

Received: 2016.01.25
Accepted: 2017.02.09
Published: 2017.05.17

Niedrobnokomórkowy rak płuca – mutacje, celowane i skojarzone terapie

Non-small cell lung cancer – mutations, targeted and combination therapy

Justyna Kutkowska¹, Irena Porębska², Andrzej Rapak¹

¹Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda, Wrocław

²Katedra i Klinika Pulmonologii i Nowotworów Płuc, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wrocław

Streszczenie

Z roku na rok zwiększa się liczba zachorowań na niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC), spowodowana głównie paleniem tytoniu. Większość pacjentów umiera z powodu zbyt późnego wykrycia nowotworu. Leczenie pacjentów z zaawansowanym NSCLC utrudnia mała wrażliwość tego nowotworu na cytostatyki oraz współistnienie wielu chorób, których podłożem jest, podobnie jak raka płuca, palenie tytoniu. Wraz z rozwojem biologii molekularnej, zaczęto wykorzystywać leczenie celowane oddziałujące na określone szlaki sygnałowe zaangażowane w procesy onkogenezy. Najlepiej przebadane i już wykorzystywane w praktyce klinicznej są związki hamujące funkcję receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych. Niedrobnokomórkowy rak płuca (NSCLC) cechuje się wieloma mutacjami m.in. EGFR – receptora naskórkowego czynnika wzrostu i mutacją KRAS. Rzadszą, ale istotną klinicznie jest rearanżacja genu *ALK*. W leczeniu chorych z NSCLC wykorzystuje się wiele inhibitorów receptora EGFR, takich jak erlotynib, gefitynib, afatynib oraz dwa związki celowane w kinazę *ALK* krizotynib i certynib. Niestety, mimo wielu badań, w dalszym ciągu nie można poprawić skuteczności leczenia pacjentów z mutacją KRAS. W literaturze opisano liczne przykłady skojarzonego traktowania komórek NSCLC. Najefektywniejszym rozwiązaniem byłoby połączenie niektórych związków wykazujących synergistyczne działanie na komórki nowotworowe. Niektóre kombinacje związków są już w badaniach klinicznych. Większość prób dotyczy połączenia inhibitorów kinaz tyrozynowych z innego typu inhibitorami farmakologicznymi lub immunoterapią. W pracy opisano mutacje występujące w NSCLC oraz leki stosowane w praktyce klinicznej, jak i będące w fazie badań przedklinicznych.

Słowa kluczowe:

niedrobnokomórkowy rak płuca • mutacje • inhibitory kinaz tyrozynowych • terapia celowana

Summary

Year after year, a growing number of cases of non-small cell lung cancer (NSCLC), mostly caused by smoking, have been noted. Most patients die because of the late detection of cancer and tumor resistance to treatment with cytostatics. Treatment of patients with advanced NSCLC is impeded by the low sensitivity of the tumor to cytostatic agents and the co-existence of many diseases, which substrate is, like lung cancer, cigarette smoking. Along with the development of molecular biology, targeted therapy has started to be used, affecting specific signaling pathways involved in the processes of oncogenesis. Compounds that inhibit the activity of receptor tyrosine kinases are very well examined and already used in clinical practice. NSCLC is characterized by multiple mutations, including EGFR (epidermal growth factor receptor) and KRAS. Rarer but clinically significant is the rearrangement of the *ALK* gene. Currently, for NSCLC treatment a number of EGFR inhibitors such as erlotinib, gefitinib, afatinib and two

	compounds targeted in ALK kinase crizotinib and ceritinib are applied. Unfortunately, despite numerous studies, we are still not able to improve the treatment effectiveness of patients with KRAS mutations. The most efficient solution would be to use a combination of the compounds exhibiting synergistic effects on tumor cells. The literature data describes numerous examples of the combination treatment of NSCLC cells. Some combinations of compounds are already in clinical trials. Most attempts relate to tyrosine kinase inhibitors in combination with other types of pharmacologic inhibitor or immunotherapy. This paper describes the mutations occurring in NSCLC and drugs used in clinical practice as well as being in preclinical development.
Keywords:	non-small cell lung cancer • mutations • tyrosine kinase inhibitors • targeted therapy
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1238141
DOI:	10.5604/01.3001.0010.3826
Word count:	5538
Tables:	3
Figures:	1
References:	120

Adres autora: dr hab. Andrzej Rapak, Laboratorium Immunobiologii Molekularnej Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: rapak@iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **AC** – gruczolakorak (adenocarcinoma), **AKT** – kinaza białkowa B, serynowo-treoninowa (protein kinase B), **ALCL** – chłoniak anaplastyczny z dużych komórek (anaplastic large-cell lymphoma), **ALK** – kinaza anaplastycznego chłoniaka (anaplastic lymphoma kinase), **BIRC** – niezależny komitet oceniający badania kliniczne (blinded independent central review committee), **BCL-2** – rodzina endogennych białkowych regulatorów apoptozy (B-cell-lymphoma-2), **BCR/ABL** – białko fuzyjne, o aktywności kinazy tyrozynowej (break point cluster region/Abelson murine leukemia viral oncogene homolog), **COX** – cyklooksygenaza (cyclooxygenase), **DCR** – poziom kontroli choroby (disease control rate), **EGFR** – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor), **FDA** – agencja żywności i leków (Food and Drug Administration), **GTP** – kwas guanozynotrójfosforowy (guanosine triphosphate), **HER2** – receptor dla ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (human epidermal growth factor receptor 2), **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor), **IGF1R** – receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1 (insulin-like growth factor 1 receptor), **IRC** – Niezależny Komitet Oceniający (Independent Review Committee), **JAK** – kinaza Janus (Janus tyrosine kinase), **LCC** – rak wielkokomórkowy (large cell carcinoma), **LCINS** – rak płuca u osób, które nigdy nie paliły tytoniu (lung cancer in never smokers), **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana mitogenami (mitogen activated protein kinase), **MEK** – kinaza aktywowana mitogenami (mitogen-activated protein kinase kinase), **NER** – naprawa przez wycięcie nukleotydu (nucleotide excision repair), **NSCLC** – niedrobnokomórkowy rak płuca (non-small cell lung cancer), **ORR** – odsetek obiektywnych odpowiedzi (objective response rate), **OS** – czas przeżycia całkowitego (overall survival), **PDGFR** – receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (platelet-derived growth factor receptor), **PFS** – ocena przeżycia bez progresji (progression-free survival), **PI3K** – kinaza fosfatydyloinozytolu (phosphoinositide-3-kinase), **PI3KCA** – gen kodujący podjednostkę katalityczną kinazy PI3K (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha), **PTEN** – białko supresorowe homologu fosfatazy i angiotensyny (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), **RAF** – rodzina kinaz serynowo-treoninowych (Raf serine-threonine kinases), **RAS** – rodzina małych GTP-az (small GTP-ases family), **SCC** – rak płaskonabłonkowy (squamous cell carcinoma), **SCLC** – drobnokomórkowy rak płuca (small cell lung cancer), **STAT** – czynnik transkrypcyjny (signal transducers and activators of transcription), **TKI** – inhibitory kinaz tyrozynowych (tyrosine kinase inhibitors), **TP53** – supresorowy gen nowotworowy białka p53 (tumor suppressor gene tumor protein 53), **VEGFR** – receptor czynnika wzrostu śródbłonna (vascular endothelial growth factor receptor).

WPROWADZENIE

Rak płuca jest główną przyczyną zgonów spośród wszystkich typów nowotworów, zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet [97]. Co roku odnotowuje się ponad 1,5 mln zgonów na całym świecie [114]. Przyczyną tak dużej umieralności jest zbyt późne wykrywanie nowotworu ze względu na bezobjawowy przebieg wczesnych postaci. Skuteczne leczenie NSCLC utrudnia także zaawansowany wiek chorych i związane z tym liczne choroby współistniejące uniemożliwiające najskuteczniejsze leczenie radykalne, polegające na resekcji mięszu płuc lub skojarzeniu chemioterapii i radioterapii. Leczenie zaawansowanych postaci niedrobnokomórkowego raka płuca napotyka na duże trudności związane z często występującą opornością na klasyczne leki cytostatyczne [27]. Powyższe fakty powodują, że 5-letnie przeżycie dotyczy jedynie 15% chorych [14].

Za podstawową przyczynę rozwoju raka płuca uważa się palenie tytoniu [26]. Głównym karcynogenem dymu tytoniowego jest benzopiren, który w wyniku kilku reakcji enzymatycznych, ulega w komórce przemianie w genotoksyczny epoksyd diolu benzopirenu [49]. Metabolit przyłącza się do DNA stając się mutagenem, przyczyniającym się do powstawania błędów genetycznych w czasie replikacji sprzyjających transformacji nowotworowej. Jest to główny mechanizm powstawania nowotworów tytoniozależnych, w tym nie tylko raka płuca, ale i m.in. nowotworów krtani, gardła, żołądka i pęcherza moczowego [115]. Choć zaburzenia w budowie podwójnej helisy wywołane przez epoksyd diolu benzopirenu mogą być usunięte przez system naprawy DNA typu wycinanie nukleotydu (NER – nucleotide excision repair), to jednak w tym przypadku do uruchomienia szlaku naprawczego dochodzi relatywnie rzadko [26]. Co więcej, oddziaływanie pochodnej benzopirenu z DNA na ogół nie blokuje również cyklu komórkowego w fazie G1, jak w przypadku poważnych uszkodzeń chromosomów. W rezultacie dochodzi do replikacji, a synteza nici DNA na matrycy uszkodzonej, związanej z epoksydem diolu benzopirenu, powoduje konwersję nukleotydu G→T [115]. Jeśli do takiej mutacji dojdzie w genach supresorowych nowotworów lub w protoonkogenach, może to doprowadzić do indukcji procesu karcynogenezy [49].

W ostatnich latach obserwuje się również coraz większą liczbę zachorowań na raka płuc u osób, które nigdy nie paliły tytoniu (LCINS) [104]. Zjawisko to częściej można zaobserwować wśród kobiet, zwłaszcza zamieszkujących tereny południowo-wschodniej Azji [106]. Za główne przyczyny uważa się uwarunkowania środowiskowe, takie jak: zanieczyszczenie powietrza, bierne palenie, ekspozycję na radon, azbest, metale ciężkie, wirus brodawczaka ludzkiego, a także uwarunkowania genetyczne [106].

Kliniczny i histopatologiczny podział wyróżnia dwa typy pierwotnych raków płuca: niedrobnokomórkowy rak płuca (NSCLC) (85%) oraz drobnokomórkowy rak płuca

(SCLC) (10-15%) [14]. Powszechniejszy, NSCLC dzieli się na trzy różne postacie histopatologiczne: gruczolakorak (AC), rak płaskonabłonkowy (SCC) oraz rak wielkomórkowy (LCC) (tabela 1) [34].

Tabela 1. Histologiczny podział NSCLC

Podtyp NSCLC	Procent rozpoznai
Gruczolakorak (AC)	40
Rak płaskonabłonkowy (SCC)	25
Rak wielkomórkowy (LCC)	10

na podstawie [34] zmodyfikowano.

