

<sup>1</sup> ГБУЗ  
«Санкт-Петербургский  
клинический научно-  
практический центр  
специализированных видов  
медицинской помощи  
(онкологический)»  
Санкт-Петербург

## РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ

<sup>2</sup> ФГБУ «НМИЦ НИИ  
онкологии  
им. Н.Н. Петрова»  
Минздрава России

Ф.В. Моисеенко<sup>1,2,3</sup>, В.М. Моисеенко<sup>1</sup>

### RESISTANCE TO TARGETED THERAPY

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО  
«Северо-Западный  
государственный  
медицинский университет  
им. И.И. Мечникова»  
Минздрава России  
(Санкт-Петербург, Россия)

**Ф.В. Моисеенко<sup>1,2,3</sup>**

*Доктор медицинских наук, доцент, заведующий отделением химиотерапии ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)», научный сотрудник научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации; профессор кафедры онкологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, Ленинградская ул., д. 68А.*

**В.М. Моисеенко<sup>1</sup>**

*Доктор медицинских наук, профессор, директор ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)». 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68а, Лит А.*

**F.V. Moiseenko<sup>1,2,3</sup>**

*Doctor of Medicine, Associate Professor, Head of the Chemotherapy, St. Petersburg Clinical Research and Practical Center of Specialized Types for Medical Care (Oncological); Researcher, Department of Innovative Methods of Therapeutic Oncology and Rehabilitation, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology; Professor of the Department of Oncology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. 197758, St. Petersburg, pos. Pesochnyi, Leningradskaya ul., 68A.*

**V.M. Moiseyenko<sup>1</sup>**

*Doctor of Medicine, Professor, Director Budgetary Health Institution "Saint-Petersburg clinical and practical center of specialized types of medical care (oncological)". 197758, St. Petersburg, Pesochny, Leningradskaya str., 68a, Lit.A.*

Резистентность к проводимой системной терапии является основным фактором, приводящим к гибели больных злокачественными опухолями. Формирование резистентности связано с наличием гетерогенности опухолевых клеток. В свою очередь, гетерогенность определяется наличием генетической нестабильности опухолевых клеток, которая и является основой для эволюции под влиянием селективных или нейтральных внешних факторов.

Современные лекарственные препараты в качестве мишени для своей внутриопухолевой активности используют те или иные белки, блокирование которых приводит к нарушению общего метаболизма опухолевых клеток и их гибели. Очевидно, что теоретическая и практическая эффективность препарата пропорциональна доле клеток, для которых данный механизм является уязвимым, и обратно пропорциональна доле клеток, которые имеют «шунтирующие» уязвимый белок механизмы.

В этой обзорной статье авторы обсуждают имеющиеся данные о возможном механизме действия таргетных препаратов на примере EGFR позитивного рака легкого.

**Ключевые слова:** злокачественные опухоли, рак легкого, молекулярные маркеры, таргетная терапия, резистентность.

Resistance to systemic therapy is the main factor that leads to patients death. The appearance of resistance is caused by genetic and phenotypic heterogeneity of tumor cells. In turn heterogeneity is caused by genetic instability that drive tumor evolution under the pressure of neutral or selective factors. Contemporary drugs execute various molecules as a targets of antitumor activity, their blockage leads to disruption in tumor metabolism and sometimes to cell death. Theoretical and practical efficacy of the drug is in proportion to the share of cells for which particular mechanism that is targeted by the drug is vulnerable. Contemporary drugs use various intracellular molecules as a target of their anticancer activity. Their blockade results in disruption of metabolic or growth cascades in tumor cells and may lead to cell death. Obviously, theoretical and practical efficacy of the drug is in direct proportion to the amount of cells that are vulnerable to the blockade of particular pathway, and is indirectly proportional to the share of cells that have «shunting» mechanisms.

In this review article authors discuss the available data on the origin of resistance using as an example EGFR mutated non-small cell lung cancer.

**Key words:** malignant tumors, lung cancer, molecular markers, targeted therapy, resistance.

## Введение

При первом контакте опухоли с ингибитором тирозинкиназ (ИТК) начинается активная гибель клеток, для которых блокируемый белок имеет драйверную функцию. Гибель происходит в первую очередь через апоптоз. Доля погибающих при этом клеток относительно всего объема опухолевой массы является биологическим значением «объективного ответа», описываемого по критериям RECIST v1.1. Именно на этом этапе между больными со сходными по наличию конкретного активирующего/драйверного нарушения опухолями начинают проявляться различия в глубине ответа, а позднее – в его длительности или механизме, определяющем рост опухолевых клеток на фоне активной концентрации препарата, то есть резистентности.

Противоопухолевое лечение изменяет клональную динамику опухоли за счет «искусственного» фактора селекции, вносимого в микроокружение опухоли – противоопухолевого препарата [1]. Воздействие этого фактора может приводить к гибели части клеток, что и определяет клинический эффект противоопухолевого препарата. Возобновление роста всех или некоторых опухолевых очагов или появление новых очагов в других органах принято трактовать в клинической практике как резистентность заболевания. В зависимости от времени прогрессирования относительно начала терапии, резистентность разделяют на первичную, когда деление значительной части опухолевых клеток продолжается, несмотря на терапию, и приобретенную, когда вслед за первичным противоопухолевым эффектом, проявляющимся в виде стабилизации размеров опухолевых очагов или их уменьшением, следует возобновление роста [2]. Несмотря на то, что в обоих случаях лечение таргетным препаратом не приводит к полной эрадикации опухолевых клеток, и требуется переход на другой вариант терапии, эти виды ответа на противоопухолевую терапию имеют

существенные клинические различия. В первом случае возможно продолжение лечения, несмотря на неэффективность препарата против части опухолевых клеток [3]. В то же время второй вариант требует перехода на другой вариант лечения сразу.

Несмотря на выраженные различия в следствиях каждого из видов резистентности для лечения пациентов, биологические механизмы, опосредующие каждый из видов резистентности, представляются авторам данной статьи крайне сходными. Как в одном, так и в другом случае часть опухолевых клеток переживает летальное для всех прочих клеток воздействие таргетного препарата. Различия заключаются лишь в доле переживших его клеток относительно общего объема опухоли [4] [5]. Проявление этой резистентности заключается в усилении пролиферативной активности одного или нескольких клонов, что постепенно приобретает и клиническое значение, описываемое как прогрессирование заболевания.

Исследования опухолей, ассоциированных с активирующими мутациями, наиболее частым вариантом которых являются нарушения EGFR, показали, что до первого приема таргетного препарата соответствующая активирующая мутация присутствует в подавляющем большинстве опухолевых клеток. Данное наблюдение относится как к клеткам в пределах одного очага – так называемая внутриопухолевая гетерогенность, так и к отдаленным метастатическим очагам – межопухолевая гетерогенность. Поэтому большинство опухолей, ассоциированных с активирующими мутациями, крайне чувствительны к противоопухолевому действию того или иного ИТК.

Тем не менее, как показывают результаты многочисленных крупных клинических работ, никто из пациентов не излечился от опухолевого процесса с помощью таргетной терапии. Более того, даже исключая из рассмотрения случаи с первичной резистентностью, которые не отвечают на терапию изначально, мы знаем, что для сходных по клиническим

факторам пациентов эффект может продолжаться от нескольких месяцев до нескольких лет. И это, вне всякого сомнения, имеет клиническое значение [6].

### Гетерогенность опухолей с EGFR мутацией до лечения

Крайне точная классификация резистентности, интересная в свете темы настоящей статьи, была предложена идеологом теории эволюции опухолей Charles Swanton. Так, в одной из своих работ он утверждает, что появление «разрастающегося» клона может быть связано как с селекцией предшествовавшего клона, ранее не имевшего преимуществ относительно прочих клеток, так и с формированием клона *de-novo*, называемым «адаптацией».

Первым объяснением различных по длительности ответов на терапию все-таки остается гетерогенность опухолевых очагов по наличию активирующих мутаций, то есть сохранение гипотетической возможности продолжения роста части клеток просто за счет отсутствия мишени для противоопухолевого препарата (ингибиторам тирозинкиназы EGFR) [7–9]. В то время как различия мутационного статуса EGFR между разными очагами у одного больного – «межопухолевая» гетерогенность, достигающая 13,9% – может быть легко объяснена первично-множественным характером солитарных очагов в легких. Гетерогенность в пределах одного опухолевого очага, как подтвердить в клинических образцах, так и объяснить значительно сложнее [7].

Одно из первых наблюдений гетерогенности опухоли до проведения терапии ИТК было сделано в работе Jiang и соавторов, опубликованной в 2008 году [9]. Авторы, выполнив микродиссекцию нескольких клеточных кластеров из различных регионов одного опухолевого очага, подвергли их клонированию и далее – амплификации, создав из каждой опухоли несколько десятков «кластеров», соответствующих различным довольно мелким участкам опухоли. Данная процедура показала, что небольшая часть опухолевых клеток (5/27 кластеров, 1/20, 5/49 для каждой из опухолей соответственно) не несла активирующих мутаций – EGFR дикого типа, что может свидетельствовать о наличии гетерогенности и определять первичную резистентность к лечению.

Сходные наблюдения были сделаны и в другой работе китайских авторов, которые подвергли исследованию 1431 фрагментов полученных из 45 аденокарцином легкого с мутациями EGFR (28–34 участка из одной опухоли) [10]. Для анализа мутационного статуса EGFR были использованы такие высокочувствительные методы генетического анализа, как денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография и аллель-специфическая ПЦР. Исследование показало, что мутации EGFR присутствовали лишь в 80,6% (1 154/1 431) и 87,1% (1 247/1 431) опухолевых клеток по данным первого и второго методов соответственно. Любопытно, что опухоли с наличием

внутриопухолевой гетерогенности также характеризовались меньшей степенью амплификации EGFR.

К сожалению, сомнения в реальности существования гетерогенности результаты этой работы полностью не устраняют. Так, сами авторы поднимают вопрос о недостаточной чувствительности применяемых методов, а также возможной контаминации исследуемого генетического материала нуклеиновыми кислотами неопухолевых клеток.

Клинически значимая гетерогенность опухоли по наличию в клетках ее составляющих активирующих мутаций могла бы выглядеть, как сосуществование в опухоли нескольких доминантных клонов, зависимых от разных молекулярных нарушений. Теоретически подобная ситуация возможна только в тех ситуациях, когда доминирующие клоны обладают сходным уровнем фенотипической адаптированности («fitness»), что наблюдается, например, при колоректальном раке, где существует внутриопухолевая гетерогенность, например, мутаций KRAS. Любопытно, что аденокарциномы легкого довольно часто представляют собой смесь из различных подтипов: папиллярного, лепидического и других. В одной работе, направленной на исследование вопроса гетерогенности активирующих мутаций, из 590 образцов аденокарциномы легкого было выявлено 105 образцов со смешанными вариантами гистологических типов аденокарциномы и 17 аденосквамозных опухолей [11]. Мутации ALK были выявлены методом иммуногистохимии (ИГХ) и FISH у 10/122 пациентов, а мутации EGFR ИГХ и ПЦР у 12/122. При исследовании ИГХ окраски образцов с мутациями EGFR окраска представлялась гомогенной в 11/12 случаев, в то время как ALK лишь в 3/10. В единственном случае с внутриопухолевой гетерогенностью EGFR отсутствие мутации (в данном случае *ex19del*) было выявлено в папиллярном компоненте, в то время как в муцинозном и ацинарном окрашивались 40% и 50% клеток соответственно.

Сходные выводы были сделаны и в работе Elza C. de Bruin, Charles Swanton и соавторов, в рамках которой было произведено полноэкзомное (WES) и полногеномное (WGS) секвенирование 25 регионов в 7 резецированных опухолях, а также окружающих нормальных тканей. В этой работе показана выраженная вариабельность мутационного профиля – до 30% (от 4% до 63%) мутаций не были одинаковыми для различных участков каждого из семи случаев [5]. При этом, у одного из пациентов (L003), единственной одинаковой мутацией, выявленной в двух отдельных очагах, была L858R, из чего авторы делают вывод о раннем сходном происхождении этих очагов и значительном «fitness» преимуществе, приобретаемом клетками с «драйверными» мутациями EGFR [12, 13].

Тем не менее, применительно к немелкоклеточному раку легкого (НМРЛ) однозначно трактовать представленные данные в пользу присутствия в опухоли, ассоциированной с «драйверными» мута-

циями, клеток без этих нарушений не представляется возможным. Теоретически невозможно исключить погрешность современных методов детекции, когда пропорция опухолевых клеток в исследованном регионе опухоли недостаточна для достоверного определения соответствующего молекулярного нарушения. Так, в исследовании Govindan и соавторов тщательному исследованию методом NGS (381 depth) были подвергнуты 16 опухолей легкого. В результате было установлено, что во всех случаях мутации EGFR и KRAS являлись ранними событиями канцерогенеза, были «стволовым» (truncal) и имели крайне высокую частоту измененного аллеля (VAF).

Любопытно, что генетическая гетерогенность присутствует и в нормальных тканях. Если взять две любые нормальные клетки одной ткани от здорового человека, то они будут нести сотни и тысячи молекулярных нарушений, которые будут отличать их друг от друга [14] [15]. Говоря об этом, нельзя не обратить внимание на известный для биологов, но малообсуждаемый в онкологии факт о том, что опухолевые клетки имеют значительно меньше генетических различий, чем нормальные клетки, что подтверждает роль сменяемости клонов в эволюции опухолей [16]. Для описания этих различий и взаимоотношения клеток в плане эволюции используется, например, индекс Симпсона, Шэннона или коэффициент сходства Джаккарда [17] [18, 19].

При применении этих метрик к опухолевым и нормальным клеткам неожиданно оказывается, что опухолевые клетки значительно больше похожи друг на друга, чем нормальные. Например, фракция различных генетических нарушений между двумя любыми опухолевыми клетками у одного пациента значительно ниже, чем между двумя нормальными клетками. Меньшая гетерогенность опухолевых клеток объясняется их клональным происхождением и клональной «чисткой», то есть разрастанием «потомков» в первую очередь тех клонов, которые на фоне генетической нестабильности приобрели дающие значимые преимущества свойства, например, драйверные активирующие мутации EGFR и ALK [20].

