

Сакаева Д.Д.¹, Данилова Д.В.¹, Гордиев М.Г.²

Предсказательное значение молекулярно-генетических маркеров в противоопухолевой лекарственной терапии метастатического колоректального рака

1 - ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» МЗ РБ, г. Уфа; 2 - ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» МЗ РТ, г. Казань

Sakaeva D.D., Danilova D.V., Gordiev M.G.

The predictive value of molecular genetic markers in anticancer drug therapy for metastatic colorectal cancer

Резюме

С целью определения частоты встречаемости и спектра мутаций гена KRAS и NRAS у пациентов с метастатическим колоректальным раком (мКРР) в Приволжском Федеральном Округе, было проанализировано 317 гистологических блоков из городов Казань, Нижний Новгород, Уфа. Мутация в гене KRAS во 2 экзоне выявлена в 29,9%, мутация NRAS в 2,6% блоков. Определение KRAS и NRAS мутаций является предиктором к назначению терапии ингибиторами EGFR.

Ключевые слова: метастатический колоректальный рак, таргетная терапия, частота и спектр мутации гена KRAS и NRAS

Summary

In order to determine the frequency and spectrum of KRAS gene mutations and NRAS in patients with metastatic colorectal cancer (MCC) in the Volga Federal District, 317 histological blocks in the cities Kazan, Nizhny Novgorod, Ufa were analyzed. Mutation in the gene KRAS Exon 2 identified in 95 blocks (29.9%), NRAS mutation in 13 blocks (2.6%). Definition of KRAS, NRAS mutations is a predictor to the destination therapy EGFR inhibitors.

Key words: metastatic colorectal cancer, targeted therapy, gene RAS value, the frequency and spectrum of mutations in KRAS and NRAS gene

Введение

Одно из направлений развития лекарственной терапии метастатического колоректального рака (мКРР), таргетная терапия, началась в конце XX века. В качестве лечебной опции рекомендованы моноклональные антитела против рецептора эпидермального фактора роста EGFR. Новым подходом в терапии мКРР явилось подразделение опухолей соответственно наличию мутации гена RAS на дикий тип и мутированный (недикий). У пациентов с диким типом гена RAS с исчерпанными возможностями химиотерапии (ХТ) применение ингибиторов EGFR позволяло добиться объективного эффекта в 10 % случаев, с увеличением общей выживаемости до 6 месяцев [2,3].

В группу значимых RAS мутаций в настоящее время включают K-RAS и N-RAS мутации. Каскадная последовательность реакций сигнального пути RAS действует как выключатель, определяющий регуляцию генной экспрессии, требующуюся для решения клетки – делиться или дифференцироваться. (рис 1). При мКРР в опухолевых клетках может происходить активация нисходящего

RAS/MAPK сигнального пути, несмотря на ингибирование EGFR моноклональными антителами, в частности, при мутациях в генах семейства RAS и BRAF. Мутации в гене KRAS в опухолях толстой кишки встречаются в 30-60% случаев, чаще всего в экзоне 2 (кодонах 12 и 13). Однако описаны мутации в экзоне (кодоне 61), и в экзоне 4 (кодонах 117 и 146). Мутации в гене NRAS (в тех же экзонах и кодонах) при мКРР составляют до 5%. [8]

Результаты исследования III фазы NCIC CTGCO.17 (National Cancer Institute Canada Clinical Trials Group), показали увеличение времени без прогрессирования (ВБП) и общей выживаемости (ОВ) в группе пациентов с диким типом KRAS, получающих цетуксимаб+ FOLFIRI . ВБП пациентов, получающих цетуксимаб+ FOLFIRI составила 3,8 мес., в группе с FOLFIRI =1,9 мес., ОВ - 9,5 мес. и 4,8 месяца соответственно. В группе с мутированным KRAS добавление цетуксимаба не изменило ВБП, она составила 1,8 мес., также как и в группе с только с химиотерапией - 1,8 мес. Общая выживаемость составила 4,6 мес. и 4,5 мес. соответственно. То есть преимуществ в комбинации цетуксимаба с цитостатиками не было.

