Phần A: GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo các số liệu thống kê mới nhất về tình hình bệnh ung thư trên toàn thế giới và tại Việt Nam, ung thư phổi đứng hàng đầu với cả số ca mới mắc và tử vong cao ở cả hai giới 70% các trường hợp ung thư phổi tại nước ta nhập viện khi bệnh đã vào giai đoạn tiến xa, không còn khả năng phẫu thuật. Lúc này, chỉ còn có thể tiến hành xạ trị hoặc hóa trị nhưng hiệu quả triệt căn không cao và để lại nhiều tác dụng phụ cho người bệnh.

Trong những năm gần đây, khoa học đã phát triển một thế hệ thuốc mới có tên là liệu pháp điều trị trúng đích (LPĐTTĐ) đem lại hiệu quả kháng ung thư cao và ít tác dụng phụ. Tuy vậy, không phải bệnh nhân nào cũng đáp ứng tốt với thuốc điều trị đích vì hiệu quả của thuốc này còn phụ thuộc vào tình trạng đột biến các gen mã hóa các protein nằm trong con đường tín hiệu tế bào ung thư. Số lượng bệnh nhân ung thư phổi ngày càng cao, như cầu sử dụng LPĐTTĐ ngày càng cao trong khi nghiên cứu xác định đột biến gen làm nền tảng cho LPĐTTĐ ở nước ta còn hạn chế.

2. MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI

Đề tài **"Xác định đột biến gen EGFR và gen KRAS quyết định tính đáp ứng thuốc trong điều trị bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ"** được thực hiện với các mục tiêu sau :

1. *Xác định tỷ lệ đột biến gen EGFR và gen KRAS quyết định tính đáp ứng thuốc điều trị đích trên bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn.*
2. *Bước đầu đánh giá hiệu quả điều trị đích bước 1 bằng erlotinib trên các bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn có đột biến gen EGFR.*

3. TÍNH CẤP THIẾT, Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA LUẬN ÁN

LPĐTTĐ đã được chứng minh có hiệu quả tốt cho bệnh nhân Ung thư phổi không tế bào nhỏ (UTPKTBN), đặc biệt là những bệnh nhân có đột biến gen EGFR và không có đột biến gen KRAS. Tháng 06/2009, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ đã chính thức đưa ra thông báo rằng bệnh nhân trước khi được chỉ định dùng thuốc ức chế EGFR cần phải làm xét nghiệm tình trạng gen EGFR.

Tại Việt Nam, nhu cầu LPĐTTĐ cho bệnh nhân UTPKTBN ngày càng tăng, nhưng chưa có nghiên cứu nào khảo sát đột biến gen EGFR và KRAS trên số lượng lớn bệnh nhân cũng như chưa có nghiên cứu nào về hiệu quả điều trị đích dựa trên tình trạng đột biến hai gen này của người bệnh. Do đó, nghiên cứu về tần suất đột biến gen EGFR và KRAS trong bệnh UTPKTBN cũng như hiệu quả điều trị đích trên nhóm bệnh nhân có đột biến gen EGFR là hướng nghiên cứu đang rất được quan tâm.

4. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Tình trạng đột biến gen EGFR và KRAS được xác định bằng hai kỹ thuật tiên tiến, giúp giảm tỷ lệ âm tính giả, cho kết quả chính xác và tin cậy. Nghiên cứu cung cấp những cơ sở ban đầu về tần suất đột biến gen EGFR và KRAS trong bệnh UTPKTBN giai đoạn muộn, cũng như hiệu quả điều trị erlotinib bước 1 trên những bệnh nhân có đột biến gen EGFR.

5. CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN

Ngoài phần đặt vấn đề, kết luận và kiến nghị, luận án có 4 chương:

Chương 1: Tổng quan tài liệu ..... 32 trang

Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu .... 13 trang

Chương 3: Kết quả nghiên cứu ..... 36 trang

Chương 4: Bàn luận ..... 39 trang

Luận án có 28 bảng, 5 biểu đồ, 1 sơ đồ, 42 hình, 10 phụ lục và 184 tài liệu tham khảo (167 tiếng Anh, 17 tiếng Việt).

Phần B: NỘI DUNG LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1
TỔNG QUAN

1.1. Bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ

Bệnh ung thư phổi được chia làm hai nhóm chính là UTPKTBN (80-85%) và ung thư phổi tế bào nhỏ (15-20%). Ung thư phổi phát sinh do sự tiếp xúc với các yếu tố sinh ung thư và sự nhạy cảm di truyền của người bệnh. Trong những năm gần đây, nhiều biến đổi ở cấp độ phân tử chi phối việc phát sinh và tiến triển khối ung thư phổi đã được xác định. Trong đó có đột biến gen EGFR và gen KRAS chiếm tỷ lệ cao, còn các rối loạn khác ít gặp hơn. UTPKTBN được chẩn đoán xác định bằng giải phẫu bệnh, chủ yếu gồm 3 phân nhóm: ung thư biểu mô tuyến (40-60%), ung thư biểu mô vảy và ung thư biểu mô tế bào lớn.

1.2. Vai trò của con đường tín hiệu EGFR

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) là thụ thể yếu tố phát triển biểu mô, là một protein xuyên màng có khả năng tyrosine kinase kích hoạt con đường tín hiệu nội bào ở các tế bào biểu mô phổi. Thông qua các trục tín hiệu RAS/RAF và PI3K/AKT, sự hoạt hóa bình thường của EGFR sẽ chi phối sự tăng sinh và tăng trưởng bình thường của tế bào. Khi các trục tín hiệu này bị kích hoạt bất thường và liên tục do đột biến gen EGFR hoặc KRAS sẽ làm tế bào chuyển dạng ác tính.

Đột biến gen EGFR liên quan đến tính đáp ứng với thuốc điều trị đích thuộc 4 exon từ 18-21 của gen EGFR và được chia làm 2 nhóm. Nhóm đột biến làm tăng tính nhạy cảm của tế bào ung thư với

thuốc điều trị đích gồm 85-90% là các đột biến xóa đoạn tại exon 19 và đột biến điểm L858R tại exon 21. Nhóm đột biến gây kháng thuốc điều trị đích gồm chủ yếu là các đột biến chèn đoạn và đột biến điểm T790M tại exon 20. Trong bệnh UTPKTBN, đột biến gen EGFR có tần suất cao ở các nước Đông Á, bệnh nhân nữ và nhóm không hút thuốc lá hơn là các phân nhóm còn lại.

Đột biến tại codon 12 và 13 gen KRAS tạo ra protein KRAS đột biến có khả năng tự kích hoạt con đường tín hiệu xuôi dòng mà không phụ thuộc vào sự hoạt hóa của EGFR thượng nguồn. Do đó, gen KRAS bị đột biến sẽ làm mất tác dụng của thuốc ức chế hoạt tính tyrosine kinase của EGFR (EGFR TKIs). Ngược lại với EGFR, đột biến gen KRAS phổ biến hơn ở bệnh nhân Âu Mỹ và có hút thuốc lá.

Hiệu quả của các EGFR TKIs dạng phân tử nhỏ như gefitinib và erlotinib đã được chứng minh qua nhiều thử nghiệm lâm sàng lớn như IPASS, WJTOG3405, OPTIMAL, EURTAC…với tỷ lệ đáp ứng cao và kéo dài được thời gian sống thêm cho người bệnh khi so sánh với các phác đồ hóa trị hai thuốc truyền thống, đặc biệt là trên nhóm bệnh nhân có đột biến gen EGFR làm tăng tính nhạy cảm với EGFR TKIs.

1.3. Các phương pháp phát hiện đột biến gen EGFR và KRAS

Kỹ thuật giải trình tự gen

Kỹ thuật PCR-RFLP

Kỹ thuật Scorpion ARMS

Kỹ thuật Smart Amplification Process

1.4. Tình hình nghiên cứu đột biến gen EGFR, KRAS và điều trị đích ung thư phổi không tế bào nhỏ tại Việt Nam

Các nghiên cứu về đột biến gen EGFR và KRAS cũng như hiệu quả điều trị đích trên bệnh nhân UTPKTBN ở nước ta còn hạn

chế, bắt đầu từ năm 2009 đến nay và mới có 10 nghiên cứu. Chưa có nghiên cứu nào kết hợp nhiều kỹ thuật với các ưu điểm khác nhau để tăng độ nhạy khi xác định đột biến. Nghiên cứu PIONEER (2014) báo cáo tỷ lệ đột biến gen EGFR trên bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến Việt Nam là 64,2%. Chưa có nghiên cứu nào đánh giá hiệu quả điều trị đích bước 1, dựa trên nền tảng kết quả xác định đột biến gen EGFR và gen KRAS.

CHƯƠNG 2
ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tương nghiên cứu: gồm 2 nhóm bệnh nhân:

- 181 bệnh nhân được xác định đột biến gen EGFR và gen KRAS là những bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn IIIB/IV mới chẩn đoán, có mô bệnh học thuộc một trong ba loại ung thư biểu mô tuyến, ung thư biểu mô vảy hoặc ung thư biểu mô tế bào lớn.

- 61 bệnh nhân được điều trị đích bước 1, được lựa chọn từ 181 bệnh nhân đã được xét nghiệm đột biến gen. Các bệnh nhân này không mang đột biến gen KRAS, chỉ mang các đột biến EGFR làm tăng tính đáp ứng thuốc điều trị đích đã được công bố.

2.2. Thiết kế nghiên cứu:

Nghiên cứu cắt ngang, mô tả loạt ca (xác định đột biến gen) và nghiên cứu tiến cứu, có theo dõi dọc thời gian sống thêm (đánh giá hiệu quả điều trị). Thời gian nghiên cứu: từ 01/01/2012 đến hết 30/03/2014.