Любопытно, что неоспоримое преимущество в «fitness», приобретаемое опухолевыми клетками вместе с активирующими мутациями, может не распространяться на другие, например, доброкачественные опухоли. Так, в литературе описана довольно высокая частота гетерогенности мутаций «драйверных» активирующих генов среди доброкачественных опухолей, что позволяет предположить связь этих свойств с комплексом генетических нарушений [16]. Эта гетерогенность стирается в первичной злокачественной опухоли, где одна из следующих мутаций определяет сильное эволюционное преимущество – например, появление мутаций, определяющих приобретение инвазивности или других свойств злокачественных опухолей [21].

Так или иначе, промежуточной точкой в дискуссии о существовании гетерогенности можно считать работу Bert Vogelstein, одного из основных идеологов современной онкогенетики [16]. По его мнению, следует трактовать имеющиеся данные о гетерогенности драйверной мутации в опухоли с позиции недостатков генетических методов анализа: «шума секвенирования», невысокой доли опухолевых клеток и недостаточной глубины секвенирования. Так, в качестве подтверждения критического взгляда на результаты современных методов исследования генетических нарушений можно привести работу Shi и соавторов, которые провели исследование способности WES выявлять мутации, характеризующие минорные субпопуляции в опухоли [22]. Для этой цели была сформирована база, которая включала технические и биологические повторы секвенсов до глубины, обычно применяемой в транскрипционных исследованиях, где каждый из возможных соматических вариантов проверялся «high-depth» методом секвенирования. В итоге было сформировано 6 пар технических повторов, каждый из которых включал независимую подготовку библиотек и секвенирование аликуот одной и той же ДНК в различные дни. Секвенирование выявило неожиданно высокую частоту дискордантности в результатах секвенирования и выявленных генетических аномалиях, что авторы исследования объясняют 1) однократным выявлением субклональной мутации, 2) герминальным характером изменений или 3) тем, что они относились к «low mappability regions».

Таким образом, на настоящий момент принято считать, что чаще всего опухоли абсолютно гомогенны с точки зрения конкретного драйверного нарушения. Следствием этого в клинической практике можно считать обоснованность однократной биопсии одного из регионов опухоли или одного из метастазов для определения тактики лечения.

### Эволюционные принципы, как факторы формирования фенотипа опухоли

Говоря о мутационной картине, наблюдаемой в клинически определяемых опухолях, заметим, что она является следствием одного из двух описываемых видов эволюции – «линейной» и «разветвленной». Линейная парадигма эволюции предполагает последовательное приобретение мутаций, которые приводят к появлению клонов с более выгодными фенотипическими свойствами клонов, которые перерастают и вытесняют клетки, не несущие этих «драйверных» нарушений. Примерами такой эволюции являются множественная миелома и АМЛ. Эволюцию солидных опухолей, включая и опухоли, ассоциированные с драйверными мутациями, принято относить к «разветвленным» [23]. Драйверные, в клиническом понимании, мутации происходят на ранних этапах канцерогенеза. Традиционная модель

предполагает последовательность экспансий отдельных клонов, которые доминируют в конкретном очаге ('selective sweeps') [24–26]. «Чистка» происходит за счет предсуществовавших клонов, когда при селекции из всего спектра пассажирских мутаций появляется одна, дающая неоспоримое конкурентное фенотипическое преимущество в конкретных условиях (called 'clonal interference') [27]. К настоящему моменту немного исследований было направлено на то, чтобы количественно охарактеризовать влияние драйверной мутации на клональную эволюцию опухоли. В одной из работ было проведено моделирование клональной эволюции с помощью non-spatial population genetics метода для пропорции ожидаемых клеток с нейтральными пассажирскими мутациями против драйверных нарушений [25]. Разработанная модель была применена к глиобластоме и раку поджелудочной железы. Ожидаемо было выявлено, что для этих опухолей преимущество при приобретении «драйверной» мутации не столь высоко – 0,4%, что отражает их крайне высокую гетерогенность. В то же время, преимущество клеток, которые приобрели активирующие «драйверные» мутации EGFR, по-видимому, настолько велико, что они вытесняют прочие клоны. Подтверждения этой гипотезы можно найти в работе Charles Swanton и соавторов, которая уже цитировалась выше. У одного из пациентов были выявлены два образования в легком. При сравнении профиля молекулярных нарушений единственной общей мутацией была L858R, что предполагает различный эволюционный путь этих опухолей, каждый из которых, тем не менее, привел к доминированию клона с мутацией EGFR.

Надо сказать, что ни на ранних, ни на последующих этапах опухолевые клетки с клинически блокируемыми «драйверными» мутациями не теряют нестабильности генома, который определяет появление других, чаще всего субклональных нарушений. Несмотря на меньшую, относительно опухолей без «драйверных» мутаций, мутационную нагрузку, в каждой опухоли все равно присутствует большое число других нарушений.

Так, спектр ранних нарушений является сочетанием и «драйверных», в клиническом понимании, нарушений и других ранних нарушений, в том числе, тех, которые определили инициацию опухоли или носили пассажирский характер, но присутствовали в клетках, давших начало доминирующему клону на момент «clonal swift». Таким образом, с эволюционной точки зрения, на момент приобретения опухолью клинического значения и начала противоопухолевого лечения, опухоли с «драйверными» активирующими мутациями представляют собой доминирующий клон с активирующей и пассажирскими мутациями, присутствовавшими на момент его экспансии. Кроме того, в связи с сохраняющейся хромосомной нестабильностью, в опухоли появляются и исчезают

и другие пассажирские нарушения, которые носят субклональный характер и являются источником для селекции в будущей эволюции опухоли.

### Конкурентные генетические нарушения в опухолях с «драйверными» мутациями, как источник резистентности

Актуальная на настоящий момент в клинической практике парадигма таргетной терапии опухолей с активирующими «драйверными» мутациями, в целом, и НМРЛ, в частности, предполагает определение одной активирующей мутации, характер которой определяет тактику лекарственной терапии и, при этом, практически всегда исключается наличие других «драйверных» активирующих нарушений, а также не учитываются прочие генетические нарушения, присутствующие в опухолевых клетках. Известные на настоящий момент драйверные мутации (EGFR, ALK, ROS, RET, MET, BRAF и пр.) классифицированы в соответствии с сигнальным каскадом, к активации которого приводит отдельное нарушение. Функциональные следствия появления молекулярных нарушений в драйверных генах соответствуют (compliment) друг другу, что реализуется в определенных паттернах ко-мутаций и практически полном исключении возможности нескольких «драйверных» нарушений одновременно.

Тем не менее, опухоли, клинически трактуемые как ассоциированные с драйверными активирующими мутациями, несут, кроме непосредственных драйверных нарушений, также и другие молекулярные изменения. По разным данным более 90% всех EGFR-ассоциированных опухолей имеют ко-существующие нарушения [28, 29]. Среднее число значимых для патогенеза нарушений колеблется от 2,58+/-1,7 до 5 [29–34]. В одной из когорт больных, получавших терапию эрлотинибом, конкурирующие мутации выявлялись у 71% пациентов. При этом, в 67% из исследованных случаев выявлялась мутация TP-53, 60% – имели одно из нарушений MET, KRAS, NRAS, SMAD4, PIK3CA, CTNNB1, DDR2, ERBB4, FGFR1 или FGFR3. Есть веские основания предполагать, что именно характер «ко-мутационного» профиля может определять длительность клинического эффекта терапии и глубину первичного ответа, а кроме того, за счет «селективного» направления процессов формирования резистентности (профиль опухоли при формировании приобретенной резистентности) [30, 31, 35, 36]. Подобные закономерности прослежены для амплификации EGFR, MET, и мутаций TP53 [29–34].

Мутации TP53 выявляются в половине всех случаев аденокарциномы легкого, независимо от статуса «драйверных» молекулярных нарушений [37]. В то время, как активирующие «драйверные» мутации появляются на ранних этапах канцерогенеза, мутации TP53 чаще всего возникают на более поздних этапах развития опухоли, что предполагает их большую роль в прогрессии опухоли, а не в ее инициации [38] [23]

[28] [39]. По данным относительно некрупных исследований было предположено, что мутации TP53, являясь самыми частыми конкурирующими мутациями при EGFR+ НМРЛ, также опосредуют эффект ИТК по остановке клеточного цикла и активации апоптоза, что может определять меньшее время до прогрессирования на фоне всех трех поколений препаратов [28, 29, 40]. Тем не менее, на настоящий момент данные о связи между конкретными мутациями TP53 у больных EGFR-ассоциированным НМРЛ можно описать как стохастические. Объяснение тому сводится к небольшому числу наблюдений синхронных мутаций TP53 и EGFR, а также большому числу вариантов мутаций TP53, выявляемых при НМРЛ. Поэтому скорее всего «ко-мутации» TP53 могут являться одним из механизмов первичной резистентности и, таким образом, определять более плохой прогноз. Тем не менее, окончательный механизм взаимодействия с сигнальным каскадом EGFR и активностью ИТК остается неизученным.

Инактивация протеина ретинобластомы 1 (RB1) – другого важнейшего опухолевого супрессора и регулятора клеточного цикла – также довольно часто встречается при аденокарциномах легкого. Инактивация сигнального каскада RB1 может происходить непосредственно за счет мутационных изменений в кодирующем его гене или за счет генетических/эпигенетических изменений других молекул, участвующих в регуляции клеточного цикла, например CDKN2A, мутациях или амплификациях протоонкогенов, инициирующих активацию клеточного цикла (CCND1/2, CCNE1, CDK4/6) [28, 41]. Таким образом, можно предположить, что недостаток контроля клеточного цикла, наблюдаемый при подобных изменениях, может компрометировать эффективность ИТК, что продемонстрировано в небольших работах, где нарушения RB1 определяли группу со значительно меньшим временем до прогрессирования 1,9 против 11,7 мес.,  $p < 0,001$ ) [40]. Любопытно, что нарушения RB1 при опухолях с мутациями EGFR практически всегда происходят вместе с мутациями TP53, что в свою очередь приводит к мимикрии EGFR мутированным НМРЛ мелкоклеточного рака легкого с биаллельной потерей RB1 и TP53. Данные наблюдения представляются крайне важными в свете гетерогенности опухолей с мутациями EGFR до начала терапии ИТК. Так, в работе Helena Yu из 863 случаев EGFR мутированного рака легкого 43 (5%) имели одновременно нарушения EGFR, TP53 и RB1 [42]. Наблюдение за пациентами показало, что для них характерна крайне высокая частота трансформации в мелкоклеточный рак легкого, как механизм приобретенной резистентности (7/39 – 18%).

В предклинических работах показана роль активации рецептора гепатоцеллюлярного фактора роста – MET – в злокачественной трансформации клеток. При этом на круг для всех больных НМРЛ различные изме-

нения активности (чаще всего это амплификация гена или различная степень повышенной экспрессии) выявляются в 50% случаев. Основная проблема для более активного использования этого маркера заключается в отсутствии четкого понимания, в каких ситуациях данный маркер имеет «драйверную» роль, а в каких – нет. Так, показано, что оценка экспрессии по данным ИГХ не позволяет выделить группу с активацией этого сигнального каскада или оценить зависимость опухоли от этого сигнального пути, что вызвано в первую очередь различной чувствительностью коммерчески доступных антител, отсутствием стандартизированной методики подсчета уровня экспрессии MET [43]. Так или иначе, но в ранних исследованиях EGFR мутированного НМРЛ, амплификация MET выявлялась в 3–22% случаев и практически всегда сочеталась с гиперэкспрессией, в то время, как не во всех случаях определение гиперэкспрессии позволяло выделить больных с амплификацией [28, 30, 44] [45]. Косвенным свидетельством большей роли амплификации как маркера активации сигнального каскада MET может служить более высокая эффективность ингибиторов MET для больных с высоким уровнем амплификации, а не низкой амплификацией или гиперэкспрессией по данным ИГХ [29, 46]. Кроме того, около 60% больных с амплификацией или гиперэкспрессией MET несут мутации TP53, что может предполагать преимущество на фоне терапии ИТК для клонов с нарушениями в EGFR, MET и TP53 зависимых сигнальных каскадах.

С учетом сказанного выше, на примере MET, можно предположить, что в этих случаях приобретенная резистентность связана с селекцией клонов, существовавших в опухоли до начала терапии ИТК.

Клиническое значение активации MET связано с тем, что этот вид нарушений определяет 3% случаев приобретенной резистентности для ИТК 1-го и 2-го поколений, а также до 20% для осимертиниба [47] [48–53]. Подтверждения для этой гипотезы были получены в исследованиях образцов, собранных до лечения у пациентов с активацией MET в качестве основного механизма приобретенной резистентности, в которых были выявлены миноритарные (<1%) субпопуляции опухолевых клеток с амплификацией MET [53, 54]. Кроме того, довольно много данных свидетельствует о том, что наличие того или иного варианта активации MET до начала терапии определяет группу с более плохим прогнозом [29, 46]. Равно как и с оценкой активации MET, с ролью этого фактора в развитии резистентности также все не настолько однозначно. Так, в нескольких работах было показано отсутствие связи между амплификацией/гиперэкспрессией MET и эффектом от ИТК 1-го поколения [54].

Кроме описанных выше ко-мутаций, сходные по доказательному уровню данные есть и для других нарушений. Например, для мутаций RAS, BRAF, ERBB, DDR2, PIK3CA, PTEN, CTNNB1, SMAD4, активации FGFR и некоторых других. Эпидемиология и патогенетиче-

ская роль этих ко-нарушений в формировании приобретенной и первичной резистентности описана довольно тщательно и суммирована в нескольких блестящих обзорах, опубликованных в 2019 году [55].

Важно оговориться, что в силу незначительности эволюционного преимущества или невысокой доли этих ко-мутаций в пределах одной опухоли, их наличие чаще всего не приводит к первичной резистентности. Большинство из выявленных закономерностей носит вероятностный характер, что не позволяет делать практические выводы. Так, например, в некоторых случаях опухоли с конкурентными нарушениями EGFR и KRAS прогрессировали на фоне терапии, в то время как другие, даже имеющие мутацию TP53, имели длительный и выраженный регресс на фоне той же терапии [30, 35].