Postęp w poznaniu biologii raka płuca spowodował, że coraz częściej do wyboru terapii oraz określenia kierunku badań klinicznych, wykorzystuje się charakterystykę molekularną komórek nowotworowych. Ocena molekularna NSCLC [21] wykazała obecność wielu biomarkerów cząsteczkowych. Markery molekularne, takie jak p63, TTF1, cytokeratyna 5/6 wykorzystuje się już w diagnostyce różnicowej raka płuca i jego podtypów [77]. Poszukuje się również markerów molekularnych użytecznych we wczesnym wykrywaniu raka płuca [73]. Obecnie jednak największe znaczenie mają biomarkery związane z mutacjami dotyczącymi szlaków sygnałowych w komórce. Do najważniejszych, wykorzystywanych w praktyce należą: mutacje receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) [89] i translokacja kinazy chłoniaka anaplastycznego (ALK) [46]. Wiele innych, np. mutacja KRAS [58] i PI3K [92] podlega intensywnym badaniom (tabela 2). Wyniki tych badań przyczyniły się do wprowadzenia terapii celowanej (lub ukierunkowanej molekularnie) polegającej na zastosowaniu leków skierowanych przeciwko nieprawidłowym białkom lub innym cząsteczkom swoistym dla komórek nowotworowych, których funkcja polega na zaburzeniu ważnych ścieżek sygnałowych i metabolicznych regulujących podstawowe procesy komórki nowotworowej. Tego typu leki są stosowane samodzielnie w raku płuca, jednak ich skuteczność może być znacząca również w połączeniu z klasyczną chemioterapią lub radioterapią, a także i immunoterapią. Obecnie wykorzystuje się głównie inhibitory błonowych kinaz tyrozynowych zapoczątkowujących przekazywanie sygnału do wnętrza komórki. Do leków tego typu należą: erlotynib, gefitynib, które działają przez hamowanie kinazy EGFR i afatynib hamujący receptory rodziny EGFR [37,40,41] oraz kryzotynib i certynib oddziałujące na kinazę ALK [38,39]. W fazie klinicznej są prowadzone badania nad sorafenibem, inhibitorem Raf [32], sunitynibem, inhibitorami receptorów VEGFR i PDGFR [50] oraz trametynibem, który hamuje receptor MET [93]. Niezwykle atrakcyjnym celem terapii jest modulacja procesu apoptozy, który pełni główną rolę w transformacji nowotworowej. Wiele uwagi poświęca się też badaniu mediatorów zapalnych oraz procesów immunologicznych, co przyczyniło się do wprowadzenia niwolumabu, jako pierwszego leku immunomodulującego w terapii NSCLC. Wykazano, iż odpowiednio dopasowana terapia celowana, może

wydłużyć przeżycie i czas progresji [67]. Wykonywanie badań molekularnych jest obecnie niezbędne do właściwego zaplanowania terapii i jest już to standardem w NSCLC [63].

W artykule omówiono najważniejsze zmiany molekularne w NSCLC związane z procesem przekazywania sygnałów, apoptozą oraz mediacją procesów zapalnych. Omówiono również wykorzystanie tych danych w praktyce do rozwoju nowych metod leczenia NSCLC. W trzeciej części pracy omówimy kojarzenie różnych sposobów farmakoterapii w celu przełamania narastającej w trakcie leczenia selekcji klonów opornych na leki ukierunkowane molekularnie stosowane w monoterapii.

Tabela 2. Częstość mutacji w cząsteczkach sygnałowych NSCLC

Mutacje w NSCLC [w %]	
Nieznana	36,4
KRAS	25
EGFR	23
EML4-ALK	6
PI3K	3
B-Raf	3
MET	2

na podstawie [21], zmodyfikowano.

SZLAKI SYGNAŁOWE

EGFR

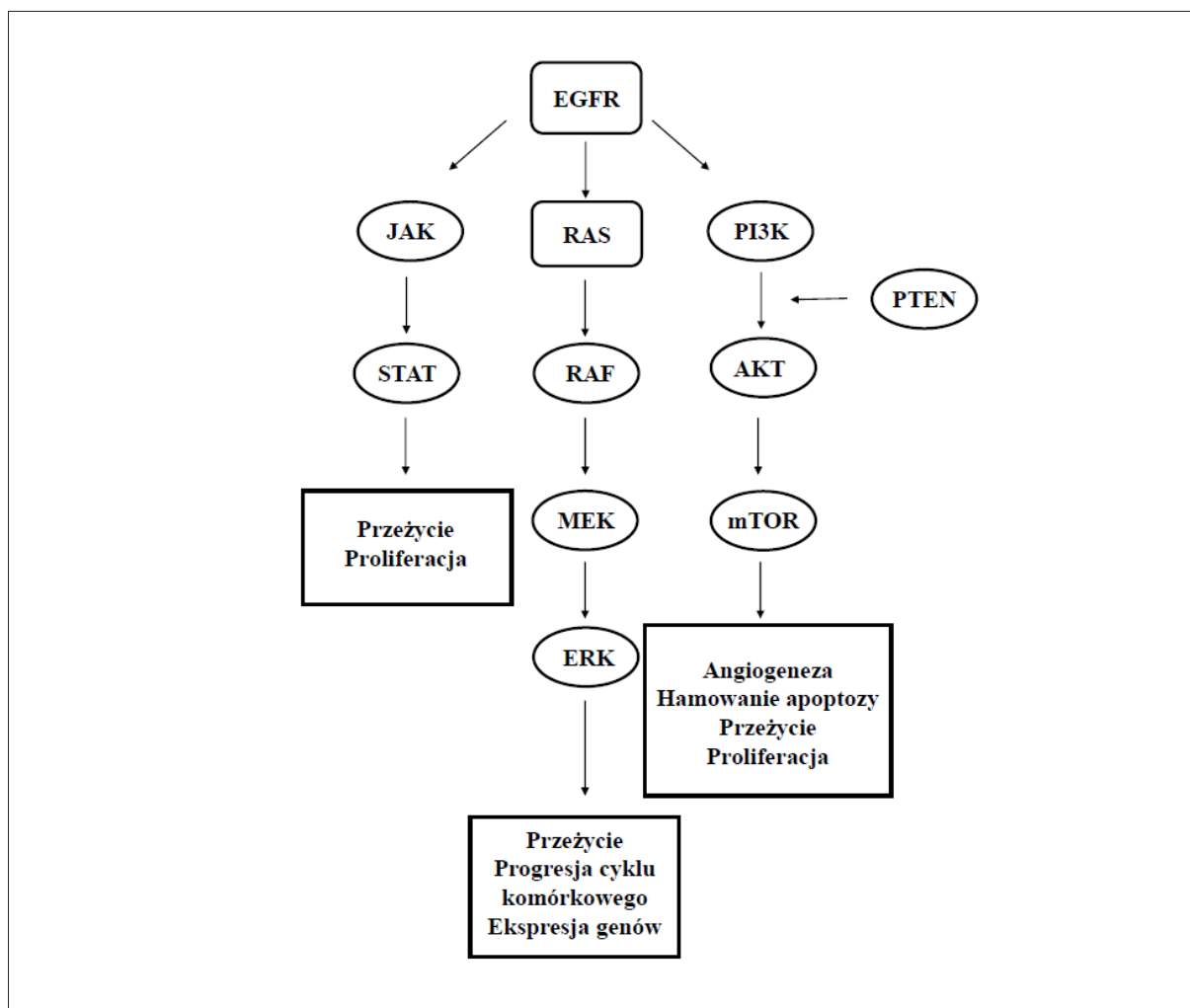
Receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, HER-1, ERBB1) jest członkiem rodziny receptorów kinazy tyrozynowej składającej się z 3 dodatkowych receptorów o podobnej strukturze: EGFR2/HER2/HER-2-NEU/ERBB2, EGFR3/HER-3/ERBB3 i ERBB4/HER4 [1]. Receptory te są zakotwiczone w błonie komórkowej komórek nabłonkowych i zawierają zewnątrzkomórkową domenę wiążącą ligand, domenę transbłonową i wewnątrzkomórkową domenę kinazy tyrozynowej, która pośredniczy w transdukcji sygnału [51]. Po związaniu liganda z receptorem, tworzone są homo- lub heterodimerowe kompleksy receptor-ligand, które powodują internalizację i autofosforylację reszt tyrozynowych, co prowadzi do aktywacji położonych niżej szlaków sygnalizacyjnych [57]. Fosforylowana kinaza tyrozynowa stymuluje wewnątrzkomórkowe przekazywanie sygnału przez kaskadę kilku dalszych szlaków, takich jak Ras-Raf-MEK-MAPK-PI3K-AKT-JAK-STAT, które regulują najważniejsze procesy życiowe komórek, w tym szczególnie ważne dla rozwoju nowotworów proliferacji, apoptozy i tworzenia naczyń krwionośnych (ryc. 1) [57,89]. Badania wykazały, że nieprawidłowa ekspresja lub mutacje w obrębie EGFR odgrywają znaczącą rolę w rozwoju, progresji i nabywaniu chemooporności NSCLC. Prawdopodobnie zmutowany gen *EGFR* jest głównym czynnikiem utrzy-

mującym samowystarczalność w zakresie sygnału proliferacyjnego i podtrzymującym fenotyp nowotworowy w niektórych NSCLC [44]. Raki płuc ze zmutowanym receptorem EGFR wykazują dużą zależność od sygnałów proliferacyjnych inicjowanych przez aktywność tego receptora, a jednocześnie dużą podatność na apoptozę w przypadku zahamowania funkcji tego receptora [101]. Nadekspresję EGFR zaobserwowano u 15% pacjentów z NSCLC. Może się pojawiać w wyniku działania różnych mechanizmów, takich jak zwiększenie liczby kopii genu, modyfikacje epigenetyczne i aktywacja przez onkogenne wirusy [29]. Najczęstsze mutacje EGFR u chorych na NSCLC polegają na delecji w eksonie 19 i swoistej mutacji punktowej w eksonie 21 kodonu 858. Obie nieprawidłowości stanowią około 80-90% wszystkich wykrytych mutacji EGFR. Mutacje te stanowią czynnik predykcyjny w zastosowaniu inhibitorów kinaz tyrozynowych i wykryto je głównie w gruczolakorakach u niepalących kobiet [105]. Niewykluczone, że jest to kluczowe zdarzenie molekularne w rozwoju NSCLC u osób niepalących. Warto zwrócić uwagę, że mutacje w genie *EGFR* mogą być również przyczyną niewrażliwości na inhibitory kinaz pierwszej generacji, takich jak erlotynib i gefitynib. Do tego typu należy mutacja punktowa w pozycji T790M polegająca na substytucji metioniny w treoninę. Ta zmiana genetyczna może mieć charakter pierwotny lub pojawić się jako wtórna podczas leczenia, co więcej może mieć również potencjał onkogenny [8,60].

Rola pozostałych receptorów z rodziny EGFR w raku płuca jest słabiej poznana. Najwięcej danych dotyczy HER-2 NEU. Obecnie wydaje się, że wysoka ekspresja HER2-NEU i innych, poza EGFR, receptorów tej rodziny sprzyja nabywaniu oporności na wybiórcze inhibitory kinaz ze względu na możliwość heterodimeryzacji receptora EGFR i potencjalizacji jego funkcji poprzez np. zastąpienie jego unieczynnionej podjednostki kinazowej, podjednostką partnera. HER2-NEU ulega heterodimeryzacji z EGFR [64], a przy tym wykazuje stałą aktywność domeny zewnątrzkomórkowej [53]. Ekspresja tego receptora występuje w około 30% NSCLC. Wykryto również mutacje genu kodującego HER2-NEU w około 1,6% NSCLC [96]. Znacznie mniej wiadomo na temat znaczenia receptora HER3-NEU oraz mutacji w genie kodującym to białko w odniesieniu do NSCLC. Receptor ten jest nieco odmienny ze względu na fakt, że po związaniu z ligandem głównie potencjalizuje efekt działania innych receptorów z rodziny EGFR poprzez dimeryzację, a sama ma słabo aktywną lub nieaktywną kinazę tyrozynową [2]. Niedawno Umelo i wsp. wykazali, że zmutowany HER3 (HER3-V855A) może pełnić onkogenną funkcję w raku płuca i stanowić atrakcyjny cel terapii [109].

