了奥希替尼靶向治疗。其中 PR 15 例(65.2%),SD 6 例(26.1%),PD 2 例(8.7%)。DCR 为 91.3%(21/23),ORR 65.2%(15/23)。每个患者的病灶变化情况见图 2(Figure 2)。无 3/4 级不良反应发生。截至 2018 年 8 月,10 例患者出现疾病进展,13 例患者仍在口服奥希替尼治疗。奥希替尼治疗的中位 PFS 为 12.5 个月(95%CI:11.2~13.8)。PFS 曲线见图 3(Figure 3)。

值得注意的是,有 6 例血 T790M 阴性的患者虽未再行二次活检和组织检测,但要求试用奥希替尼靶向治疗,1 例患者获得了 PR,1 例 SD(PFS 时间超过 5 个月),其余 4 例无效。

3 讨论

EGFR-TKI 靶向治疗进展后患者常常缺乏可用的组织进行 EGFR T790M 分子评估^[8]。比如骨转移在高达 50%的 EGFR 突变的 NSCLC 中存在,对于只有骨转移的患者,由于活检标本脱钙会损害 DNA 质量,因此缺乏可用的组织标本。其他具有挑战性的情况包括在疾病进展时肿瘤位置或大小不佳,不适合活检^[14]。据报道至少 23%的肺癌患者在获得性耐药时只得到了有限的、低质量的组织供肿瘤基因分析^[6,14,15]。

外周血“液体活检”进行 ctDNA 分析具有一些潜在的用途,例如:①用于肿瘤分子分

析的替代样品^[9];②用于监测靶向治疗疗效的潜在动态标记^[16];③早期检测耐药突变等^[17,18]。在Ⅰ期和Ⅱ期 AURA 试验的回顾性分析中,使用 BEAMing 方法在中心血实验室分析血 T790M 状态,发现奥希替尼对血浆中 T790M 阳性的患者有等同于组织 T790M 阳性患者的疗效^[11]。前瞻性的研究提示,根据 eTAm-Seq 检测血 ctDNA T790M 结果可以指导奥希替尼二线治疗 EGFR 突变型 NSCLC 患者的疗效;在可评估的患者中,血 T790M 阳性患者奥希替尼的 PR 为 62.5%,6 个月和 12 个月的中位 PFS 分别为 66.7% 和 52%^[19]。本研究发现外周血 T790M 阳性患者接受奥希替尼治疗的 ORR 65.2%,DCR 91.3%。作为比较,AURA 研究的Ⅱ期扩展研究提示第一代 EGFR-TKI 耐药后再活检组织 T790M 阳性患者,接受奥希替尼的 ORR 62%,DCR 90%^[20]。因此,本研究提示基于 Ultra-ARMS 检测方法的血 T790M 阳性患者使用奥希替尼,其疗效与组织标本研究相近。

尽管如此,T790M 检测的金标准仍然是组织标本。本研究中,有 9 例血 T790M 阴性患者后续进行了再次活检和组织检测,3 例在组织中检测到 T790M 突变。有 6 例血 T790M 阴性的患者虽未再行组织检测,但要求试用奥希替尼靶向治疗,1 例患者获得了 PR,1 例 SD (PFS 时间超过 5 个月),2 例患者均临床获益。既往研究证明,血 T790M 阳性率低于组织标本检测的阳性率,血检测存在假阴性,因此对于血检测 T790M 阴性的患者,应设法再次行组织活检^[10]。血 T790M 阳性率显著低于组织标本检测的阳性率的原因可能有:①组织标本中肿瘤细胞 DNA 含量比血浆多;②血液中 ctDNA 来源于部分肿瘤细胞坏死释放,并非与肿瘤组织的生物学信息完全一致;③组织标本和血标本采用了同一检测方法;如果血液标本采用敏感性更高的方法,可能使血标本阳性率得到提升。

本研究表明采用 Ultra-ARMS 方法,第一代 EGFR-TKI 获得性耐药的患者的血浆 T790M 阳性率为 27.2%。本研究血检测 T790M 阳性率与其他一些方法的血检测结果相近,比如日本西部肿瘤学小组 WJOG 8014LTR 研究采用 ddPCR 检测方法发现第一代 EGFR-TKI 耐药患者血 EGFR T790M 阳性率为 28.8%^[13]。另一项研究用 Scorpion ARMS 方法检测提示吉非替尼或厄洛替尼耐药患者血 T790M 阳性率