Опухоли легкого с активирующими мутациями обладают обычными характеристиками опухолевого процесса, в первую очередь, нестабильностью генома, которая определяет на протяжении всего периода развития опухолевого процесса достаточный для селекции объем генетической и фенотипической изменчивости. Резкая экспансия клона с появившейся «активирующей» мутацией приводит к практически полному его доминированию до начала таргетной терапии.

### Мутация T790M и представление о резистентности опухолей к ИТК

Несколько в стороне от прочих ко-мутационных изменений находится вторичная мутация T790M. В связи с высокой частотой ее появления на фоне терапии ИТК 1–2 поколений, а также точечным характером патогенетическая роль присутствия или появления T790M на различных этапах применения ИТК изучена более детально, чем роль других механизмов.

T790M стала первым из механизмов приобретенной резистентности, выявленных вскоре после обнаружения самих активирующих мутаций EGFR [56, 57] [58] [59]. Изначально это молекулярное нарушение было идентифицировано как механизм приобретенной резистентности к ИТК первого и второго поколений. Треонин в 790 позиции является основанием «gatekeeper», называемым так из-за локализации у входа в гидрофобный карман задней части АТФ-связывающего кармана, что является определяющим для селективности ингибитора. Расположение в *cis*- позиции по отношению к первичной активирующей мутации приводит к существенным конформационным изменениям АТФ-связывающего кармана рецептора [60]. Замена треонина на метионин с более массивной боковой цепью нарушает связывание с препаратами первого поколения (гефитинибом и эрлотинибом) [56, 57, 61]. В противоположность им препараты второго поколения (афатиниб и дакомитиниб) имеют другую точку связывания – серин в 797 позиции, с которым эти препараты связываются кова-

лентно. Именно это отличие определяет эффективное блокирование первичных «активирующих» мутаций, а также предполагает блокирование рецептора с первичной мутацией и T790M [62, 63]. Тем не менее, их эффективность в отношении T790M позитивного прогрессирования оказалась минимальна [64, 65]. Подобные различия пред- и клинической эффективности принято объяснять небольшим терапевтическим окном в отношении T790M – препарат активен против EGFRwt и T790M в одинаковой концентрации, что приводит к крайне выраженной его токсичности [66].

Любопытно, что ранние исследования показали, что с функциональной точки зрения, активирующие мутации EGFR снижают аффинность рецептора к его естественному лиганду АТФ, при этом, появление второй мутации T790M восстанавливает чувствительность до уровня рецептора дикого типа [67]. Клетки с двумя мутациями менее активно пролиферируют, чем клетки только с первичной активирующей мутацией, что находит отражение в клиническом феномене «вспышки», возникающем при отмене активного ранее препарата на фоне прогрессирования заболевания [68]. В условиях отмены ИТК, эта популяция быстро восстанавливает рост и вытесняет менее активные, но резистентные клетки. Авторам представляется, что эта парадигма сходна по своей сути с «clonal sweep», произошедшим при приобретении опухолевыми клетками активирующих мутаций впервые t [60]. Кроме того, показано, что возникающая на фоне резистентности опухоль, несущая T790M, принципиально отличается от первичной. Так, например, число нарушений, определяемых в T790M-позитивных опухолях, достоверно выше наблюдавшегося в первичной ( $2,41 \pm 1,89$  S.E.M. против  $2,01 \pm 1,77$  S.E.M  $P=4,5E^{-04}$ ) [29]. Другой важной особенностью T790M-ассоциированной резистентности является то, что T790M-позитивность является не качественной, а количественной характеристикой резистентной опухоли, а глубина регресса опухоли на фоне ингибитора третьего поколения – роцилентиниба – зависит от доли клеток, имевших при начале лечения эту мутацию: чем больше T790M-позитивных клеток, тем больше степень уменьшения опухоли [69].

Таковы основные особенности опухоли с наличием двух драйверных мутаций, одна из которых T790M. Возвращаясь к вопросу о динамике ключевых для возникновения резистентности генетических и фенотипических особенностей опухоли на фоне терапии таргетными препаратами, обсужденный ранее вопрос о появлении *de novo* или предсуществовании в виде минимальных популяций, в равной степени относится и к T790M.

Долгое время считалось, что T790M появляется на фоне успешного и длительного применения ИТК 1–2 поколений в остаточных клетках, а отдельные случаи выявления T790M до начала терапии определяют резистентность к более старым поколениям

препаратов [37]. Далее во многих работах методами на основе ПЦР было показано, что частота *de novo* T790M в образцах, полученных до начала терапии ИТК 1–2 поколений, не превышает 2–4,2% [31, 32] [70]. При использовании более чувствительных методов, например dd-PCR – 0,01%, частота детекции T790M возрастает до 17–79% [71] [72]. Интересно, что в двух приведенных выше работах присутствие низкочастотных аллелей с T790M (<5%) являлось позитивным прогностическим фактором, в то время как более высокая частота аллеля T790M в опухоли (29–40%) определяла группу с крайне негативным прогнозом (ВДП 3,3 мес. против 20 мес.) [73]. Значимые различия в выживаемости, теоретически, могут отражать клональную динамику опухолей на фоне терапии ИТК 1–3 поколений, а также предопределять доминирующий механизм приобретенной резистентности. В работе G. Oxnard на примере осимертиниба показано, что среди больных, которые сохраняли T90M (32%) на момент прогрессирования на осимертинибе, вероятность более длительной выживаемости без прогрессирования и прогрессирования через C797S, была выше, чем для пациентов, у которых при прогрессировании T790M выявлена не была (68%) [36]. На основании этого авторы делают предположение, что на фоне терапии тем или иным ИТК происходит селекция предсуществующих клонов, часть из которых может продолжить развитие и определить характер приобретенной резистентности [30, 35, 36].

В этой связи представляется интересным, что воздействие на опухоль, резистентную к монотерапии гефитинибом, с помощью комбинации ИТК 2 поколения афатиниба и антиангиогенного препарата бевацизумаба изменяет направление селекции и приводит к большей частоте резистентности через T790M, что проявляется клинически в конверсии части T790M-случаев прогрессирования в T790M+. Авторы предполагают, что антиангиогенная терапия и блокирование HER2 изменяют селективное давление на резистентную опухоль в сторону усиления преимущества T790M+ клона [74].

Все сказанное выше позволяет предполагать, что часть клеток в первичной опухоли может иметь отдельные аллели с T790M еще до начала терапии ИТК 1–2 поколения [71] [75] [23]. Возможность предсуществования T790M даже не в виде отдельных клеток, а в виде аллелей в отдельных опухолевых клетках может объяснять совершенно различные, порой противоречащие друг другу, результаты тестирования T790M. Кроме того, подтверждает присутствие и, что важнее, клиническую значимость гетерогенности ко-мутационного профиля в популяции опухолевых клеток с мутацией EGFR до начала терапии [71, 73].

Таким образом, если относительная частота аллеля, а, говоря другими словами, доля клона в общей массе опухоли достаточна для быстрого возобновления роста опухоли, то это приводит к недостатку

эффекта. Параллельно при небольшой относительной частоте аллеля его доля постепенно увеличивается, что требует времени и определяет уже вторичную резистентность [75].

### Роль ранних этапов взаимодействия ИТК и опухолевых клеток с «драйверными» мутациями

Принципиально, на примере T790M позитивного прогрессирования, можно сделать, как минимум, несколько интересных выводов о принципах формирования резистентности. На фоне терапии ингибиторами третьего поколения происходит исчезновение клона с T790M, но, при этом, сохраняется первичная мутация, что предполагает более позднее появление T790M в ходе канцерогенеза, о чем уже говорилось ранее [76]. На фоне терапии ингибиторами третьего поколения и осимертинибом, в частности, появляются другие мутации, например, C797S, C797G, G796, L792, L718, G719, S768I, о предсуществовании которых до начала терапии на настоящий момент данных нет [77].

Разумно предположить, что резервуаром для формирования приобретенной резистентности являются сохранившиеся на фоне начала лечения опухолевые клетки, которые либо быстро потеряли чувствительность к ИТК, что позволило им не погибнуть в первые часы/дни лечения, либо часть опухолевых клеток первичной опухоли не имела чувствительности с самого начала.

Нам представляется интересным описать имеющиеся представления о времени начала ответа на терапию. Так, показано, что активная форма рецептора EGFR приводит к передаче сигнала по нескольким сигнальным каскадам Raf-MEK-ERK (MAPK) и PI3K-AKT к ядру клетки. Совокупным результатом их активации является усиление пролиферативных и антиапоптотических сигналов [78; 79].

Связывание ИТК с АТФ-связывающим карманом приводит к быстрой деактивации сигнального каскада. По данным биохимических исследований, первые признаки апоптоза – конденсация хроматина в ядре, формирование апоптотических телец – начинается уже через 20–60 минут после начала экспозиции и продолжается до 3–4 часов, а по некоторым данным – до 24–48 часов. При этом, другие эффекты на биологию опухолевых клеток, которые определяют противоопухолевый эффект препарата, развиваются несколько медленнее – 6 и более часов [80, 81]. На модели опухоли с мутацией L858R методом Western immunoblot показано значимое снижение экспрессии EGFR, pEGFR, pAKT, pERK и pSTAT3 через 24 часа после начала экспозиции к таргетному препарату [82]. В исследованиях *in vitro* показано, что в ответ на терапию ИТК EGFR происходит быстрое дефосфорилирование и мутированного и дикого типа рецептора EGFR, что приводит к гибели опухолевых клеток через апоптоз, подтвержденный данными гистопатологического ис-



следования тканей уже через 24 часа [82–84]. В одной из работ показано, что через 24 часа после начала инкубации окраска гематоксилином-эозином и TTF-1 позволяет выявить существенное уменьшение числа опухолевых клеток относительно контроля. Отдельную роль, значение которой до настоящего момента окончательно не изучено, по-видимому, играют иммунологические механизмы. На фоне ранних этапов взаимодействия опухолевых клеток и таргетного препарата, на фоне резкого снижения клеточности опухолевой ткани также наблюдается выраженное усиление лейкоцитарной инфильтрации [82].

Тем не менее, механизмы непосредственной деактивации сигнальных каскадов и ранние процессы, происходящие в клетках после этого, не были изучены досконально ни в клинике, ни на моделях лабораторных животных [82]. Представляется, что суть проблемы исследования этих ранних механизмов заключается в необходимости задержки между началом терапии и обследованием с целью визуализации ее эффекта. В имеющихся работах на предклинических моделях животных визуализация очагов производилась с помощью МРТ через 1–7 дней после начала терапии [62, 85, 86]. Так, в одном из исследований МРТ, выполненном через 1 день после приема первой дозы эрлотиниба, установлено уменьшение размеров опухоли на 65%, и высокая скорость регресса опухоли. Другим возможным направлением для оценки противоопухолевого эффекта ИТК является исследование метаболизма опухолевых клеток. Метод ПЭТ-КТ позволяет на довольно чувствительном уровне визуализировать изменения метаболизма опухолевых клеток уже на ранних этапах развития противоопухолевого эффекта [87, 88]. В одном из немногих экспериментов, проведенных с использованием ПЭТ, было показано, что у всех животных (4/4) после приема эрлотиниба наблюдалось снижение захвата изотопа на 32–54% относительно результатов исследования до лечения.

Несмотря на то, что в клинических работах оценка эффекта терапии обычно производится через 4–6 недель, есть данные, подтверждающие выраженные клинические проявления и уменьшения объема опухолевой массы в течение недели приема ИТК [65, 89] [90] [91]. В одном из исследований ранний эффект, оцененный на 14 день терапии эрлотинибом, наблюдался у 21/29 больных (53,8%) и во всех случаях соответствовал частичному регрессу заболевания по критериям RECIST. При этом, только у 4/29 больных частичный регресс не был выявлен на 14 день, но затем установлен при плановом обследовании на 8-й неделе лечения. Крайне любопытно, что время до прогрессирования опухоли в числовом значении различалось с 8.1 месяца для больных с ранним ответом на терапию до 11,9 месяцев для больных без раннего ответа. Несмотря на отсутствие статистической достоверности ( $p=0,4059$ ), данная тенденция представляется несколько контринтуитивной. Подобная же

закономерность была выявлена и для показателя продолжительности жизни, который для группы раннего ответа составил 18,3 месяца, а для группы позднего – 24 месяца ( $p=0,3999$ ) [92]. Но похожая работа, подразумевавшая первую оценку раннего ответа через 6–8 недель, продемонстрировала противоположную закономерность. Было установлено достоверно большее время до прогрессирования и общая выживаемость для больных с ранним эффектом: ВДП 10,9 vs. 2,4 месяцев (HR: 0,42; 95% CI: 0,19–0,93;  $P=0,033$ ) и ОВ 23,2 vs. 11,9 месяцев (HR: 0,3; 95% CI: 0,15–0,85;  $P=0,021$ ) [93]. Важно сказать, что ранний ответ был выявлен у 75% (26/30 – частичный регресс, 4/30 – полный регресс).

Подведем промежуточные итоги: несмотря на общее понимание механизмов, лежащих в основе противоопухолевого действия таргетных препаратов на опухолевые клетки с «драйверными» нарушениями, ни время достижения максимального эффекта, ни спектр изменений, происходящих в опухоли на фоне начала таргетной терапии и определяющий «пул» оставшихся и непогибших клеток, на настоящий момент в достаточной степени не изучены.

### «Резидуальная» болезнь как источник резистентности

Несмотря на длительную историю исследования взаимодействия таргетных препаратов и опухолевых клеток с различными активирующими молекулярными нарушениями, вопрос происхождения резистентности остается предметом исследования на клеточных линиях, а чувствительная и резистентная к терапии опухоль являются двумя дискретными и изучаемыми отдельно ситуациями. Авторам же представляется очевидным, что первым шагом к изучению этого состояния могло бы стать описание морфологического субстрата для последующего формирования резистентных клеток, коим является остаточная ткань опухоли. Естественной моделью для получения и последующего изучения подобного материала в случае опухолей легкого являются клинические ситуации, характеризующиеся местным или олигометастатическим распространением. К сожалению, подобных работ до настоящего момента в литературе представлено крайне мало.