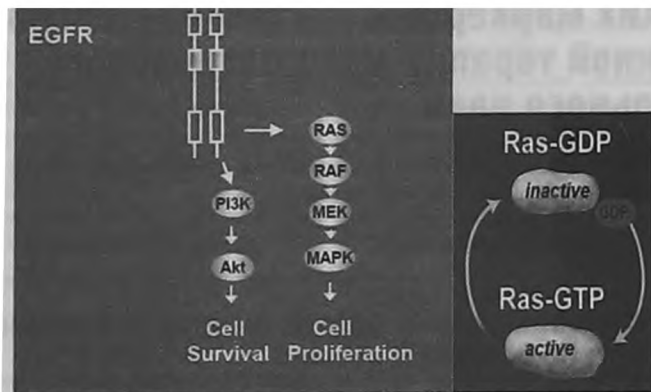


Рисунок 1. EGFR и два пути передачи сигнала в ядро клетки — Raf-MEK-MAPK и PI-3K-Akt. Переход белка Ras в активированную форму и обратно. (Адаптировано по J.Tabernero)

[9,10,12]. В данном исследовании также была проанализирована частота встречаемости мутаций по кодонам во 2 экзоне гена KRAS (табл. 1). У пациентов при наличии любой мутации KRAS добавление цетуксимаба в терапию не приносило значимой пользы.

В исследовании III фазы PRIME (Panitumumab Randomized trial In combination with chemotherapy for Metastatic colorectal cancer to determine Efficacy), была подтверждена необходимость проведения теста KRAS, и было дополнительно изучено влияние мутаций генов

KRAS не только во 2-ом экзоне, а также 3-ем и 4-ом экзонах), и новой мутации NRAS (2, 3 и 4-й экзоны) на результаты терапии. Исследования PRIME продемонстрировало увеличение ВП и ОВ в группе пациентов с диким типом KRAS, получавших панитумумаб+ FOLFOX4, которая составила 9,6 мес. и 23,9 мес. соответственно, а в группе с FOLFOX4- 8,0 мес. и 19,7 мес.

В группе с мутированным KRAS ВВП существенно сократилось в группе панитумумаб +FOLFOX4 и медиана общей выживаемости составила 15,5 мес.,

Таблица 1. Распределение частоты мутаций по кодонам во 2 экзоне гена KRAS по данным исследования NCIC CTGCO.17.

| Показатели (n=164)* | Частота встречаемости |
|---------------------|-----------------------|
| Женщины | 63 (38,4%) |
| Мужчины | 101 (61,4%) |
| G13D | 20 (11,7%) |
| G13A | 1 (0,6%) |
| G13C | 1 (0,6%) |
| G13V | 1 (0,6%) |
| G12D | 61 (35,7%) |
| G12V | 48 (28,1%) |
| G12C | 9 (5,3%) |
| G12S | 17 (9,9%) |
| G12A | 11 (6,4%) |
| G12R | 2 (1,2%) |

* У 7 пациентов выявлено более 1 мутации.

Таблица 2. Распределение частоты мутаций по кодонам во 2, 3, 4 экзонах генов KRAS и NRAS по данным исследования PRIME.

| Ген | Частота мутации, % |
|----------------------------|--------------------|
| KRAS | |
| Экзон 2 (кодоны 12 и 13) | 40 |
| Экзон 3 (кодон 61) | 3,8 |
| Экзон 4 (кодоны 117 и 146) | 5,8 |
| NRAS | |
| Экзон 2 (кодоны 12 и 13) | 3,5 |
| Экзон 3 (кодоны 61) | 4,1 |
| Экзон 4 (кодоны 117 и 146) | 0 |

Таблица 3. Мутации, определяемые в гене KRAS

| Мутации, определяемые в гене KRAS | |
|-----------------------------------|--------------------|
| В кодоне 12 | В кодоне 13 |
| Gly12Ser (GGT>AGT) | Gly13Asp (GGC>GAC) |
| Gly12Arg (GGT>CGT) | |
| Gly12Cys (GGT>TGT) | |
| Gly12Asp (GGT>GAT) | |
| Gly12Ala (GGT>GCT) | |
| Gly12Val (GGT>GTT) | |

а в группе FOLFOX4 - 19,3 мес.[5,11]. Исследование PRIME при его планировании предусматривало оценку результатов терапии в зависимости от типа генов, в его рамках и было проведено дополнительное изучение влияния мутаций генов KRAS (3-й и 4-й экзоны), NRAS (2, 3 и 4-й экзоны) на активность в сочетании с FOLFOX4 в первой линии лечения мКРП (табл. 2). Чаще всего встречаются мутации во 2 экзоне кодонами 12 и 13 генов KRAS и NRAS. Наличие мутации в любом из экзонов генов KRAS, NRAS является предиктором ответа на терапию ингибиторами EGFR.

С 1 ноября 2011 года стартовал проект "Совершенствование молекулярно-генетической диагностики в Российской Федерации с целью повышения эффективности противоопухолевого лечения", в котором определяли наличие мутации гена KRAS у пациентов с мКРП. С 2014 года проект расширился за счет тестирования гена NRAS.

Цель исследования - определить частоту и спектр мутаций, в генах KRAS и NRAS у пациентов с мКРП в Приволжском Федеральном округе (ПФО).

