

Paweł Krawczyk¹, Janusz Milanowski^{1, 2}¹Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie²Instytut Medycyny Wsi w Lublinie

Czynniki molekularne w indywidualizacji leczenia systemowego niedrobnokomórkowego raka płuca — odległa przyszłość czy teraźniejszość?

Molecular factors in individualisation of chemotherapy in non-small cell lung cancer — is it far future or close present?

Adres do korespondencji:

Dr hab. med. Paweł Krawczyk
Katedra i Klinika Pneumonologii,
Onkologii i Alergologii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin
Tel.: +48 (81) 724 42 93
Faks: +48 (81) 724 42 83
e-mail: pulm.lab@am.lublin.pl

STRESZCZENIE

Indywidualizacja stosowania terapii systemowych, w tym chemioterapii w zaawansowanym niedrobnokomórkowym raku płuca (NDRP), staje się faktem. Do niedawna rozpoznawanie histopatologiczne, stopień zaawansowania nowotworu oraz stan sprawności chorych decydowały o wyborze metody leczenia. Jednak taki sposób kwalifikacji chorych wiązał się z dużym odsetkiem niepowodzeń terapii. Wiadomo obecnie, że czynniki molekularne mogą decydować o skuteczności leczenia. Do niekorzystnych czynników predykcyjnych w leczeniu związkami platyny należy wysoka ekspresja enzymu rozpoznającego miejsca uszkodzenia DNA w komórkach nowotworowych — ERCC1. Oporność na gemcytabinę warunkuje wysoka aktywność enzymu naprawy DNA — RRM1. Alkaloidy *vinca* oraz taksoidy nie hamują podziałów komórki, jeśli we wrzecionie kariokinetycznym występuje klasa III β -tubuliny. Analogi kwasu foliowego (pemetreksed) hamują syntezę puryn i pirymidyn, ale tylko w komórkach o niskiej ekspresji enzymów zależnych od folianów, takich jak syntaza tymidylowa. Niepodważalna jest korzystna rola obecności mutacji w eksonach 19 i 21 genu *EGFR*. Natomiast dyskusyjny jest obecnie wpływ powielenia liczby kopii genu *EGFR* w komórkach nowotworowych na skuteczność niektórych leków ukierunkowanych molekularnie, na przykład inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR. Trwają badania nad wpływem stężenia cząsteczek adhezji międzykomórkowej (ICAM) i naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w surowicy krwi na efekt działania leku antyangiogenego — bewacyzumabu. Oznaczenia niektórych z czynników predykcyjnych (np. mutacje w genie *EGFR*) już wkrótce będą wykorzystane w rutynowej diagnostyce podczas kwalifikacji do leczenia. W przypadku innych metod występują duże trudności związane z problemami w uzyskaniu miarodajnych i powtarzalnych wyników u wszystkich chorych. Synteza nowych leków oraz postęp w wykrywaniu silnych czynników predykcyjnych już dzisiaj zaowocowały wydłużeniem czasu i poprawą jakości życia chorych.

Słowa kluczowe: niedrobnokomórkowy rak płuca, czynniki predykcyjne, chemioterapia, naprawa DNA, β -tubulina, aneuploidia, inhibitory kinazy tyrozynowej, EGFR

ABSTRACT

The individualization of systemic therapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) becomes fact. Recently, chosen of therapy's methods were depended on histopathological diagnosis, stage of disease and patients' performance status. However, the percentage of patients with resistance to chemotherapy was high. Currently, it was shown that molecular factors may determine treatment efficacy. The high expression of excision repair cross complementing group 1 (ERCC1) enzyme, which recognizes DNA damage, is unfavorable predictive factors in platinum-based therapy. High activity of subunit M1 of ribonucleotide reductase (RRM1) is connected with the resistance to gemcitabine treatment. Among the all mechanisms regarding the resistance to anti-tubulin agents (*vinca* alkaloids and taxanes), the overexpression of class III β -tubulin is of particular interest. Folate analogous — pemetrexed — works by inhibiting enzymes (thymidylate synthase, dihydrofolate reductase and glycinamide ribonucleotide formyltransferase) used in purine and pyrimidine synthesis. The favourable role of *EGFR* gene mutations during therapy with the tyrosine kinase domain inhibitors is unquestionable. However, the predictive role of *EGFR* gene amplification in these therapies is receding into the background. The level of ICAM and VEGF in serum as well as polymorphism of *VEGF*, *ICAM* and *IL-8* genes could be practical predictive factors for bevacizumab therapy. Presently, the estimation of several predictive factors (e.g. mutation in *EGFR* gene) is used in routine diagnostic during qualification into specific treatment in lung cancer. Although, still is the paucity of reliable and repeatedly molecular methods to estimate the predictive, genetic factors. Currently, the prolongation of overall survival of patients with NSCLC is connected with both: new therapeutic agent synthesis as well as with predictive factors detection.

Key words: non-small cell lung cancer, predictive factors, chemotherapy, DNA repair, β -tubulin, aneuploidy, tyrosine kinase inhibitors, EGFR

Onkol. Prak. Klin. 2010; 6, 2: 62–72

Wstęp

W Polsce z powodu raka płuca w ostatnich latach umiera rocznie około 22 tysięcy osób, co stanowi około 24% wszystkich zgonów z powodu nowotworów złośliwych. Większość — około 85% — pierwotnych nowotworów o wspomnianej lokalizacji stanowi niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP).

Doszczętne leczenie chirurgiczne NDRP jest możliwe w Polsce jedynie u około 15% chorych z rozpoznaniem NDRP we wczesnym stadium zaawansowania. Stosowanie chemioterapii adiuwantowej poprawia efekty leczenia operacyjnego w grupie chorych na NDRP w II i IIIA stopniu zaawansowania [1].

Zaawansowany NDRP jest chorobą nieuleczalną. Pierwsze próby efektywnej chemioterapii paliatywnej w NDRP datuje się na lata 80. ubiegłego wieku i wiąże się one z wprowadzeniem do leczenia związków platyny. W latach 90. zaczęto stosować dwulekowe schematy chemioterapii z udziałem związków platyny w połączeniu z etopozydem, gemcytabiną, winorelbiną, paklitakselem lub docetakselem. W wyniku stosowania chemioterapii uzyskano wydłużenie czasu przeżycia całkowitego chorych o 1,5–2 miesiące (do około 8 miesięcy), a odsetek chorych żyjących rok lub dłużej wzrósł o około 10%. Niestety, obiektywną odpowiedź obserwowano jedynie u 25–30% chorych, niezależnie od stosowanego schematu leczenia. Stabilizacja choroby występowała u kolejnych 30% chorych, a w pojedynczych przypadkach dochodziło do całkowitej remisji [2].

Czynniki predykcyjne i oporność na chemioterapię

Niezadowalające efekty leczenia i brak odpowiedzi u znacznego odsetka chorych skłoniły badaczy do poszukiwania klinicznych i molekularnych czynników predykcyjnych, pozwalających przewidzieć efekt chemioterapii. Czynniki predykcyjne wskazują na prawdopodobieństwo uzyskania odpowiedzi na zastosowane leczenie i możliwość odniesienia korzyści w zakresie wskaźników przeżycia. Zależność między czynnikami predykcyjnymi a przebiegiem choroby po leczeniu może być ilościowa (zarówno u chorych z korzystnym czynnikiem predykcyjnym, jak i u chorych bez niego efekt leczenia jest zauważalny) lub jakościowa (efekt leczenia widoczny jest jedynie w grupie chorych, u których występują korzystne czynniki predykcyjne, natomiast w drugiej grupie leczenie nie przynosi rezultatu lub nawet pogarsza rokowanie). W odróżnieniu od czynników predykcyjnych czynniki prognostyczne określają rokowanie niezależnie od rodzaju zastosowanego leczenia.