2.3. Phương pháp nghiên cứu:

2.3.1. Xác định đột biến gen EGFR và KRAS:

Mẫu mô sinh thiết đúc nến được lựa chọn vùng tập trung tế bào ung thư. DNA được tách chiết và tinh sạch bằng xylene và phenol/chloroform. Thực hiện song song 2 kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS để xác định đột biến gen EGFR và KRAS:

- Kỹ thuật giải trình tự gen sử dụng BidDye Kit (Applied Biosystems), giải trình tự tự động trên máy ABI3700, phân tích bằng phần mềm Seqscape (Applied Biosystems). Trình tự gen EGFR và KRAS của bệnh nhân được đối chiếu với trình tự tham chiếu trên GenBank.

- Kỹ thuật Scorpion ARMS sử dụng EGFR PCR kit và KRAS PCR kit (Quiagen) phát hiện 29 loại đột biến gen EGFR và 7 loại đột biến gen KRAS bằng phản ứng real-time PCR, độ nhạy 1 alen đột biến/100 alen.

2.3.2. Theo dõi hiệu quả điều trị erlotinib bước 1:

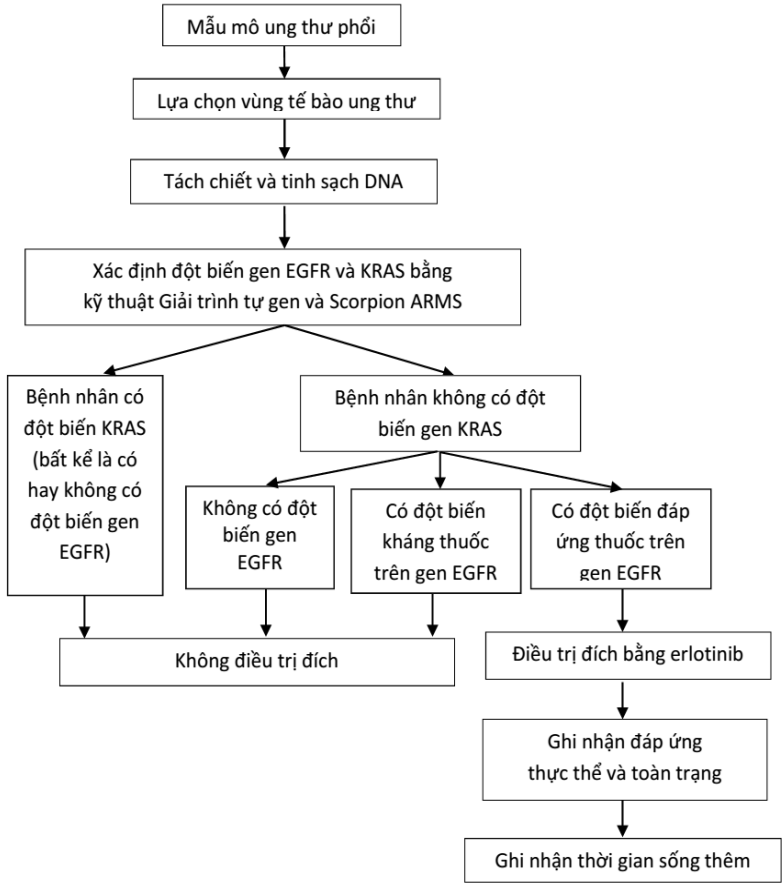
Xác định tỷ lệ đáp ứng thực thể ORR (theo tiêu chuẩn RECIST v1.1), tỷ lệ đáp ứng toàn trạng (theo chỉ số Karnofsky) mỗi 3 tháng. Ghi nhận thời gian sống thêm bệnh không tiến triển (PFS) và thời gian sống thêm toàn thể (OS) của các bệnh nhân được điều trị erlotinib bước 1. Ghi nhận và phân độ tác dụng phụ (nếu có) của erlotinib theo tiêu chuẩn *Đánh giá độc tính của hóa chất* của Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (CTCAE v3.0).

2.4. Xử lý số liệu:

Quản lý, phân tích thông tin và xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 21.0. So sánh sự khác biệt giữa các nhóm bằng test Chi bình phương Sử dụng phương pháp Kaplan-Meier để phân tích thời gian sống thêm. Sử dụng test Logrank để so sánh thời gian sống thêm trung bình giữa các nhóm (với $p<0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê)

2.5. Đạo đức nghiên cứu:

Nghiên cứu được tiến hành dựa trên sự tự nguyện tham gia của các bệnh nhân. Các số liệu sử dụng trong nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng Đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội.



Sơ đồ tiến hành nghiên cứu

CHƯƠNG 3
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

181 bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn IIIB/IV mới chẩn đoán đã được xét nghiệm xác định đột biến gen EGFR và KRAS.

3.1. Tỷ lệ đột biến gen EGFR

Bằng kỹ thuật giải trình tự gen xác định được 80/181 trường hợp đột biến, bằng kỹ thuật Scorpion ARMS xác định được 101/181 trường hợp đột biến. Kết hợp cả hai kỹ thuật xác định được 106 trường hợp đột biến (58,6%). Trong đó, đột biến xóa đoạn LREA (exon 19) và đột biến L858R (exon 21) chiếm tỷ lệ cao nhất (lần lượt là 48,1% và 40,6%).

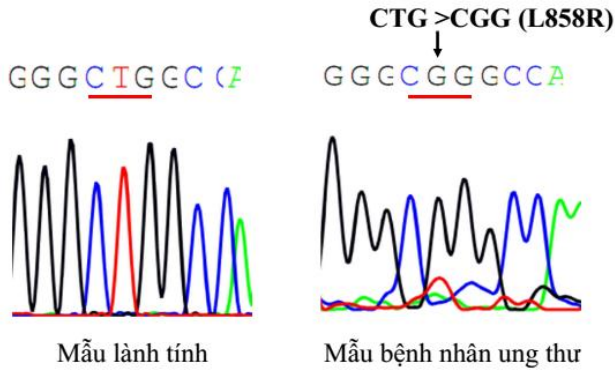
Phát hiện được 2/106 trường hợp là đột biến đôi S768I+V769L (exon 20) và T790M (exon 20)+L858R (exon 21).

Phát hiện 04/106 trường hợp là đột biến mới chưa được công bố trên y văn, gồm: đột biến c.2137delA (exon 18), c.2373_2374delAA (exon 20), c.2499_2521del23 (exon 21) và c.2554/2555insACA (exon 21). Các đột biến này chưa rõ tính đáp ứng với thuốc EGFR TKIs.

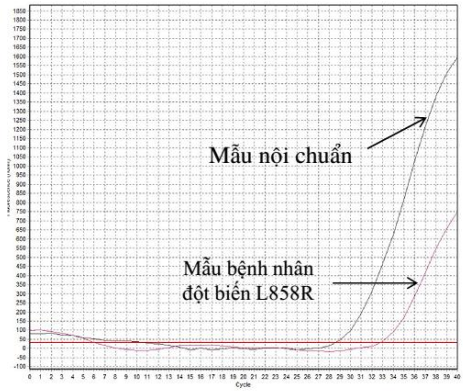
Đột biến làm tăng tính nhạy cảm với thuốc EGFR TKIs chiếm ưu thế 99/102 trường hợp (97,0%). 3/102 trường hợp là các đột biến gây kháng thuốc (3%).

Bảng 1. Tỷ lệ các loại đột biến gen EGFR

Đột biến	Exon	Đáp ứng với EGFR TKIs	KT giải trình tự	KT Scorpion ARMS	Kết hợp 2 kỹ thuật
G719S	18	Nhạy	1	1	1 (0,9%)
c.2137delA	18	Chưa rõ	1	0	1 (0,9%)
LREA	19	Nhạy	45	51	51 (48,1%)
T790M	20	Kháng	1	1	1 (0,9%)
c.2373_2374 delAA	20	Chưa rõ	1	0	1 (0,9%)
S768I + V769L	20	Kháng	1	0*	1 (0,9%)
L858R	21	Nhạy	25	43	43 (40,6%)
L861Q	21	Nhạy	2	4	4 (3,8%)
T790M + L858R	20 + 21	Kháng	1	1	1 (0,9%)
c.2499_2521 del23	21	Chưa rõ	1	0	1 (0,9%)
c.2554/2555 insACA	21	Chưa rõ	1	0	1 (0,9%)
Tổng số đột biến			80	101	106 (100%)
Tỷ lệ đột biến			80/181 = 44,2%	101/181 = 55,8%	106/181 = 58,6%



Hình 1. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến L858R trên exon 21 của gen EGFR



Hình 2. Hình ảnh kết quả đột biến L858R exon 21 gen EGFR bằng kỹ thuật Scorpion ARMS

3.2. Tỷ lệ đột biến gen KRAS

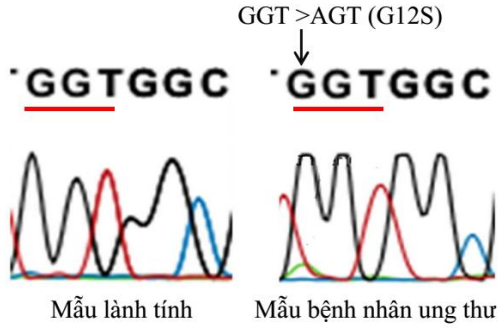
Bảng 2. Tỷ lệ các loại đột biến gen KRAS

Loại đột biến	KT giải trình tự gen	KT Scorpion ARMS	Tổng hợp 2 kỹ thuật
G12A (codon 12)	2	3	3 (10,7%)
G12D (codon 12)	9	10	10 (35,7%)
G12C (codon 12)	2	4	4 (14,3%)
G12S (codon 12)	1	1	1 (3,6%)
G12V (codon 12)	5	5	5 (17,8%)
G13D (codon 13)	4	5	5 (17,8%)
Tổng số đột biến	**23**	**28**	**28 (100%)**
Tỷ lệ đột biến	23/181=**12,7%**	28/181=**15,5%**	28/181=**15,5%**

- Bằng kỹ thuật giải trình tự gen xác định được 23/181 trường hợp đột biến gen KRAS, bằng kỹ thuật Scorpion ARMS xác định được 28/181 trường hợp đột biến. Kết hợp cả hai kỹ thuật xác định được

28/181 trường hợp đột biến gen KRAS (15,5%). Trong đó, đột biến tại codon 12 chiếm ưu thế (82,2%) so với đột biến tại codon 13 (17,8%).