Материалы и методы

В рамках проекта «Совершенствование молекулярно-генетической диагностики в Российской Федерации с целью повышения эффективности противоопухолевого лечения» в период с 2014-2016 год были проанализированы гистологические блоки больных мКРП из городов ПФО (Казань, Нижний Новгород, Уфа) на наличие мутаций в генах KRAS и NRAS.

Выделение ДНК из опухолевого материала проводили с помощью наборов «ДНК-ткань-Ф» (ТестГен, Димитровград) согласно инструкции компании-производителя (для парафиновых блоков использовались 4 среза толщиной 10 мкм)

Стандартные плазмидные образцы, содержащие мутации, использовали в качестве положительного контроля. Искусственно синтезированные фрагменты ДНК размером 300 п.н., содержащие мутацию, вставляли в вектор pAL-TA. Плазмиды со вставкой были произведены ЗАО «Евроген» (г. Москва). Концентрацию определяли с помощью метода стандартных разведений, используя в качестве референса геномную ДНК Jurkat Genomic DNA (Thermo Fisher, США). Содержание мутантной ДНК варьировалось от 0% до 10%.

Для детекции мутаций в гене KRAS, использовались смеси праймеров и зондов в конечных концентрациях 900 и 600 нМ соответственно. Для ПЦР «в реальном времени» использовали термоциклер «Rotor-Gene 6000» (Qiagen, Германия), ПЦР-смесь готовили в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 70 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 16,6 мМ сульфат аммония, 0,01%-ный Твин-20, 2 мМ хлорид магния, 200 нМ каждого dNTP, 500 нМ праймеров, 250 нМ флуоресцентных зондов, 1,5 ед. Taq ДНК-полимеразы. Условия амплификации фрагментов ДНК: 95С/2 мин – 1-й цикл; 94С/10 сек, 62С/60 – 60 циклов;

Комплекты олигонуклеотидов были разработаны и произведены ООО «Тестген» (г. Димитровград).

Список определяемых мутаций в генах KRAS, представлен в табл. 3.

Таблица 4. Частота и спектр мутаций гена KRAS, NRAS во 2 экзоне, кодонах 12 и 13* по регионам ПФО.

| Показатели | Казань n=115 | Нижний Новгород n=92 | Уфа n=110 | NCIC STG CO.17 n=164 | Данные ПФО n=164 |
|------------------------------|-----------------|----------------------------|--------------|----------------------------|---------------------|
| | 61 | 35 (38%) | 43(39%) | 63 (38,4%) | 47,5%(58) |
| мужчины | 54 | 57(62 %) | 67(61%) | 101 (61,4%) | 64 (52,5%) |
| мутация KRAS(всего) | 35 | 42(45,6%) | 18(16,4%) | 20 (11,7%) | 26 (21,3 %) |
| мутация KRAS(женщины) | 21 | 19(45,2%) | 4(22,2%) | 61 (35,7%) | 42 (34,4%) |
| мутация KRAS(мужчины) | 14 | 23 (54,8%) | 14(77,8%) | 48(28,1%) | 28 (23%) |
| G13D | 11(31%) | 8(19%) | 4 (22,2%) | 9(5,3%) | 9 (7,4%) |
| G12D | 10(28%) | 13 (31%) | 7 (38,9%) | 17(9,9%) | 6 (4,9%) |
| G12V | 8 (23%) | 9 (21,4%) | 3 (16,7%) | 11 (6,4%) | 9(7,4%) |
| G12C | 4 (12%) | 2(4,8%) | 2 (11,1%) | 2 (1,2%) | 2(1,6%) |
| G12S | 2 (6%) | 1 (2,4 %) | 2 (11,1 %) | | |
| G12A | 0 | 8 (19%) | 0 | | |
| G12R | 0 | 1 (2,4 %) | 0 | | |

* Ни в одном случае не было выявлено 2 или более мутации одновременно.

Результаты и обсуждение

Было проанализировано 317 гистологических блоков. Мутация KRAS выявлена в 95 блоках (29,9%), мутация NRAS в 13 блоках(2,6%).

Из 115 гистологических блоков, присланных из г.Казань, мужчин было 54, а женщин 61. Мутация KRAS была выявлена в 35 блоках – 21 женщина и 14 мужчин; мутация NRAS в 1 блоке.

Проанализировано 92 гистологических блока из г.Нижний Новгород – 35 женщин и 57 мужчин. Мутация KRAS обнаружена в 42 блоках– 19 женщин и 23 мужчины; мутация NRAS в 2 блоках.

Проанализировано 110 гистологических блоков из г.Уфа – женщин 43, мужчин 57. Мутация KRAS обнаружена в 18 блоках – у 4 женщин и 14 мужчин, мутация NRAS в 5 блоках (табл. 4).