EML4-ALK

Kinaza anaplastycznego chłoniaka (ALK) jest transbłonową receptorową kinazą tyrozynową należącą do nadrodziny receptorów insulinowych [46]. Aktywacja genu *ALK* odbywa się zwykle poprzez przegrupowanie chromosomów w wyniku umieszczenia jednego z kilku



Ryc. 1. Szlak receptora EGFR (na podstawie [74] zmodyfikowano)

różnych partnerów fuzyjnych, a także przez związanie z nimi regionu promotora przed domeną kinazy ALK, powodując jego transkrypcję i ekspresję białka [10]. Kilka lat temu w komórkach NSCLC wykryto nową rearanżację genu w wyniku fuzji między genem *EML4* i genem *ALK*. Białko *EML4-ALK* zawiera N-kończącą domenę *EML4* oraz wewnątrzkomórkową domenę katalityczną *ALK*. Region *EML4* powoduje konstytutywną dimeryzację domeny kinazy *ALK*, prowadząc do nieprawidłowej aktywacji przekazywania sygnałów, za pośrednictwem takich mediatorów jak Akt, STAT3 i ERK1/2 [10]. Powoduje to proliferację i przetrwanie komórki nowotworowej; znanych jest wiele wariantów kodujących białko *EML4-ALK*. U prawie 33% pacjentów z mutacją *EML4-ALK* w NSCLC wykryto kodowanie prowadzące do zestawienia eksonu 13 *EML4* do eksonu 20 *ALK* (E13, A20). U 29% pacjentów zaobserwowano dołączenie eksonu 6 *EML4* do eksonu 20 *ALK* (E6a/b, A20). Ponadto, zidentyfikowano kilka innych, rzadszych partnerów fuzyjnych *EML4*, takich jak *TFG-ALK* oraz *KIF5B* [46]. Transformację rearanżującą gen *ALK* zaobserwowano nie tylko w NSCLC, ale również w innych w guzach łitych, takich jak chłoniak

anaplastyczny z dużych komórek (ALCL), guzach miofibroblastycznych, co sugeruje, iż przekazywanie sygnału za pośrednictwem *ALK* może odgrywać rolę w rozwoju i progresji wielu nowotworów [54].

KRAS

Mutacja protoonkogennego szlaku RAS jest stwierdzana prawie u jednej trzeciej ludzkich typów nowotworów [6,33]. U ludzi występują trzy geny kodujące cztery różne białka Ras: H-RAS, N-RAS, K-RAS-4A i K-RAS-4B, dwa ostatnie to alternatywne warianty składania genu *KRAS* [81]. Zewnątrzkomórkowe sygnały aktywują białka Ras, które wiążą się z molekułą zwaną GTP biorącą udział w wielu procesach komórkowych, obejmujących proliferację, różnicowanie i apoptozę. Onkogenne postaci RAS preferencyjnie wiążą GTP, przez co pozostają ciągle w postaci aktywnej [81]. Białko Ras może być aktywowane przez wiele mechanizmów, np. przez receptory o aktywności kinaz tyrozynowych, takich jak EGFR i inne receptory czynników wzrostu, jak PDGFR i IGFR lub przez mutację aktywującą w genie kodującym [6].

Szlak efektorowy Ras składa się z kinaz RAF – MEK – ERK (ryc. 1) [58]. Raf aktywowany jest za pomocą części białka Ras pośredniczącej w przyłączaniu do błony komórkowej, następnie, Raf aktywuje kinazy MEK1/2, które aktywują ERK1/2. Aktywowane kinazy ERK1/2 fosforylują kilka cytoplazmatycznych i jądrowych białek obejmujących czynniki transkrypcyjne, które kontrolują przejścia G1-S cyklu komórkowego [6]. Szlak Ras jest więc uniwersalnym łańcuchem przekazywania sygnału pełniącym główną rolę w komunikacji wewnątrz komórki i sterującym przekazywaniem różnorodnych sygnałów, w tym przede wszystkim proliferacyjnych [47]. Ciągła aktywność szlaku Ras wynikająca z mutacji ma bardzo duże znaczenie nie tylko w powstaniu oraz podtrzymaniu fenotypu nowotworowego, ale i w oporności na terapię przeciwnowotworową. U ponad 25% pacjentów z NSCLC obserwuje się mutację KRAS, z czego w 97% przypadkach mutacja występuje w eksonie 2 i 3 (G12, G13 i Q61). Ze względu na bardzo duże znaczenie i bardzo częste występowanie tej onkogennej mutacji, wiele badań skupia się nad opracowaniem czynników hamujących dalsze elementy szlaku, takie jak kinazy MEK i Raf [33]. Niestety, jak dotychczas, białka Ras pozostały nieosiągniętym celem i nie opracowano jeszcze celowanej terapii skierowanej bezpośrednio w nowotwory Ras-aktywne [68].

B-Raf

B-Raf jest jednym z trzech członków rodziny kinazy Raf: A-Raf, B-Raf, C-Raf. Należy do grupy kinaz serynowo-treoninowych i odgrywa istotną rolę w aktywacji ścieżki mitogennej kinazy białkowej MAPK [11,18]. Kinaza B-Raf leży poniżej Ras w szlaku sygnałowym RAS-RAF-MEK-ERK, odpowiedzialnym za wzrost komórek. Najczęściej mutację BRAF obserwuje się w czerniaku (mutacja V600E) [15]. Mutacje BRAF wykrywane są dość rzadko, bo u około 2% pacjentów z NSCLC. W NSCLC prawie 80% przypadków to mutacja w V600E następująca przez substitucję aminokwasów w eksonie 15. Obserwowane są także mutacje non-V600E rozproszone w eksonie 11 i 15 [11]. Wiele mutacji non-V600E wykazuje tylko pośrednią lub małą aktywność kinazy, a dane z badań przedklinicznych wskazują, że raki charakteryzujące się obecnością kinazy B-raf non-V600E są odporne na leczenie celowane, chociaż niektóre z nich mogą być wrażliwe na inhibitory szlaku MEK [15]. Mimo że mutacje białka B-Raf w NSCLC zaobserwowano i opisano wiele lat temu, to nadal nie są dobrze poznane ze względu na małą liczbę przypadków [18].

PI3K

Kinaza fosfatydyloinozytolu (PI3K) odgrywa kluczową rolę w metabolizmie komórkowym i proliferacji, wpływając na powstawanie różnych ludzkich nowotworów [25]. Po aktywacji, PI3K inicjuje zdarzenia prowadzące do fosforylacji Akt, mającej wpływ na dodatkowe białka szlaku przekazywania sygnałów [25]. Na nadaktywność PI3K wpływa mutacja *PIK3CA*, genu kodującego katalityczną podjednostkę p10a PI3K, a także brak aktywności

białka supresorowego homologu fosfatazy i angiotensyny PTEN. Białko PTEN odgrywa ważną rolę w regulowaniu szlaku PI3K, a brak jego ekspresji może działać przeciwapoptotycznie i spowodować przetrwanie nowotworu [69]. W NSCLC znaczące mutacje w obrębie *PIK3CA* wpływają na spiralną domenę wiążącą (ekson 9, E545K lub E542K) lub na katalityczną podjednostkę (ekson 20, H1047R lub H1047L) i są uznawane za potencjalny onkogeny cel terapii [92].

MET

Receptor MET został scharakteryzowany, jako receptor transbłonowy, który jest aktywowany przez czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) [31]. Wiązanie HGF z MET powoduje dimeryzację receptora i autofosforylację reszt tyrozynowych w domenie kinazy, co prowadzi do aktywacji położonych niżej kaskad sygnalizacyjnych, w których pośredniczą głównie ścieżki RAS-MAPK i PI3K-AKT. Ponadto, w kilku badaniach wykazano występowanie współpracy oraz komunikacji między receptorem MET i innymi szlakami receptorowymi, w tym EGFR, HER2-NEU i IGF1R [13]. Dowiedziono, że amplifikacja MET w liniach komórkowych raka płuc może wywołać oporność na inhibitory EGFR przez aktywację HER3 zależnej od szlaku PI3K-AKT [13,31].

COX-2

Cyklooksigenaza (COX) jest głównym enzymem konwersji kwasu arachidonowego do prostaglandyn. Istnieją trzy izoenzymy COX: COX-1 i COX-2 oraz COX-3 (split variant COX1). COX-1 występuje w wielu prawidłowych tkankach, podczas gdy COX-2 syntetyzowany jest pod wpływem mediatorów zapalnych i mitogennych i odgrywa ważną rolę w reakcjach zapalnych [19]. Wykazano, że nadekspresja COX-2 wspiera i podtrzymuje wzrost nowotworów przez zwiększenie odporności na sygnał apoptotyczny, indukowanie angiogenezy oraz zmniejszenie odpowiedzi immunologicznej organizmu przeciwko nowotworowi. COX-2 ulega nadekspresji w różnych typach nowotworów, takich jak rak żołądka, przełyku oraz płuca. Zwiększona ekspresja COX-2 jest także związana z bardziej agresywnym zachowaniem nowotworu i gorszą prognozą u pacjentów z NSCLC [12]. Być może COX-2 jest jednym z mediatorów związanych ze znanym zjawiskiem indukcji powstawania nowotworów w przewlekłych stanach zapalnych [116].

p53

Supresorowy gen nowotworowy kodujący białko p53 (*TP53*) odgrywa ważną rolę w procesie apoptozy, zatrzymaniu cyklu komórkowego i utrzymaniu stabilności genomu. Mutacje *TP53* powodują inaktywację białka p53, które realizuje swoją funkcję przez aktywację transkrypcji setek genów wskutek wiązania się do swoistych sekwencji w ich miejscach promotorowych [65]. Mutacje genu *TP53* są jednymi z najczęstszych i najbardziej uniwersalnych zmian genetycznych wykrywanych w nowo-

tworach, w tym również w NSCLC (65% przypadków) [5]. Często występują w zmianach przednowotworowych oraz w histologicznie prawidłowej śluzówce oskrzela, otaczającej nowotwór, co świadczy o ich znaczeniu już we wczesnych etapach transformacji nowotworowej. Ponadto, mutacje *TP53* mogą się wiązać ze złym rokowaniem, a także ze słabą odpowiedzią na chemioterapię i radioterapię [5].

Bcl-2

Po raz pierwszy białka Bcl-2 zidentyfikowano w chłoniaku. Rodzina Bcl-2 obejmuje około 20 homologów w tym białka antyapoptotyczne, takie jak Bcl-2, Mcl-1 i Bcl-xL oraz proapoptotyczne Bax, Bak i Bid [80]. Członkowie rodziny Bcl-2 sterują integralnością zewnętrznej błony mitochondrialnej, a zatem są istotne w określaniu wrażliwości komórek na apoptozę indukowaną przez szlak wewnętrzny. Równowaga między przeżyciem i śmiercią komórek jest modulowana przez proporcje i interakcje antyapoptotycznych i proapoptotycznych białek tej rodziny [120]. Białka Bcl-2 wykryto zarówno w komórkach podstawnych nabłonka nienowotworowej błony śluzowej oskrzeli jak i raku płuca [80]. Według niektórych badań wysoka ekspresja Bcl-2 jest związana z niekorzystnymi efektami leczenia w różnych typach nowotworów, w tym nowotworów gruczołu krokowego, przełyku, nerek, jak również u pacjentów z NSCLC [55]. Inne badania wskazują na dłuższe przeżycie chorych, których guzy wykazują dużą ekspresję białek Bcl-2 [3]. Mimo dużej liczby badań, rola Bcl-2 w przewidywaniu wyników leczenia pozostaje więc kontrowersyjna.