Имеющаяся на настоящий момент информация по описанным случаям хирургического удаления опухолей на фоне эффекта ИТК EGFR представлена в таблице 1. Суммируя представленный в виде отдельных наблюдений опыт, можно сказать, что с высокой вероятностью при местно распространенном процессе применение различных ИТК у больных с документированной драйверной мутацией EGFR позволяло существенно уменьшить размеры опухоли, а также лимфатических узлов и зачастую выполнить полную циторедуктивную операцию [94–96]. К сожалению, практически во всех описанных случаях в удаленных образцах выявлялись опухолевые клетки

Таблица 1

## Характеристика представленных в литературе случаев предоперационного использования ИТК EGFR

Исследование (год, ссылка)	N	Вариант терапии и длительность	Клинический ответ	Морфологический ответ	ИГХ/дополнительные исследования	П/о лечение и отдаленные показатели выживаемости
Takamochi и соавт. (2007, {Takamochi et al., 2007, #49662})	Муж 73 года, cT2N2M1 – IV, EGFRmut	Гефитиниб, 3 недели	Частичный регресс	Небольшие количества опухолевых клеток, образующих желёзы, окруженные лимфоцитами и гистиоцитами. Опухолевые клетки имели пикнотические ядра и эозинофильную цитоплазму. Массивные зоны некроза с гнездами гистиоцитов, замещающих опухолевую ткань.	Молекулярно-генетический анализ – делеция в экзоне 19	Не представлены
	Жен, 57 лет, cT1N2M0 – IIIA, EGFRmut	Гефитиниб, 4 месяцев	Частичный регресс	pCR. Жизнеспособных опухолевых клеток не выявлено. В зоне опухолевого очага аморфная, бледная и бедная клетками картина	Не проводился	Не представлены
Karpets и соавт. (2008, {Karpets et al., 2008, #52843})	Жен 67 лет, IIIA, EGFRmut	Эрлотиниб, 3 недели	Частичный регресс	Нет жизнеспособной ткани, остаточная зона фиброзной ткани (1,2 см)	1,5 мм на фоне полей фиброзного замещения, лимфоцитарной инфильтрации, пролиферации фибробластов, депозитов коллагена, гигантских клеток и многочисленных «пенистых» макрофагов	Не представлены
Levchenko E. и соавт. (2009, {Levchenko et al., 2009, #60132})	Мужчина, 67 лет, cT3N2M1 – IV, Ex19del	Гефитиниб, 2 месяца	Частичный регресс	Воспалительная лимфоцитарная инфильтрация и дистрофические изменения в опухолевой	Уменьшение Ki-67 с 7% в биопсийном материале до 3% в операционном	Продолжение терапии гефитиниб -> ОВ
	Мужчина, 48 лет, cT2N2M1 – IV, Ex19del	Гефитиниб, 3 месяца	Частичный регресс	Отдельные опухолевые клетки на фоне фиброзной ткани	Не проводился	Прогрессирование через 3 месяца -> ХТ -> смерть
Liu и соавт (2011, {Liu et al., 2011, #16400})	Мужчина, 64 лет, IV, Ex 21	Гефитиниб, 30 дней	Частичный регресс	pCR. Минимальное число опухолевых желёз и несколько некротизированные зоны выявлены в первичном очаге, большая часть из которого были представлены соединительной рубцовой тканью. Похожая картина наблюдалась и в л/у.	Не проводился	Продолжение гефитиниба

Исследование (год, ссылка)	N	Вариант терапии и длительность	Клинический ответ	Морфологический ответ	ИГХ/дополнительные исследования	П/о лечение и отдаленные показатели выживаемости
Hashimoto и соавт. (2012, {Hashimoto et al., 2012, #21131})	Муж, 66 лет, cT4N1M1a – IV. Ex19del	Гефитиниб, 6 месяцев	Частичный регресс	Нижняя доля справа: очаг < 1 см до начала лечения: без признаков опухоли, клетки с признаками атипии Средняя доля справа: клетки аденокарциномы	ус-T2a	без адьювантной терапии БРВ – 12+ месяц
Ong M и соавт. (2012, {Ong et al., 2012, #96840})	Жен, 78 лет, cT4N1M1a – IV. Д8	Эрлотиниб, 3 месяца	Частичный регресс	Фиброз 30%, аденокарцинома смешанного типа с преобладанием папиллярной и бронхоалоальвеолярного подтипа без лимфоваскулярной инвазии; л/у группы 4R и 11 без метастазов.	Молекулярно-генетический анализ: L861Q в материале	Эрлотиниб адьювантно БРВ – 12 месяцев ОВ (12 мес афтиниб 3-ья линия – 24+ месяц)
Yasunobu Funakoshi и соавт. (2013, {Funakoshi et al., 2013, #45874})	Жен, 69 лет, cT2aN0M0 – IV. EGFRmut	Гефитиниб, 8 месяцев	Частичный регресс (-40%)	Массивный некроз с преобладанием фибробластов и поля неизмененной аденокарциномы	Не проводились	Без адьювантной терапии. БРВ – 26 месяцев
Marech I и соавт. (2013, {Marech et al., 2013, #36963})	Жен, 67 лет, cT4N2M0 – IIIB. EGFRmut	Гефитиниб,			Не проводился	БРВ – 26 месяцев
López-González, A. и соавт. (2013, {López-González et al., 2013, #12519})	Жен, 66 лет, cT4N2M0 – IIIB. EGFRmut	Гефитиниб, 1 месяц	Частичный регресс (КТ -50%; ПЭТ-КТ -80%)	Доля жизнеспособной опухолевой ткани <10%	Не проводились	БРВ – 17 месяцев (МГС в головном мозге) ОВ 22 месяца
Qiming Wang и соавт. (2010, {Wang et al., 2010, #23533})	Жен, 78 лет, cT4N1M1a – IV. Д8	Эрлотиниб, 4 недели	Частичный регресс	в первичном очаге выявлены анапластические клетки, кроме того подобные клетки выявлены также и в зоне инфильтрации лимфатических узлов.	Молекулярно-генетический анализ не выявил в этих зонах мутаций ни в 18, ни в 21 экзонах.	Со дня 14 после операции продолжена терапия эрлотинибом 150 мг/сут – без прогрессирования 11 месяцев
H. Lara-Guerra и соавт. (2012, {Lara-Guerra et al., 2012, #38039})	27 (6 с мутацией EGFR)	Гефитиниб, 1 месяц		Остаточная опухолевая ткань присутствовала в зонах массивного фиброза и в частности зоне массивных лимфоцитарных инфильтратов	Крайне любопытным представляется наблюдение авторов о низкой пролиферативной активности опухолевых клеток, при окраске на Кi67, в зоне фиброза и высокая активность в зонах богатых лимфоцитами.	

Исследование (год, ссылка)	N	Вариант терапии и длительность	Клинический ответ	Морфологический ответ	ИГХ/дополнительные исследования	П/о лечение и отдаленные показатели выживаемости
Yamamoto и соавт. (2017, {Yamamoto et al., 2017, # 14972})	Жен, 72 г., cT2N2M0 – IIIA, L858R	Гефитиниб, 8 месяцев	Частичный регресс	Резидуальные живые опухолевые клетки, формирующие различные железистые структуры и небольшие солидные гнезда в первичной опухоли, но не в метастатических л/у. Остаточная опухоль сформирована умеренно дифференцированной инвазивными ацинарными структурами с лепидическим характером роста.	T790M –	Адьювантный гефитиниб БРВ – 8 месяцев (МТС в Г/М)
	Жен, 68 г., cT3N2M0 – IIIA, Ex19del	Афатиниб, 2 месяца	Частичный регресс	Пролиферация фибробластов, лимфоцитов и гистиоцитов	T790M – ИГХ к TTF1 и панцито- кератину позволило выявить резидуальные опухолевые клетки на не- большой площади в пер- вичном очаге.	Адьювантный гефитиниб БРВ – 8 месяцев (МТС в Г/М)
Sakanoue и соавт. (2018, {Sakanoue et al., 2018, # 33565})	Жен 70 г., cT3N0M0 – IIIA, Ex19del	Гефитиниб, 3 недели	Частичный регресс	Остаточные опухолевые клетки в центре опухолевой массы.	Не проводился	БРВ – 26 месяцев
	Жен 44 г., cT2aN2M0 – IIIA, ex19del	Афатиниб, 3 месяцев	Частичный регресс	Остаточные микроскопические локусы аденокарциномы с полями геморрагий и склеротических изменений	EGFR ex19del	Адьювантная ХТ БРВ – 9 месяцев
Mazzoni и соавт. (2018, {Mazzoni et al., 2018, # 54684})	Муж 74 г., cT2aN3M0 – IIIB, L858R	Афатиниб, 3 месяца	Частичный регресс – КТ, полный метаболический регресс – ПЭТ-КТ	Инвазивная аденокарцинома с аци- нарной архитектоникой на фоне рас- пространенного фиброза легочной паренхимы без неопластической ин- фильтрации л/у	EGFR L858R	Адьювантно афатиниб 30 мг БРВ – 10 месяцев

[95, 97]. Но в некоторых ситуациях на фоне длительного применения ингибиторов EGFR удавалось выявить полный патоморфологический регресс, описанная продолжительного которого была, однако, невелика – всего лишь 4 месяца наблюдения [98]. Важно сказать, что большинство попыток отмены препаратов после достижения полного патоморфологического регресса и выполнения полной циторедуктивной операции не имели успеха, и через определенное время у больных выявлялось прогрессирование болезни [99–103].

Одной из наиболее структурированных работ, посвященных исследованию предоперационной терапии ИТК, является проспективное нерандомизированное исследование 2-й фазы, проведенное Н. Lara-Guerra и соавторами [104]. В рамках этого исследования 27 больных независимо от наличия активирующих молекулярных нарушений получали терапию гефитинибом в течение 4 недель до выполнения хирургического лечения. Крайне важным с точки зрения темы нашего исследования является то, что из 27 больных молекулярные нарушения, классифицируемые как активирующие мутации, были выявлены у 6 больных с аденокарциномой легкого. При этом у 4 из 6 больных присутствовала делеция в экзоне 19. У двух из 4 больных с делецией на фоне терапии был выявлен частичный регресс в соответствии с критериями RECIST. У оставшихся двух больных регресс составил 10 и 27% соответственно. Важно отметить, что при морфологическом исследовании остаточной опухоли во всех случаях выявлялся массивный фиброз в центральной области со значительной потерей клеточности. Остаточная опухолевая ткань присутствовала в зонах массивного фиброза и, в частности, в зоне массивных лимфоцитарных инфильтратов. Крайне любопытным представляется наблюдение авторов о низкой пролиферативной активности опухолевых клеток при окраске на Ki67 в зоне фиброза и высокая активность в зонах, богатых лимфоцитами.

Авторам представляется крайне интересным, что, несмотря на более чем 10-летнюю историю исследования этого вопроса, интерес к нему по-прежнему не ослабевает, а понимание особенностей этой ситуации и описание полученных наблюдений находится на том же уровне. Так, последние работы, посвященные отдельным пациентам, которым было выполнено хирургическое лечение на фоне терапии, относятся к 2018–2019 гг. [105] Суммируя все сказанное выше, можно сказать, что, по-видимому, выраженное уменьшение объема опухолевых очагов происходит на фоне терапии не часто и практически не отражается на увеличении показателей выживаемости. Данные предположения, построенные на описанных выше единичных наблюдениях, находят подтверждение в последнем из представленных исследований, посвященных неoadьюватному применению ИТК EGFR – рандомизированному исследованию EMERGING-STONG 1103 [96]. В исследовании был рандомизи-

рован 71 пациент, и в результате было показано, что частота объективных ответов на фоне таргетной терапии не превышала таковую для цитостатической терапии, использовавшейся в контрольной группе (54,1% против 34,3%,  $p = 0,092$ ). Важным с точки зрения нашего исследования выводом можно считать относительно невысокую частоту большого морфологического ответа (объем остаточной опухоли <10%) на фоне эрлотиниба – 9,7%.

### Эпигенетическая трансформация на ранних этапах лечения

Важнейший вывод из представленных литературных данных: излечение пациентов при использовании таргетной терапии не происходит практически никогда даже в случае достижения полного патоморфологического регресса.

*Таким образом, конкретные механизмы, через которые опухолевые клетки получают возможность пролиферировать на фоне противоопухолевого препарата, могут присутствовать в различных пропорциях в опухоли уже к моменту начала терапии. Клинические проявления первичной или приобретенной резистентности зависят лишь от скорости деления клеток конкретного клона с уникальным сочетанием различных молекулярных нарушений, определяющих, во-первых, снижение значимости для пролиферации дезактивированного рецептора через шунтирующие его каскады или активации нижележащих молекул, а во-вторых, определяющих меньшую возможность препарата блокировать искомую мишень.*

Другим возможным механизмом, который позволяет отдельным опухолевым клеткам сохранить жизнеспособность на фоне первых этапов лечения, может быть их стремительное фенотипическое изменение – приобретение фенотипа, характеризующегося нечувствительностью к внешним воздействиям. В пользу этого предположения говорят и общебиологические законы, касающиеся, в частности, того, что частота эпигенетических изменений в клетке на порядок превышает частоту генетических изменений и может быть основным двигателем клональной эволюции [106]. Как сказано в эволюционной теории Дарвина, генотип определяет фенотип, но эволюционный выбор происходит на уровне фенотипических изменений. Механизмы природной селекции в опухолях функционируют на уровне фенотипических свойств и определяются генетической вариабельностью, поскольку именно приобретенные генетические изменения наследуются и передаются следующим поколениям [107] [1].

Именно на возможности эпигенетических изменений и строится вторая гипотеза, объясняющая невозможность излечения опухолей с активирующими мутациями с помощью таргетных препаратов. Она основана на предположении о приобретении небольшой частью опухолевых клеток состояния

«drug-tolerant» в ответ на воздействие повреждающего агента, что позволяет этой части клеток его пережить без признаков деления или с минимальным делением. После длительного лечения, когда изменение размеров опухоли в целом не происходило, небольшая часть клеток, перешедших в состояние «drug-tolerant», приобретает способность расширяться и делиться, несмотря на сохранение концентрации препарата.