Największą wartość predykcyjną ma czynnik, którego wartość prognostyczna jest niewielka lub nawet jego obecność może pogarszać rokowanie. W przypadku czynników molekularnych istotną kwestią jest ich obecność tylko w komórkach nowotworowych. Jeśli analiza ma charakter ilościowy, a badany czynnik występuje na różnym poziomie w komórkach prawidłowych i zmienionych nowotworowo, to miarodajny wy-

nik uzyskuje się dopiero po odseparowaniu jednych komórek od drugich. Wartościowymi czynnikami predykcyjnymi będą także te, których przydatność wykazano w badaniach porównujących różne rodzaje terapii, a nie tylko aktywne postępowanie i placebo.

Jedną z pierwszych prób indywidualizacji postępowania na podstawie rozpoznania histopatologicznego było zastosowanie bewacyzumabu u chorych z niepłaskonabłonkowym NDRP. W przypadku chorych z rakiem gruczołowym w pierwszej linii leczenia bewacyzumab w połączeniu z karboplatiną i paklitaksem wydłużył medianę czasu przeżycia całkowitego do 14,2 miesiąca. W innym badaniu z zastosowaniem pemetreksedu i cisplatinu u chorych z rozpoznaniem raka gruczołowego wydłużono medianę czasu przeżycia całkowitego do 12,6 miesiąca, ale z kolei u chorych na raka płaskonabłonkowego efekt leczenia pemetreksedem i cisplatiną był nawet gorszy niż chemioterapii cisplatiną w połączeniu z gemcytabiną. Przyczyną tego zjawiska może być wysoka ekspresja syntazy tymidylowej w komórkach raka płaskonabłonkowego. Enzym ten bierze udział w syntezie DNA i potrzebuje kwasu foliowego do prawidłowego działania. Pemetreksed jest analogiem kwasu foliowego i jego antagonistą. Niska ekspresja syntazy tymidylowej w sytuacji niedoboru kwasu foliowego w efekcie leczenia może być przyczyną wrażliwości komórek nowotworowych na działanie pemetreksedu [3, 4].

Kryterium histopatologiczne próbowano także stosować w kwalifikacji do terapii ukierunkowanych molekularnie, do których należy zastosowanie inhibitorów kinazy tyrozynowej (TKI, *tyrosine kinase inhibitors*) — erlotynibu i gefitynibu oraz leków antyangiogennych ukierunkowanych na czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) — bewacyzumabu. W przypadku TKI-EGFR większy odsetek odpowiedzi na leczenie u chorych z rakiem gruczołowym wiązał się z polisomią genu *EGFR* oraz częstszą obecnością mutacji w genie *EGFR* w komórkach nowotworowych, natomiast podczas stosowania leków anti-VEGF większa skuteczność korelowała z małym stężeniem molekuł adhezyjnych: cząsteczek adhezji międzykomórkowej (ICAM, *intra-cellular adhesion molecule*) i komórek śródbłonna (VCAM, *vascular cell adhesion molecule*), oraz VEGF w surowicy krwi [5–7].

Brak odpowiedzi na chemioterapię wynika z oporności komórek nowotworowych na działanie leków cytotoksycznych. Oporność może być pierwotna (występuje przed rozpoczęciem leczenia) lub wtórna (jest stymulowana podawaniem leków). Oporność wtórna wynika z wyodrębnienia i rozwoju klonu komórek nowotworowych pierwotnie opornych na leczenie lub jest spowodowana mutacjami zachodzącymi pod wpływem leczenia. Najczęściej oporność ma charakter selektyw-

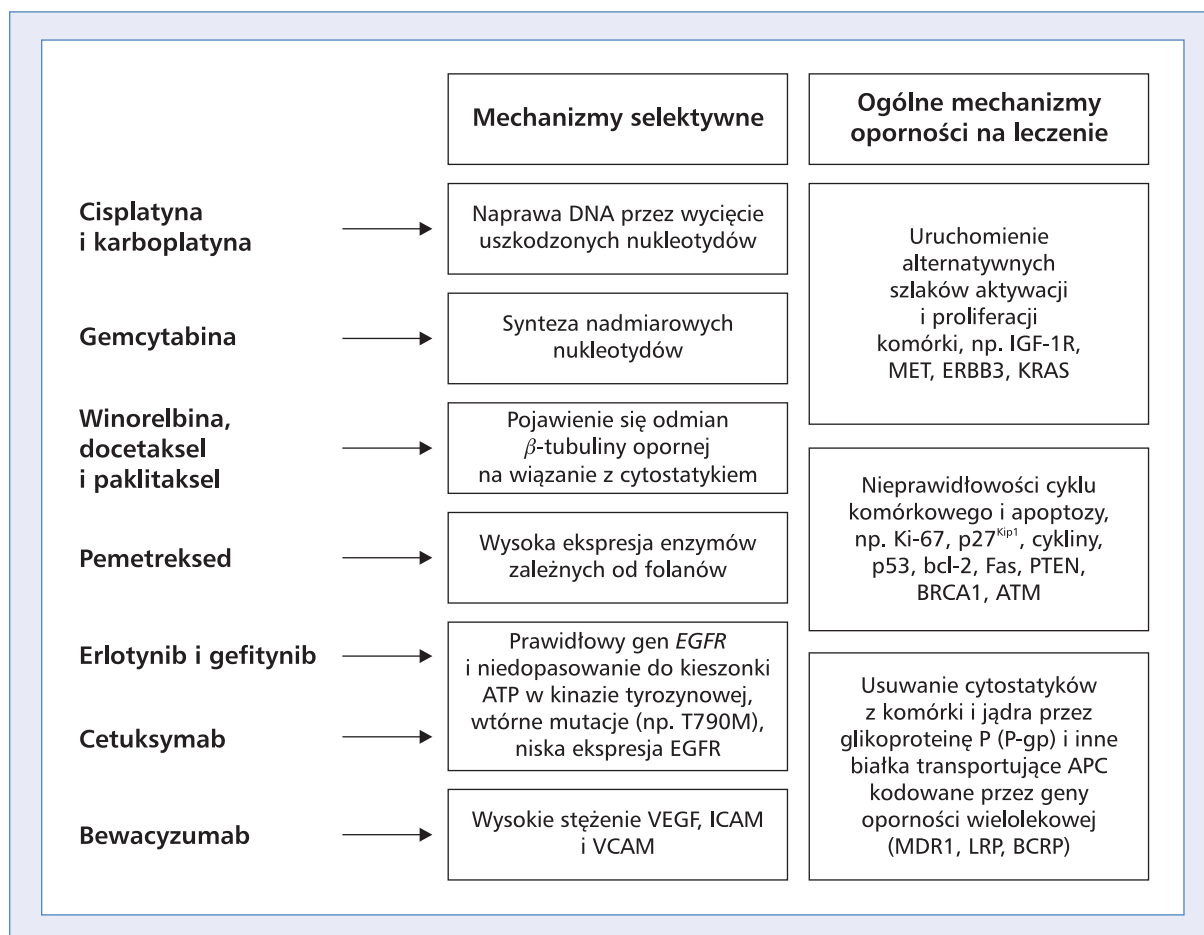
ny i dotyczy konkretnego leku o ściśle sprecyzowanym mechanizmie działania. Oporność wielolekowa jest łatwiejsza do przełamania i wiąże się z różnymi mechanizmami obrony komórek przed toksycznym działaniem leków.