- Không phát hiện được đột biến đôi và không phát hiện đột biến mới nào tại codon 12 và 13 gen KRAS.



Hình 3. Hình ảnh giải trình tự gen phát hiện đột biến G12S trên exon 2 gen KRAS

Trong 181 bệnh nhân, chiếm đa số (56,4%) là trường hợp có đột biến gen EGFR nhưng không có đột biến gen KRAS. 4/181 trường hợp vừa mang đột biến gen EGFR, vừa mang đột biến gen KRAS (2,2%).

Bảng 3. Phân bố tình trạng đột biến gen EGFR và KRAS

Tình trạng đột biến	Có đột biến gen EGFR	Không có đột biến gen EGFR	Tổng
Có đột biến gen KRAS	4 (2,2%)	24 (13,2%)	28 (15,5%)
Không có đột biến gen KRAS	102 (56,4%)	51 (28,2%)	153 (84,5%)
Tổng	106 (58,6%)	75 (41,4%)	181 (100%)

3.3. Hiệu quả điều trị erlotinib bước 1

Theo sơ đồ nghiên cứu, tiêu chuẩn chọn mẫu, và kết quả xác định đột biến gen EGFR và KRAS của bệnh nhân, 72 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn tham gia vào quá trình đánh giá hiệu quả điều trị erlotinib bước 1. Tuy nhiên, do một số yếu tố khách quan nên chỉ còn 61 bệnh nhân thực sự được theo dõi điều trị erlotinib. Tuổi trung bình của nhóm là 66,16±18,24.

Bảng 4. Đáp ứng thực thể của nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib (n=61)

Loại đáp ứng	3 tháng		6 tháng		9 tháng		12 tháng	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Hoàn toàn	0	0	0	0	1	1,6	1	1,6
Một phần	22	36,1	39	63,9	28	45,9	18	29,5
Giữ nguyên	37	60,6	16	26,2	16	26,2	14	22,9
Tiến triển	2	3,3	6	9,9	16	26,2	28	45,9
ORR	22	**36,1**	39	**63,9**	20	**47,5**	19	**31,1**

1/61 trường hợp đáp ứng hoàn toàn trong suốt quá trình nghiên cứu. Tỷ lệ đáp ứng (ORR) đạt cao nhất ở tháng thứ 6 (63,9%), sau đó giảm dần còn 47,5% và 31,1% tương ứng thời điểm tháng thứ 9 và tháng thứ 12.

Bảng 5. Đáp ứng toàn trạng của nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib (n=61)

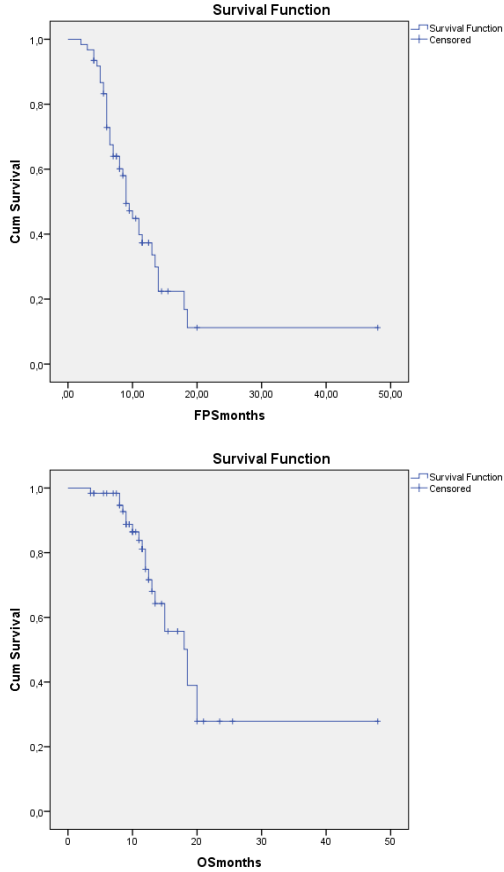
Chỉ số Karnofski	3 tháng		6 tháng		9 tháng		12 tháng	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ổn định/Tăng	59	96,7	54	88,5	47	77,0	33	54,1
Giảm	2	3,3	7	11,5	14	23,0	28	45,9

Tỷ lệ bệnh nhân có chỉ số ổn định/tăng cao nhất ở thời điểm tháng thứ 3 sau điều trị và giảm dần theo thời gian, tương ứng với tỷ lệ bệnh nhân tiến triển bệnh.

Bảng 6.Tương quan giữa đặc điểm bệnh nhân và thời gian sống thêm

Đặc điểm bệnh nhân		n	PFS trung bình (tháng)	OS trung bình (tháng)
Giới	**Nam**	36	9,18	12,72
	Nữ	25	9,58	11,92
		P	*0,811*	*0,648*
Tuổi	**<65**	20	11,73	14,53
	≥65	41	8,18	11,35
		P	*0,04*	*0,08*
Tiền căn hút thuốc	**Không hút thuốc**	37	9,81	13,15
	Hút thuốc	24	9,04	11,91
		P	*0,647*	*0,482*

Thời gian điều trị erlotinib trung bình là 9,8 tháng. Trung vị PFS là 9,4 tháng (3,2 – 48) và trung vị OS là 15,5 tháng (5,7 – 48 tháng) (biểu đồ 1). Do các nhóm đặc điểm phân bố tương đối đồng đều nên nghiên cứu không phát hiện được những khác biệt nhỏ có hưởng lợi từ erlotinib giữa hầu hết các phân nhóm. Có sự khác biệt có ý nghĩa giữa PFS trung bình ở nhóm bệnh nhân <65 tuổi là 11,73 tháng và ở nhóm ≥65 tuổi là 8,18 tháng (p <0,05) nhưng lợi ích này không ghi nhận được ở OS trung bình.



Biểu đồ 1. Biểu đồ Kaplan-Meier thể hiện thời gian sống thêm bệnh không tiến triển (PFS) và thời gian sống thêm tổng cộng (OS) của nhóm bệnh nhân điều trị erlotinib

Bảng 7. Các tác dụng phụ của erlotinib trong nghiên cứu

Tác dụng phụ	Độ 1-2	Độ 3-4	Tổng cộng
Giảm bạch cầu hạt	9 (14,8%)	0	9 (14,8%)
Giảm Hb	7 (11,5%)	0	7 (11,5%)
Tiêu chảy	24 (39,3%)	0	24 (39,3%)
Tăng men gan	9 (14,8%)	1 (1,6%)	10 (16,4%)
Buồn nôn, nôn	5 (8,2%)	0	5 (8,2%)
Phát ban thể nổi mụn	28 (45,9%)	4 (6,6%)	32 (52,4%)
Viêm cạnh móng	13 (21,3%)	1 (1,6%)	14 (23,0%)
Đau cơ khớp	3 (4,9%)	0	3 (4,9%)
Rụng tóc	2 (3,3%)	0	2 (3,3%)

CHƯƠNG 4
BÀN LUẬN

4.1. Xác định tỷ lệ đột biến gen EGFR và KRAS

4.1.1. Kỹ thuật xác định đột biến gen EGFR và KRAS

Được xem là đại diện cho nhóm *kỹ thuật tầm soát đột biến*, đến nay kỹ thuật giải trình tự gen vẫn được sử dụng rộng rãi để tìm các đột biến đã công bố và đột biến "mới" chưa được công bố. Bằng kỹ thuật này, nghiên cứu phát hiện được 04 đột biến mới chưa được công bố, gồm: đột biến xóa 1 nucleotid c.2137del A (exon 18), đột biến xóa 2 nucleotid c.2373_2374 delAA (exon 20), đột biến xóa 23 nucleotid c.2499_2521del23 (exon 21) và đột biến thêm 3 nucleotid c.2554/2555insACA (exon 21). Tuy vậy, kỹ thuật giải trình tự gen chỉ có thể phát hiện đột biến khi lượng alen đột biến hiện diện ít nhất 25% trong tổng số alen của quần thể tế bào, tương đương độ nhạy

25%. Trong nghiên cứu, tình trạng này đã được khắc phục bằng cách: tách chiết DNA từ vùng mô đã được lựa chọn tập trung nhiều tế bào ung thư và thực hiện song song kỹ thuật Scorpion ARMS, vốn có độ nhạy cao hơn. Tuy còn nhiều hạn chế nhưng do đột biến gen EGFR trên exon 18 ÷ 21 và đột biến codon 12, 13 gen KRAS rất đa dạng nên kỹ thuật giải trình tự gen vẫn được xem là "tiêu chuẩn vàng" để khảo sát các loại đột biến này.

Scorpion ARMS là sự kết hợp của kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen đột biến (ARMS) và công nghệ Scorpion trong phản ứng real-time PCR, với độ nhạy cao (1%). Đây là một kỹ thuật thuộc nhóm *phát hiện trúng đích*, đã được nhiều tác giả sử dụng trong nghiên cứu về đột biến gen EGFR và gen KRAS. Nhờ có độ nhạy cao, kỹ thuật Scorpion ARMS đã giúp khẳng định lại số trường hợp nghi ngờ có đột biến khi thực hiện bằng kỹ thuật giải trình tự gen. Đây là lần đầu tiên kỹ thuật Scorpion ARMS được thực hiện tại Việt Nam, cho phép phát hiện chính xác đột biến gen trong các mô phân tích có tỷ lệ tế bào ung thư thấp (<25%) và alen đột biến chiếm tỉ lệ rất nhỏ (khoảng 1%). Ngoài ra, do thời gian thực hiện xét nghiệm ngắn và ít giai đoạn cần thao tác nên kỹ thuật này rất phù hợp với các phòng xét nghiệm dịch vụ. Tuy nhiên, kỹ thuật này được thiết kế dạng mồi đặc hiệu bắt cặp với alen đột biến nên chỉ phát hiện được những đột biến đã được công bố, đồng thời những đột biến này phải có mồi đặc hiệu trong hỗn hợp phản ứng. Do đó, đối với những đột biến mới, chưa được công bố thì không thể có mồi đặc hiệu được thiết kế sẵn như 4 loại đột biến gen EGFR mới phát hiện trong nghiên thì kỹ thuật Scorpion ARMS không thể phát hiện ra, sẽ cho kết quả âm tính giả.