LECZENIE NSCLC A CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA

Szanse na 5-letnie przeżycie pacjentów z NSCLC są zróżnicowane i zależą głównie od stadium klinicznego choroby. Najwyższe, 73% szanse na 5-letnie przeżycie mają pacjenci, u których nowotwór został wcześniej wykryty (stadium IA). W stadium IB i II wynoszą nawet do 52,2%, a w zaawansowanym NSCLC (stadia IIIA-IV) zaledwie do 3,7% [30]. U około 20-30% pacjentów z NSCLC w stadium I, II i IIIA stosuje się leczenie radykalne oparte przede wszystkim na chirurgicznej resekcji uzupełnionej niekiedy chemioterapią, pozostali pacjenci mogą otrzymać połączone: chemioterapię i radioterapię lub wyłącznie radioterapię [107]. Chemioterapia oparta na cisplatynie, jako uzupełnienie leczenia chirurgicznego, może zwiększyć szansę przeżycia, we wczesnym stadium nowotworu nawet o 5%. Niestety, u wielu chorych z niskim zaawansowaniem raka płuca dochodzi do nawrotu choroby, czemu sprzyja przede wszystkim obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych (cecha N1). U 21% pacjentów w stadium IA i aż u 42% w stadium IB obserwuje się wznowę choroby nowotworowej, która kończy się śmiercią [16]. Pacjenci w stadium IIIB mogą być leczeni radykalnie kombinacją chemioterapii i radioterapii lub być poddani tylko leczeniu paliatywnemu. Chorzy w stadium IV otrzymują wyłącznie leczenie paliatywne. Wielu (40-50%) pacjentów z NSCLC będących

w stadium regionalnie zaawansowanym lub z przerzutami (IIIB i IV), nie jest kwalifikowanych do skojarzonej terapii radykalnej (chemio-radioterapii). Tacy pacjenci byli dotychczas leczeni tylko paliatywną chemioterapią systemową opartą na pochodnych platyny, bez szans na wyleczenie, a tylko w celu przedłużenia i poprawy jakości przeżycia [4]. Wśród tych pacjentów leczenie systemowe pozwala na wydłużenie czasu życia nawet o 8-12 miesięcy, a także poprawia jakość życia [4]. Wybór terapii dla pacjentów w zaawansowanym stadium, zależał do niedawna tylko od histologicznego typu choroby, stanu ogólnego, chorób współistniejących i wcześniejszego leczenia [45]. Obecnie do tych danych niezbędne jest dołączenie charakterystyki molekularnej NSCLC u indywidualnych chorych. W przypadku choroby przerzutowej leczenie cytostatykami oparte jest na połączeniu cisplatyny lub karboplatyny z lekami takimi jak paklitaksel, docetaksel, gemcytabina i winorelbina, które z pochodnymi platyny wykazują większą skuteczność w porównaniu z terapią opartą na pojedynczym cytostatyku [45]. Wydaje się jednak, że klasyczna chemioterapia, jako samodzielna metoda leczenia, wyczerpała swój potencjał i nie oczekuje się już znaczących postępów w jej rozwoju.

CELOWANA MONOTERAPIA NSCLC

Mała skuteczność leczenia zaawansowanego raka płuca skłoniła do poszukiwania bardziej zaawansowanych metod opartych na nowej koncepcji: uderzającego w „czułe punkty” nowotworu. Wraz z postępem w biologii molekularnej taka koncepcja zyskała szansę na realizację. Szczególną uwagę poświęca się genetyce NSCLC. Odkrywa się coraz nowsze mutacje w komórkach nowotworowych i określa się ich znaczenie w rokowaniu i ocenie wrażliwości na nowe generacje leków przeciwnowotworowych (omówione w pierwszej części pracy).

Najważniejszą grupę leków ukierunkowanych molekularnie, o znanych czynnikach predykcyjnych tworzą inhibitory kinaz tyrozynowych (tabela 3).

Pacjenci z mutacją aktywującą w genie *EGFR* mogą być leczeni bardzo skutecznie lekami hamującymi aktywność zmutowanego receptora: odwracalnymi i wysoce wybiórczymi, jak erlotynib i gefitynib lub nieodwracalnymi oraz mniej wybiórczymi jak afatynib. Niestety, ich zastosowanie ogranicza mała częstość mutacji predykcyjnej wynosząca dla rasy kaukaskiej tylko około 13% [110]. Związki te wiążą się z wewnątrzkomórkową domeną EGFR i hamują działanie receptora blokując szlak przekazywania sygnału do jądra komórki. Zahamowanie czynności EGFR w komórkach nowotworowych blokuje wewnątrzkomórkowe onkogenne szlaki przekazywania informacji omówionych w pierwszej części pracy [61]. Przeprowadzono wiele badań *in vitro* i *in vivo* oceniających wpływ erlotynibu, gefitynibu i afatynibu na komórki nowotworowe. Podczas badań przedklinicznych wykazano, że inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR zahamowały wzrost hodowli linii komórkowych wywodzących się z różnych nowotwo-

Tabela 3. Inhibitory kinaz tyrozynowych w niedrobnokomórkowym raku płuca

Lek	Cel molekularny	Wskazanie do leczenia	Faza badań	
Erlotinib (Tarceva)	EGFR	Leczenie pacjentów z mutacją EGFR z delecją w eksonie 19 lub 21(L858R)	Zgoda FDA	[40]
Gefitynib (Iressa)	EGFR	Leczenie pacjentów z mutacją EGFR z delecją w eksonie 19 lub 21(L858R)	Zgoda FDA	[41]
Afatynib (Gilotrif)	EGFR	Leczenie pierwszego rzutu u pacjentów z mutacją EGFR z delecją w eksonie 19 lub 21(L858R)	Zgoda FDA	[37]
Krizotynib (Xalkori)	ALK	Pacjenci z ALK-pozytywnym oporni na pochodne platyny	Zgoda FDA	[39]
Cerytynib (Zykadia)	ALK	Pacjenci z ALK-pozytywnym, z nawrotem choroby lub z nietolerancją na krizotynib	Zgoda FDA	[38]

rów litych [23]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach na modelach zwierzęcych, w których podanie leku powodowało zmniejszenie lub zahamowanie wzrostu przeszczepów ludzkich guzów u myszy [100]. Inhibitory kinazy tyrozynowej EGFR powodowały również zatrzymanie cyklu komórkowego, zwiększały apoptozę oraz zmniejszały zdolność komórek do migracji [23].

Na podstawie pozytywnych wyników badań przedklinicznych, rozpoczęto badania kliniczne z udziałem inhibitorów EGFR. Równocześnie wprowadzono do praktyki klinicznej w leczeniu NSCL dwa drobnocząsteczkowe inhibitory kinaz: erlotynib i gefitynib. Początkowo zastosowanie niektórych inhibitorów kinaz tyrozynowych (np. erlotynibu) było oparte głównie na badaniach przedklinicznych i przewidywaniu skutku wynikającego z zablokowania EGFR [95]. Rezultaty takiego podejścia były zadowalające i wyselekcjonowano grupę chorych, u których skuteczność tego leku była szczególnie duża. Były to osoby niepalące, pacjenci z podtypem gruczolakoraka wykazującego ekspresję białka EGFR [95]. W analizie retrospektywnej tego badania okazało się, że czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na erlotynib może być zwielokrotnienie kopii genu oceniane metodą hybrydyzacji *in situ* [108]. W następnych latach udowodniono jednak, że najsilniejszym czynnikiem predykcyjnym w odpowiedzi na erlotynib jest występowanie swoistych mutacji w genie *EGFR*. Obecność tych mutacji wyraźnie zwiększała skuteczność leczenia raków „EGFR zależnych” i pozwoliła na znaczące wydłużenia przeżycia chorych na zaawansowanego raka płuca przy zminimalizowaniu objawów niepożądanych [78,90], co potwierdzono w badaniach fazy IV [82].

Podobnie jak erlotynib również gefitynib, drugi odwracalny inhibitor kinazy tyrozynowej, znalazł szerokie zastosowanie kliniczne u pacjentów z mutacją aktywującą w genie *EGFR*. Jego skuteczność w leczeniu zaawansowanego NSCLC zarówno w pierwszej, jak i kolejnych (po klasycznej chemioterapii) liniach leczenia potwierdzono w licznych badaniach klinicznych [48,71,72].

Dużym problemem w praktyce klinicznej jest wystąpienie oporności na inhibitory kinaz tyrozynowych. Wiele

badan wskazało markery molekularne tej oporności, która może być zarówno nabyta (np. mutacja T790M, amplifikacja MET czy HER2-NEU) lub pierwotna (np. mutacja KRAS, BRAF, PIK3CA czy translokacja EML4-ALK) [98]. Odpowiedzią na ten problem była synteza inhibitorów kinaz kolejnej generacji. Trzecim, wprowadzonym do praktyki klinicznej inhibitorem kinaz tyrozynowych, jest afatynib. Różni się od poprzednich inhibitorów przede wszystkim tym, że wiąże się nieodwracalnie nie tylko z EGFR, ale i innymi członkami tej rodziny i to zarówno gdy tworzą one homo-, jak i heterodimery. Afatynib przejawia aktywność wobec komórek raka z obecnością mutacji T790M, powodującą oporność na erlotynib i gefitynib. Afatynib wykazał większą skuteczność zarówno w porównaniu do klasycznej chemioterapii [94] i był skuteczny u chorych, u których wystąpiła progresja po leczeniu erlotynibem lub gefitynibem [52]. Najnowszym lekiem z grupy inhibitorów kinaz tyrozynowych zaaprobowanym w przyspieszonej procedurze rejestracyjnej w USA oraz warunkowo dopuszczonym do obrotu w krajach Unii Europejskiej jest ozymertynib (AZD9291) [36]. Ozymertynib jest inhibitorem 3 generacji wykazujący dużą skuteczność u pacjentów z mutacją T790M genu *EGFR* i wspomniana wyżej rejestracja dotyczy zastosowania leku u chorych z NSCLC z taką mutacją genetyczną.

W fazie badań klinicznych są również wybiórcze inhibitory HER2-NEU i HER3-NEU w raku płuca. Obiecujące wyniki uzyskano dla patritumabu, który jest przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko HER3-NEU [66]. W subanalizie badania HERALD sugeruje się, że markerem predykcyjnym skuteczności patritumabu może być poziom mRNA dla hereguliny – liganda HER3-NEU [70].

Do nowych leków z grupy inhibitorów kinaz tyrozynowych należą leki hamujące kinazę ALK. Pacjenci, u których wykryto fuzję genów *EML4* i *ALK*, a w następstwie onkogeną aktywację ALK mogą być leczeni drobnocząsteczkowymi inhibitorami – krizotynibem oraz cerytynibem [38,39]. W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że krizotynib hamuje fosforylację ALK i transdukcję sygnału, co w rezultacie zatrzymuje cykl komórkowy

w fazie G1-S i indukuje apoptozę [22]. Zgoda na wykrzystanie kryzotyningu w leczeniu pacjentów została oparta na badaniach klinicznych, w których wykazano lepszą skuteczność leku w zakresie przeżycia wolnego od progresji (PFS) i całkowitej odpowiedzi na leczenie (ORR) w porównaniu z chemioterapią. Początkowo lek zarejestrowano do leczenia chorych z rearanżacją genu *ALK*, jednak w marcu 2016 r. FDA wydała decyzję o dopuszczeniu tego leku również u chorych z NSCLC wykazującym rearanżację genu *ROS1* [86]. Podobnie jak w inhibitorach EGFR, również w przypadku białka *Alk* obserwuje się nabywanie oporności lub pierwotną oporność na kryzotyning [42]. Odpowiedzią na ten problem kliniczny było opracowanie inhibitorów *ALK* drugiej generacji. Do tej grupy należy certynib. Działanie certynibu blokuje autofosforylację zmutowanego receptora *ALK* i tym samym blokuje przekazywanie sygnału do wnętrza komórki. Związek jest zarejestrowany do leczenia pacjentów, którzy są oporni na kryzotyning [38]. Jego skuteczność potwierdzono w dwóch wielośrodkowych badaniach z jedną grupą leczonych i oczekuje się wyników badań randomizowanych. Drugim lekiem aktywnym po niepowodzeniu leczenia kryzotyningiem, jest alektynib [84]. Na podstawie przyspieszonej procedury rejestracyjnej w grudniu 2015 r. FDA ustaliła wskazanie do zastosowania tego leku w zaawansowanym NSCLC z mutacją *EMLA4-ALK* u chorych z progresją po leczeniu kryzotyningiem lub nietolerancją tego leku [84]. Tak więc przykład inhibitorów błonowych kinaz tyrozynowych obrazuje znaczący postęp w leczeniu celowanym NSCLC wyrażający się nie tylko w syntezie i udowodnieniu skuteczności leczenia ukierunkowanego molekularnie u chorych z określonym zdarzeniem genetycznym, ale też odpowiedzi na narastającą w trakcie leczenia oporność na leki.