Kluczem do zrozumienia mechanizmów selektywnej oporności na działanie cytostatyków, a zarazem sposobem na opracowanie algorytmów kwalifikacji do zindywidualizowanej terapii, jest poznanie mechanizmów działania poszczególnych chemioterapeutyków. Cisplatiną i karboplatiną tworzą krzyżowe wiązania między sąsiadującymi niemi DNA oraz w obrębie tej samej nici (addukty cisplatin-DNA), co uniemożliwia replikację DNA i podział komórki. Gemcytabina jest analogiem deoksycytydyny i wbudowuje się zamiast niej do DNA, co powoduje zaburzenia syntezy DNA i prowadzi do apoptozy komórek. Winorelbina — tak jak inne alkaloidy *vinca* oraz taksoidy (doceksel i paklitaksel) — wiąże się z β -tubuliną i powoduje zahamowanie mitozy przez uszkodzenie wrzeciona kariokinetycznego. Pemetreksed zaburza syntezę nukleotydów przez enzymy zależne od folanów (syntaza tymidylowa, reduktaza dihydrofolanowa). Erlotynib i gefitynib blokują nieprawidłową kieszonkę dla ATP w kinazie tyrozynowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, *epidermal growth factor receptor*), a cetuksymab zewnątrzkomórkową domenę tego receptora. Bewacyzumab upośledza unaczynienie guza przez blokowanie VEGF.

Mechanizmy powstawania oporności na poszczególne leki przedstawiono na rycinie 1. Zgodnie z zasadami zawartymi w tym schemacie rozpoczęto badania nad poszczególnymi jego ogniwami, które doprowadziły do wykrycia kilku istotnych czynników predykcyjnych.

Naprawa DNA przez kompleks NER

Kompleks NER (*nucleotide excision repair*) jest odpowiedzialny za usuwanie adduktów cisplatin-DNA i nukleotydów uszkodzonych przez czynniki chemiczne i promieniowanie UV. W rozpoznawaniu uszkodzeń DNA bierze udział wiele białkowych komponentów NER. Wydaje się jednak, że efektywność działania NER w dużej mierze zależy od funkcji enzymów o aktywności egzonukleazowej — ERCC1/XPF. Enzym ERCC1 (*excision repair crosscomplementation group 1*) jest odpowiedzialny za nacinanie uszkodzonej nici DNA, a następnie niszczenie wyciętego fragmentu DNA. W miejscu wyciętej pojedynczej nici DNA, na matrycy prawidłowej nici, rozpoczyna się synteza łańcucha oligonukleotydowego, w której udział biorą między innymi: polimerazy δ lub ϵ , ligazy, helikazy (np. enzym XPD) oraz podjednostka M1 reduktazy rybonukleotydów (RRM1, *subunit M1 of ribonucleotide re-*



Rycina 1. Selektywne i ogólne mechanizmy oporności komórek nowotworowych na cytostatyki stosowane w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca. EGFR — receptor naskórkowego czynnika wzrostu; VEGF — naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu; ICAM — cząsteczki adhezji międzykomórkowej; VCAM — cząsteczki adhezji śródbłonkowej

Figure 1. Selective and common mechanisms of cancer cell resistance to chemotherapeutic agents in non-small cell lung cancer. EGFR — epidermal growth factor receptor; VEGF — vascular endothelial growth factor; ICAM — intracellular adhesion molecule; VCAM — vascular cell adhesion molecule

ductase). Podjednostka RRM1 odpowiada za syntezę deoksynukleotydów, z których odbudowywana jest usunięta wcześniej nić DNA [8, 9].

Wysoka ekspresja ERCC1/XPF oraz RRM1 w komórkach nowotworowych może być odpowiedzialna za większość przypadków oporności tych komórek na działanie związków platyny i gemcytabiny. Intensywne usuwanie uszkodzonych fragmentów DNA niweczy efekt działania cisplatyny i karboplatyny. Natomiast wysoka ekspresja RRM1 dostarcza nadmiarowych deoksynukleotydów, które konkurują o wbudowywanie się do nici DNA z gemcytabiną uszkadzającą strukturę podwójnej helisy. Zanim jednak stwierdzono wartość predykcyjną omawianych czynników, wykryto ich właściwości prognostyczne. Zjawisko „paradoxa naprawy DNA” powoduje, że duża zdolność komórek nowotworowych do naprawy DNA jest ko-

rzystnym czynnikiem prognostycznym. Sprawność kompleksu NER wiąże się z większą stabilnością genomu komórek nowotworowych, a więc z większym stopniem ich zróżnicowania, mniejszą zdolnością do proliferacji i szerzenia w postaci przerzutów. Zjawisko to czyni z oznaczania efektywności ERCC1 i RRM1 doskonałe czynniki predykcyjne, gdyż ich wartość predykcyjna jest przeciwstawna wartości prognostycznej [8, 9].

Korzystną rolę prognostyczną wysokiej ekspresji ERCC1 udowodnił między innymi zespół Gerolda Bepflera. U operowanych chorych w tkance guza oznaczono ekspresję genu *ERCC1* poprzez pomiar mRNA dla tego genu metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR, *real-time polymerase chain reaction*). Wykazano, że mediana przeżycia chorych z wysoką ekspresją ERCC1 jest istotnie ($p < 0,01$)

dłuższa (94,6 miesiąca) niż chorych z niską ekspresją ERCC1 (35,5 miesiąca) [9, 10]. Wyniki te potwierdzili w większej grupie chorych Zheng i wsp., którzy dowiedli ponadto, że u chorych z wysoką ekspresją RRM1 mediana całkowitego czasu życia była istotnie dłuższa ($p = 0,004$, 120 miesięcy) niż u chorych z niską ekspresją tego enzymu (54,5 miesiąca). Ekspresję białek oceniano w materiale tkankowym z NDRP metodą immunofluorescencji [11].

Dowodów na rolę wysokiej ekspresji ERCC1 jako niekorzystnego czynnika predykcyjnego w leczeniu cisplatyną dostarczyły badania Olausena i wsp. w ramach projektu IALT-BIO. Za pomocą badania immunohistochemicznego (IHC, *immunohistochemistry*) badacze określili ekspresję białka ERCC1 w 761 guzach NDRP, wśród których 335 (44%) wykazywało ekspresję tego białka. Chorzy uczestniczący w badaniu IALT po zabiegu operacyjnym otrzymywali adiuwantową chemioterapię z udziałem cisplatyny w połączeniu z alkaloidami *vinca* lub etopozydem, a pacjentów w grupie kontrolnej jedynie obserwowano. Okazało się, że adiuwantowa chemioterapia spowodowała wydłużenie czasu przeżycia całkowitego chorych z guzami ERCC1-negatywnymi (56 vs. 42 miesiąca; $p < 0,002$), ale nie wpływała na przeżycie chorych z guzami ERCC1-pozytywnymi (50 vs. 55 miesięcy; $p = 0,40$), choć w tym przypadku — ze względu na częste powikłania — pogarszała jakość życia. Chorzy, którzy nie otrzymywali uzupełniającego leczenia, żyli dłużej, jeśli w guzie występowała ekspresja ERCC1 ($p = 0,009$) [12–14].

Cepi i wsp. dowiedli również, że chorzy z zaawansowanym rakiem płuca odnoszą korzyść z chemioterapii paliatywnej z zastosowaniem cisplatyny i gemcytabiny, jeśli w guzach występowało małe stężenie mRNA dla ERCC1 (17,3 vs. 10,9 miesiąca). Efekt leczenia był jeszcze lepszy, jeśli ekspresja obu genów (*ERCC1* i *RMM1*) była niska [15].