Таким образом, материалах, присланных из городов ПФО, наиболее частыми мутациями в гене KRAS 2 экзоне, были мутации в кодонах 12D,12V,13D. Отмечено увеличение частоты мутации в гене KRAS в ПФО (в г.Нижний Новгород – 45,6%, в г.Казань- 30%, в г. Уфа -16,4 %). При анализе распределения больных по полу отмечено преобладание мутации KRAS у женщин в гт. Казань -60% среди общего числа гистологических блоков содержащих мутацию KRAS. Преобладание мужчин отмечено в гт. Нижний Новгород и Уфа. В г. Нижний Новгород количество блоков, содержащих мутацию в гене KRAS, у мужчин составило 54,8% среди гистологических блоков содержащих мутацию и

25% от общего числа больных, (женщины, среди общего числа больных, у которых была выявлена мутация составили 20,6%) В г. Уфа мутация в гене KRAS у мужчин была выявлена у 77,8% среди гистологических блоков содержащих мутацию и 12,7% от общего числа больных(женщины, среди общего числа больных, содержащих мутации составили 3,6%). Данные по частоте и спектру, по полу мутаций гена KRAS у больных КРР в исследуемых регионах ПФО сопоставимы с результатами в исследовании NCICCTG CO.17

Заключение

Таким образом пациентам с мКРР, которым планируется терапия ингибиторами EGFR, должно проводиться тестирование на наличие мутаций гена KRAS и NRAS во 2 экзоне, 12-м и 13-м кодонах. При обнаружении мутации в гене KRAS,NRAS терапия таргетными препаратами не показана. ■

Сакаева Д.Д., Данилова Д.В., ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» МЗ РБ, г. Уфа; Гордиев М.Г. ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» МЗ РТ, г. Казань; Автор, ответственный за переписку - Сакаева Д.Д.- д.м.н., профессор, заместитель главного врача по терапии ГБУЗ «Республиканский Клинический Онкологический Диспансер» МЗРБ, 450000, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Проспект Октября 73/1, тел. +79033115085, E-mail: d_sakaeva@mail.ru

Литература:

1. Stintzing S., Jung A., Rossius L. et al. Analysis of KRAS/ NRAS and BRAF mutations in FIRE-3: A randomized phase III study of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab as first-line treatment for wild-type (WT) KRAS (exon 2) metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. Presented at: European Cancer Congress 2013; Sept 27 – Oct 1, 2013; Amsterdam. Abstract LBA17.
2. Van Cutsem E., Peeters M., Siena S. et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer J Clin Oncol 2007 May 1;25(13):1658–64.
3. Jonker D.J., O'Callaghan C.J., Karapetis C.S. et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer N Engl J Med 2007 Nov 15;357(20):2040–8.
4. Vaughn C.P., Zobel S.D., Furtado L.V. et al. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. Genes Chromosomes Cancer 2011;50:307
5. Jean-Yves Douillard, Salvatore Siena et al. Randomized, Phase III Trial of Panitumumab With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 Alone As First-Line Treatment in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer: The PRIME Study Journal of Clinical Oncology number 31 november 1, 2010 (4668 – 4706)
6. Oliner K.S., Douillard J.Y., Siena S. et al. Analysis of KRAS/NRAS and BRAF mutations in the phase III PRIME study of panitumumab (pmab) plus FOLFOX versus FOLFOX as first-line treatment (tx) for metastatic colorectal cancer (mCRC). J Clin Oncol 2013;31(suppl; abstr 3511).
7. Karapetis C.S., Khambata-Ford S., Jonker D.J. et al. (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N. Engl. J. Med., 359: 1757–1765.)
8. Linardou H. All about KRAS for clinical oncology practice: Gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer // J. Cancer Treatment Reviews. – 2011. – Vol.37. – P 221-233
9. Sotelo M.J., Garcia-Paredes B, Aguado C, Sastre J, Diaz-Rubio E. Role of cetuximab in first-line treatment of metastatic colorectal cancer. // World J Gastroenterol.. — 2014. — Т. 20, № 15. — С. 4208-4219.
10. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. Lancet Oncol 2005;

- 6: 279–86
11. Stephenson J, Cohn A, Crawford J et al. Administration of panitumumab (Pmab) every two weeks (Q2W) as a 30-min or 60-min infusion: safety and pharmacokinetics (PK) from a phase I study in patients with solid tumors. *Gastrointestinal Cancers Symposium, Orlando, 2007*; Abstr. 368.
12. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials and the Australasian Gastro-Intestinal Trials Group: The influence of K-Ras exon 2 mutations on outcomes in a randomized phase III trial of cetuximab + best supportive care (BSC) versus BSC alone on patients with EGFR-positive colorectal cancer. *10th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, Spain, June 25-28, 2008*