Как уже отмечалось выше, огромный накопленный опыт применения различных ИТК показал, что, во-первых, к одному и тому же препарату существует множество различных механизмов резистентности, а во-вторых, практически всегда у одного пациента может присутствовать в отдельных или всех очагах опухоли несколько этих механизмов одновременно. И получается, что клетки, пережившие первое воздействие противоопухолевого препарата и перешедшие в состояние «drug-tolerant», в определенный момент времени дают начало одному или нескольким клонам, которые, кроме прочих молекулярных нарушений, будут иметь один из механизмов приобретенной резистентности. Подтверждения этому были получены в серии блестящих экспериментов, предпринятых Sharma и соавторами.

В рамках этих работ на первом этапе был продемонстрирован феномен трансформации небольшой части клеток в состояние, при котором ранее чувствительные клетки теряли эту чувствительность к эффективному ранее препарату, например, эрлотинибу и gefитинибу [108]. При стандартном дозировании эрлотиниба, эквивалентном биологической дозе, применяемой у человека, через 9 дней непрерывной экспозиции к ИТК в нескольких исследованных клеточных линиях (M14, HCC827, KATO II, HCC1419) оставалось только 0,03% клеток, которые находились в «сонном» состоянии, характеризовавшемся небольшим числом клеток в фазах S и G2/M и значимым в фазе G1. Через некоторое время около 20% из них начинали неактивно пролиферировать. Эта часть получила название «drug-tolerant» expanded population (DTEP) и отличалась от предшествовавших клеток наличием невысокой, но стойкой пролиферативной активности. DTEP содержала сравнимое число клеток в G1 и S фазах, и значительно меньшее – в фазе G2/M, чем DTP. И DTP, и DTEP обладали выраженной резистентностью к ИТК – более чем в 500 раз более высокая концентрация не приводила к возникновению апоптоза. При этом клетки продолжали экспрессировать EGFR, а также сохраняли мутацию EGFR, что исключает риск контаминации культуры. В клетках на фоне коинкубации с эрлотинибом сохранялось подавление киназной активности EGFR, а значит – отсутствие усиленного эффлюкса препарата, как возможного механизма резистентности [109]. Немаловажно, что в большинстве колоний резистентность к эрлотинибу сохранялась и после длительных периодов исключения таргетного препарата из среды

(>30 дней), что подтверждает необратимость этих свойств у DTEP. В одной полученной линии DTEP на начальных этапах наблюдались признаки восстановления чувствительности, однако при более длительном эксперименте оказалось, что у нее просто более медленная кинетика деления. Но в другой работе была показана обратимость DTP/DTEP фенотипа на границе 30 удвоений, что вносит некоторое противоречие в представление о трансформации этих клеток.

### Лекарственная резистентность резидуальных резистентных клеток

Вопрос лекарственной чувствительности был исследован довольно тщательно на нескольких линиях DTEP, полученных, что крайне важно, из одной родительской клетки DTP [109]. Панель исследования чувствительности включала 570 препаратов с различными механизмами противоопухолевого действия. Оценка результатов блокирования производилась путем сравнения площади под кривой для PC9 и конкретной DTEP-X – всего в анализ были включены 17 линий DTEP. Кроме частных выводов об эффективности отдельных препаратов при определенных линиях DTEP, также были сделаны некоторые общие наблюдения. Оказалось, что DTP/DTEP менее чувствительны к различным EGFR ингибиторам, ингибиторам Aurora kinase и цитостатической терапии, чем родительская линия PD9. Ни один из обобщенных классов противоопухолевых препаратов не был эффективен сразу во всех DTEP, при этом, для каждой из PERC был один или несколько эффективных классов. Это означает, что PERC активируют различные механизмы при формировании резистентности к EGFR. Так, в некоторых линиях DTEP были выявлены T790M [1, 4–9]. При сравнении между собой – PERCs с T790M обладали более выраженной чувствительностью к ингибиторам EGFR. В одной из DTEP (# 17) была выявлена амплификация MET. Были также выявлены нарушения в сигнальном каскаде MAPK – NRAS для PERCs 10, 13, 14 (Q61K) и PERC15 (E63K) – которые были чувствительны к MEK ингибитору селуметинибу. Любопытно, что для некоторых DTEP механизм резистентности идентифицирован не был. Важно, что формирование резистентного фенотипа в одном случае сопровождалось существенным ростом мутационной нагрузки.

*Итак, сформировавшиеся из одной клетки-родителя DTEP/PERC могли иметь практически любой из описанных механизмов резистентности к ИТК и характеризовались мало предсказуемой чувствительностью к различным классам препаратов с направленным действием.*

Любопытно, что молекулярный анализ не выявил в DTP и DTEP мутации T790M или активации/амплификации MET как стандартных механизмов приобретенной резистентности. Полученные клетки были малочувствительны ко многим классам таргетных

препаратов, но кроме этого также значительно менее чувствительны и к цисплатину, что предполагает неспецифический для ИТК характер резистентности. Значительные отличия ДТР были выявлены и на уровне фенотипического профиля – эти клетки имели экспрессию таких маркеров «стволовых» клеток, как CD133 и, в одинаковой степени, CD44, при этом, клеток, экспрессирующих CD24 среди ДТР, значительно больше, чем в первичной «родительской» культуре. Было выполнено и более широкое сравнение фенотипического профиля с помощью полногеномного экспрессионного профилирования. Оно так же показало значительные различия в экспрессионном профиле, которые имели не случайный характер. Профиль фенотипических изменений в ДТЕР связан с глобальными изменениями хроматина. Так, при обработке нуклеазами в ДТЕР не происходила порезка ДНК, что подтверждает предшествовавшее изменение ее конформационной структуры.

С целью определения генов, которые могли бы участвовать в изменении хроматина, отдельному анализу были подвергнуты регионы с повышенной экспрессией в ДТР и ДТЕР. Среди них единственным, связанным с модификацией хроматина, был KDM5A/RBP2/Jarid1A, который был открыт как ретинобластома-связанный протеин, обладающий деметилирующей активностью в отношении H3K4. Ожидается в клетках с повышенной экспрессией KDM5A/RBP2/Jarid1A наблюдалось снижение метилированной формы H3K4 (H3K4me3/2). По-видимому, метилирование гистонов имело функциональное значение для формирования ДТР, а затем и ДТЕР, поскольку деплеция KDM5A в родительских клетках РС9 методом РНК-интерференции значительно снижала частоту формирования ДТР на фоне ИТК и цисплатина, что подтверждает универсальность этого механизма. В продолжении этого исследования, проведенного Gulfem, было подтверждено различие в профиле посттрансляционной модификации гистонов между «родительскими клетками» РС9 и «дочерними» ДТР (110). Методом масс-спектрометрии было показано глобальное повышение ацетилирования и снижение метилирования нескольких гистонов (H3K9 и H3K27) в ДТР. Метилирование гистонов происходит при участии метилтрансфераз – сложных белковых комплексов, состоящих из многих субъединиц. В ДТР уровень некоторых из них, в частности G9a и SETD1B, значимо повышен относительно родительских клеточных линий. Нокаут различных элементов из комплекса метилтрансфераз предотвращал возникновение ДТР.

Принимая во внимание значимость H3K9me3-медианного формирования гетерохроматина, предыдущие работы указали на то, что H3K9me3 локализуется преимущественно в повторяемых регионах генома. Поэтому было исследовано глобальное повышение H3K9me3 методом иммунопреципитации хроматина с последующим ChIP-seq. В результате

было показано, что в РС9ДТР в два раза больше регионов, ассоциированных с H3K9me3, относительно родительских клеток. Последующая локализация пиков показала обогащение H3K9me3 не только в повторяющихся, но и в уникальных генах, в том числе, ассоциированных с центромерными и теломерными повторениями. Для уникальных элементов уровень метилирования H3K9 был одинаковым для РС9 и ДТР. А вот для повторяющихся элементов для ДТР преобладали последовательности, происходящие от транспозонов LINE-1. Большинство транспозонов, относящихся к этому классу, являются «вырожденными», обрезанными и мутированными последовательностями. Однако около 7,000 элементов сохраняют полностью свою структуру. Эти последовательности кодируют три открытые рамки считывания, относящиеся к ORF0, 1, 2, а некоторые сохранили возможность к транспозированию. Индуцированная экспрессия LINE-1 может быть следствием экспозиции к цитостатическим препаратам (карбоплатину) или эрлотинибу в РС9. Экспрессия транспозонов LINE-1 повышается в РС9 после экспозиции к эрлотинибу. Этого не происходит в РС9ДТР. Кроме того, в ДТР экспрессия LINE-1 в ответ на экспозицию карбоплатином (как стрессом) повышается значительно меньше, чем в родительских клетках. По большей части H3K9me3 выявлялась в длинных LINE-1, включая специфичные для приматов (L1PA2-6) и человека (L1HS). Сравнительная калькуляция позволила выявить, что наиболее богат H3K9me3 LINE-1s, полученный от приматов. Описанный выше механизм блокирования экспрессии транспозонов LINE-1 за счет повышенного метилирования H3K9 регионов, кодирующих эти элементы, на фоне стрессового воздействия противоопухолевого препарата может быть одним из механизмов формирования ДТР.

Для подтверждения того, что репрессия LINE-1 определяет выживание ДТР, был использован ингибитор HDAC, который реверсирует формирование гетерохроматина. В эксперименте ДТР оказались чувствительны к HDACi и репопулировали на фоне комбинации HDACi (MS275) и эрлотиниба медленнее. Предотвращение возникновения ДТР и ДТЕР было исследовано для 13 препаратов с потенциальным противоопухолевым эффектом. Среди тестируемых проявили влияние 4 ингибитора гистоновых деацетилаз, селективный ингибитор IGF-1R. При этом не один из них не обладал противоопухолевым действием в монорежиме без ИТК.

## Заключение

К настоящему моменту в комбинации с ИТК EGFR были исследованы практически все классы противоопухолевых средств, включая цитостатики, антиангиогенные препараты, ингибиторы контрольных точек и даже вещества, применяемые для лечения других заболеваний, такие как, например, метформин [111–117]

. Часть из изученных комбинаций позволяли достичь более длительного времени без прогрессирования относительно монотерапии ИТК, некоторые даже увеличивали показатели общей продолжительности жизни больных, тем не менее, ни одна из попыток не явилась возможностью для принципиального изменения парадигмы.

Таким образом, воздействие ИТК, является значимым фактором, направляющим эволюцию опухоли. На ранних этапах одним из возможных механизмов адаптации могут быть быстрые процессы включения неселективной защиты, основанные на программах эпигенетической трансформации. Так или иначе, практически всегда часть опухолевых клеток выживает на фоне начальных этапов и постепенно возобновляет рост. Резистентная к ИТК опухоль является

значительно более многообразной структурой, так как является продуктом нескольких синхронно работающих механизмов адаптации. Такой взгляд на течение опухолевого процесса на фоне ИТК ставит под сомнение целесообразность селективного воздействия на отдельные механизмы приобретенной резистентности, которые могут иметь довольно высокое клиническое значение – Т790М и осимертиниб, но никогда не приведут к существенному изменению продолжительности жизни пациентов. В этой связи, авторам представляется, что изменение тактики ранних этапов лечения, возможно за счет усиления его агрессивности или интеграции на первых часах терапии ИТК новых классов препаратов, направленных на блокирование эпигенетических механизмов адаптации может привести к излечению больных.

## Список литературы

1. Greaves M., Maley C. C. Clonal evolution in cancer // Nature. – 2012. – Т. 481, № 7381. – С. 306–13.
2. Jackman D., Pao W., Riely G. J., Engelman J. A., Kris M. G., Janne P. A., Lynch T., Johnson B. E., Miller V. A. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer // J Clin Oncol. – 2010. – Т. 28, № 2. – С. 357–60.
3. Park K., Yu C. J., Kim S. W., Lin M. C., Sriuranpong V., Tsai C. M., Lee J. S., Kang J. H., Chan K. C., Perez-Moreno P., Button P., Abn M. J., Mok T. First-Line Erlotinib Therapy Until and Beyond Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Progression in Asian Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: The ASPIRATION Study // JAMA Oncol. – 2016. – Т. 2, № 3. – С. 305–12.
4. Burrell R. A., Swanton C. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance // Mol Oncol. – 2014. – Т. 8, № 6. – С. 1095–111.
5. de Bruin E. C., McGranahan N., Mitter R., Salm M., Wedge D. C., Yates L., Jamal-Hanjani M., Shafi S., Murugaesu N., Rowan A. J., Gronroos E., Mubammad M. A., Horswell S., Gerlinger M., Varela L., Jones D., Marshall J., Voet T., Van Loo P., Rassi D. M., Rintoul R. C., Janes S. M., Lee S. M., Forster M., Ahmad T., Lawrence D., Falzon M., Capitanio A., Harkins T. T., Lee C. C., Tom W., Teefe E., Chen S. C., Begum S., Rabinowitz A., Phillimore B., Spencer-Dene B., Stamp G., Szallasi Z., Matthews N., Stewart A., Campbell P., Swanton C. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution // Science. – 2014. – Т. 346, № 6206. – С. 251–6.
6. Schuler M., Paz-Ares L., Sequist L. V., Hirsh V., Lee K. H., Wu Y. L., Lu S., Zhou C., Feng J., Ellis S. H., Samuelsen C. H., Tang W., Marten A., Ehrnrooth E., Park K., Yang J. C. First-line afatinib for advanced EGFRm+ NSCLC: Analysis of long-term responders in the LUX-Lung 3, 6, and 7 trials // Lung Cancer. – 2019. – Т. 133. – С. 10–19.
7. Chen Z. Y., Zhong W. Z., Zhang X. C., Su J., Yang X. N., Chen Z. H., Yang J. J., Zhou Q., Yan H. H., An S. J., Chen H. J., Jiang B. Y., Mok T. S., Wu Y. L. EGFR mutation heterogeneity and the mixed response to EGFR tyrosine kinase inhibitors of lung adenocarcinomas // Oncologist. – 2012. – Т. 17, № 7. – С. 978–85.
8. Taniguchi K., Okami J., Kodama K., Higashiyama M., Kato K. Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib // Cancer Sci. – 2008. – Т. 99, № 5. – С. 929–35.
9. Jiang S. X., Yamashita K., Yamamoto M., Piao C. J., Umezawa A., Saegusa M., Yoshida T., Katagiri M., Masuda N., Hayakawa K., Okayasu I. EGFR genetic heterogeneity of nonsmall cell lung cancers contributing to acquired gefitinib resistance // Int J Cancer. – 2008. – Т. 123, № 11. – С. 2480–6.
10. Bai H., Wang Z., Wang Y., Zhuo M., Zhou Q., Duan J., Yang L., Wu M., An T., Zhao J., Wang J. Detection and clinical significance of intratumoral EGFR mutational heterogeneity in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer // PLoS One. – 2013. – Т. 8, № 2. – С. e54170.
11. Zito Marino F., Liguori G., Aquino G., La Mantia E., Bosari S., Ferrero S., Rosso L., Gaudio G., De Rosa N., Scrima M., Martucci N., La Rocca A., Normanno N., Morabito A., Rocco G., Botti G., Franco R. Intratumor Heterogeneity of ALK-Rearrangements and Homogeneity of EGFR-Mutations in Mixed Lung Adenocarcinoma // PLoS One. – 2015. – Т. 10, № 9. – С. e0139264.
12. McGranahan N., Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future // Cell. – 2017. – Т. 168, № 4. – С. 613–628.