Autorzy niniejszego opracowania we własnym pilotażowym badaniu — przeprowadzonym z wykorzystaniem metody IHC u 34 chorych z NDRP — wykazali, że odsetek pacjentów z remisją bądź stabilizacją choroby po leczeniu schematem zawierającym cisplatynę był istotnie ($p < 0,05$) większy w grupie chorych z guzami ERCC1-negatywnymi (61,6%) niż wśród pacjentów z guzami ERCC1-pozytywnymi (23,1%) (ryc. 2).

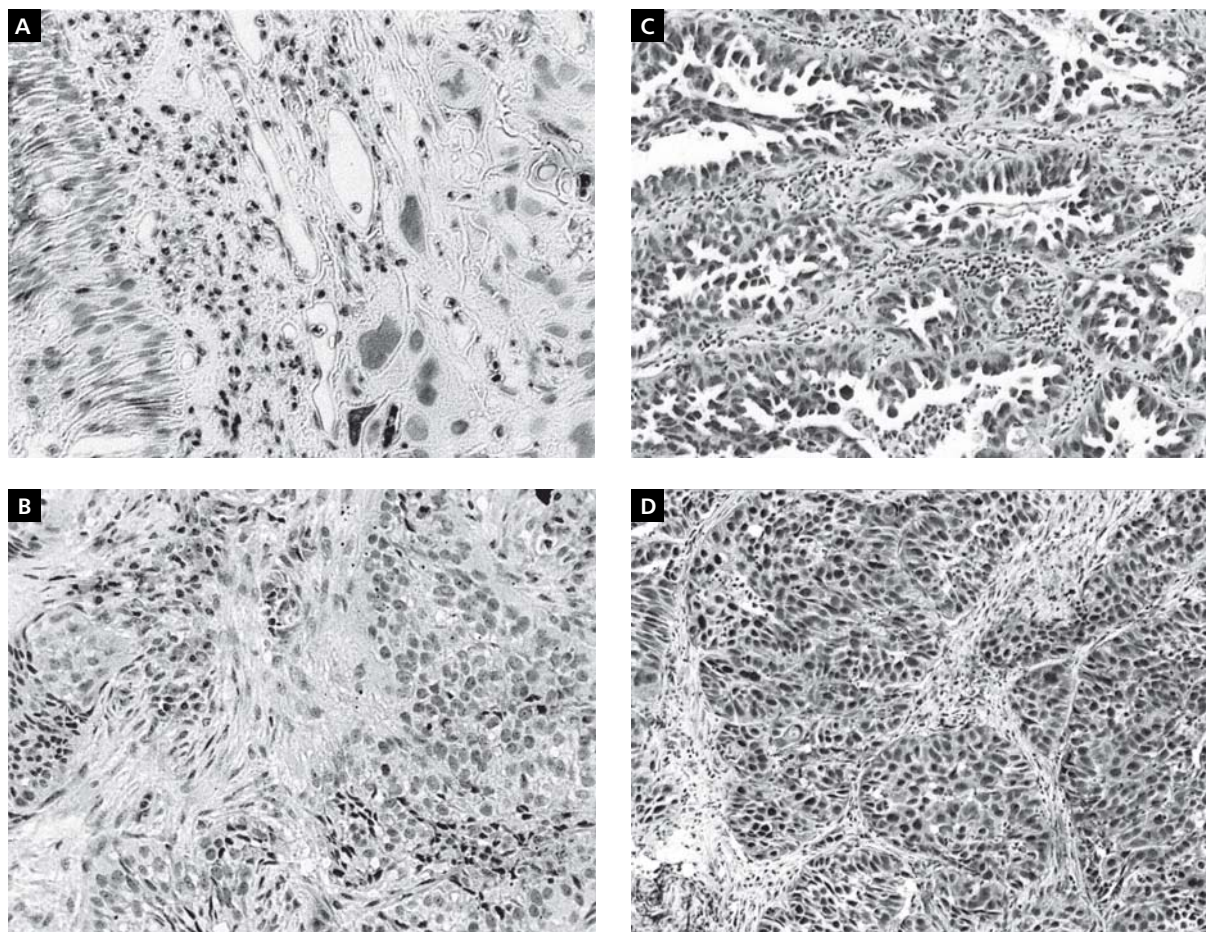
Wszystkie omówione dotąd badania wymagały dostępności tkanki guza do przeprowadzenia analiz biomolekularnych. Ryu i wsp. wyszli z założenia, że aktywność białka ERCC1 zależy także od polimorfizmu genu *ERCC1*, który można wykryć metodą PCR w leukocytach krwi obwodowej. Genotyp CC w kodonie 118 (*Asn118Asn*) genu *ERCC1* wiąże się z mniejszą aktywnością enzymu ERCC1 w tkankach (także nowotworowych) oraz dłuższą medianą czasu przeżycia całkowitego

tego chorych na NDRP po leczeniu cisplatyną niż genotyp CT i TT (16,2 vs. 9,4 miesiąca) [16].

Wśród badań dotyczących roli czynników predykcyjnych największą wartość w kwalifikacji do terapii przeciwnowotworowej mają badania prospektywne. Na uwagę zasługuje praca Cobo i wsp., która objęła 366 chorych z zaawansowanym NDRP. Autorzy wykazali, że u chorych leczonych cisplatyną i docetaksem odpowiedź na terapię uzyskuje się w 39,3%. Natomiast, przeprowadzając kwalifikację do różnych rodzajów terapii na podstawie ekspresji ERCC1 i wykluczając grupę chorych z guzami ERCC1-pozytywnymi z leczenia cisplatyną, odsetek odpowiedzi zwiększył się do 50,7% [17]. Jeszcze ciekawszych wyników dostarczyła praca Simona i wsp. (badanie MADeIT), w której autorzy w tkance nowotworowej ocenili ekspresję ERCC1 i RRM1 i na tej podstawie kwalifikowali chorych z zaawansowanym typem nowotworu do czterech rodzajów chemioterapii — karboplatyna z gemcytabiną, karboplatyna z docetaksem, docetaksel z gemcytabiną oraz docetaksel z winorelbina. W grupie chorych, u których nie przeprowadzono badań molekularnych, stosowano karboplatynę w połączeniu z gemcytabiną. Indywidualizacja terapii doprowadziła do wydłużenia mediany czasu przeżycia całkowitego (13,3 vs. 6,7 miesiąca), odsetka obiektywnej odpowiedzi na leczenie (44% vs. 24%) oraz odsetka chorych żyjących dłużej niż rok (59% vs. 38%) [13, 14, 18].

Białko BRCA1 jest komponentem NER sprzężonym z transkrypcją i bierze udział w naprawie niesparowanych zasad DNA (*mismatch repair*). Uczestniczy też we wbudowywaniu β -tubulin do wrzeciona podziałowego oraz przekazywaniu sygnału do apoptozy poprzez białko p53 i kinazę c-Jun. Mutacje genów *BRCA1* i *BRCA2* predysponują do rozwoju raka sutka i jajnika, ale warunkują również wrażliwość tego nowotworu na działanie cisplatyny.

Wysoka ekspresja BRCA1 może skłaniać do zastosowania chemioterapii z zastosowaniem leków z grupy taksanów, a nie platyny i gemcytabiny. Rosell i wsp. w prospektywnym badaniu stwierdzili, że kwalifikacja chorych z zaawansowanym NDRP do leczenia na podstawie oceny stężenia mRNA dla BRCA1 wydłuża czas ich życia do ponad 15 miesięcy. Mediana czasu przeżycia całkowitego chorych z niską ekspresją BRCA1 leczonych cisplatyną i gemcytabiną wynosiła 18 miesięcy, u chorych z pośrednią ekspresją BRCA1 leczonych cisplatyną i docetaksem osiągnęła 15 miesięcy, natomiast chorych z wysoką ekspresją BRCA1 leczonych docetaksem w monoterapii nie przekraczała 12 miesięcy [19]. Taron i wsp. wykazali, że ekspresja mRNA dla BRCA1 może być czynnikiem predykcyjnym dla neoadiuwantowej chemioterapii opartej na związkach platyny. Mediana przeżycia była najwyższa u chorych z niską ekspresją BRCA1 [20].