Jednym z najczęstszych typów mutacji w NSCLC jest mutacja genu *KRAS*, na którą nie opracowano jeszcze skutecznej celowanej terapii. Nie powiodły się bezpośrednie próby zahamowania zmutowanego białka *KRAS* [68]. W najnowszych badaniach naukowcy skupili się więc na próbach wielopoziomowego zahamowania szlaków przekazywania informacji w taki sposób, aby skutecznie zablokować kaskadę sygnałową, mimo stałej aktywności zmutowanego białka *KRAS* [43]. Taka idea doprowadziła do syntezy i badań klinicznych nad multipotentnymi inhibitorami kinaz, do których należy np. sorafenib [58]. Sorafenib jest wielokinazowym inhibitorem wpływającym na aktywność kinaz tyrozynowych receptorów błonowych oraz wewnątrzkomórkowych kinaz serynowo-treoninowych elementów szlaku sygnałowego *Ras/MAPK* [112]. Jako jeden z nielicznych nowych leków celowanych blokuje jednocześnie kinazy błonowe i wewnątrzkomórkowe. Działanie tego typu leków, pozwalające na „zignorowanie” stale aktywnego białka *Ras* może być skuteczne zarówno w pierwotnej terapii jak i u chorych z nabytą opornością na inhibitory kinaz błonowych. Efekt funkcjonalny sorafenibu w badaniach *in vitro* i *in vivo* wiąże się z działaniem przeciwproliferacyjnym,

jak i przeciwiangiogennym [119]. Lek został już zarejestrowany w rakach wątrobowokomórkowym, nerkowokomórkowym i zróżnicowanym raku tarczycy [28]. W NSCLC trwają obecnie intensywne badania. Użytkano już obiecujące wyniki badania II fazy pacjentów z zaawansowanym NSCLC (stadium III B lub IV) cechującym się mutacją genu *KRAS*. Koncepcja zablokowania szlaku sygnałowego poniżej białka *Ras* znalazła wyraz w syntezie związków hamujących kinazę *MEK*. Należy do nich np. selumetinib, który obecnie znajduje się w fazie badań klinicznych zarówno w monoterapii, jak i z innymi lekami [7]. Natomiast niepowodzeniem jak dotąd zakończyły się badania nad innym inhibitorem *MEK* trametinibem, który w monoterapii nie okazał się skuteczniejszy niż docetaksel, natomiast wykazał się znaczącymi objawami niepożądanymi, w tym zgnoami [9].

Badania nad przywróceniem właściwej regulacji apoptozy na skutek restytucji prawidłowej funkcji białka *p53* są zaawansowane, ale nie przyniosły jeszcze wymiernych efektów w postaci wprowadzenia celowanej terapii w NSCLC. Terapie zmierzającą do restytucji prawidłowego białka *p53* zastosowali po raz pierwszy Roth i wsp. w 1996 r. [91], jednak ta postać terapii genowej nie znalazła zastosowania w praktyce NSCLC. W leczeniu raka płaskonabłonkowego głowy i szyi zarejestrowano natomiast w Chinach produkt biotechnologiczny Gencidine [76]. Jednak produkty do terapii genowej budzą dość liczne kontrowersje związane zarówno z odległymi skutkami terapii, jak i np. warunkami produkcji i podawania genetycznie zmodyfikowanych cząsteczek, jako przykład można podać Adnexynę, która ostatecznie nie została dopuszczona do obrotu w Unii Europejskiej do leczenia zespołu Li-Fraumeni [35].

SKOJARZONA TERAPIA NSCLC

Klasyczne cytostatyki stosowane obecnie w terapii przeciwnowotworowej mają podobny mechanizm działania i małą swoistość. Stosowane jednocześnie wykazują działanie addytywne przy wielu działaniach niepożądanych. Jak wynika z wyżej przedstawionych danych, nowe leki ukierunkowane molekularnie weszły już do praktyki klinicznej, ale są stosowane w monoterapii. Racjonalne wydają się jednak próby kojarzenia różnych postaci leczenia farmakologicznego w zaawansowanym raku płuca. Skojarzenie nowoczesnych metod leczenia farmakologicznego ma również uzasadnienie, jako uzupełnienie metod leczenia radykalnego opartego na radioterapii i chirurgii. Skojarzona terapia może być bardziej skuteczna, ponieważ oddziałuje na wiele procesów fizjologicznych (apoptoza, różnicowanie, angiogeneza, przerzutowanie, reakcja układu immunologicznego) oraz pozwala na użycie dużo mniejszych stężeń związków. Łączenie różnych metod leczenia, w tym opartego na klasycznej chemioterapii i lekach celowanych, pozwala przede wszystkim na przełamanie pierwotnej oporności komórek nowotworowych na pojedyncze leki, a także zmniejsza możliwość nabycia tej oporności. Tera-

pia wielolekowa ogranicza również niekorzystne skutki heterogenności nowotworu. W literaturze opisano liczne przykłady skojarzonego traktowania komórek NSCLC. Niektóre kombinacje związków są już w badaniach klinicznych, większość prób dotyczy połączenia inhibitorów kinaz tyrozynowych z klasycznymi cytostatykami.

Połączenie docetakselu z gefitynibem wykazywało synergistyczne działanie na komórki NSCLC, zarówno z mutacją receptora EGFR, jak i KRAS, co stwarza nadzieję na przełamanie oporności na leczenie guzów z mutacją KRAS [56]. Inną koncepcją oddziaływania na błonowe receptory o aktywności kinaz tyrozynowych jest blokowanie zewnątrzkomórkowej domeny przez fałszywe ligandy. Do tego typu leków należy necitumumab, przeciwciało monoklonalne blokujące aktywność receptora EGFR. Lek dopuszczono do użycia u chorych z płaskonabłonkowym NSCLC z obecnością przerzutów w połączeniu z cisplatyną i gemcytabiną [87]. Próbowano również określić skuteczność kojarzenia różnych typów inhibitorów kinaz tyrozynowych. Zbadano wpływ kombinacji afatynibu z cetuksymabem u pacjentów z mutacją EGFR, opornych na erlotynib i gefitynib [88]. Celem takiej kombinacji było nieodwracalnie zablokowanie receptora EGFR oraz innych członków rodziny receptorów EGFR. Koncepcja okazała się skuteczna również przy połączeniu erlotynibu z cetuksymabem, ponieważ ten zestaw leków spowodował wydłużenie życia pacjentów z dziką mutacją receptora EGFR oraz z nieznaną mutacją nowotworową [113]. Ważnym kierunkiem badań jest łączenie leków działających na różnych poziomach szlaku sygnałowego. W badaniu II fazy z wykorzystaniem erlotynibu oraz trametynibu, inhibitora receptora MET zaobserwowano wydłużenie życia i dobrą tolerancję tak połączonych leków przez chorych na NSCLC [93]. Kojarzenie inhibitorów kinaz przebadano również w odniesieniu do metod niefarmakologicznych. Skutecznym sposobem terapii może być dołączenie farmakoterapii do terapii fotodynamicznej, która jest w praktyce stosowana do leczenia paliatywnego zwężeń oskrzeli wywołanych przez NSCLC lub bardzo wczesnych raków płuca [99]. Wykazano, iż erlotynib wzmacnia skutek terapii fotodynamicznej [38]. Bardzo obiecujące wyniki badań dotyczą połączenia inhibitora BRAF dabrafenibu i inhibitora MEK trametynibu u chorych z NSCLC, których guzy wykazują mutację BRAF V600E [79].

Niektóre koncepcje łączenia leków ukierunkowanych molekularnie z innymi lekami nie znajdują potwierdzenia w praktyce klinicznej. Niepowodzeniem zakończyła się np. III faza badań klinicznych, w których użyto gefitynibu z cisplatyną i paklitakselem. Stwierdzono wytworzenie się chemiooporności z powodu aktywacji receptora IGF-1R [119]. Necitumumab jest również przykładem leku, który w badaniach klinicznych, wykazał skuteczność w ściśle określonym schemacie leczenia. Próba zastosowania w raku niepłaskonabłonkowym pemetreksedu i cisplatyny zakończyła się niepowodzeniem [75].

Dużą uwagę w kojarzeniu leków przeciwnowotworowych poświęca się lekom przeciwzapalnym i immunomodulującym. Ich działanie w takich kombinacjach ma przede wszystkim działanie proapoptotyczne i antyproliferacyjne. Większość takich połączeń jest obecnie w badaniach przedklinicznych. Kombinacja inhibitora COX-2 celekoksytu i sorafenibu znacznie hamowała proliferację komórek A549 przez zmniejszenie ekspresji surwiwiny i Bcl-2 oraz zahamowania fosforylacji kinaz MEK i ERK [118]. Antybiotyk klatrynomycyna, który również ma słabe działanie przeciwzapalne, wzmacniał cytotoksyczne działanie gefitynibu w komórkach NSCLC przez wpływ na proces autofagii [103]. Rapamycyna, stosowana jako lek immunosupresyjny w transplantologii, wzmacniała antyproliferacyjne działanie dasatinibu, inhibitora kinazy BCR/ABL i kinaz rodziny Src przez zahamowanie kinazy mTOR, odpowiedzialnej za regulację wzrostu, proliferację i ruchliwość komórek oraz Src, która pełni rolę białkowego produktu onkogenów komórkowych umiejscowionych w jądrze komórkowym [17]. Niesteroidowy lek przeciwzapalny sulindak w połączeniu z simwastatyną synergistycznie indukował apoptozę w komórkach A549 poprzez obniżenie ekspresji surwiwiny [59]. Kwas retinowy ATRA z genisteiną zmniejszał przerzutowy potencjał komórek A549 przez zahamowanie ekspresji białek powierzchniowych MUC1 i ICAM-1 [20]. 5-Fluorouracyl w połączeniu z kwasem gambogenik znacznie zwiększał kaspazozależną apoptozę jak i nekroptozę poprzez indukcję czynników ROS [102]. Beta-guttikalton (gambogic acid) wykazywał silne działanie synergiczne z cisplatyną *in vitro* oraz *in vivo* w wyniku zahamowania NF-κB i MAPK [111]. Połączenie aspiryny z blokerem białek Bcl-2, ABT-737 zmniejszało cytoprotekcyjne działanie procesu autofagii na indukujący śmierć komórek przez wpływ na kinazę MAPK p38 [117]. Inny inhibitor Bcl-2 AT101 wzmacniał antyproliferacyjne działanie cisplatyny zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Kombinacja tych substancji znajduje się w II fazie badań klinicznych [83].