13. Laurent-Puig P., Pekin D., Normand C., Kotsopoulos S. K., Nizard P., Perez-Toralla K., Rowell R., Olson J., Srinivasan P., Le Corre D., Hor T., El Harrak Z., Li X., Link D. R., Bouche O., Emile J. F., Landi B., Boige V., Hutchison J. B., Taly V. Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy // *Clin Cancer Res.* – 2015. – Т. 21, № 5. – С. 1087–97.
14. Blokzijl F., de Ligt J., Jager M., Sasselli V., Roerink S., Sasaki N., Huch M., Boymans S., Kuijk E., Prins P., Nijman I. J., Martincorena I., Mokry M., Wiegerinck C. L., Middendorp S., Sato T., Schwank G., Nieuwenhuis E. E., Verstegen M. M., van der Laan L. J., de Jonge J., JN I. J., Vries R. G., van de Wetering M., Stratton M. R., Clevers H., Cuppen E., van Boxtel R. Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life // *Nature.* – 2016. – Т. 538, № 7624. – С. 260–264.
15. Bae T., Tomasini L., Mariani J., Zhou B., Roychowdhury T., Franjic D., Pletikos M., Pattni R., Chen B. J., Venturini E., Riley-Gillis B., Sestan N., Urban A. E., Abyzov A., Vaccarino F. M. Different mutational rates and mechanisms in human cells at pregastrulation and neurogenesis // *Science.* – 2018. – Т. 359, № 6375. – С. 550–555.
16. Reiter J. G., Makobon-Moore A. P., Gerold J. M., Heyde A., Attiyeh M. A., Kobutek Z. A., Tokheim C. J., Brown A., DeBlasio R. M., Niyazov J., Zucker A., Karchin R., Kinzler K. W., Iacobuzio-Donabue C. A., Vogelstein B., Nowak M. A. Minimal functional driver gene heterogeneity among untreated metastases // *Science.* – 2018. – Т. 361, № 6406. – С. 1033–1037.
17. Almendro V., Cheng Y. K., Randles A., Itzkovitz S., Marusyk A., Ametller E., Gonzalez-Farre X., Munoz M., Russnes H. G., Helland A., Rye I. H., Borresen-Dale A. L., Maruyama R., van Oudenaarden A., Dowsett M., Jones R. L., Reis-Filho J., Gascon P., Gonen M., Michor F., Polyak K. Inference of tumor evolution during chemotherapy by computational modeling and in situ analysis of genetic and phenotypic cellular diversity // *Cell Rep.* – 2014. – Т. 6, № 3. – С. 514–27.
18. Rosenbloom D. I. S., Camara P. G., Chu T., Rabadan R. Evolutionary scalpels for dissecting tumor ecosystems // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* – 2017. – Т. 1867, № 2. – С. 69–83.
19. Merlo L. M., Pepper J. W., Reid B. J., Maley C. C. Cancer as an evolutionary and ecological process // *Nat Rev Cancer.* – 2006. – Т. 6, № 12. – С. 924–35.
20. Martincorena I., Campbell P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells // *Science.* – 2015. – Т. 349, № 6255. – С. 1483–9.
21. Maley C. C., Galipeau P. C., Li X., Sanchez C. A., Paulson T. G., Reid B. J. Selectively advantageous mutations and hitchhikers in neoplasms: p16 lesions are selected in Barrett's esophagus // *Cancer Res.* – 2004. – Т. 64, № 10. – С. 3414–27.
22. Shi W., Ng C. K. Y., Lim R. S., Jiang T., Kumar S., Li X., Wali V. B., Piscuoglio S., Gerstein M. B., Chagpar A. B., Weigelt B., Pusztai L., Reis-Filho J. S., Hatzis C. Reliability of Whole-Exome Sequencing for Assessing Intratumor Genetic Heterogeneity // *Cell Rep.* – 2018. – Т. 25, № 6. – С. 1446–1457.
23. Jamal-Hanjani M., Wilson G. A., McGranahan N., Birkbak N. J., Watkins T. B. K., Veeriah S., Shafi S., Johnson D. H., Mitter R., Rosenthal R., Salm M., Horswell S., Escudero M., Matthews N., Rowan A., Chambers T., Moore D. A., Turajlic S., Xu H., Lee S. M., Forster M. D., Ahmad T., Hiley C. T., Abbosh C., Falzon M., Borg E., Marafioti T., Lawrence D., Hayward M., Kolvekar S., Panagiotopoulos N., Janes S. M., Thakrar R., Ahmed A., Blackball F., Summers Y., Shab R., Joseph L., Quinn A. M., Crosbie P. A., Naidu B., Middleton G., Langman G., Trotter S., Nicolson M., Remmen H., Kerr K., Chetty M., Gomersall L., Fennell D. A., Nakas A., Rathinam S., Anand G., Khan S., Russell P., Ezbil V., Ismail B., Irvin-Sellers M., Prakash V., Lester J. F., Kornaszewska M., Attanoos R., Adams H., Davies H., Dentro S., Taniere P., O'Sullivan B., Lowe H. L., Hartley J. A., Iles N., Bell H., Ngai Y., Shaw J. A., Herrero J., Szallasi Z., Schwarz R. F., Stewart A., Quezada S. A., Le Quesne J., Van Loo P., Dive C., Hacksbaw A., Swanton C., Consortium T. R. Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer // *N Engl J Med.* – 2017. – Т. 376, № 22. – С. 2109–2121.
24. Maley C. C., Aktipis A., Graham T. A., Sottoriva A., Boddy A. M., Janiszewska M., Silva A. S., Gerlinger M., Yuan Y., Pienta K. J., Anderson K. S., Gatenby R., Swanton C., Posada D., Wu C. I., Schiffman J. D., Hwang E. S., Polyak K., Anderson A. R., Brown J. S., Greaves M., Shibata D. Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms // *Nat Rev Cancer.* – 2017. – Т. 17, № 10. – С. 605–619.
25. Bozic I., Antal T., Ohtsuki H., Carter H., Kim D., Chen S., Karchin R., Kinzler K. W., Vogelstein B., Nowak M. A. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – Т. 107, № 43. – С. 18545–50.
26. Beerewinkel N., Antal T., Dingli D., Traulsen A., Kinzler K. W., Velculescu V. E., Vogelstein B., Nowak M. A. Genetic progression and the waiting time to cancer // *PLoS Comput Biol.* – 2007. – Т. 3, № 11. – С. e225.
27. de Visser J. A., Rozen D. E. Clonal interference and the periodic selection of new beneficial mutations in *Escherichia coli* // *Genetics.* – 2006. – Т. 172, № 4. – С. 2093–100.
28. Blakely C. M., Watkins T. B. K., Wu W., Gini B., Chabon J. J., McCoach C. E., McGranahan N., Wilson G. A., Birkbak N. J., Olivari V. R., Rotow J., Maynard A., Wang V., Gubens M. A., Banks K. C., Lanman R. B., Caulin A. F., St John J., Cordero A. R., Giannikopoulos P., Simmons A. D., Mack P. C., Gandara D. R., Husain H., Doebele R. C., Riess J. W., Diehn M., Swanton C., Bivona T. G. Evolution and clinical impact of co-occurring genetic alterations in advanced-stage EGFR-mutant lung cancers // *Nat Genet.* – 2017. – Т. 49, № 12. – С. 1693–1704.
29. Yu H. A., Suzawa K., Jordan E., Zehir A., Ni A., Kim R., Kris M. G., Hellmann M. D., Li B. T., Somwar R., Solit D. B., Berger M. F., Arcila M., Riely G. J., Ladanyi M. Concurrent Alterations in EGFR-Mutant Lung Cancers Associated with Resistance to EGFR Kinase Inhibitors and Characterization of MTOR as a Mediator of Resistance // *Clin Cancer Res.* – 2018. – Т. 24, № 13. – С. 3108–3118.

30. Jakobsen J. N., Santoni-Rugiu E., Grauslund M., Melchior L., Sorensen J. B. Concomitant driver mutations in advanced EGFR-mutated non-small-cell lung cancer and their impact on erlotinib treatment // *Oncotarget*. – 2018. – Т. 9, № 40. – С. 26195–26208.
31. Hong S., Gao F., Fu S., Wang Y., Fang W., Huang Y., Zhang L. Concomitant Genetic Alterations With Response to Treatment and Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients With EGFR-Mutant Advanced Non-Small Cell Lung Cancer // *JAMA Oncol*. – 2018. – Т. 4, № 5. – С. 739–742.
32. Rachiglio A. M., Fenizia F., Piccirillo M. C., Galetta D., Crino L., Vincenzi B., Barletta E., Pinto C., Ferrau F., Lambiase M., Montanino A., Roma C., Ludovini V., Montagna E. S., De Luca A., Rocco G., Botti G., Perrone F., Morabito A., Normanno N. The Presence of Concomitant Mutations Affects the Activity of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients // *Cancers (Basel)*. – 2019. – Т. 11, № 3.
33. Bria E., Pilotto S., Amato E., Fassan M., Novello S., Peretti U., Vavala T., Kinspergher S., Rigbi L., Santo A., Brunelli M., Corbo V., Giglioli E., Sperduti I., Milella M., Chilosì M., Scarpa A., Tortora G. Molecular heterogeneity assessment by next-generation sequencing and response to gefitinib of EGFR mutant advanced lung adenocarcinoma // *Oncotarget*. – 2015. – Т. 6, № 14. – С. 12783–95.
34. Lim S. M., Kim H. R., Cho E. K., Min Y. J., Ahn J. S., Ahn M. J., Park K., Cho B. C., Lee J. H., Jeong H. C., Kim E. K., Kim J. H. Targeted sequencing identifies genetic alterations that confer primary resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitor (Korean Lung Cancer Consortium) // *Oncotarget*. – 2016. – Т. 7, № 24. – С. 36311–36320.
35. Lee T., Lee B., Choi Y. L., Han J., Ahn M. J., Um S. W. Non-small Cell Lung Cancer with Concomitant EGFR, KRAS, and ALK Mutation: Clinicopathologic Features of 12 Cases // *J Pathol Transl Med*. – 2016. – Т. 50, № 3. – С. 197–203.
36. Oxnard G. R., Hu Y., Mileham K. F., Husain H., Costa D. B., Tracy P., Feeney N., Sholl L. M., Dahlberg S. E., Redig A. J., Kwiatkowski D. J., Rabin M. S., Paweletz C. P., Thress K. S., Janne P. A. Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients With EGFR T790M-Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib // *JAMA Oncol*. – 2018. – Т. 4, № 11. – С. 1527–1534.
37. Liu Y., Sun L., Xiong Z. C., Sun X., Zhang S. L., Ma J. T., Han C. B. Meta-analysis of the impact of de novo and acquired EGFR T790M mutations on the prognosis of patients with non-small cell lung cancer receiving EGFR-TKIs // *Onco Targets Ther*. – 2017. – Т. 10. – С. 2267–2279.
38. Testa U., Castelli G., Pelosi E. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells // *Cancers (Basel)*. – 2018. – Т. 10, № 8.
39. Robinson D. R., Wu Y. M., Lonigro R. J., Vats P., Cobain E., Everett J., Cao X., Rabban E., Kumar-Sinha C., Raymond V., Schuetz S., Alva A., Siddiqui J., Chugh R., Worden F., Zalupski M. M., Innis J., Mody R. J., Tomlins S. A., Lucas D., Baker L. H., Ramnath N., Schott A. F., Hayes D. F., Vijai J., Offit K., Stoffel E. M., Roberts J. S., Smith D. C., Kunju L. P., Talpaz M., Cieslik M., Chinnaiyan A. M. Integrative clinical genomics of metastatic cancer // *Nature*. – 2017. – Т. 548, № 7667. – С. 297–303.
40. Kim E. S., Roy U. B., Ersek J. L., King J., Smith R. A., Martin N., Martins R., Moore A., Silvestri G. A., Jett J. Updates Regarding Biomarker Testing for Non-Small Cell Lung Cancer: Considerations from the National Lung Cancer Roundtable // *J Thorac Oncol*. – 2019. – Т. 14, № 3. – С. 338–342.
41. Imielinski M., Berger A. H., Hammerman P. S., Hernandez B., Pugh T. J., Hodis E., Cho J., Sub J., Capelletti M., Sivachenko A., Sougnez C., Auclair D., Lawrence M. S., Stojanov P., Cibulskis K., Choi K., de Waal L., Sbarijnia T., Brooks A., Greulich H., Banerji S., Zander T., Seidel D., Leenders F., Ansen S., Ludwig C., Engel-Riedel W., Stoelben E., Wolf J., Goparju C., Thompson K., Winckler W., Kwiatkowski D., Johnson B. E., Janne P. A., Miller V. A., Pao W., Travis W. D., Pass H. I., Gabriel S. B., Lander E. S., Thomas R. K., Garraway L. A., Getz G., Meyerson M. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing // *Cell*. – 2012. – Т. 150, № 6. – С. 1107–20.
42. Offin M., Chan J. M., Tenet M., Rizvi H. A., Shen R., Riely G. J., Rekhtman N., Daneshbod Y., Quintanal-Villalonga A., Penson A., Hellmann M. D., Arcila M. E., Ladanyi M., Pe'er D., Kris M. G., Rudin C. M., Yu H. A. Concurrent RB1 and TP53 Alterations Define a Subset of EGFR-Mutant Lung Cancers at Risk for Histologic Transformation and Inferior Clinical Outcomes // *J Thorac Oncol*. – 2019. – Т. 14, № 10. – С. 1784–1793.
43. Planchard D. Have We Really MET a New Target? // *J Clin Oncol*. – 2018.10.1200/JCO.2018.79.3455. – C. JCO2018793455.
44. Bean J., Brennan C., Shib J. Y., Riely G., Viale A., Wang L., Chitale D., Motoi N., Szoke J., Broderick S., Balak M., Chang W. C., Yu C. J., Gazdar A., Pass H., Rusch V., Gerald W., Huang S. F., Yang P. C., Miller V., Ladanyi M., Yang C. H., Pao W. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2007. – Т. 104, № 52. – С. 20932–7.
45. Schildhaus H. U., Schulteis A. M., Ruschhoff J., Binot E., Merkelbach-Bruse S., Fassunke J., Schulte W., Ko Y. D., Schlesinger A., Bos M., Gardizi M., Engel-Riedel W., Brockmann M., Serke M., Gerigk U., Hekmat K., Frank K. F., Reiser M., Schulz H., Kruger S., Stoelben E., Zander T., Wolf J., Buettner R. MET amplification status in therapy-naive adeno- and squamous cell carcinomas of the lung // *Clin Cancer Res*. – 2015. – Т. 21, № 4. – С. 907–15.
46. Noro R., Seike M., Zou F., Soeno C., Matsuda K., Sugano T., Nishijima N., Matsumoto M., Kitamura K., Kosaibira S., Minegishi Y., Yoshimura A., Kubota K., Gemma A. MET FISH-positive status predicts short progression-free survival and overall survival after gefitinib treatment in lung adenocarcinoma with EGFR mutation // *BMC Cancer*. – 2015. – Т. 15. – С. 31.
47. Morgillo F., Della Corte C. M., Fasano M., Ciardiello F. Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer // *ESMO Open*. – 2016. – Т. 1, № 3. – С. e000060.