Rycina 2. Określenie ekspresji ERCC1 za pomocą metody immunohistochemicznej. A. Kontrola negatywna; B. Brak ekspresji ERCC1; C. Ekspresja ERCC1 w komórkach raka gruczołowego; D. Ekspresja ERCC1 w komórkach raka płaskonabłonkowego

Figure 2. Estimation of ERCC1 expression using immunohistochemistry method. A. Negative control; B. Lack of ERCC1 expression; C. ERCC1 expression in adenocarcinoma cells. D. ERCC1 expression in squamous cell carcinoma

Rola β -tubuliny klasy III w powstawaniu oporności na działanie alkaloidów *vinca* i taksanów

Winorelbina, winkrystyna oraz taksoidy (docetaksel i paklitaksel) upośledzają kinetykę tubulin — alkaloidy *vinca* poprzez depolimeryzację mikrotubul, a taksoidy przez ich stabilizację. Niezależnie od mechanizmu działania leki cytotoksyczne doprowadzają do zaburzeń budowy wrzeciona kariokinetycznego i zahamowania podziałów komórki. Polimery zbudowane z β -tubuliny klasy III są odporne na wiązanie z lekami cytotoksycznymi i wykazują większą dynamikę niż inne heterodimery tubulin (np. $\alpha\beta$ II lub $\alpha\beta$ IV). W związku z tym komórki nowotworowe, które zawierają heterodimery tubulin $\alpha\beta$ III, mogą być odporne na działanie omawianych grup leków. Beta-tubulina klasy III wy-

stępuje w komórkach NDRP częściej u kobiet, u chorych poniżej 60. roku życia oraz w raku gruczołowym i wielkokomórkowym [21].

Seve i wsp., wykorzystując ilościową metodę IHC oraz dane z badania JBR.10, wykazali ograniczoną przydatność oznaczania ekspresji β -tubuliny klasy III w tkance guza jako czynnika predykcyjnego w chemioterapii adiuwantowej za pomocą cisplatyny i winorelbiny — u 55% chorych (265) stwierdzano ekspresję tego rodzaju tubuliny. Wysoka ekspresja β -tubuliny klasy III wiązała się z krótszą medianą czasu przeżycia do progresji i całkowitego czasu przeżycia u chorych operowanych bez późniejszej chemioterapii, co sugerowało, że obecność tego rodzaju tubuliny jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym. Zaskakująca może być obserwacja, że chorzy z wysoką ekspresją β -tubuliny klasy III odnosili większą korzyść z chemioterapii adiuwantowej niż pacjenci w grupie przyjmującej place-

bo (względna redukcja ryzyka zgonu o 36%; $p = 0,007$), czego nie stwierdzono u chorych z niską ekspresją [22].

Przeciwnie wyniki uzyskali Okuda i wsp., którzy stosowali chemioterapię adiuwantową cisplatyną i paklitakselem u 50 chorych [23], oraz Rosell i wsp., stosujący paliatywną chemioterapię za pomocą karboplatyny i paklitakselu u 75 pacjentów z przerzutowym rakiem płuca [21], a także Seve i wsp., leczący 93 chorych z zaawansowanym NDRP za pomocą schematów opartych na winorelbynie [21]. Duże stężenie mRNA dla β -tubuliny klasy III w pierwszym badaniu oraz wysoka ekspresja tej tubuliny w dwóch pozostałych badaniach warunkowały występowanie oporności na działanie taksoidów i winorelbiny. Ponadto, wyniki te potwierdzili Seve i wsp., porównując dwie grupy chorych leczonych schematami zawierającymi paklitaksel (47) lub gemcytabinę (44). Wysoka ekspresja β -tubuliny klasy III była niekorzystnym czynnikiem predykcyjnym u chorych leczonych taksoidem (skrócenie mediany czasu do progresji oraz całkowitego czasu życia), ale nie u osób otrzymujących gemcytabinę [21]. Jednak ze względu na retrospektywny charakter badań oraz ograniczoną liczebność badanych grup do cytowanych wyników należy podchodzić z właściwą rezerwą [21, 23].

Podpis genetyczny — aneuploidia jako przyczyna powstawania nowotworów

Podstawą do zrozumienia roli różnic w ekspresji wielu genów w patogenezie nowotworów jest zjawisko aneuploidii komórek nowotworowych. Aneuploidia oznacza, że ilość DNA zawartego w komórce aneuploidycznej jest inna niż w prawidłowych komórkach diploidalnych, zawierających po jednym chromosomie matki i ojca. Najbardziej typowym przykładem takiej sytuacji jest powielenie (trisomia lub polisomia) lub brak całego chromosomu (monosomia), chociaż częściej dochodzi do utraty lub powielenia fragmentu chromosomu. Według teorii Duesberga większość komórek aneuploidalnych jest martwa w chwili powstania lub jest niezdolna do dalszego wzrostu. Jednak w nielicznych, które przetrwają, proporcje aktywności tysięcy genów są zmienione. Na ich matrycy powstają enzymy syntetyzujące i naprawiające DNA oraz białka odpowiedzialne za apoptozę lub przeżycie nieprawidłowych komórek. Komórka aneuploidalna staje się niestabilna, powstają w niej kombinacje genów, które pozwalają jej proliferować bez ograniczeń i w dowolnym miejscu. Przedstawiona teoria jest dobrym uzupełnieniem standardowej teorii karcynogenezy, która zakłada obecność mutacji wybranych genów supresorowych (np. *TP53*) i onkogenów (np. *KRAS*) w komórkach nowotworowych [24].

Oznaczanie ekspresji tysięcy genów, które wymknęły się spod kontroli w komórkach nowotworowych, może znaleźć zastosowanie w prognozowaniu przebiegu chorób nowotworowych. Metoda RT-PCR umożliwia analizę stężenia mRNA syntetyzowanych na matrycy pojedynczych, wybranych genów. Natomiast mikromacierze rozszerzają te możliwości do oznaczania ekspresji kilku lub nawet kilkunastu tysięcy genów w jednym eksperymencie. Komplementarne DNA powstające na matrycy mRNA jest znakowane fluorochromem, a następnie hybryduje z sondami o znanej sekwencji nukleotydowej, stanowiącymi zasadniczy element mikromacierzy. Intensywność sygnału dla poszczególnych sond jest proporcjonalna do ilości cDNA o danej sekwencji w badanej próbce. Tak powstaje „podpis genetyczny” będący informacją o ekspresji genów istotnych dla transformacji nowotworowej i występowania oporności na cytostatyki.

Chen i wsp. udowodnili, że „podpis genetyczny”, na który składała się analiza ekspresji od 5 (*DUSP6*, *MMD*, *STAT1*, *ERBB3*, *LCK*) do 16 wybranych z 672 genów, jest bardzo czułym czynnikiem prognostycznym u operowanych chorych na NDRP w stadium IB i II [25]. Tsao i wsp. wykazali ponadto, że w grupie, w której ryzyko zgonu jest duże, odnotowano korzyść z chemioterapii adiuwantowej (redukcja ryzyka względnie o 67%; $p = 0,0005$). Natomiast chorzy z grupy małego ryzyka zgonu nie powinni otrzymywać chemioterapii [26].