PODSUMOWANIE

Zastosowanie leczenia celowanego lub ukierunkowanego molekularnie otwiera przed onkologią wiele nowych możliwości terapeutycznych charakteryzujących się zupełnie odmiennymi mechanizmami działania. Umożliwia osiągnięcie lepszych wyników w wyselekcjonowanych podgrupach chorych, stanowiących stosunkowo niewielki odsetek w ich ogólnej populacji. Obecnie leki ukierunkowane molekularnie można zaoferować kilkunastu procentom chorym na raka płuca. Z wyników badań zespołu prof. Krawczyka z Katedry i Kliniki Pneumonologii Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie wynika, że w Polsce 10% pacjentów z tym nowotworem ma mutacje w genie *EGFR*, a rearanżację genu *ALK* stwierdza się prawie u 5% chorych i są to przede wszystkim pacjenci niepalący [62].

Rozwój wiedzy na temat raka płuca, nie prowadzi obecnie do powstawania kolejnych linii toksycz-

nych chemioterapeutyków, zmierza raczej w kierunku wybiórczego, celowanego, niekiedy skojarzonego leczenia tej choroby. Duży wybór leków celowanych umożliwia indywidualizację leczenia i wybór metody odpowiedniej do indywidualnego chorego. Nie można jednak pominąć faktu, że takie podejście wymaga szczegółowej oceny cech molekularnych raka u indywidualnych chorych. Większość leków celowanych jest stosowanych w ściśle wyselekcjonowanej populacji, ponieważ stosowane u niewyselekcjonowanej grupy pacjentów zazwyczaj nie wykazują znaczącego działania terapeutycznego. Istnienie czynników predykcyjnych odpowiedzi na terapię celowaną w NSCLC wymusza postępowanie w dziedzinie diagnostyki molekularnej, a jednocześnie „przenosi” metody badań molekularnych stosowane dotąd głównie w celach naukowych do praktyki klinicznej. W związku z tym powstaje wiele problemów związanych z wyborem najbardziej czułych i swoistych testów do oceny np. mutacji genu *EGFR* i odpowiedniej ich walidacji oraz certyfikowania laboratoriów diagnostycznych wykonujących badania na użytek kliniczny. Amerykańska Agencja FDA wraz z zatwierdzaniem leków ukierunkowanych molekularnie reguluje również zasady badań molekularnych dla potrzeb terapii celowanej. Przykładem tego jest zgoda FDA użycia metody oznaczania mutacji krążącego w osoczu genu *EGFR* pochodzącego z komórek guza [85]. Również w Polsce reguluje się metodologię badań molekularnych dla celów klinicznych i opracowuje stosowne wytyczne [62]. W wytycznych zwraca się uwagę nie tylko na zagadnienia techniczne oznaczania mutacji, ale również na ścisłą współpracę biologa molekularnego,

patologa i klinicysty w dostarczaniu odpowiedniego jakościowo i ilościowo materiału komórkowego lub tkankowego, odpowiedniej oceny przez patologa oraz czasu wykonania badania. Obecnie większość badań molekularnych wykonuje się na tkance lub komórkach NSCLC pozyskanych bezpośrednio z guza podczas zabiegów diagnostycznych lub terapeutycznych. Rozszerzenie panelu badań materiału tkankowego o diagnostykę molekularną wymusza na klinicystach uzyskanie większej niż dotychczas ilości materiału tkankowego, co jest trudne, a czasem nawet niemożliwe u osób z zaawansowanym nowotworem. Odpowiedzią na te problemy jest opracowanie metod „płynnej biopsji”, czyli pozyskiwanie krążącego DNA uwalnianego z komórek guza. Wspomniany wyżej test zaaprobowany przez FDA jest przykładem takiej metody. Wadą nowych leków, poza koniecznością zaawansowanych badań laboratoryjnych w celu selekcji pacjentów, jest również wysoka cena, odzwierciedlająca koszty licznych badań podstawowych, klinicznych, wreszcie kosztów produkcji związanych np. z tym, że niektóre nowe leki będą wymagać np. inżynierii genetycznej. Powoduje to wprowadzanie odrębnych analiz kosztowych terapii, co przedstawili z podaniem przykładów Larson i wsp. [24].

Pomimo wad terapii celowanej, wydaje się, że przyszłość onkologii opierać się będzie z pewnością na coraz liczniejszych lekach ukierunkowanych molekularnie. Taki dobór metod może zaowocować lepszymi wynikami i dalszym wydłużeniem życia pacjentów przy zminimalizowaniu groźnych objawów niepożądanych i zachowaniu dobrej jakości życia.

PÍSMIENICTWO

- [1] Alvarado D., Klein D.E., Lemmon M.A.: ErbB2 resembles an auto-inhibited invertebrate epidermal growth factor receptor. *Nature*, 2009; 461: 287-291
- [2] Amin D.N., Campbell M.R., Moasser M.M.: The role of HER3, the unpretentious member of the HER family, in cancer biology and cancer therapeutics. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2010; 21: 944-950
- [3] Anagnostou V.K., Lowery F.J., Zolota V., Tzelepi V., Gopinath A., Liceaga C., Panagopoulos N., Frangia K., Tanoue L., Boffa D., Gettinger S., Dettmerbeck F., Homer R.J., Dougenis D., Rimm D.L., Syrigos K.N.: High expression of BCL-2 predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer patients with non squamous histology. *BMC Cancer*, 2010; 10: 186
- [4] Azzoli C.G., Baker S. Jr., Temin S., Pao W., Aliff T., Brahmer J., Johnson D.H., Laskin J.L., Masters G., Milton D., Nordquist L., Pfister D.G., Piantadosi S., Schiller J.H., Smith R. i wsp.: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2009; 27: 6251-6266
- [5] Bae E.Y., Lee E.J., Kang H.G., Lee S.Y., Jin G., Lee W.K., Choi J.E., Jeon H.S., Lim J.O., Lee E.B., Park J.Y.: Polymorphisms in apoptosis-related genes and TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *J. Korean Med. Sci.*, 2011; 26: 1527-1530
- [6] Baines A.T., Xu D., Der C.J.: Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med. Chem.*, 2011; 3: 1787-1808
- [7] Banerji U., Camidge D.R., Verheul H.M., Agarwal R., Sarker D., Kaye S.B., Desai I.M., Timmer-Bonte J.N., Eckhardt S.G., Lewis K.D., Brown K.H., Cantarini M.V., Morris C., George S.M., Smith P.D., van Herpen C.M.: The first-in-human study of the hydrogen sulfate (Hyd-sulfate) capsule of the MEK1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886): a phase I open-label multicenter trial in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2010; 16: 1613-1623
- [8] Bell D.W., Gore I., Okimoto R.A., Godin-Heymann N., Sordella R., Mulloy R., Sharma S.V., Brannigan B.W., Mohapatra G., Settleman J., Haber D.A.: Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat. Genet.*, 2005; 37: 1315-1316
- [9] Blumenschein G.R.Jr., Smit E.F., Planchard D., Kim D.W., Cadranet J., De Pas T., Dunphy F., Udud K., Ahn M.J., Hanna N.H., Kim J.H., Mazieres J., Kim S.W., Baas P., Rappold E. i wsp.: A randomized phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib (GSK1120212) compared with docetaxel in KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann. Oncol.*, 2015; 26: 894-901
- [10] Bravaccini S., Tumedei M.M., Ulivi P., Zoli W., Calistri D., Candoli P., Amadori D., Puccetti M.: ALK translocation detection in non-small cell lung cancer cytological samples obtained by TBNA or EBUS-TBNA. *Cytopathology*, 2016; 27: 103-107
- [11] Brustugun O.T., Khattak A.M., Tromborg A.K., Beigi M., Beiske K., Lund-Iversen M., Helland A.: BRAF-mutations in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2014; 84: 36-38

- [12] Butkiewicz D., Krześniak M., Drosik A., Giglok M., Gdowicz-Kłosok A., Kosarewicz A., Rusin M., Masłyk B., Gawkowska-Suwińska M., Suwiński R.: The VEGFR2, COX-2 and MMP-2 polymorphisms are associated with clinical outcome of patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*, 2015; 137: 2332-2342
- [13] Calles A., Kwiatkowski N., Cammarata B.K., Ercan D., Gray N.S., Jänne P.A.: Tivantinib (ARQ 197) efficacy is independent of MET inhibition in non-small-cell lung cancer cell lines. *Mol. Oncol.*, 2015; 9: 260-269
- [14] Cancer Facts & Figures 2014. [http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2014/\(01.12.2015\)](http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2014/(01.12.2015))
- [15] Cardarella S., Ogino A., Nishino M., Butaney M., Shen J., Lydon C., Yeap B.Y., Sholl L.M., Johnson B.E., Jänne P.A.: Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2013; 19: 4532-4540
- [16] Chansky K., Sculier J.P., Crowley J.J., Giroux D., Van Meerbeeck J., Goldstraw P.: The International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project: prognostic factors and pathologic TNM stage in surgically managed non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 2009; 4: 792-801
- [17] Chen B., Xu X., Luo J., Wang H., Zhou S.: Rapamycin enhances the anti-cancer effect of dasatinib by suppressing Src/PI3K/mTOR pathway in NSCLC cells. *PLoS One*, 2015; 10: e0129663
- [18] Chen D., Zhang L.Q., Huang J.F., Liu K., Chuai Z.R., Yang Z., Wang Y.X., Shi D.C., Liu Q., Huang Q., Fu W.L.: BRAF mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2014; 9: e101354
- [19] Chen L., He Y., Huang H., Liao H., Wei W.: Selective COX-2 inhibitor celecoxib combined with EGFR-TKI ZD1839 on non-small cell lung cancer cell lines: in vitro toxicity and mechanism study. *Med. Oncol.*, 2008; 25: 161-171
- [20] Cheng J., Qi J., Li X.T., Zhou K., Xu J.H., Zhou Y., Zhang G.Q., Xu J.P., Zhou R.J.: ATRA and genistein synergistically inhibit the metastatic potential of human lung adenocarcinoma cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015; 8: 4220-4227
- [21] Cheng L., Alexander R.E., MacLennan G.T., Cummings O.W., Montironi R., Lopez-Beltran A., Cramer H.M., Davidson D.D., Zhang S.: Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod. Pathol.*, 2012; 25: 347-369
- [22] Christensen J.G., Zou H.Y., Arango M.E., Li Q., Lee J.H., McDonnell S.R., Yamazaki S., Alton G.R., Mroczkowski B., Los G.: Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol. Cancer Ther.*, 2007; 6: 3314-3322
- [23] Ciardiello F., Caputo R., Bianco R., Damiano V., Pomato G., De Placido S., Bianco A.R., Tortora G.: Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 2053-2063
- [24] Cost-Utility Analysis of Treatments for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. http://www.ajpb.com/journals/ajpb/2015/ajpb_novemberdecember2015/cost-utility-analysis-of-treatments-for-advanced-non-small-cell-lung-cancer (03.01.2016)
- [25] Courtney K.D., Corcoran R.B., Engelman J.A.: The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28: 1075-1083
- [26] Czyżykowski R., Połowinczak-Przybyłek J., Potemski P.: Nicotine-induced resistance of non-small cell lung cancer to treatment – possible mechanisms. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2016; 70: 186-193
- [27] d'Amato T.A., Landreneau R.J., McKenna R.J., Santos R.S., Parker R.J.: Prevalence of in vitro extreme chemotherapy resistance in resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.*, 2006; 81: 440-446
- [28] Dasari A., Gore L., Messersmith W.A., Diab S., Jimeno A., Weekes C.D., Lewis K.D., Drabkin H.A., Flaig T.W., Camidge D.R.: A phase I study of sorafenib and vorinostat in patients with advanced solid tumors with expanded cohorts in renal cell carcinoma and non-small cell lung cancer. *Invest. New Drugs*, 2013; 31: 115-125
- [29] De Luca A., Carotenuto A., Rachiglio A., Gallo M., Maiello M.R., Aldinucci D., Pinto A., Normanno N.: The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment. *J. Cell Physiol.*, 2008; 214: 559-567
- [30] DeSantis C.E., Lin C.C., Mariotto A.B., Siegel R.L., Stein K.D., Kramer J.L., Alteri R., Robbins A.S., Jemal A.: Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.*, 2014; 64: 252-271
- [31] Dimou A., Non L., Chae Y.K., Tester W.J., Syrigos K.N.: MET gene copy number predicts worse overall survival in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC); a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2014; 9: e107677
- [32] Dingemans A.M., Mellema W.W., Groen H.J., van Wijk A., Burgers S.A., Kunst P.W., Thunnissen E., Heideman D.A., Smit E.F.: A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIB or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. *Clin. Cancer Res.*, 2013; 19: 743-751
- [33] El-Chaar N.N., Piccolo S.R., Boucher K.M., Cohen A.L., Chang J.T., Moos P.J., Bild A.H.: Genomic classification of the RAS network identifies a personalized treatment strategy for lung cancer. *Mol. Oncol.*, 2014; 8: 1339-1354
- [34] Ettinger D.S., Akerley W., Bepler G., Blum M.G., Chang A., Cheney R.T., Chirieac L.R., D'Amico T.A., Demmy T.L., Ganti A.K., Govindan R., Grannis F.W. Jr., Jahan T., Jahanzeb M., Johnson D.H. i wsp.: Non-small cell lung cancer. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, 2010; 8: 740-801
- [35] European Medicines Agency: Advexin – Product Information. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000919/wapp/Initial_authorisation/human_wapp_000042.jsp (13.06.2016)
- [36] European Medicines Agency: Tagrisso – Product Information. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/004124/human_med_001961.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 (15.06.2016)
- [37] FDA Approval for Afatinib Dimaleate. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-afatinibdimaleate> (05.12.2015)
- [38] FDA Approval for Ceritinib – National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-ceritinib> (05.12.2015)
- [39] FDA Approval for Crizotinib. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-crizotinib> (05.12.2015)
- [40] FDA Approval for Erlotinib Hydrochloride – National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-erlotinib-hydrochloride> (05.12.2015)
- [41] FDA Approval for Gefitinib. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-gefitinib> (05.12.2015)
- [42] Gadgeel S.M., Gandhi L., Riely G.J., Chiappori A.A., West H.L., Azada M.C., Morcos P.N., Lee R.M., Garcia L., Yu L., Boisserie F., Di Laurenzio L., Golding S., Sato J., Yokoyama S., Tanaka T., Ou S.H.: Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol.*, 2014; 15: 1119-1128
- [43] Gautschi O., Milia J., Cabarro B., Bluthgen M.V., Besse B., Smit E.F., Wolf J., Peters S., Früh M., Koeberle D., Oulhouir Y., Schuler M., Curioni-Fontecedro A., Huret B., Kerjovan M. i wsp.: Targeted therapy for patients with BRAF-mutant lung cancer: results from the European EURAF cohort. *J. Thorac. Oncol.*, 2015; 10: 1451-1457
- [44] Gazdar A.F., Shigematsu H., Herz J., Minna J.D.: Mutations and addition to EGFR: the Achilles 'heel' of lung cancers? *Trends. Mol. Med.*, 2004; 10: 481-486
- [45] Goffin J., Lacchetti C., Ellis P.M., Ung Y.C., Evans W.K.: First-line