为 45.2%(19/42),高于本研究的阳性率^[12]。因此,我们认为需要进一步的研究将 Ultra-ARMS 方法与其他血液 T790M 检测方法同时比较,才能更好阐明它们之间的阳性率差异。

综上所述,对第一代 EGFR-TKI 耐药后未能再次行组织活检的患者,Ultra-ARMS 方法检测血 T790M 阳性可预测奥希替尼疗效。血 T790M 检测阴性的患者建议再次取组织进行 T790M 检测以排除假阴性。组织检测是 T790M 检测的金标准,血 T790M 检测可作为补充。

参考文献:

- [1] 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[J]. Lancet Oncol,2012,13:239-246.
- [2] Maemondo M,Inoue A,Kobayashi K,et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. N Engl J Med,2010,362:2380-2388.
- [3] Mok TS,Wu YL,Thongprasert S,et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma [J]. N Engl J Med,2009,361:947-957.
- [4] Wu YL,Zhou C,Hu CP,et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6):an open-label,randomised phase 3 trial[J]. Lancet Oncol,2014,15:213-222.
- [5] Arcila ME,Oxnard GR,Nafa K,et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay [J]. Clin Cancer Res,2011,17:1169-1180.
- [6] Yu HA,Arcila ME,Rekhtman N,et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers [J]. Clin Cancer Res,2013,19:2240-2247.
- [7] Cross DA,Ashton SE,Ghiorghiu S,et al. AZD9291,an irreversible EGFR TKI,overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer [J]. Cancer Discov,2014,4:1046-1061.
- [8] Remon J,Menis J,Hasan B,et al. The APPLE trial:feasibility and activity of AZD9291 (osimertinib) treatment on positive plasma T790M in EGFR-mutant NSCLC patients [J]. Clin Lung Cancer,2017,18:583-588.

- [9] Jovelet C, Ileana E, Le Deley MC, et al. Circulating cell-free tumor DNA analysis of 50 genes by next-generation sequencing in the prospective MOSCATO trial [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22: 2960–2968.
- [10] Jenkins S, Yang JC, Ramalingam SS, et al. Plasma ctDNA analysis for detection of the EGFR T790M mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2017, 12: 1061–1070.
- [11] Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (AZD9291) in advanced non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2016, 34: 3375–3382.
- [12] Kuang Y, Rogers A, Yeap BY, et al. Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: 2630–2636.
- [13] Takahama T, Sakai K, Takeda M, et al. Detection of the T790M mutation of EGFR in plasma of advanced non-small cell lung cancer patients with acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors (West Japan Oncology Group 8014LTR Study) [J]. Oncotarget, 2016, 7: 58492–58499.
- [14] Bosc C, Ferretti GR, Cadranet J, et al. Rebiopsy during disease progression in patients treated by TKI for oncogene-addicted NSCLC [J]. Target Oncol, 2015, 10: 247–253.
- [15] Hata A, Katakami N, Yoshioka H, et al. T790M heterogeneity in individual patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer after acquired resistance to EGFR-TKI [J]. J Thorac Oncol, 2015, 10: 1553–1559.
- [16] Marchetti A, Palma JF, Felicioni L, et al. Early prediction of response to tyrosine kinase inhibitors by quantification of EGFR mutations in plasma of nscl patients [J]. J Thorac Oncol, 2015, 10: 1437–1443.
- [17] Sorensen BS, Wu L, Wei W, et al. Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib [J]. Cancer, 2014, 120: 3896–3901.
- [18] Murtaza M, Dawson SJ, Pogrebniak K, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer [J]. Nat Commun, 2015, 6: 8760.
- [19] Remon J, Caramella C, Jovelet C, et al. Osimertinib benefit in EGFR-mutant NSCLC patients with T790M-mutation detected by circulating tumour DNA [J]. Ann Oncol, 2017, 28: 784–790.
- [20] Yang JC, Ahn MJ, Kim DW, et al. Osimertinib in pretreated T790M-positive advanced non-small-cell lung cancer: AURA study phase II extension component [J]. J Clin Oncol, 2017, 35: 1288–1296.