Czynniki predykcyjne w leczeniu ukierunkowanym molekularnie

W przypadku leków ukierunkowanych molekularnie konieczność oznaczania molekularnych czynników predykcyjnych należy niemal do definicji tej grupy leków. W przypadku bewacyzumabu cel terapii, którym jest zablokowanie VEGF (główny czynnik wzrostu naczyń krwionośnych w obrębie guza), decydował o wyborze czynników predykcyjnych. W przypadku chorych na zaawansowanego NDRP i o histologii innej niż rak płaskonabłonkowy leczonych w pierwszej linii bewacyzumabem w połączeniu z chemioterapią efekt leczenia można w pewnym stopniu przewidzieć dzięki oznaczeniu stężenia VEGF i molekuł adhezyjnych w surowicy krwi. Okazało się jednak, że małe stężenie VEGF nie ma korzystnej wartości predykcyjnej. Natomiast u chorych, u których wyjściowe stężenie ICAM w surowicy krwi było małe, uzyskiwano lepszą odpowiedź na leczenie bewacyzumabem (32% vs. 14%), mediana czasu życia była u nich dłuższa oraz częściej żyli rok lub dłużej (65% vs. 25%) [7].

W przypadku TKI-EGFR ten prosty mechanizm przewidywania efektów terapii okazał się nieskutecz-

ny. Wysoka ekspresja EGFR na powierzchni komórek nowotworowych określana metodą IHC nie determinowała większej skuteczności leczenia. Ponadto, niemożliwe okazało się zastosowanie TKI-EGFR łącznie z chemioterapią ze względu na odmienny mechanizm działania obu grup leków. Leki cytotoksyczne eliminują dzielące się komórki nowotworowe w fazie M cyklu komórkowego, zmniejszając tym samym populację komórek w fazie G1, w której działają TKI-EGFR. W związku z tym gefitynib i erlotynib zastosowano w monoterapii w drugiej lub trzeciej linii leczenia oraz zamiast standardowej chemioterapii w pierwszej linii leczenia zaawansowanego NDRP. Jednocześnie podjęto wiele badań klinicznych, których celem było precyzyjne określenie grupy chorych mogących odnieść największą korzyść z leczenia TKI-EGFR [5, 6].

Początkowo sądzono, że duża skuteczność leczenia TKI-EGFR zależy od powielenia kopii genu *EGFR*. Mechanizm aneuploidii w obrębie chromosomu 7. miał powodować nadmierną aktywację szlaków metabolicznych związanych z *EGFR*. W wielu badaniach potwierdzono, że chorzy z większą (4 lub więcej) liczbą kopii genu *EGFR* w ponad 40% komórek nowotworowych analizowanych metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridisation*) uzyskiwali lepszą odpowiedź na leczenie TKI-EGFR, czas przeżycia do progresji i czas przeżycia całkowitego były u nich dłuższe. Zwiększenie liczby kopii genu *EGFR* miało oczywiste przełożenie na ekspresję EGFR na powierzchni komórki, nie wyjaśniało jednak, dlaczego spektakularne odpowiedzi na terapię zdarzały się także u chorych FISH-negatywnych, a u wielu spośród chorych FISH-pozytywnych nie uzyskiwano odpowiedzi na leczenie. W przypadku rasy kaukaskiej obiektywną odpowiedź na leczenie TKI-EGFR odnotowano u około 10% chorych z NDRP, a pozytywny wynik FISH dotyczył około 40% chorych [27].

Kolejne badania przeprowadzone w latach 2007–2009 wyjaśniły, że zarówno na aktywację proliferacji komórek nowotworowych zależną od szlaku PI3K/AKT, jak i na efekt leczenia TKI-EGFR wpływała mutacja w obrębie domeny kinazy tyrozynowej EGFR. Efekt terapii obserwowano u chorych, u których mutacja *EGFR* odgrywała zasadniczą rolę w powstawaniu komórek nowotworowych. Efekt ten wynikał z dwóch zjawisk. Konformacja kinazy tyrozynowej, zdeterminowana przez zmutowany gen *EGFR*, miała większą zdolność do przekazywania reszty fosforanowej z ATP na kolejne ogniwa szlaku metabolicznego (fosforylacja ERBB3) oraz warunkowała takie ułożenie TKI-EGFR w kieszonce dla ATP, które uniemożliwiało wiązanie ATP. Ponadto, mutacje genu *EGFR* (najczęściej delecje w obrębie eksonu 19 i substytucja L858R w eksonie 21) dotyczyły głównie osób niepalących tytoniu z rakiem gruczołowym, nieznacznie częściej kobiet i osób

po 65. roku życia. Ponadto, u ponad 80% chorych z mutacją *EGFR* w badaniu FISH wykazano także znaczące powielenie liczby kopii tego genu. Mutacje występowały też znacznie częściej u chorych rasy azjatyckiej (40%) niż kaukaskiej (10%) [28–30].

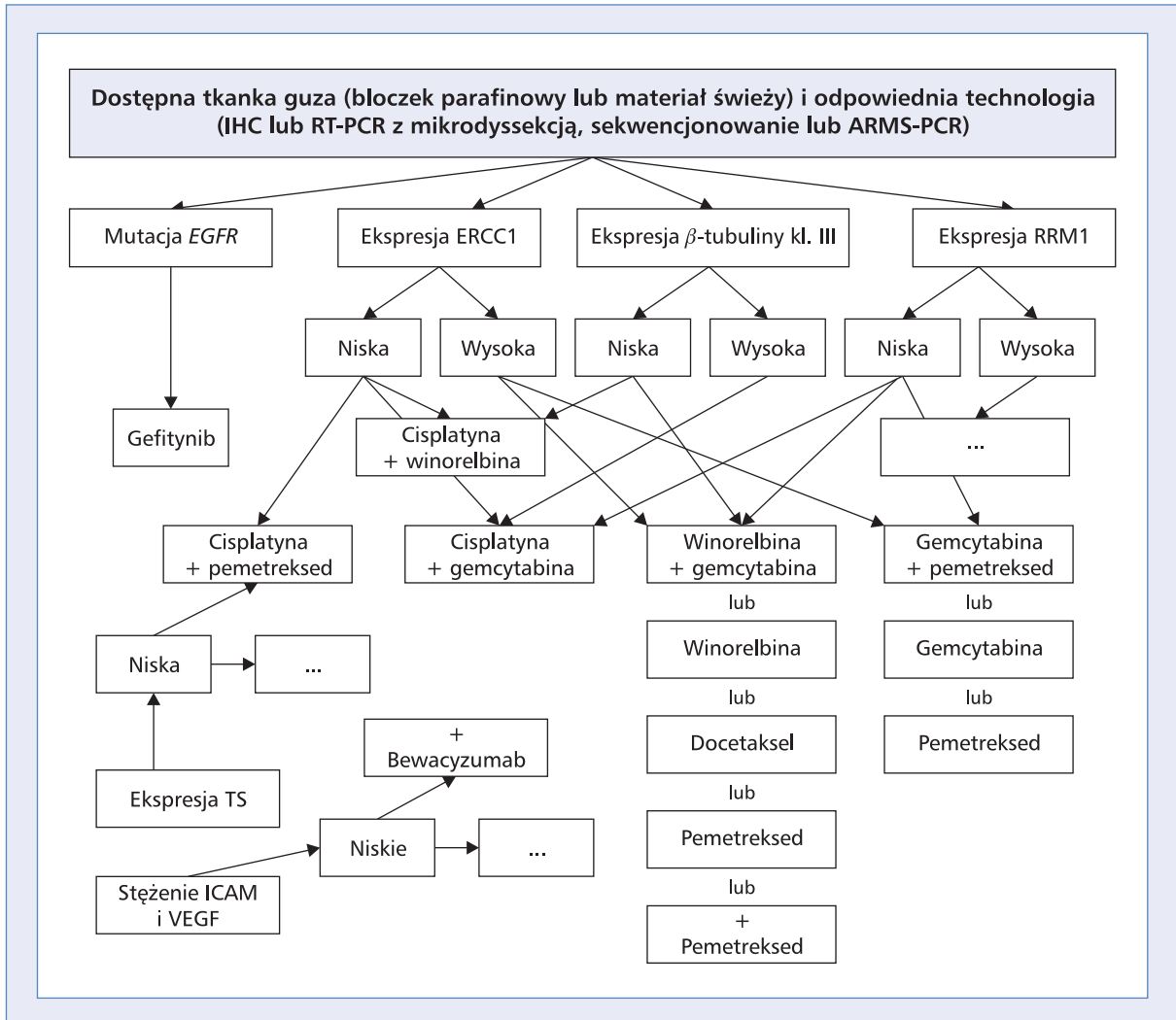
Ograniczone ramy obecnego opracowania uniemożliwiają wymienienie wszystkich badań dotyczących roli czynników predykcyjnych dla TKI-EGFR w NDRP. Trzeba jednak przyznać, że niezwykle postęp w badaniach molekularnych prowadzonych w NDRP, jaki osiągnięto w ostatnich latach, jest spowodowany wprowadzeniem do leczenia właśnie tych leków. Nic dziwnego, skoro odsetek obiektywnych odpowiedzi na TKI-EGFR w pierwszej linii leczenia u chorych z zaawansowanym NDRP i mutacją *EGFR* wynosi 70–80%, a mediana czasu przeżycia do progresji przekroczyła 12 miesięcy (w przypadku chemioterapii odpowiednio — 30–40% i około 6 miesięcy). Dane te dowodzą niezwykłej skuteczności omawianej grupy leków u wybranych chorych na NDRP [31, 32].