48. Ramalingam S. S., Yang J. C., Lee C. K., Kurata T., Kim D. W., John T., Nogami N., Obe Y., Mann H., Rukazenkov Y., Gbiorgbiu S., Stetson D., Markovets A., Barrett J. C., Thress K. S., Janne P. A. Osimertinib As First-Line Treatment of EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer // *J Clin Oncol.* – 2018. – Т. 36, № 9. – С. 841–849.
49. Tetsu O., Hangauer M. J., Phuchareon J., Eisele D. W., McCormick F. Drug Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer // *Chemotherapy.* – 2016. – Т. 61, № 5. – С. 223–35.
50. Piotrowska Z., Isozaki H., Lennerz J. K., Gainor J. F., Lennes I. T., Zhu V. W., Marcoux N., Banwait M. K., Digumarthy S. R., Su W., Yoda S., Riley A. K., Nangia V., Lin J. J., Nagy R. J., Lanman R. B., Dias-Santagata D., Mino-Kenudson M., Iafrate A. J., Heist R. S., Shaw A. T., Evans E. K., Clifford C., Ou S. I., Wolf B., Hata A. N., Sequist L. V. Landscape of Acquired Resistance to Osimertinib in EGFR-Mutant NSCLC and Clinical Validation of Combined EGFR and RET Inhibition with Osimertinib and BLU-667 for Acquired RET Fusion // *Cancer Discov.* – 2018. – Т. 8, № 12. – С. 1529–1539.
51. Minari R., Bordi P., Tiseo M. Third-generation epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer: review on emerged mechanisms of resistance // *Transl Lung Cancer Res.* – 2016. – Т. 5, № 6. – С. 695–708.
52. Camidge D. R., Davies K. D. MET Copy Number as a Secondary Driver of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer // *J Clin Oncol.* – 2019. – Т. 37, № 11. – С. 855–857.
53. Turke A. B., Zejnullahu K., Wu Y. L., Song Y., Dias-Santagata D., Lifshits E., Toschi L., Rogers A., Mok T., Sequist L., Lindeman N. I., Murphy C., Akhavanfard S., Yeap B. Y., Xiao Y., Capelletti M., Iafrate A. J., Lee C., Christensen J. G., Engelman J. A., Janne P. A. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC // *Cancer Cell.* – 2010. – Т. 17, № 1. – С. 77–88.
54. Wei Z., An T., Wang Z., Chen K., Bai H., Zhu G., Duan J., Wu M., Yang L., Zhuo M., Wang Y., Liu X., Wang J. Patients harboring epidermal growth factor receptor (EGFR) double mutations had a lower objective response rate than those with a single mutation in non-small cell lung cancer when treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors // *Thorac Cancer.* – 2014. – Т. 5, № 2. – С. 126–32.
55. Santoni-Rugiu E., Melchior L. C., Urbanska E. M., Jakobsen J. N., Stricker K., Grauslund M., Sorensen J. B. Intrinsic resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Differences and Similarities with Acquired Resistance // *Cancers (Basel).* – 2019. – Т. 11, № 7.
56. Kobayashi S., Boggon T. J., Dayaram T., Janne P. A., Koehler 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. – Т. 352, № 8. – С. 786–92.
57. Pao W., Miller V. A., Politi K. A., Riely G. J., Somwar R., Zakowski M. F., Kris M. G., Varmus H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain // *PLoS Med.* – 2005. – Т. 2, № 3. – С. e73.
58. Arcila M. E., Oxnard G. R., Nafa K., Riely G. J., Solomon S. B., Zakowski M. F., Kris M. G., Pao W., Miller V. A., Ladanyi M. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay // *Clin Cancer Res.* – 2011. – Т. 17, № 5. – С. 1169–80.
59. Sequist L. V., Waltman B. A., Dias-Santagata D., Digumarthy S., Turke A. B., Fidias P., Bergethon K., Shaw A. T., Gettinger S., Cospers A. K., Akhavanfard S., Heist R. S., Temel J., Christensen J. G., Wain J. C., Lynch T. J., Vernovsky K., Mark E. J., Lanuti M., Iafrate A. J., Mino-Kenudson M., Engelman J. A. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors // *Sci Transl Med.* – 2011. – Т. 3, № 75. – С. 75ra26.
60. Oxnard G. R., Arcila M. E., Chmielecki J., Ladanyi M., Miller V. A., Pao W. New strategies in overcoming acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer // *Clin Cancer Res.* – 2011. – Т. 17, № 17. – С. 5530–7.
61. Kwak E. L., Sordella R., Bell D. W., Godin-Heymann N., Okimoto R. A., Brannigan B. W., Harris P. L., Driscoll D. R., Fidias P., Lynch T. J., Rabindran S. K., McGinnis J. P., Wissner A., Sharma S. V., Isselbacher K. J., Settleman J., Haber D. A. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2005. – Т. 102, № 21. – С. 7665–70.
62. Li D., Ambrogio L., Shimamura T., Kubo S., Takahashi M., Chirieac L. R., Padera R. F., Shapiro G. I., Baum A., Himmelsbach F., Rettig W. J., Meyerson M., Solca F., Greulich H., Wong K. K. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models // *Oncogene.* – 2008. – Т. 27, № 34. – С. 4702–11.
63. Engelman J. A., Zejnullahu K., Gale C. M., Lifshits E., Gonzales A. J., Shimamura T., Zhao F., Vincent P. W., Naumov G. N., Bradner J. E., Altbaus I. W., Gandhi L., Shapiro G. I., Nelson J. M., Heymach J. V., Meyerson M., Wong K. K., Janne P. A. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib // *Cancer Res.* – 2007. – Т. 67, № 24. – С. 11924–32.
64. Reckamp K. L., Giaccone G., Camidge D. R., Gadgeel S. M., Khuri F. R., Engelman J. A., Koczywas M., Rajan A., Campbell A. K., Gernhardt D., Ruiz-Garcia A., Letrent S., Liang J., Taylor I., O'Connell J. P., Janne P. A. A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib // *Cancer.* – 2014. – Т. 120, № 8. – С. 1145–54.
65. Miller V. A., Hirsh V., Cadranel J., Chen Y. M., Park K., Kim S. W., Zhou C., Su W. C., Wang M., Sun Y., Heo D. S., Crino L., Tan E. H., Chao T. Y., Shabidi M., Cong X. J., Lorence R. M., Yang J. C. Afatinib versus placebo for patients with

advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial // *Lancet Oncol.* – 2012. – Т. 13, № 5. – С. 528–38.

66. *Camidge D. R., Pao W., Sequist L. V.* Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2014. – Т. 11, № 8. – С. 473–81.

67. *Yun C. H., Mengwasser K. E., Toms A. V., Woo M. S., Greulich H., Wong K. K., Meyerson M., Eck M. J.* The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – Т. 105, № 6. – С. 2070–5.

68. *Chmielecki J., Foo J., Oxnard G. R., Hutchinson K., Ohashi K., Somwar R., Wang L., Amato K. R., Arcila M., Sos M. L., Socci N. D., Viale A., de Stanchina E., Ginsberg M. S., Thomas R. K., Kris M. G., Inoue A., Ladanyi M., Miller V. A., Michor F., Pao W.* Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling // *Sci Transl Med.* – 2011. – Т. 3, № 90. – С. 90ra59.

69. *Ichihara E., Lovly C. M.* Shades of T790M: Intratumor Heterogeneity in EGFR-Mutant Lung Cancer // *Cancer Discov.* – 2015. – Т. 5, № 7. – С. 694–6.

70. *Tian P., Wang Y., Wang W., Li Y., Wang K., Cheng X., Tang Y., Han-Zhang H., Ye J., Chuai S., Li W.* High-throughput sequencing reveals distinct genetic features and clinical implications of NSCLC with de novo and acquired EGFR T790M mutation // *Lung Cancer.* – 2018. – Т. 124. – С. 205–210.

71. *Fujita Y., Suda K., Kimura H., Matsumoto K., Arai T., Nagai T., Saijo N., Yatabe Y., Mitsudomi T., Nishio K.* Highly sensitive detection of EGFR T790M mutation using colony hybridization predicts favorable prognosis of patients with lung cancer harboring activating EGFR mutation // *J Thorac Oncol.* – 2012. – Т. 7, № 11. – С. 1640–4.

72. *Lettig L., Sabnane N., Pepe F., Cerutti R., Albeni C., Franzi F., Veronesi G., Ogliari F., Pastore A., Tuzi A., Pinotti G., Bovio A., Verusio C., Giordano M., Troncone G., Sessa F., Malapelle U., Furlan D.* EGFR T790M detection rate in lung adenocarcinomas at baseline using droplet digital PCR and validation by ultra-deep next generation sequencing // *Transl Lung Cancer Res.* – 2019. – Т. 8, № 5. – С. 584–592.

73. *Ricciuti B., Baglivo S., Pagliarunga L., De Giglio A., Bellezza G., Chiari R., Crino L., Metro G.* Osimertinib in patients with advanced epidermal growth factor receptor T790M mutation-positive non-small cell lung cancer: rationale, evidence and place in therapy // *Ther Adv Med Oncol.* – 2017. – Т. 9, № 6. – С. 387–404.

74. *Hata A., Katakami N., Kaji R., Yokoyama T., Kaneda T., Tamiya M., Inoue T., Kimura H., Yano Y., Tamura D., Morita S., Negoro S., Group H. O.* Does afatinib plus bevacizumab combination therapy induce positive conversion of T790M in previously-negative patients? // *Oncotarget.* – 2018. – Т. 9, № 78. – С. 34765–34771.

75. *Turner N. C., Reis-Filho J. S.* Genetic heterogeneity and cancer drug resistance // *Lancet Oncol.* – 2012. – Т. 13, № 4. – С. e178–85.

76. *Piotrowska Z., Niederst M. J., Karlovich C. A., Wakelee H. A., Neal J. W., Mino-Kenudson M., Fulton L., Hata A. N., Lockerman E. L., Kalsy A., Digumarthy S., Muzikansky A., Raponi M., Garcia A. R., Mulvey H. E., Parks M. K., DiCecca R. H., Dias-Santagata D., Iafrate A. J., Shaw A. T., Allen A. R., Engelman J. A., Sequist L. V.* Heterogeneity Underlies the Emergence of EGFR T790 Wild-Type Clones Following Treatment of T790M-Positive Cancers with a Third-Generation EGFR Inhibitor // *Cancer Discov.* – 2015. – Т. 5, № 7. – С. 713–22.

77. *Leonetti A., Sharma S., Minari R., Perego P., Giovannetti E., Tiseo M.* Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer // *Br J Cancer.* – 2019. – Т. 121, № 9. – С. 725–737.

78. *Yarden Y., Slivkouski M. X.* Untangling the ErbB signalling network // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2001. – Т. 2, № 2. – С. 127–37.

79. *Sharma S. V., Gajowniczek P., Way I. P., Lee D. Y., Jiang J., Yuza Y., Classon M., Haber D. A., Settleman J.* A common signaling cascade may underlie “addiction” to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes // *Cancer Cell.* – 2006. – Т. 10, № 5. – С. 425–35.

80. *Takeuchi K., Ito F.* EGF receptor in relation to tumor development: molecular basis of responsiveness of cancer cells to EGFR-targeting tyrosine kinase inhibitors // *FEBS J.* – 2010. – Т. 277, № 2. – С. 316–26.

81. *Dragowska W. H., Weppler S. A., Wang J. C., Wong L. Y., Kapanen A. I., Rawji J. S., Warburton C., Qadir M. A., Donohue E., Roberge M., Gorski S. M., Gelmon K. A., Bally M. B.* Induction of autophagy is an early response to gefitinib and a potential therapeutic target in breast cancer // *PLoS One.* – 2013. – Т. 8, № 10. – С. e76503.

82. *Venugopalan A., Lee M. J., Niu G., Medina-Echeverez J., Tomita Y., Lizak M. J., Cultraro C. M., Simpson R. M., Chen X., Trepel J. B., Guba U.* EGFR-targeted therapy results in dramatic early lung tumor regression accompanied by imaging response and immune infiltration in EGFR mutant transgenic mouse models // *Oncotarget.* – 2016. – Т. 7, № 34. – С. 54137–54156.