systemic chemotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a systematic review. *J. Thorac. Oncol.*, 2010; 5: 260-274

- [46] Gridelli C., Peters S., Sgambato A., Casaluze F., Adjei A.A., Ciardiello F.: ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer Treat. Rev.*, 2014; 40: 300-306
- [47] Hames M.L., Chen H., Iams W., Aston J., Lovly C.M., Horn L.: Correlation between KRAS mutation status and response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2016; 92: 29-34
- [48] Han J.Y., Park K., Kim S.W., Lee D.H., Kim H.Y., Kim H.T., Ahn M.J., Yun T., Ahn J.S., Suh C., Lee J.S., Yoon S.J., Han J.H., Lee J.W., Jo S.J., Lee J.S.: First-SIGNAL: first-line single-agent iressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung. *J. Clin. Oncol.*, 2012; 30: 1122-1128
- [49] Hecht S.S.: Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *Int. J. Cancer*, 2012, 131: 2724-2732
- [50] Heist R.S., Wang X., Hodgson L., Otterson G.A., Stinchcombe T.E., Gandhi L., Villalona-Calero M.A., Watson P., Vokes E.E., Socinski M.A., Alliance for Clinical Trials in Oncology: CALGB 30704 (Alliance): a randomized phase II study to assess the efficacy of pemetrexed or sunitinib or pemetrexed plus sunitinib in the second-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 2014, 9: 214-221
- [51] Herbst R.S.: Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2004; 59: 21-26
- [52] Hirsh V., Cadranel J., Cong X.J., Fairclough D., Finnen H.W., Lawrence R.M., Miller V.A., Palmer M., Yang J.C.: Symptom and quality of life benefit of afatinib in advanced non-small-cell lung cancer patients previously treated with erlotinib or gefitinib: results of a randomized phase IIb/III trial (LUX-Lung 1). *J. Thorac. Oncol.*, 2013; 8: 229-237
- [53] Hynes N.E., Lane H.A.: ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, 2005; 5: 341-354
- [54] Iacono D., Chiari R., Metro G., Bennati C., Bellezza G., Cenci M., Ricciuti B., Sidoni A., Baglivo S., Minotti V., Crinò L.: Future options for ALK-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2015; 87: 211-219
- [55] Javid J., Mir R., Mirza M., Imtiyaz A., Prasant Y., Mariyam Z., Julka P.K., Mohan A., Lone M., Ray P.C., Saxena A.: CC genotype of anti-apoptotic gene BCL-2 (-938 C/A) is an independent prognostic marker of unfavorable clinical outcome in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin. Transl. Oncol.*, 2015; 17: 289-295
- [56] Jiang H., Zhao P.J., Su D., Feng J., Ma S.L.: Paris saponin I induces apoptosis via increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 expression in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Mol. Med. Rep.*, 2014; 9: 2265-2272
- [57] Jorissen R.N., Walker F., Pouliot N., Garrett T.P., Ward C.W., Burgess A.W.: Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.*, 2003; 284: 31-53
- [58] Karachaliou N., Mayo C., Costa C., Magri I., Gimenez-Capitan A., Molina-Vila M.A., Rosell R.: KRAS mutations in lung cancer. *Clin. Lung Cancer*, 2013; 14: 205-214
- [59] Kim Y.S., Seol C.H., Jung J.W., Oh S.J., Hwang K.E., Kim H.J., Jeong E.T., Kim H.R.: Synergistic effect of sulindac and simvastatin on apoptosis in lung cancer A549 cells through AKT-dependent downregulation of survivin. *Cancer Res. Treat.*, 2015; 47: 90-100
- [60] Kobayashi S., Boggon T.J., Dayaram T., Janne P.A., Kocher O., Meyerson M., Johnson B.E., Eck M.J., Tenen D.G., Halmos B.: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 352: 786-792
- [61] Kowalczyk A., Szutowicz-Zielińska E., Dziadziuszko R., Jassem J.: Znaczenie inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca. *Onkologia w Praktyce Klinicznej*, 2005; 1: 217-224
- [62] Krawczyk P., Chorostowska-Wynimko J., Dziadziuszko R., Jassem J., Krzakowski M., Langfort R., Puacz E., Wasąg B., Wojas-Krawczyk K.: Zalecenia metodyczne dotyczące oceny mutacji genu EGFR oraz rearanżacji genu ALK w kwalifikacji chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca do terapii ukierunkowanych molekularnie. *Nowotwory*, 2014; 64: 336-342
- [63] Krzakowski M., Jassem J., Dziadziuszko R., Kowalski D.M., Olszewski W., Orłowski T., Rzyman W., Smorczewska M.: Nowotwory płuca i opłucnej oraz śródpiersia. W: Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych 2013, t. 1, Via Medica, Gdańsk 2013, 69-101
- [64] Lenferink A.E., Pinkas-Kramarski R., van de Poll M.L., van Vugt M.J., Klapper L.N., Tzahar E., Waterman H., Sela M., van Zoelen E.J., Yarden Y.: Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J.*, 1998; 17: 3385-3397
- [65] Li G., Zhao J., Peng X., Liang J., Deng X., Chen Y.: Radiation/paclitaxel treatment of p53-abnormal non-small cell lung cancer xenograft tumor and associated mechanism. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2012; 27: 227-233
- [66] Lockhart A.C., Liu Y., Dehdashti F., Laforest R., Picus J., Frye J., Trull L., Belanger S., Desai M., Mahmood S., Mendell J., Welch M.J., Siegel B.A.: Phase 1 evaluation of [(64)Cu]DOTA-patritumab to assess dosimetry, apparent receptor occupancy, and safety in subjects with advanced solid tumors. *Mol. Imaging Biol.*, 2016; 18: 446-453
- [67] Ma P.C.: Personalized targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Cleve. Clin. J. Med.*, 2012; 79: eS56-eS60
- [68] Mao C., Qiu L.X., Liao R.Y., Du F.B., Ding H., Yang W.C., Li J., Chen Q.: KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer*, 2010; 69: 272-278
- [69] Marsit C.J., Zheng S., Aldape K., Hinds P.W., Nelson H.H., Wiencke J.K., Kelsey K.T.: PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Hum. Pathol.*, 2005; 36: 768-776
- [70] Mendell J., Freeman D.J., Feng W., Hettmann T., Schneider M., Blum S., Ruhe J., Bange J., Nakamaru K., Chen S., Tsuchihashi Z., von Pawel J., Copigneaux C., Beckman R.A.: Clinical translation and validation of a predictive biomarker for patritumab, an anti-human epidermal growth factor receptor 3 (HER3) monoclonal antibody, in patients with advanced non-small cell lung cancer. *EBioMedicine*, 2015; 2: 264-271
- [71] Mitsudomi T., Morita S., Yatabe Y., Negoro S., Okamoto I., Tsurutani J., Seto T., Satouchi M., Tada H., Hirashima T., Asami K., Katakami N., Takada M., Yoshioka H., Shibata K. i wsp.: Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJ-TOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.*, 2010; 11: 121-128
- [72] Mok T.S., Wu Y.L., Thongprasert S., Yang C.H., Chu D.T., Saijo N., Sunpawaravong P., Han B., Margono B., Ichinose Y., Nishiwaki Y., Ohe Y., Yang J.J., Chewaskulyong B., Jiang H. i wsp.: Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 2009; 361: 947-957
- [73] Montani F., Marzi M.J., Dezi F., Dama E., Carletti R.M., Bonizzi G., Bertolotti R., Bellomi M., Rampinelli C., Maisonneuve P., Spaggiari L., Veronesi G., Nicassio F., Di Fiore P.P., Bianchi F.: miR-Test: a blood test for lung cancer early detection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2015; 107: djv063
- [74] Nyati M.K., Morgan M.A., Feng F.Y., Lawrence T.S.: Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2006; 6: 876-885
- [75] Paz-Ares L., Mezger J., Ciuleanu T.E., Fischer J.R., von Pawel J., Provencio M., Kazarnowicz A., Losonczy G., de Castro G. Jr., Szczesna A., Crino L., Reck M., Ramlau R., Ulsperger E., Schumann C. i wsp.: Necitumumab plus pemetrexed and cisplatin as first-line therapy

in patients with stage IV non-squamous non-small-cell lung cancer (INSPIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.*, 2015; 16: 328-337