Podsumowanie

W przypadku leków stosowanych od kilkunastu lat — cisplatyny, winorelbiny lub gemcytabiny — czynniki predykcyjne są dopiero badane, a ich wartości klinicznej nie potwierdzono. Kwalifikacja na podstawie wyniku badań molekularnych do klasycznej chemioterapii NDRP wydaje się kwestią czasu.

Obecnie trudno sobie jednak wyobrazić możliwość zastosowania czynników molekularnych w planowaniu schematów chemioterapii. Chemioterapia NDRP opiera się przede wszystkim na związkach platyny. Rezygnacja z chemioterapii z zastosowaniem cisplatyny według wyników badań molekularnych wymaga precyzyjnego potwierdzenia roli predykcyjnej omawianych czynników. Inaczej jest w przypadku, gdy można dokonać wyboru pomiędzy winorelbina, gemcytabina, taksoidami czy pemetreksedem. Wówczas czynniki molekularne mogą mieć zasadnicze znaczenie w wyborze schematu leczenia, po uwzględnieniu działań niepożądanych poszczególnych leków. Należy jednak pamiętać, że w sytuacji braku konkretnych wskazań do określonego schematu leczenia o jego składzie mogą decydować czynniki finansowe (zróżnicowany koszt leków) lub nawet przyzwyczajenie i doświadczenie onkologów preferujących sprawdzone schematy. Hipotetyczne schematy leczenia pierwszej i drugiej linii w NDRP, skomponowane na podstawie występowania predykcyjnych czynników molekularnych, przedstawiono na rycinach 3 i 4.

Uzasadnione są pytania skierowane do lekarzy patomorfologów i onkologów. Pierwsze z nich dotyczy możliwości rozszerzenia panelu badań IHC o wykry-



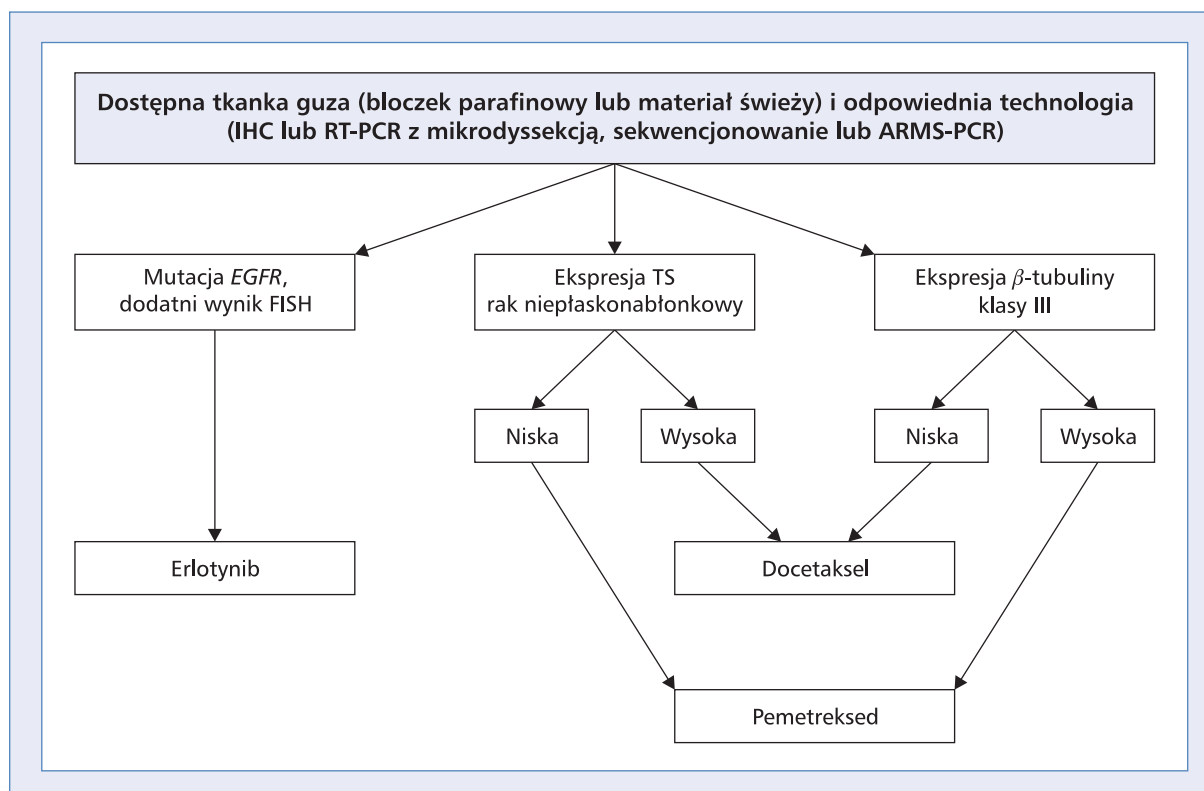
Rycina 3. Hipotetyczny algorytm umożliwiający indywidualizację chemioterapii pierwszej linii w zaawansowanym niedrobnokomórkowym raku płuca (NDRP) na podstawie wyników badań molekularnych. ICAM — cząsteczki adhezji międzykomórkowej; VEGF — naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu; IHC — badanie immunohistochemiczne; RT-PCR — metoda łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym; ARMS-PCR — metoda łańcuchowej reakcji polimerazy techniką amplifikacji allelospecyficznej

Figure 3. Hypothetical algorithm of qualification the patients into first-line therapy based on molecular factors in non-small cell lung cancer. ICAM — intracellular adhesion molecule; VEGF — vascular endothelial growth factor; IHC — immunohistochemistry; RT-PCR — real time polymerase chain reaction; ARMS-PCR — amplification refractory mutation system polymerase chain reaction

wanie w tkance nowotworowej ekspresji takich białek, jak ERCC1, RRM1, syntaza tymidyłowa czy β-tubulina klasy III. Onkolodzy natomiast powinni zastanowić się, czy taka informacja zawarta w wyniku badania histopatologicznego będzie przez nich wykorzystana. Możliwa byłaby wówczas konfrontacja wyników leczenia z profilem molekularnym chorego, a nawet wybór niektórych leków w sytuacji, gdy żadne czynniki kliniczne nie decydowałyby o składzie schematów chemioterapii. Należy się także zastanowić, czy koszty i nakład

pracy tego typu postępowania będą równoważone korzyścią płynącą dla chorych na raka płuca.