Ngoài ra, do đột biến gen EGFR rất đa dạng nên kỹ thuật Scorpion ARMS cũng không thể thiết kế để phát hiện toàn bộ. Trong số các đột biến điểm gen EGFR, chỉ có đột biến L858R và L861Q

(exon 21) và đột biến T790M và S786I (exon 20). Hầu hết các đột biến còn lại khác đều được xác định dưới dạng nhóm. Có thể nhận thấy, kỹ thuật Scorpion ARMS được thiết kế để xác định những đột biến exon 18-21 gen EGFR và đột biến codon 12-13 gen KRAS có tần suất lưu hành cao và có ý nghĩa trong điều trị.

Đây là lần đầu tiên tại Việt Nam, đột biến EGFR và KRAS trên bệnh nhân UTPKTBN được khảo sát bằng hai kỹ thuật được xem là đại diện cho hai nhóm kỹ thuật xác định đột biến gen. Hai kỹ thuật này bổ khuyết cho nhau và xác định tỷ lệ đột biến gen EGFR, KRAS lưu hành trong trong UTPKTBN một cách chính xác nhất và không bỏ sót đột biến mới. Tuy nhiên, cách làm này khó có thể áp dụng cho bệnh nhân trên lâm sàng do rào cản về thời gian và kinh phí. Việc thử nghiệm kết hợp các kỹ thuật tầm soát và kỹ thuật phát hiện trúng đích cũng đã được áp dụng nhiều trên thế giới như kết hợp giải trình tự và PCR RFLP, giải trình tự với Taqman PCR, giải trình tự với SMAP....đều nhằm mục đích cải tiến các khuyết điểm của kỹ thuật cổ điển và gia tăng độ nhạy, tránh bỏ sót đột biến, làm lỡ cơ hội sử dụng thuốc điều trị đích cho bệnh nhân. Lựa chọn sử dụng kỹ thuật nào phải phụ thuộc vào nhiều yếu tố như mục đích, bản chất mẫu xét nghiệm, trang thiết bị và tay nghề kỹ thuật viên.

4.1.2. Tỷ lệ đột biến gen EGFR

Kết quả nghiên cứu cho thấy đột biến gen EGFR rất đa dạng, phân bố cả 4 exon, gồm tất cả các dạng đột biến điểm, xóa đoạn và thêm đoạn Trong những đột biến gen EGFR đơn độc đã phát hiện trong nghiên cứu, đột biến xóa đoạn LREA exon 19 chiếm tỷ lệ cao nhất (51/106 trường hợp, 48,2%), kế đến là đột biến L858R exon 21 (43/106 trường hợp, 40,7%). Ngoài ra, còn một số đột biến hiếm gặp khác chiếm tỷ lệ thấp. Tỷ lệ đột biến đôi cũng rất thấp, mỗi loại chỉ có một trường hợp. Kết quả này tương đối phù hợp với đa số nghiên

cứu trên thế giới. Sự khác biệt, nếu có, có thể do chủng tộc và kỹ thuật xác định đột biến.

Nghiên cứu phát hiện 4 đột biến mới, chưa công bố trên y văn, không loại trừ đây là những đột biến đặc biệt ở người Kinh. Bốn đột biến này xuất hiện với tỷ lệ rất thấp và hiện tại chưa rõ có ảnh hưởng ra sao đối với thuốc điều trị đích hoặc có thể chỉ là những đột biến vô nghĩa. Việc xác định một đột biến mới có ảnh hưởng đến tính đáp ứng với thuốc điều trị đích hay không cần thực hiện *in vitro* và trên động vật trước khi thử nghiệm trên người bệnh. Mặt khác, với tần suất quá thấp, việc theo dõi, đánh giá ảnh hưởng của bốn đột biến này trên một quần thể để có ý nghĩa thống kê là rất khó khăn.

Các đột biến gen EGFR làm tăng tính nhạy cảm với thuốc EGFR TKIs chiếm 97,0%, trong khi các đột biến kháng thuốc chỉ có 3,0%. Đột biến T790M đơn độc ở exon 20 chiếm 1/3 trong số đột biến kháng thuốc. Các tỷ lệ tương đồng với các thống kê trước đây trên thế giới. Hoàng Anh Vũ xác định đột biến EGFR trên 71 bệnh nhân UTPKTBN người Kinh nhưng không phát hiện trường hợp đột biến kháng thuốc nào đã được công bố. 2/3 đột biến kháng thuốc rơi vào hai trường hợp đột biến đôi. Đột biến S768I + V769L (exon 20) gây kháng thuốc EGFR TKIs đã được công bố. Đột biến T790M (exon 20) + L858R (exon 21) là một trường hợp đột biến đôi phức tạp khi mang đồng thời đột biến gây kháng và tăng nhạy cảm EGFR TKIs. Nghiên cứu khả năng đáp ứng với gefitinib ở cấp độ *in vitro* của đột biến T790M + L858R cho thấy tình trạng kháng thuốc mạnh do bộ đôi làm tăng ái lực gắn kết ATP của EGFR gấp 5 lần đột biến L858R.

4.1.3. Tỷ lệ đột biến gen KRAS

Exon 2 của gen KRAS, là vùng chứa codon 12 và 13, được xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS cho tỷ lệ đột biến là 15,5%, tương đồng với nhiều nghiên cứu trước đây.

Tỷ lệ đột biến codon 12 và 13 của exon 2 gen KRAS trong bệnh UTPKTBN tại châu Á được báo cáo là thấp hơn các quốc gia Âu Mỹ. Tỷ lệ này trên người Việt Nam trong nghiên cứu cao hơn tỷ lệ trên người Trung Quốc và Triều Tiên có lẽ do kết hợp 2 kỹ thuật giải trình tự và Scorpion ARMS giúp tìm ra nhiều đột biến hơn, không loại trừ đột biến gen KRAS có thể phổ biến hơn ở người Kinh. Ngoài các yếu tố đã được xác định như chủng tộc, giới tính, thói quen hút thuốc và loại mô bệnh học, tỷ lệ đột biến gen KRAS còn chịu ảnh hưởng bởi yếu tố kỹ thuật tương tự như đột biến gen EGFR.

Các đột biến KRAS phát hiện trong nghiên cứu đều được báo cáo và có tỷ lệ tương đồng trên cơ sở dữ liệu COSMIC. Một điểm đáng quan tâm là phát hiện đột biến KRAS trong nhóm có mang đột biến EGFR và nhóm không có đột biến EGFR. Các nghiên cứu trước đây thường ghi nhận rằng đột biến gen KRAS hiện diện trong những khối u có gen EGFR và ALK bình thường, nói một cách khác là đột biến KRAS và các đột biến gen khác trong UTPKTBN loại trừ lẫn nhau. Tuy nhiên, khi ứng dụng các kỹ thuật có độ nhạy cao để phát hiện đột biến KRAS, cũng có những nghiên cứu ghi nhận đột biến KRAS gặp trong những trường hợp có đột biến EGFR và là nguyên nhân kháng erlotinib và gefitinib nguyên phát. Kết quả nghiên cứu cho thấy trong UTPKTBN cần khảo sát đồng thời cả hai đột biến gen EGFR và KRAS để giúp chọn lựa bệnh nhân phù hợp cho điều trị đích bằng erlotinib và gefitinib.

4.2. Đánh giá hiệu quả điều trị đích bước 1 bằng erlotinib trên bệnh nhân UTPKTBN có đột biến gen EGFR

4.2.1. Đáp ứng điều trị

Ở giai đoạn muộn, việc cải thiện chất lượng sống được đặt lên hàng đầu, vì vậy hóa trị toàn thân (cả hóa chất truyền thống và thuốc

điều trị đích) có vai trò chủ yếu là giảm nhẹ triệu chứng (cả cơ năng và thực thể) và kéo dài OS cho người bệnh.

Đáp ứng thực thể

Đáp ứng hoàn toàn hiếm khi đạt được ở bệnh nhân ung thư giai đoạn cuối vì kích thước u lớn, xâm lấn và có thể đã cho di căn xa. Do đó, đáp ứng hoàn toàn ở tháng thứ 9 điều trị cho thấy hiệu quả tốt của erlotinib trên những bệnh nhân có đột biến gen EGFR. Tỷ lệ đáp ứng ORR trong nghiên cứu đạt cao nhất là 63,9% vào tháng thứ 6 sau điều trị. Đây là ORR khá cao trong các nghiên cứu đã thực hiện tại Việt Nam. ORR trong nghiên cứu của Tamura và cộng sự là 75%, của Mok và cộng sự là 71,4%, của Inoue và cộng sự là 66% và của Jeanne và cộng sự là 66%.

Tuy nhiên, sau khi đạt cao nhất tại thời điểm tháng thứ 6, ORR bắt đầu giảm dần, gợi ý một tình trạng kháng thuốc thứ phát. Việc tiếp xúc với erlotinib một thời gian có thể đã kích thích sự phát sinh một số rối loạn ở cấp độ phân tử gây kháng với EGFR TKIs như đột biến T790M exon 20 gen EGFR, sự khuếch đại thụ thể MET, tăng biểu hiện yếu tố phát triển tế bào gan HGF…Do không thể tiến hành sinh thiết lại để xét nghiệm, đồng thời tại Việt Nam cũng chưa có điều kiện để xác định các rối loạn di truyền này nên nguyên nhân bệnh tiến triển sau một thời gian dùng thuốc vẫn chưa được tìm hiểu. Bên cạnh đó, 2 bệnh nhân có bệnh tiến triển chỉ sau một thời gian dùng thuốc rất ngắn và đã được xếp vào nhóm nghi ngờ kháng thuốc nguyên phát. Tuy đã loại trừ đột biến codon12-13 gen KRAS và các đột biến gen EGFR kháng thuốc cùng các đột biến gen EGFR mới nhưng còn có các biến đổi ở cấp độ phân tử khác như sự hiện diện của đột biến codon 600 gen BRAF và phức hợp gen ALK-EML4. Các rối loạn này, nếu không được xác định trước khi điều trị đích sẽ gây lãng phí cho nền y tế. Do đó, cần nhanh chóng xây dựng quy

trình kỹ thuật xác định các rối loạn liên quan đến tình trạng kháng thuốc điều trị đích, đặc biệt là tình trạng kháng nguyên phát.