[76] Peng Z.: Current status of genedicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum. Gene Ther.*, 2005; 16: 1016-1027

[77] Petersen I.: The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Dtsch. Arztebl. Int.*, 2011; 108: 525-531

[78] Pirker R., Herth F.J., Kerr K.M., Filipits M., Taron M., Gandara D., Hirsch F.R., Grunewald D., Popper H., Smit E., Dietel M., Marchetti A., Manegold C., Schirmacher P., Thomas M. i wsp.: Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop. *J. Thorac. Oncol.*, 2010; 5: 1706-1713

[79] Planchard D., Kim T.M., Mazieres J., Quoix E., Riely G., Barlesi F., Souquet P.J., Smit E.F., Groen H.J., Kelly R.J., Cho B.C., Socinski M.A., Pandite L., Nase C., Ma B. i wsp.: Dabrafenib in patients with BRAF^{V600E}-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.*, 2016; 17: 642-650

[80] Porebska I., Wyrodek E., Kosacka M., Adamiak J., Jankowska R., Harlozinska-Szymrka A.: Apoptotic markers p53, Bcl-2 and Bax in primary lung cancer. *In Vivo*, 2006; 20: 599-604

[81] Pylyayeva-Gupta Y., Grabocka E., Bar-Sagi D.: RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer*, 2011; 11: 761-774

[82] Reck M., van Zandwijk N., Gridelli C., Baliko Z., Rischin D., Allan S., Krzakowski M., Heigener D.: Erlotinib in advanced non-small cell lung cancer: efficacy and safety findings of the global phase IV Tarceva Lung Cancer Survival Treatment study. *J. Thorac. Oncol.*, 2010; 5: 1616-1622

[83] Ren T., Shan J., Li M., Qing Y., Qian C., Wang G., Li Q., Lu G., Li C., Peng Y., Luo H., Zhang S., Yang Y., Cheng Y., Wang D., Zhou S.F.: Small-molecule BH3 mimetic and pan-Bcl-2 inhibitor AT-101 enhances the antitumor efficacy of cisplatin through inhibition of APE1 repair and redox activity in non-small-cell lung cancer. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2015; 9: 2887-2910

[84] Research C.f.D.E.a.: Approved Drugs – Alectinib. <http://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm476946.htm> (19.06.2016)

[85] Research C.f.D.E.a.: Approved Drugs – Cobas EGFR Mutation Test v2. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm504540.htm> (19.06.2016)

[86] Research C.f.D.E.a.: Approved Drugs – FDA Approves Crizotinib Capsules. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm490391.htm> (19.06.2016)

[87] Research C.f.D.E.a.: Drug Approvals and Databases – Drug Trials Snapshots: PORTRAZZA. <http://www.fda.gov/drugs/informationon-drugs/ucm483844.htm> (19.06.2016)

[88] Ribeiro Gomes J., Cruz M.R.: Combination of afatinib with cetuximab in patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer resistant to EGFR inhibitors. *Onco. Targets Ther.*, 2015; 8: 1137-1142

[89] Roengvoraphoj M., Tsongalis G.J., Dragnev K.H., Rigas J.R.: Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for non-small cell lung cancer: focus on epidermal growth factor receptor mutation testing and mutation-positive patients. *Cancer Treat. Rev.*, 2013; 39: 839-850

[90] Rosell R., Carcereny E., Gervais R., Vergnenegre A., Massuti B., Felip E., Palmero R., Garcia-Gomez R., Pallares C., Sanchez J.M., Porta R., Cobo M., Garrido P., Longo F., Moran T. i wsp.: Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.*, 2012; 13: 239-246

[91] Roth J.A., Nguyen D., Lawrence D.D., Kemp B.L., Carrasco C.H., Ferson D.Z., Hong W.K., Komaki R., Lee J.J., Nesbitt J.C., Pisters K.M.,

Putnam J.B., Schea R., Shin D.M., Walsh G.L. i wsp.: Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat. Med.*, 1996; 2: 985-991

[92] Scheffler M., Bos M., Gardizi M., König K., Michels S., Fassunke J., Heydt C., Künstlinger H., Ihle M., Ueckerth F., Albus K., Serke M., Gerigk U., Schulte W., Töpelt K. i wsp.: PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies. *Oncotarget*, 2015; 6: 1315-1326

[93] Sequist L.V., von Pawel J., Garmey E.G., Akerley W.L., Brugger W., Ferrari D., Chen Y., Costa D.B., Gerber D.E., Orlov S., Ramlau R., Arthur S., Gorbachevsky I., Schwartz B., Schiller J.H.: Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2011; 29: 3307-3315

[94] Sequist L.V., Yang J.C., Yamamoto N., O'Byrne K., Hirsh V., Mok T., Geater S.L., Orlov S., Tsai C.M., Boyer M., Su W.C., Bennouna J., Kato T., Gorbunova V., Lee K.H., Shah R. i wsp.: Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.*, 2013; 31: 3327-3334

[95] Shepherd F.A., Rodrigues Pereira J., Ciuleanu T., Tan E.H., Hirsh V., Thongprasert S., Campos D., Maoleekoonpiroj S., Smylie M., Martins R., van Kooten M., Dediu M., Findlay B., Tu D., Johnston D. i wsp.: Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 353: 123-132

[96] Shigematsu H., Takahashi T., Nomura M., Majumdar K., Suzuki M., Lee H., Wistuba II, Fong K.M., Toyooka S., Shimizu N., Fujisawa T., Minna J.D., Gazdar A.F.: Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 2005; 65: 1642-1646

[97] Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A.: Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.*, 2014; 64: 9-29

[98] Siegelin M.D., Borczuk A.C.: Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. *Lab. Invest.*, 2014; 94: 129-137

[99] Simone C.B. 2nd, Friedberg J.S., Glatstein E., Stevenson J.P., Sterman D.H., Hahn S.M., Cengel K.A.: Photodynamic therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.*, 2012; 4: 63-75

[100] Sirotnak F.M.: Studies with ZD1839 in preclinical models. *Semin. Oncol.*, 2003; 30: 12-20

[101] Soria J.C., Mok T.S., Cappuzzo F., Jänne P.A.: EGFR-mutated oncogene-addicted non-small cell lung cancer: current trends and future prospects. *Cancer Treat. Rev.*, 2012; 38: 416-430

[102] Su J., Cheng H., Zhang D., Wang M., Xie C., Hu Y., Chang H.C., Li Q.: Synergistic effects of 5-fluorouracil and gambogic acid on A549 cells: activation of cell death caused by apoptotic and necroptotic mechanisms via the ROS-mitochondria pathway. *Biol. Pharm. Bull.*, 2014; 37: 1259-1268

[103] Sugita S., Ito K., Yamashiro Y., Moriya S., Che X.F., Yokoyama T., Hiramoto M., Miyazawa K.: EGFR-independent autophagy induction with gefitinib and enhancement of its cytotoxic effect by targeting autophagy with clarithromycin in non-small cell lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015; 461: 28-34

[104] Toh C.K., Gao F., Lim W.T., Leong S.S., Fong K.W., Yap S.P., Hsu A.A., Eng P., Koong H.N., Thirugnanam A., Tan E.H.: Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. *J. Clin. Oncol.*, 2006; 24: 2245-2251

[105] Tokumo M., Toyooka S., Kiura K., Shigematsu H., Tomii K., Aoe M., Ichimura K., Tsuda T., Yano M., Tsukuda K., Tabata M., Ueoka H., Tanimoto M., Date H., Gazdar A.F., Shimizu N.: The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 1167-1173

[106] Torok S., Hegedus B., Laszlo V., Hoda M.A., Ghanim B., Berger W., Klepetko W., Dome B., Ostoros G.: Lung cancer in never smokers. *Future Oncol.*, 2011; 7: 1195-1211

- [107] Travis W.D., Brambilla E., Noguchi M., Nicholson A.G., Geisinger K.R., Yatabe Y., Beer D.G., Powell C.A., Riely G.J., Van Schil P.E., Garg K., Austin J.H., Asamura H., Rusch V.W., Hirsch F.R. i wsp.: International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.*, 2011; 6: 244-285
- [108] Tsao M.S., Sakurada A., Cutz J.C., Zhu C.Q., Kamel-Reid S., Squire J., Lorimer I., Zhang T., Liu N., Daneshmand M., Marrano P., da Cunha Santos G., Lagarde A., Richardson F., Seymour L. i wsp.: Erlotinib in lung cancer – molecular and clinical predictors of outcome. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 353: 133-144
- [109] Umelo I., Noeparast A., Chen G., Renard M., Geers C., Vansteenkiste J., Giron P., De Wever O., Teugels E., De Grève J.: Identification of a novel HER3 activating mutation homologous to EGFR-L858R in lung cancer. *Oncotarget*, 2016; 7: 3068-3083
- [110] Vallee A., Sagan C., Le Loupp A.G., Bach K., Dejoie T., Denis M.G.: Detection of EGFR gene mutations in non-small cell lung cancer: lessons from a single-institution routine analysis of 1,403 tumor samples. *Int. J. Oncol.*, 2013; 43: 1045-1051
- [111] Wang L.H., Li Y., Yang S.N., Wang F.Y., Hou Y., Cui W., Chen K., Cao Q., Wang S., Zhang T.Y., Wang Z.Z., Xiao W., Yang J.Y., Wu C.F.: Gambogic acid synergistically potentiates cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through suppressing NF- κ B and MAPK/HO-1 signalling. *Br. J. Cancer*, 2014; 110: 341-352
- [112] Wang W.L., Tang Z.H., Xie T.T., Xiao B.K., Zhang X.Y., Guo D.H., Wang D.X., Pei F., Si H.Y., Zhu M.: Efficacy and safety of sorafenib for advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014; 15: 5691-5696
- [113] Wheler J.J., Tsimberidou A.M., Falchook G.S., Zinner R.G., Hong D.S., Fok J.Y., Fu S., Piha-Paul S.A., Naing A., Kurzrock R.: Combining erlotinib and cetuximab is associated with activity in patients with non-small cell lung cancer (including squamous cell carcinomas) and wild-type EGFR or resistant mutations. *Mol. Cancer Ther.*, 2013; 12: 2167-2175
- [114] WHO | Cancer. WHO; [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/\(10.11.2015\)](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/(10.11.2015))
- [115] Wu X., Zhao H., Suk R., Christiani D.C.: Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene*, 2004; 23: 6500-6523
- [116] Yokouchi H., Kanazawa K.: Revisiting the role of COX-2 inhibitor for non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.*, 2015; 4: 660-664
- [117] Zhang C., Shi J., Mao S.Y., Xu Y.S., Zhang D., Feng L.Y., Zhang B., Yan Y.Y., Wang S.C., Pan J.P., Yang Y.P., Lin N.M.: Role of p38 MAPK in enhanced human cancer cells killing by the combination of aspirin and ABT-737. *J. Cell Mol. Med.*, 2015; 19: 408-417
- [118] Zhang H., Li Z., Wang K.: Combining sorafenib with celecoxib synergistically inhibits tumor growth of non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.*, 2014; 31: 1954-1960
- [119] Zhang J., Gold K.A., Kim E.: Sorafenib in non-small cell lung cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2012; 21: 1417-1426
- [120] Zhang J., Wang S., Wang L., Wang R., Chen S., Pan B., Sun Y., Chen H.: Prognostic value of Bcl-2 expression in patients with non-small-cell lung cancer: a meta-analysis and systemic review. *Oncol. Targets Ther.*, 2015; 8: 3361-3369

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.