W przypadku nowych leków ukierunkowanych molekularnie, takich jak TKI-EGFR i przeciwciała anty-VEGF, sytuacja jest inna. Sformułowanie „lek ukierunkowany molekularnie” nie jest zresztą do końca precyzyjne. Czy winorelbina łącząca się z β-tubuliną wrzeczona podziałowego nie działa w sposób ukierunkowany molekularnie? Niemniej przed metodami, które pojawiły się w leczeniu NDRP w ciągu ostatnich kil-



Rycina 4. Hipotetyczny algorytm umożliwiający indywidualizację chemioterapii drugiej linii w zaawansowanym niedrobnokomórkowym raku płuca (NDRP) na podstawie wyników badań molekularnych. IHC — badanie immunohistochemiczne; RT-PCR — metoda łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym; ARMS-PCR — metoda łańcuchowej reakcji polimerazy techniką amplifikacji allelospecyficznej; FISH — fluoroscencyjna hybrydyzacja *in situ*

Figure 4. Hypothetical algorithm of qualification the patients into second-line therapy based on molecular factors in non-small cell lung cancer. IHC — immunohistochemistry; RPT-PCR — real time polymerase chain reaction; ARMS-PCR — amplification refractory mutation system polymerase chain reaction; FISH — fluorescence *in situ* hybridisation

ku lat, stawia się znacznie większe wymagania. Ich realizacja zaowocowała poznaniem licznych, istotnych mechanizmów oporności na leczenie i opracowaniem metod oznaczania czynników predykcyjnych. To z kolei przyczynia się do wzrostu efektywności leczenia i zmniejszenia działań niepożądanych oraz otwiera nowe możliwości leczenia dla chorych, którzy nie mogą być poddawani klasycznej chemioterapii.

Piśmiennictwo

1. Pignon J.P., Tribodet H., Scagliotti G.V. i wsp. Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation (LACE): a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 3552–3559.
2. Kelly K., Crowley J., Bunn P.A., Presant C.A. i wsp. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: A Southwest Oncology Group Trial. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19: 3210–3218.
3. Scagliotti G.V., Parikh P., von Pawel J. i wsp. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed

in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 3543–3551.

4. Syrigos K.N., Vansteenkiste J., Parikh P. i wsp. Prognostic and predictive factors in a randomized phase III trial comparing cisplatin-pemetrexed versus cisplatin-gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol. Advance.* Access published online on October 14, 2009.
5. Tsao M.S., Sakurada A., Cutz J.C. i wsp. Erlotinib in lung cancer — molecular and clinical predictors of outcome. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 133–144.
6. Hirsch F.R., Varella-Garcia M., Bunn P.A. i wsp. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 5034–5042.
7. Dowlati A., Gray R., Sandler A.B., Schiller J.H., Johnson D.H. Cell adhesion molecules, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without bevacizumab — an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 1407–1412.
8. Vilmar A., Sorensen J.B. Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) in platinum-based treatment of non-small cell lung cancer with special emphasis on carboplatin: a review of current literature. *Lung Cancer* 2009; 64: 131–139.
9. Bepler G., Begnum M., Simon G.R. Molecular analysis-based treatment strategies for non-small cell lung cancer. *Cancer Control* 2008; 15: 130–139.

10. Simon G.R., Shwati S., Cantor A., Smith P., Bepler G. ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with non-small cell lung cancer. *Chest* 2005; 127: 978–983.
11. Zheng Z., Chen T., Li X., Haura E., Sharma A., Bepler G. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356: 800–808.
12. Olaussen K.A., Dunant A., Fouret P. i wsp. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 983–991.
13. Schettino C., Bareschino M.A., Maione P., Rossi A., Ciardiello F., Gridelli C. The potential role of pharmacogenomic and genomic in the adjuvant treatment of early stage non small cell lung cancer. *Current Genomic* 2008; 9: 252–262.
14. Ikeda N., Nagase S., Ohira T. Individualized adjuvant chemotherapy for surgically resected lung cancer and the roles of biomarkers. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2009; 15: 144–149.
15. Ceppi P., Volante M., Novello S. i wsp. ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann. Oncol.* 2006; 17: 1818–1825.
16. Ryu J.S., Hong Y.C., Han H.S. i wsp. Association between polymorphisms of ERCC1 and XPD and survival in non-small-cell lung cancer patients treated with cisplatin combination chemotherapy. *Lung Cancer* 2004; 44: 311–316.
17. Cobo M., Isla D., Massuti B. i wsp. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: A phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 2747–2754.
18. Simon G., Sharma A., Li X. i wsp. Feasibility and efficacy of molecular analysis-directed individualized therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 2741–2746.
19. Rosell M., Cobo M., Isla D., Camps C., Massuti B. Pharmacogenomic and gemcitabine. *Ann. Oncol.* 2006; 17 (supl. 5): 13–16.
20. Taron M., Rosell R., Felip E. i wsp. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Human Mol. Gen.* 2004; 13: 2443–2449.
21. Seve P., Dumontet C. Is class III β -tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents. *Lancet Oncol.* 2008; 9: 168–175.
22. Seve P., Lai R., Ding K. i wsp. Class III β -tubulin expression and benefits from adjuvant cisplatin/vinorelbine chemotherapy in operable non-small cell lung cancer: analysis of NCIC JBR.10. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 994–999.
23. Okuda K., Sasaki H., Dumontet C. i wsp. Expression of excision repair cross-complementation group 1 and class III β -tubulin predict survival after chemotherapy for completely resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 62: 105–112.
24. Duesberg P.H., Li R., Rasnick D. i wsp. Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2000; 119: 83–93.
25. Chen H.Y., Yu S.L., Chen C.H. i wsp. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356: 11–20.
26. Tsao M.S., Zhu C., Ding K. i wsp. A 15-gene expression signature prognostic for survival and predictive for adjuvant chemotherapy benefit in JBR.10 patients. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: ASCO 2008; abstr. 7510.
27. Capuzzo F. EGFR FISH versus mutation: different tests, different end-points. *Lung Cancer* 2008; 60: 160–165.
28. Yun C.H., Boggon T.J., Li Y. i wsp. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: Mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* 2007; 11: 217–227.
29. Schneider C.P., Heigener D., Schott von Romer K. i wsp. Epidermal growth factor-related tumor markers and clinical outcomes with erlotinib in non-small cell lung cancer: an analysis of patients from german cancers in the TRUST study. *J. Thorac. Oncol.* 2008; 3: 1446–1453.
30. Brugger W., Triller N., Blasinska-Morawiec M. i wsp. Biomarker analyses form the phase III placebo-controlled SATURN study of maintenance erlotinib following first-line chemotherapy for advanced NSCLC. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: ASCO 2009; Abstr. 15.
31. Mok T., Wu Y.L., Thongprasert S. i wsp. Phase III, randomised, open-label, first-line study of gefitinib (G) vs carboplatin/ paclitaxel (C/P) in clinically selected patients (pts) with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) (IPASS). *Proc ESMO.* 2008; Abstr. LBA 2.
32. Paz-Ares L., Soulieres D., Klughammer B., Melezínek I., Moecks J., Mok T. Pooled analysis of clinical outcomes in studies of patients with EGFR mutations treated with either an EGFR TKI or chemotherapy. 13th WCLC 2009; Abstract.