Đáp ứng toàn trạng

Tỷ lệ bệnh nhân có chỉ số Karnofski ổn định/tăng đạt cao nhất vào tháng thứ 3 sau điều trị (96,7%). 2 bệnh nhân không hề có cải thiện toàn trạng sau dùng thuốc, có thể do có một rối loạn ở cấp độ phân tử khác gây kháng với erlotinib như đã đề cập ở trên. Tỷ lệ bệnh nhân có chỉ số Karnoski ổn định/tăng giảm dần ở các thời điểm đánh giá điều trị sau, tương ứng với sự tăng dần của tỷ lệ bệnh tiến triển. Chỉ số Karnofsky tăng chứng tỏ toàn trạng người bệnh khá lên, chất lượng sống có cải thiện. Trên bệnh nhân điều trị erlotinib có đáp ứng, cải thiện triệu chứng thường được ghi nhận ở ngay tháng đầu ở 80% bệnh nhân. Một số bệnh nhân dù đáp ứng chỉ ở mức *bệnh giữ nguyên* nhưng về cơ năng dung nạp thuốc tốt, bệnh nhân cảm thấy đỡ mệt, ăn uống khá hơn, chất lượng sống được nâng cao. Các bệnh nhân điều trị erlotinib bằng đường uống còn tránh được tình mệt mỏi, chán ăn và buồn nôn trong những ngày sau truyền hóa chất.

4.2.2. Thời gian sống thêm

Trung vị PFS và OS trong nghiên cứu này lần lượt là 9,4 tháng và 15,5 tháng, tương đồng so với báo cáo của Inoue, Sequist, Mok và Tamura, nhưng lại có khác biệt so với của Jeanne dù cũng trên bệnh nhân châu Á. Khi so sánh với các phác đồ hóa trị truyền thống 2 thuốc có platinum trên cùng đối tượng bệnh nhân ở một số nghiên cứu khác, PFS và OS của nghiên cứu này đều kéo dài hơn. Tỷ lệ bệnh nhân còn sống sau 1 năm trong nghiên cứu này là 74,9%, cao hơn của Mok là 58% và của các báo cáo trên nhóm hóa trị truyền thống là khoảng 33%. Một số nghiên cứu đã công bố mối tương quan giữa hiệu quả của erlotinib với giới tính, thể mô bệnh học, tình trạng

hút thuốc lá và chủng tộc. Tuy nhiên, do quần thể nghiên cứu có tỷ lệ nam cao hơn nữ và nhóm tuổi ≥65 chiếm ưu thế nên chỉ có độ tuổi được ghi nhận là yếu tố giúp kéo dài thời gian PFS (p<0,04). Lợi ích này không quan sát được ở thời gian OS.

Tóm lại, erlotinib cần được chỉ định bước 1 trên các bệnh nhân có đột biến EGFR làm tăng tính nhạy cảm với thuốc EGFR TKIs. Trên các bệnh nhân bước 1 không thể hóa trị, nên xem xét điều trị erlotinib nếu là bệnh nhân châu Á và ung thư thể biểu mô tuyến. Tốt nhất là cần có kết quả xét nghiệm tình trạng đột biến gen EGFR và KRAS trước khi lựa chọn phác đồ điều trị để người bệnh đạt được hiệu quả điều trị tối ưu, tránh những trường hợp điều trị thử, chờ đợi rồi thay đổi phác đồ.

4.2.3. Tác dụng phụ của erlotinib

So với các phác đồ hóa trị cổ điển có platinum, điều trị đích bằng erlotinib hoặc gefitinib được ghi nhận dung nạp tốt hơn và ít các tác dụng phụ ở mức độ trung bình-nặng hơn, đặc biệt là tác dụng phụ trên hệ tạo huyết. Trong nghiên cứu này, tác dụng phụ gặp nhiều nhất của erlotinib là phát ban thể nổi mụn ở da (52,4%) và tiêu chảy (39,3%). Độ nặng của tác dụng phụ này hầu hết là độ I-II, có thể kiểm soát được bằng thuốc bôi ngoài da có corticoid hoặc giảm liều erlotinib đối với phát ban da. Rất ít trường hợp tác dụng phụ trên hệ tạo huyết như giảm bạch cầu hạt (14,8%) và giảm huyết sắc tố (11,5%) mức độ nhẹ. Phát ban da thể nổi mụn là một trong những tác dụng phụ chính của EGFR TKIs, bên cạnh tiêu chảy và viêm cạnh móng. Trong nghiên cứu này, phát ban da thể nổi mụn cũng chiếm tỷ lệ cao nhất trong nhóm erlotinib. Một nghiên cứu tiền cứu ghi nhận phát ban thể nổi mụn giúp tiên lượng hiệu quả erlotinib. Phát ban da thể nổi mụn càng nặng, kết quả điều trị thường càng tốt.

KẾT LUẬN

1. Xác định tỷ lệ đột biến gen EGFR và gen KRAS bằng hai kỹ thuật giải trình tự gen và Scorpion ARMS.

- 106/181 bệnh nhân mang đột biến gen EGFR (58,6%). Tỷ lệ đột biến LREA (exon 19) và L858R (exon 21) là 48,2% và 40,7%, các đột biến khác chiếm 12,1%. 2/106 bệnh nhân mang đột biến đôi; 4/106 bệnh nhân mang đột biến mới, gồm c.2137delA (exon 18), c.2373_2374delAA (exon 20), c.2499_2521del23 và c.2554/2555insACA (exon 21).
- 28/181 bệnh nhân mang đột biến gen KRAS (15,5%). Tỷ lệ đột biến tại codon 12 là 82,2% và tại codon 13 là 17,8%.
- 4/181 bệnh nhân cùng mang đột biến gen EGFR và KRAS (2,2%).

2. Đánh giá hiệu quả điều trị đích bước 1 bằng erlotinib

Lần đầu tiên tại Việt Nam, nghiên cứu đánh giá hiệu quả điều trị bước 1 bằng erlotinib được thực hiện trên 61 bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn, có đột biến gen EGFR, không có đột biến gen KRAS, cho hiệu quả tốt và kéo dài thời gian sống thêm với tỷ lệ đáp ứng là 63,9%, trung vị PFS là 9,4 tháng và trung vị OS là 15,5 tháng. Erlotinib đường uống có tính dung nạp tốt. Chỉ có độ tuổi < 65 tuổi được ghi nhận là yếu tố giúp kéo dài PFS (p=0,04).

KIẾN NGHỊ

1. Cần phải xét nghiệm tìm đột biến gen EGFR và KRAS cho bệnh nhân trước khi bắt đầu liệu trình điều trị đích bước 1 nhằm đem lại lợi ích cao nhất cho người bệnh. Để giảm chi phí xét nghiệm, bước đầu nên sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen (có giá thành cạnh tranh hơn) để tầm soát đột biến. Những bệnh nhân nào có kết quả đột biến gen âm tính bằng kỹ thuật giải trình tự sẽ được xét nghiệm lại bằng kỹ thuật Scorpion ARMS.
2. Mở rộng nghiên cứu hiệu quả điều trị đích trên bệnh nhân UTPKTBN giai đoạn muộn có đột biến gen EGFR theo từng nhóm bệnh và theo các dạng đột biến khác nhau.
3. Xác định tính đáp ứng với thuốc EGFR TKIs của các đột biến gen EGFR mới phát hiện, gồm các đột biến xóa đoạn c.2137delA (exon 18), c.2373_2374delAA (exon 20), c.2499_2521del23 (exon 21) và đột biến thêm đoạn c.2554/2555insACA (exon 21).

BACKGROUND

According to the latest worldwide cancer statistics, lung cancer ranks first with high incidence and mortality in both sexes. 70% of lung cancer patients in Vietnam were diagnosed at advanced stages and no longer underwent an operation. By that time, radiation therapy or chemotherapy should be administrated but left more adverse events and the radical efficacy was limited.

In recent years, scientists have developed a new kind of drugs that called the targeted therapy. Targeted therapy locked the target

proteins in the cellular signaling pathways in lung tumors, harvesting high anti-tumor efficacy and less side effects. However, not all patients are responsive to targeted therapy since the responsiveness of targeted drugs depend on the mutation status of the genes encoding functional proteins in the signaling pathways.

OBJECTIVES

The study **"Detection of EGFR and KRAS mutation related to responsiveness of targeted therapy in non-small cell lung cancer"** was carried out with the following objectives:

3. *Determining the frequencies of the targeted therapeutic responsiveness related-EGFR and -KRAS mutation in advanced non-small cell lung cancer.*
4. *Initially evaluating the responsiveness of first-line erlotinib in advanced and EGFR-mutated non-small cell lung cancer patients.*

URGENT NATURE OF THE STUDY

Targeted therapy has been shown to be effective to non-small cell lung cancer (NSCLC) patients, especially in those harboring EGFR mutated gene and KRAS non-mutated gene. In June 2009, FDA recommended that EGFR mutation status should be determined in the initation of EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR TKIs) administration. Although the targeted therapy becomes more frequent in Vietnam, there has not been any study investigating the EGFR and KRAS mutation on a large scale and evaluating the effectiveness of

genotype-driven targeted therapy. Therefore, the studies on this field are considerable concerned.

NEW CONTRIBUTIONS FROM THE THESIS

EGFR and KRAS mutation were detected by using the two advanced methods which helped to lower the false negative rate and made the results more precise. This study provides not only the initial information about the frequencies of EGFR and KRAS mutation in advanced NSCLC but the responsiveness of first-line erlotinib in the EGFR-mutated patients as well .

THESIS OUTLINE

This thesis covers 125 pages, including: preamble (2 pages), the overview (34 pages), materials and method (13 pages), results (37 pages), discussion (37 pages), conclusion (1 page), petition (1 page). It consists of 27 tables, 5 charts, 1 diagram, 42 figures and 184 references (17 in Vietnamese and 167 in English).

Chapter 1: OVERVIEW

1. Non-small cell lung cancer

Non-small cell lung cancer gets the majority of lung cancer with the frequency from 80% to 85%. NSCLC arises from the exposure to carcinogenic risk factors and the genetic susceptibility of patients. More molecular dysfunctions of NSCLC have been discovered in recent years, including EGFR and KRAS mutations, which account for higher proportion than other rare genetic disorders. NSCLC is

divided into three main histologic subtypes, including adenocarcinoma, squamous carcinoma and large cell carcinoma.

2. Role of EGFR signaling pathway

Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a transmembrane tyrosine kinase receptor that plays a central role in regulating cell division and death. Downstream effects of EGFR activation include modulation of three major pathways that have been well characterized. Induction of the RAS-RAF-MAPK pathway occurs when phosphorylated EGFR recruits the guanine-nucleotide exchange factor via some adapter proteins, which activates RAS. This step subsequently stimulates RAF and the MAP kinase pathway, ultimately affecting cell proliferation, tumor invasion, and metastasis.

Although mutations can occur anywhere within the tyrosine kinase domain, a significant set of EGFR mutations in lung cancer that are associated with objective response to single agent TKI therapy are observed in exons 18–21. The most frequent of these are in-frame deletions in exon 19 that occur in approximately 45% of cases, followed by point mutations in exon 21, in 40–45% of cases. While more than 20 different deletions are observed in exon 19, L858R in exon 21 is the most common point mutation detected. In NSCLC, EGFR mutation is more frequent in East Asia than other countries, in female than male and in never smokers than ever smokers.

Mutation in codon 12 and 13 of KRAS gene transcripted a mutated KRAS protein which is able to auto-activate the downstream

signaling pathway regardless of the upstream EGFR. Therefore, KRAS-mutated NSCLC were intrinsically 'resistant' to the EGFR TKIs gefitinib and erlotinib. Unlike EGFR mutation, KRAS mutation is more common in Caucasian patients and smokers.

The efficacy of the small molecules EGFR TKIs gefitinib and erlotinib has been shown through many clinical trials such as IPASS, WJTOG3405, OPTIMAL, EURTAC ... with high response rates and prolong survival time when compared with platinum-based chemotherapy, especially in EGFR TKIs-sensitive EGFR mutants.

3. EGFR and KRAS mutation testing methods

Direct sequencing method

PCR RFLP method

Scorpion ARMS method

Smart Amplification Process method

4. Researchs in EGFR and KRAS mutation and targeted therapy of non-small cell lung cancer in Vietnam

Researchs about EGFR and KRAS mutations or the efficacy of targeted therapy in NSCLC in Vietnam have been limited. There were 10 studies from 2009 till now. There is no study in combination more methods to elevate the sensitivity of the test. The occurrence of EGFR mutation in Vietnamese adenocarcinoma NSCLC was reported 64,2% in the PIONEER study (2014). Besides, there is also no evaluation of the responsiveness of first-line EGFR TKIs, driven by EGFR and KRAS mutation status.

Chapter 2: MATERIALS AND METHOD

1. Materials: including 2 groups:

- 181 advanced and chemonaive NSCLC patients whose histologic subtypes are adenocarcinomas or squamous carcinomas or large cell carcinomas, were determined EGFR and KRAS mutations.

- 61 first-line erlotininib administrated patients, selected from the 181 patients above. These 61 patients were adenocarcinomas and harbored EGFR TKIs-sensitive mutated EGFR gene and non-mutated KRAS gene.

2. Study design:

Cross-sectional and descriptional study (for mutation detection study) and cohort and survival study (for responsivess of first-line erlotinib study). Study duration: from 01/01/2012 to 30/03/2014.

3. Study method:

3.1. Detection of EGFR and KRAS mutations:

All samples underwent a haematoxylin and eosin pathology review to confirm the diagnosis of NSCLC and the presence of tumor in the samples. The NSCLC samples were macro-dissected by scraping only the tumor area that had been selected by a pathologist. Genomic DNA was extracted and purified using xylene and phenol/chloroform. EGFR and KRAS mutation were detected by using simultaneously direct sequencing and Scorpion ARMS method:

- The Sequencing reaction using BidDye Kit (Applied Biosystems) was done in ABI3700 analyzer and Seqscape software (Applied Biosystems). Sequences of EGFR and KRAS genes of the patients were compared with the reference sequence in GeneBank.

- Scorpion ARMS method using EGFR PCR kit and KRAS PCR kit (Quiagen) detects 29 EGFR mutations and 7 KRAS mutation by real-time PCR, the sensitivity 1% (1 mutated allele in total of 100 alleles).

3.2. Responsiveness of first-line erlotinib:

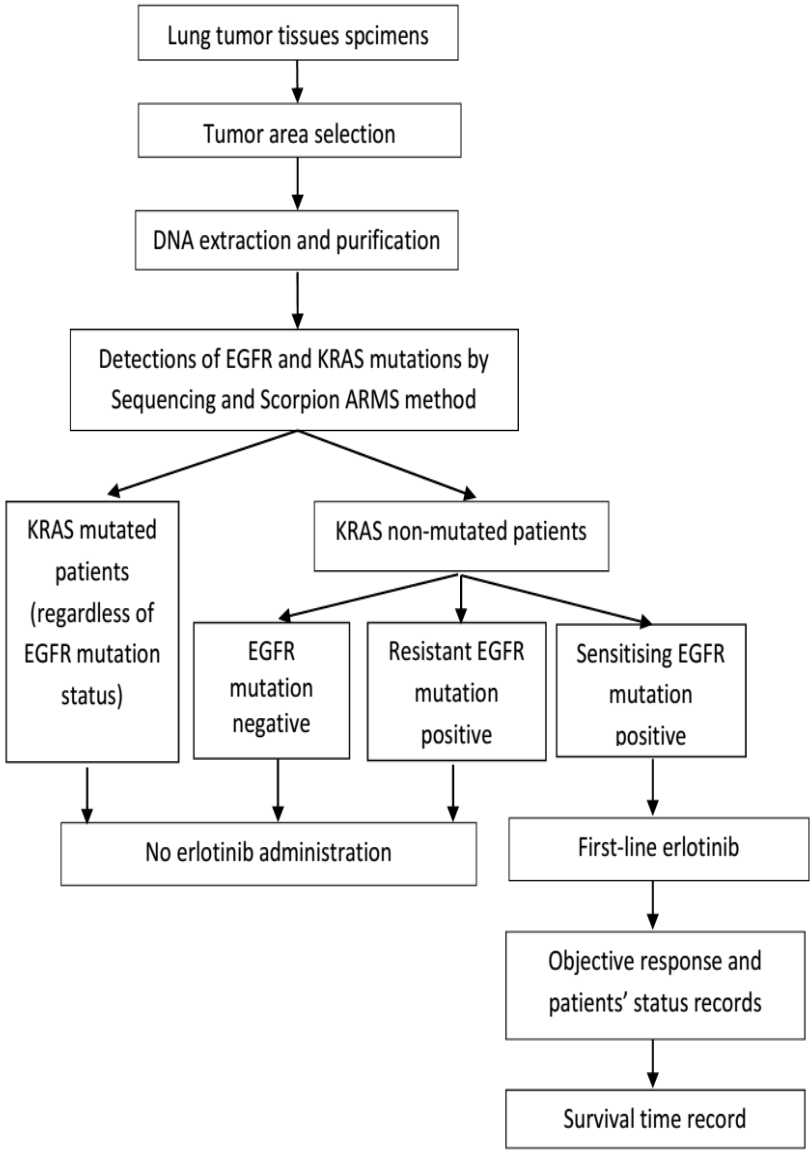
The overall response rate (ORR) (according to RECIST criteria version 1.1) and patients' performance status (according to Karnofski scores) were recorded after each 3 months. The progression-free survival time (PFS) and the overall survival time (OS) were recorded. Adverse events were followed and classified according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE v3.0).

4. Data processing:

The statistical analyses were done using the SPSS software package version 21.0. Chi-square tests and Fisher's exact tests (when there were fewer than five expected counts in the contingency table) were used to assess the difference between subgroups. Kaplan-Meier curve was used for survival analysis. Logrank test was used to compared the mean survival time between subgroups. All statistical tests were two sided and *p* values less than 0,05 were considered statistically significant.

5. Ethics in medical research:

The study was conducted based on the voluntary participation of patients. The data used in the study was approved by the Ethics Board of the Ministry of Health.



Study processing diagram

Chapter 3: STUDY RESULTS

181 advanced and chemonaïve NSCLC patients were undergone EGFR and KRAS mutation testing.

1. Frequency of EGFR mutation

This study detected EGFR muations in 80/181 patients by using direct sequencing and in 101/181 patients by Scorpion ARMS method. In the combination of the two methods, 106/181 patients (55,8%) showed an EGFR mutation. Mutations were found in all four exons but mainly clustered in exon 19 and 21 (48,1% and 40,6%, respectively).

2/106 patients carried the double mutation, including S768I+V769L (exon 20) and T790M (exon 20)+L858R (exon 21).

New mutations occurred in 04/106 patients, including: c.2137delA (exon 18), c.2373_2374delAA (exon 20), c.2499_2521del23 (exon 21) và c.2554/2555insACA (exon 21). Their responses to EGFR TKIs are unknown.

Patients with the EGFR TKIs-sensitive mutation were in the majority of cases (99/102, 97,0%) while those with the EGFR TKIs-resistant mutation were in 3/102 (3,0%).

‘

Table 1. Incidence of EGFR mutations

Mutation	Exon	Response to EGFR TKIs	Direct sequencing	Scorpion ARMS method	Combination
G719S	18	Sensitive	1	1	1 (0,9%)
c.2137delA	18	Unknown	1	0	1 (0,9%)
LREA	19	Sensitive	45	51	51 (48,1%)
T790M	20	Resistant	1	1	1 (0,9%)
c.2373_2374 delAA	20	Unknown	1	0	1 (0,9%)
S768I + V769L	20	Resistant	1	0*	1 (0,9%)
L858R	21	Sensitive	25	43	43 (40,6%)
L861Q	21	Sensitive	2	4	4 (3,8%)
T790M + L858R	20 + 21	Resistant	1	1	1 (0,9%)
c.2499_2521 del23	21	Unknown	1	0	1 (0,9%)
c.2554/2555 insACA	21	Unknown	1	0	1 (0,9%)
All mutation			80	101	106 (100%)
Mutation rate			80/181 = 44,2%	101/181 = 55,8%	106/181 = 58,6%

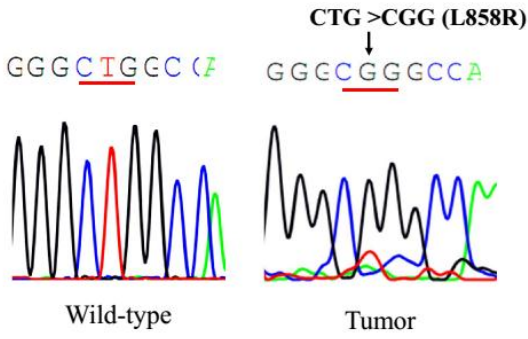


Figure 1. L858R mutation in exon 21 of EGFR gene by direct sequencing

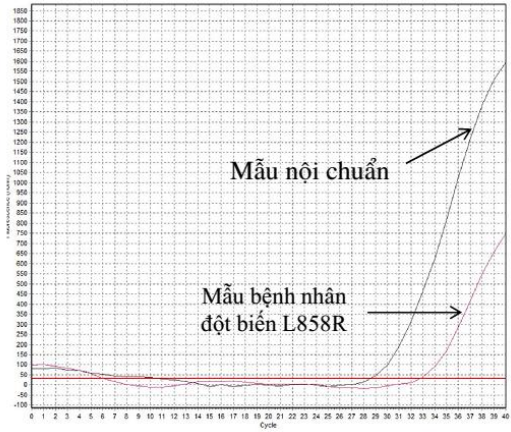


Figure 2. L858R mutation in exon 21 of EGFR gene by Scorpion ARMS method

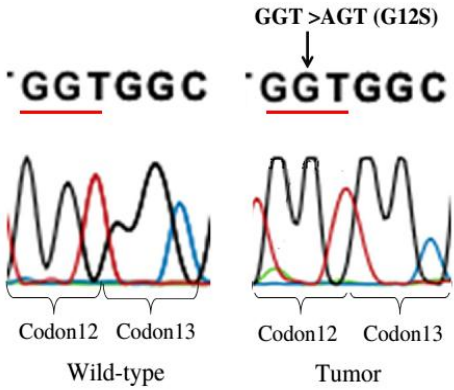
2. Frequency of KRAS mutation

Table 2. Incidence of KRAS mutations

Mutation	Direct sequencing	Scorpion ARMS method	Combination
G12A (codon 12)	2	3	3 (10,7%)
G12D (codon 12)	9	10	10 (35,7%)
G12C (codon 12)	2	4	4 (14,3%)
G12S (codon 12)	1	1	1 (3,6%)
G12V (codon 12)	5	5	5 (17,8%)
G13D (codon 13)	4	5	5 (17,8%)
All mutation	**23**	**28**	**28 (100%)**
Mutation rate	23/181=**12,7%**	28/181=**15,5%**	28/181=**15,5%**

- This study detected KRAS mutations in 23/181 patients by using direct sequencing and in 28/181 patients by Scorpion ARMS method. In the combination of the two methods, 28/181 patients (55,8%) showed a KRAS mutation. Mutations were found in all four exons but mainly clustered in exon 19 and 21 (48,1% and 40,6%, respectively).

- No double mutation or new mutation in the codon 12 and 13 was discovered.



Hình 3. Mutation G12S in exon 2 of KRAS gene by direct sequencing

The mutated EGFR and non-mutated KRAS patients were in the majority of cases (56,4%). The concurrent EGFR and KRAS mutations occurred in 4/181 patients (2,2%).

Table 3. Fequencies of EGFR and KRAS mutations

Mutation status	EGFR mutation positive	EGFR mutation negative	All
KRAS mutation positive	4 (2,2%)	24 (13,2%)	28 (15,5%)
KRAS mutation negative	102 (56,4%)	51 (28,2%)	153 (84,5%)
All	106 (58,6%)	75 (41,4%)	181 (100%)

3. Responsiveness of first-line erlotinib

According to the study processing diagram, eligibility criteria and mutation status, there were 61 patients who were selected to first-line erlotinib study. Mean ages were 66,16±18,24.

Table 4. Objective response rate (n=61)

Response	3-month		6-month		9-month		12-month	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Complete response	0	0	0	0	1	1,6	1	1,6
Partial response	22	36,1	39	63,9	28	45,9	18	29,5
Stable disease	37	60,6	16	26,2	16	26,2	14	22,9
Progressive disease	2	3,3	6	9,9	16	26,2	28	45,9
ORR	22	**36,1**	39	**63,9**	20	**47,5**	19	**31,1**

There was 1/61 patient who got complete response . The overall response rate (ORR) reached to the highest at the time of 6-month (63,9%) and then went down to 47,5% and 31,1% at the 9-month and 12-month, respectively.

Table 5. Karnofsky scores (n=61)

Karnofsky scores	3-month		6-month		9-month		12-month	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Stable/Increase	59	96,7	54	88,5	47	77,0	33	54,1
Decrease	2	3,3	7	11,5	14	23,0	28	45,9

The rate of patients who got a stable or increase Karnofski score was highest at the time of 3-month. This rate decreased time by time, corresponding to the rate of progressive patients.

Table 6. Relationship between patients' characteristic and survival time

Characteristic		n	Median PFS (months)	Median OS (months)
Gender	**Male**	36	9,18	12,72
	Female	25	9,58	11,92
		p	*0,811*	*0,648*
Age	**<65**	20	11,73	14,53
	≥65	41	8,18	11,35
		p	*0,04*	*0,08*
Smoking status	**Non-smoking**	37	9,81	13,15
	Smoking	24	9,04	11,91
		p	*0,647*	*0,482*

The mean duration of treatment was 9,8 months. The median PFS was 9,4 months (3,2 – 48 months) and the median OS was 15,5 months (5,7 – 48 months) (Figure 4). Due to the equality between the patients' characteristics, statistically significance was hardly discovered from most of subgroups. The PFS was statistically significance longer in <65-year old patients than in ≥65-year old

patients (11,73 months vs 8,18 months, p <0,05). However, this difference was not observed in OS.

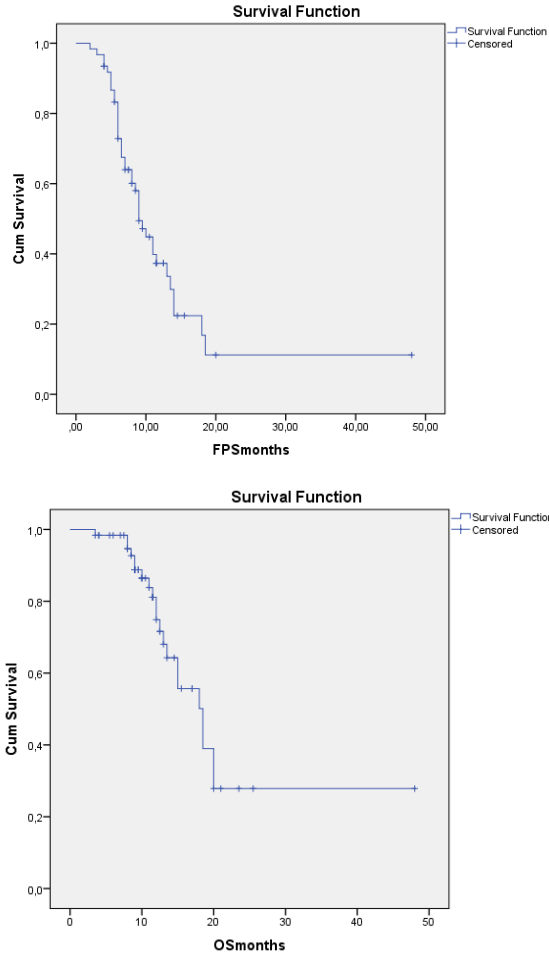


Figure 4. Kaplan-Meier curves for progression-free survival (PFS) and overall survival (OS)

Table 7. Adverse events of erlotinib

Adverse events	Grade 1-2	Grade 3-4	All adverse events
Leukopenia	9 (14,8%)	0	9 (14,8%)
Anemia	7 (11,5%)	0	7 (11,5%)
Diarrhea	24 (39,3%)	0	24 (39,3%)
Hepatic enzyme evaluation	9 (14,8%)	1 (1,6%)	10 (16,4%)
Vomiting	5 (8,2%)	0	5 (8,2%)
Rash or acne	28 (45,9%)	4 (6,6%)	32 (52,4%)
Paronychia	13 (21,3%)	1 (1,6%)	14 (23,0%)
Myalgia, arthralgia	3 (4,9%)	0	3 (4,9%)
Hair loss	2 (3,3%)	0	2 (3,3%)

Chapter 4: DISCUSSION

1. Frequencies of EGFR and KRAS mutations

1.1. EGFR and KRAS mutation testing method

Which method was used to determine the mutations is also an important factor impacting on the occurrence of the mutation as well. The rate of the mutations in tumor DNA detected by the Scorpion ARMS was compared with that determined by the direct sequencing as a current standard method. DNA from tumor samples consisted of a mixture of the mutant DNA and wild-type DNA because the EGFR mutation status was always heterogeneous, and the complete removal of normal cells, such as normal epithelial cells and inflammatory cells, from tumor specimens is very difficult. Since parallel tumor tissue investigations were done on all specimens, which is a

recognized advantage in the present study, more EGFR mutations were detected (106 cases), instead of 101 cases or 80 cases when using Scorpion ARMS only or direct sequencing only. Ellison *et al* reported the overall EGFR mutation rate was 12.6%, higher than the single Scoripon ARMS method or sequencing (8.4% and 7.9%, respectively). It can be speculated that the high sensitivity and specificity of the EGFR Scorpion allowed the study to detect more mutations or to confirm uncertain results, which originated from the lower sensitivity of direct sequencing. Although Shi *et al* reported high frequency of EGFR mutations in seven Asian countries of the PIONEER study by using Scorpion ARMS method, no new or unknown mutation was found (22). In this study, 4 new mutations (deletion and insertion) and one V769L mutation were determined only by using direct sequencing. This is the first time in Vietnam, a EGFR mutational analysis was carried on by both direct sequencing and Scorpion ARMS method. One limitation of the EGFR Scorpion kit is that it is able to detect mutations targeted by the designed Scorpion primers while EGFR mutations are not solely at several sites but clustered around the ATP-binding site in exon 18, 19, 20 and 21. In addition, the occurrence of EGFR mutations depends on various technical factors such as the tissue extraction method, the qualification of the tumor tissue and the DNA purification procedure.

1.2. EGFR mutation rate

The current study reports the results from a molecular analysis of the EGFR gene in 181 non-small cell lung cancer patients before the initation of gefitinib or erlotinib administration. Among the 181 patients, there were 106 patients (58,6%) carrying EGFR mutations in the tumor. The positive rate of EGFR mutations is much higher than previously reported for Caucasian patients but rather higher than that observed in East Asian patients. The frequency of EGFR mutations was reported 39% in Japan, 34.6% in Korea, 38.6% in Taiwan and 57.4% in Thailand. This suggests that previously study designs had import selection biases concerning this mutation analyses. One possible explanation for the higher mutation rate in this study lies in the distribution of the histological subgroups. In a manner consistent with the previous reports, the EGFR mutations are tightly associated with this pathology type. Since adenocarcinomas were also in this study more likely to exhibit a EGFR mutation, the frequency was overestimated.

Moreover, the mutations seem to be complex in that 2 tumors carried double mutation, including T790M+L858R and S768I+V769L. This finding would suggest that the cancer cells might be accumulating multiple molecular events in the EGFR gene in these tumor specimens. Regarding to the impact of EGFR mutations on the responsiveness of tyrosine kinase inhibitors, the sensitising mutations were more frequent than the resistant mutations in this

study (99/106, 93.4% vs 3/106, 2.8%), which is a finding similar to the previous reports. 2 of 3 tumors occurring resistant mutations carried the double mutation, in which T790M, S768I and V769L were resistant-reported mutations while L858R is classified into sensitizing mutation. Although EGFR double mutations were previously reports, from which the frequencies varied from 13% to 17%, they were limitedly studied in Vietnamese NSCLC patients. T790M+L858R is a comlex double mutation for the combination of a sensitising and a resistant mutation. The *in vitro* gefitinib response of EGFR T790M+L858R mutants was investigated, compared with single and double mutants. The T790M+L858R double mutants showed strong resistance to gefitinib treatment because they increased the ATP affinity of EGFR kinase domain 5-fold higher than the L858R single mutants.

1.3. KRAS mutation rate

Mutations in codon 12 and 13 of KRAS gene were discovered in total 28/181 patients (15,5%) by using the direct sequencing and Scorpion ARMS method. KRAS mutation in Asia patients was less frequent than in Caucasian ones. This study carried out in Vietnamese patients reported a higher proportion of KRAS mutation than in China and Korea. That might be due to the combination of two method leading to detect more mutations and it has not been excluded that KRAS mutation was more common in the Kinh. Besides the characteristics which have been discussed such as

ethnics, gender, smoking history and histologic subtype, KRAS mutation rate was influenced by technical factors like EGFR mutations.

The KRAS mutations detected in this study had been reported with the similar frequencies in the COSMIC database. Another point of interest was that KRAS mutations were detected in both EGFR mutant and non-mutant group. It was discussed in the previous reports that *KRAS* mutations are usually mutually exclusive with *EGFR* mutations and *ALK* translocations. However, highly sensitive methods facilitated to detect the concurrent EGFR and KRAS mutations, which were intrinsically 'resistant' to the EGFR TKIs gefitinib and erlotinib. The outcomes recommended that EGFR and KRAS mutation should be determined simultaneously in the initation of gefitinib or erlotinib administration.

2. Evaluation of first-line erlotinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer

2.1. Therapeutic response

In advanced stages, improving the quality of life is priority, so the systemic therapy (both traditional chemotherapy and targeted therapy) helps to take palliative care and prolong OS for patients.

Objective response

Complete response is rarely achieved in advanced NSCLC patients because of the size, invasion and metastases of the tumors. Therefore, a complete response at the 9-month time showed good effectiveness of erlotinib in EGFR mutated patients. The ORR in the

study was 63.9%, the highest value at 6-month time after administration. This is a high ORR in the previous studies carried out in Vietnam. The ORR was reported as 75% and 71.4% by Tamura et al and Mok et al, as 66% by both Inoue et al and Jeanne et al.

However, after reaching the highest values at 6 months, the ORR began declining, suggesting a secondary drug resistance. It might be noticed that the exposure to erlotinib may have stimulated a number of molecular EGFR TKIs-resistant disorders such as the mutation T790M in the exon 20 of EGFR gene, the MET amplification, the HGF overexpression ... These hypotheses have not been explored since the molecular disorders have not been determined in Vietnam at the present time and the biopsy has not been extracted many times for molecular testing.

In addition, that 2 patients having progressive diseases after only a very short time suggested a primary drug resistance. Although KRAS mutation, EGFR TKIs-resistant EGFR mutations and new EGFR mutations were excluded due to eglibility criteria, there were also molecular disorders responsible for the outcome, such as a BRAF mutation or EML4-ALK translocation. Thus, technical procedures for genotype-driven therapies should be established.

Patients' status

The percentage of patients with stable/increase Karnofski scores reached to a peak (96.7%) at the 3-month after erlotinib administration. Two patients had no any improvement, may be due to a molecular disorder, causing resistance to erlotinib as mentioned

above. After this period, the proportion went down, corresponding to the gradual increase of the progressive disease rate. That Karnofsky scores rose proved the patients' better performance status and the improvement in the quality of their lives. Symptomatic improvements were observed in the first month in 80% of the complete and partial response patients. In the stable diseases, erlotinib was well tolerated so the patients felt better and avoid fatigue, loss of appetite and nausea.

2.2. Survival time

Median PFS and OS were recorded 9,4 months and 15,5 months, respectively, similarly compared with which reported by Inoue, Sequist, Mok and Tamura et al, but differed from that of Jeanne et al. When compared with traditional platinum-based chemotherapy, the PFS and OS of this study were more prolonged. This study showed a 74.9% of 1-year OS, higher than which of Mok et al (58%) and which of previous studies in traditional platinum-based chemotherapy patients (approximately 33%). A number of studies have been published the correlation between the efficacy of erlotinib with sex, histologic subtypes, smoking status and race. However, only the age <65-year old was noticed to be a factor that helped to prolong PFS ($p < 0.04$) due to the similarity between the study subgroups. This difference was not observed in OS.

In summary, first-line erlotinib should be administrated in EGFR TKIs-sensitive EGFR-mutated NSCLC patients. In the patients who were not suitable for chemotherapy, erlotinib administration should

be considered if the patient is Asian and adenocarcinoma. However, the EGFR and KRAS mutation testing were strongly recommended for the optimal therapeutic selection.

2.3. Adverse events of erlotinib

Compared with the traditional platinum-based chemotherapy, targeted therapy with erlotinib or gefitinib was observed better tolerability and fewer side effects, especially adverse effects in bone marrow. In this study, the most common adverse events of erlotinib are skin rash or acne (52.4%) and diarrhea (39.3%). The severity of this side effect clustered in grade 1-2 and could be controlled by corticoid cream or erlotinib-dose reduction. Skin rash or acne is one of the main adverse events of EGFR TKIs, in addition of diarrhea and paronychia. A prospective study reported skin rash to be a predictor for erlotinib effectiveness.

CONCLUSION

2. Frequencies of EGFR and KRAS mutations determined by using direct sequencing and Scorpion ARMS method:

- The frequencies of EGFR and KRAS mutations were 58,6% (106/181) and 15,5% (28/181) in 181 advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients, detected by using the direct sequencing and Scorpion ARMS method.

- 4/106 patients showed new mutations in EGFR gene, including small deletions c.2137delA (exon 18), c.2373_2374delAA

(exon 20), c.2499_2521del23 (exon 21) and an insertion c.2554/2555insACA (exon 21).

- 4/181 patients carried the concurrent mutations in EGFR and KRAS genes.

2. Responsiveness of first-line erlotinib

This is the first time in Vietnam that the responsiveness of first-line erlotinib was studied in advanced NSCLC patients who were EGFR mutation positive and KRAS mutation negative. The overall response rate was 63,9%, the median of progression-free survival time was 9,4 months and the median of overall survival time was 15,5 months. Age under 65-year old was noticed to improve PFS (p=0,04).

PETITION

4. EGFR and KRAS mutation testings were recommended before the initation of first-line gefitinib or erlotinib administration for the highest benefits of the patients. For lowering the testing expenditures, the direct sequencing should be indiated to screen mutations before Scorpion ARMS method.
5. Evaluate the responsiveness of erlotinib or gefitinib in advanced and EGFR-mutated NSCLC in different therapeutic groups (first-line or second-line) and in different mutation types.
6. Determine the responses of the new EGFR mutations in this study to erlotinib and gefitinib.