83. *Costa D. B., Halmos B., Kumar A., Schumer S. T., Huberman M. S., Boggon T. J., Tenen D. G., Kobayashi S.* BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations // *PLoS Med.* – 2007. – Т. 4, № 10. – С. 1669–79; discussion 1680.

84. *Kleiman L. B., Maiwald T., Conzelmann H., Lauffenburger D. A., Sorger P. K.* Rapid phospho-turnover by receptor tyrosine kinases impacts downstream signaling and drug binding // *Mol Cell.* – 2011. – Т. 43, № 5. – С. 723–37.

85. *Regales L., Gong Y., Shen R., de Stanchina E., Vivanco L., Goel A., Koutcher J. A., Spassova M., Ouerfelli O., Mellinghoff I. K., Zakowski M. F., Politi K. A., Pao W.* Dual targeting of EGFR can overcome a major drug resistance mutation in mouse models of EGFR mutant lung cancer // *J Clin Invest.* – 2009. – Т. 119, № 10. – С. 3000–10.

86. *Politi K., Zakowski M. F., Fan P. D., Schonfeld E. A., Pao W., Varmus H. E.* Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors // *Genes Dev.* – 2006. – Т. 20, № 11. – С. 1496–510.

87. Chen Z., Cheng K., Walton Z., Wang Y., Ebi H., Shimamura T., Liu Y., Tupper T., Ouyang J., Li J., Gao P., Woo M. S., Xu C., Yanagita M., Altabef A., Wang S., Lee C., Nakada Y., Pena C. G., Sun Y., Franchetti Y., Yao C., Saur A., Cameron M. D., Nishino M., Hayes D. N., Wilkerson M. D., Roberts P. J., Lee C. B., Bardeesy N., Butaney M., Chiriac L. R., Costa D. B., Jackman D., Sharpless N. E., Castrillon D. H., Demetri G. D., Janne P. A., Pandolfi P. P., Cantley L. C., Kung A. L., Engelman J. A., Wong K. K. A murine lung cancer co-clinical trial identifies genetic modifiers of therapeutic response // *Nature*. – 2012. – Т. 483, № 7391. – С. 613–7.
88. de Jong M., Essers J., van Weerden W. M. Imaging preclinical tumour models: improving translational power // *Nat Rev Cancer*. – 2014. – Т. 14, № 7. – С. 481–93.
89. 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., Insa A., De Marinis F., Corre R., Bover L., Illiano A., Dansin E., de Castro J., Milella M., Reguart N., Altavilla G., Jimenez U., Provencio M., Moreno M. A., Terrasa J., Munoz-Langa J., Valdivia J., Isla D., Domine M., Molinier O., Mazieres J., Baize N., Garcia-Campelo R., Robinet G., Rodriguez-Abreu D., Lopez-Vivanco G., Gebbia V., Ferrera-Delgado L., Bombaron P., Bernabe R., Bearz A., Artal A., Cortesi E., Rolfo C., Sanchez-Ronco M., Drozdowskyj A., Queralt C., de Aguirre I., Ramirez J. L., Sanchez J. J., Molina M. A., Taron M., Paz-Ares L., *Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Francais de P.-C., Associazione Italiana Oncologia T.* Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial // *Lancet Oncol*. – 2012. – Т. 13, № 3. – С. 239–46.
90. Janjigian Y. Y., Smit E. F., Groen H. J., Horn L., Gettinger S., Camidge D. R., Riely G. J., Wang B., Fu Y., Chand V. K., Miller V. A., Pao W. Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations // *Cancer Discov*. – 2014. – Т. 4, № 9. – С. 1036–45.
91. Kris M. G., Natale R. B., Herbst R. S., Lynch T. J., Jr., Prager D., Belani C. P., Schiller J. H., Kelly K., Spiridonidis H., Sandler A., Albain K. S., Cella D., Wolf M. K., Averbuch S. D., Ochs J. J., Kay A. C. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial // *JAMA*. – 2003. – Т. 290, № 16. – С. 2149–58.
92. Chang J. W., Hou M. M., Hsieh J. J., Cheung Y. C., Wang H. M., Chen J. S., Wang C. H., Chen C. H., Yeh K. Y., Ou L. Y., Hsieh C. H., Wu H. D., Chen Y. T., Chang I. C., Huang S. F. Early radiographic response to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor in non-small cell lung cancer patients with epidermal growth factor receptor mutations: A prospective study // *Biomed J*. – 2015. – Т. 38, № 3. – С. 221–8.
93. Salvador-Coloma C., Lorente D., Palanca S., Simarro J., Mancheno N., Sandoval J., Laboz A., Juan O. Early radiological response as predictor of overall survival in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor mutations // *J Thorac Dis*. – 2018. – Т. 10, № 3. – С. 1386–1393.
94. Kappers I., Klomp H. M., Burgers J. A., Van Zandwijk N., Haas R. L., van Pel R. Neoadjuvant (induction) erlotinib response in stage IIIA non-small-cell lung cancer // *J Clin Oncol*. – 2008. – Т. 26, № 25. – С. 4205–7.
95. Hisbida T., Nagai K., Mitsudomi T., Yokoi K., Kondo H., Horinouchi H., Akiyama H., Nagayasu T., Tsuboi M., *Japan Clinical Oncology G.* Salvage surgery for advanced non-small cell lung cancer after response to gefitinib // *J Thorac Cardiovasc Surg*. – 2010. – Т. 140, № 5. – С. e69–71.
96. Zhong W. Z., Chen K. N., Chen C., Gu C. D., Wang J., Yang X. N., Mao W. M., Wang Q., Qiao G. B., Cheng Y., Xu L., Wang C. L., Chen M. W., Kang X., Yan W., Yan H. H., Liao R. Q., Yang J. J., Zhang X. C., Zhou Q., Wu Y. L. Erlotinib Versus Gemcitabine Plus Cisplatin as Neoadjuvant Treatment of Stage IIIA-N2 EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer (EMERGING-CTONG 1103): A Randomized Phase II Study // *J Clin Oncol*. – 2019. – Т. 37, № 25. – С. 2235–2245.
97. Aukema T. S., Kappers I., Olmos R. A., Codrington H. E., van Tinteren H., van Pel R., Klomp H. M., Group N. E. L. S. Is 18F-FDG PET/CT useful for the early prediction of histopathologic response to neoadjuvant erlotinib in patients with non-small cell lung cancer? // *J Nucl Med*. – 2010. – Т. 51, № 9. – С. 1344–8.
98. Weber B., Sorensen B. S., Knap M. M., Madsen H. H., Nexø E., Meldgaard P. Complete pathologic response in lung tumors in two patients with metastatic non-small cell lung cancer treated with erlotinib // *J Thorac Oncol*. – 2011. – Т. 6, № 11. – С. 1946–9.
99. Funakoshi Y., Takeuchi Y., Maeda H. Pneumonectomy after response to gefitinib treatment for lung adenocarcinoma // *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. – 2013. – Т. 21, № 4. – С. 482–4.
100. Lopez-Gonzalez A., Almagro E., Salas C., Varela A., Provencio M. Use of a tyrosine kinase inhibitor as neoadjuvant therapy for non-small cell lung cancer: A case report // *Respir Med Case Rep*. – 2013. – Т. 9. – С. 8–10.
101. Provencio-Pulla M., Nadal-Alforja E., Cobo M., Insa A., Rivas M. C., Majem M., Rodriguez-Abreu D., Lopez-Vivanco G., Domine M., Morillo E. D. B., Massuti B., Campelo R. G., Marti A. M., Bernabé R., Franco F., Jove M., Arrabal R., Martin P., Casal J., Calvo V. Neoadjuvant chemo/immunotherapy for the treatment of stages IIIA resectable non-small cell lung cancer (NSCLC): A phase II multicenter exploratory study—NADIM study-SLCG // *Journal of Clinical Oncology*. – 2018. – Т. 36, № 15, suppl. – С. 8521–8521.
102. Shu C. A., Grigg C., Chiu Z., Garofano R. F., Patel V., Hernandez S., Negri T., Sachter A. G., Smith-Marrone S., Stoopler M., Gainor J. F., Awad M. M., D'Ovidio F., Sonett J. R., Bacchetta M., Saqi A., Rizvi N. A. Neoadjuvant atezolizumab + chemotherapy in resectable non-small cell lung cancer (NSCLC) // *Journal of Clinical Oncology*. – 2018. – Т. 36, № 15, suppl. – С. 8532–8532.
103. Kwiatkowski D. J., Rusch V. W., Chافت J. E., Johnson B. E., Nicholas A., Wistuba I. I., Merritt R., Lee J. M., Bunn P. A., Tang Y., Phan S.-C., Waqar S. N., Patterson A., Haura E. B., Toloza E. M., Reckamp K. L., Raz D., Schulze K.,

Johnson A., Carbone D. P. Neoadjuvant atezolizumab in resectable non-small cell lung cancer (NSCLC): Interim analysis and biomarker data from a multicenter study (LCMC3) // *Journal of Clinical Oncology*. – 2019. – Т. 37, № 15, suppl. – С. 8503–8503.

104. Lara-Guerra H., Chung C. T., Schwock J., Pintilie M., Hwang D. M., Leighl N. B., Waddell T. K., Tsao M. S. Histopathological and immunohistochemical features associated with clinical response to neoadjuvant gefitinib therapy in early stage non-small cell lung cancer // *Lung Cancer*. – 2012. – Т. 76, № 2. – С. 235–41.

105. Mazzoni F., Petreni P., Perna M., Scotti V., Bongiolatti S., Livi L., Di Costanzo F., Voltolini L. Afatinib with subsequent surgery in stage III NSCLC with EGFR mutation: Lessons learned from two clinical experiences // *Tumori*. – 2018. – Т. 104, № 6. – С. NP5-NP9.

106. Siegmund K. D., Marjoram P., Woo Y. J., Tavare S., Shibata D. Inferring clonal expansion and cancer stem cell dynamics from DNA methylation patterns in colorectal cancers // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2009. – Т. 106, № 12. – С. 4828–33.

107. Varley K. E., Mutch D. G., Edmonston T. B., Goodfellow P. J., Mitra R. D. Intra-tumor heterogeneity of MLH1 promoter methylation revealed by deep single molecule bisulfite sequencing // *Nucleic Acids Res*. – 2009. – Т. 37, № 14. – С. 4603–12.

108. Sharma S. V., Lee D. Y., Li B., Quinlan M. P., Takahashi F., Maheswaran S., McDermott U., Azizian N., Zou L., Fischbach M. A., Wong K. K., Brandstetter K., Wittner B., Ramaswamy S., Classon M., Settleman J. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations // *Cell*. – 2010. – Т. 141, № 1. – С. 69–80.

109. Ramirez M., Rajaram S., Steininger R. J., Osipchuk D., Roth M. A., Morinishi L. S., Evans L., Ji W., Hsu C. H., Thurley K., Wei S., Zhou A., Koduru P. R., Posner B. A., Wu L. F., Altschuler S. J. Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells // *Nat Commun*. – 2016. – Т. 7. – С. 10690.

110. Guler G. D., Tindell C. A., Pitti R., Wilson C., Nichols K., KaiWai Cheung T., Kim H. J., Wongchenko M., Yan Y., Haley B., Cuellar T., Webster J., Alag N., Hegde G., Jackson E., Nance T. L., Giresi P. G., Chen K. B., Liu J., Jhunjhunwala S., Settleman J., Stephan J. P., Arnott D., Classon M. Repression of Stress-Induced LINE-1 Expression Protects Cancer Cell Subpopulations from Lethal Drug Exposure // *Cancer Cell*. – 2017. – Т. 32, № 2. – С. 221–237 e13.

111. Mok T. S., Wu Y. L., Ahn M. J., Garassino M. C., Kim H. R., Ramalingam S. S., Shepherd F. A., He Y., Akamatsu H., Theelen W. S., Lee C. K., Sebastian M., Templeton A., Mann H., Marotti M., Gbiorgbiu S., Papadimitrakopoulou V. A., Investigators A. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer // *N Engl J Med*. – 2017. – Т. 376, № 7. – С. 629–640.

112. Wu Y. L., Sequist L. V., Hu C. P., Feng J., Lu S., Huang Y., Li W., Hou M., Schuler M., Mok T., Yamamoto N., O'Byrne K., Hirsh V., Gibson N., Massey D., Kim M., Yang J. C. EGFR mutation detection in circulating cell-free DNA of lung adenocarcinoma patients: analysis of LUX-Lung 3 and 6 // *Br J Cancer*. – 2017. – Т. 116, № 2. – С. 175–185.

113. Wu Y. L., Zhou C., Hu C. P., Feng J., Lu S., Huang Y., Li W., Hou M., Shi J. H., Lee K. Y., Xu C. R., Massey D., Kim M., Shi Y., Geater S. L. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial // *Lancet Oncol*. – 2014. – Т. 15, № 2. – С. 213–22.

114. Tanaka K., Babic I., Nathanson D., Akhavan D., Guo D., Gini B., Dang J., Zhu S., Yang H., De Jesus J., Amzajerdi A. N., Zhang Y., Dibble C. C., Dan H., Rinkenbaugh A., Yong W. H., Vinters H. V., Gera J. F., Cavenee W. K., Cloughesy T. F., Manning B. D., Baldwin A. S., Mischel P. S. Oncogenic EGFR signaling activates an mTORC2-NF-kappaB pathway that promotes chemotherapy resistance // *Cancer Discov*. – 2011. – Т. 1, № 6. – С. 524–38.

115. Song Z., Zhu H., Guo Z., Wu W., Sun W., Zhang Y. Correlation of EGFR mutation and predominant histologic subtype according to the new lung adenocarcinoma classification in Chinese patients // *Med Oncol*. – 2013. – Т. 30, № 3. – С. 645.

116. Wu S. G., Shib J. Y. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer // *Mol Cancer*. – 2018. – Т. 17, № 1. – С. 38.

117. Nakamura H., Kawasaki N., Taguchi M., Kabasawa K. Survival impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis // *Thorax*. – 2006. – Т. 61, № 2. – С. 140–5.

## References

1. Greaves M., Maley C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012; 481(7381): 306-13.
2. Jackman D., Pao W., Riely G.J., Engelman J.A., Kris M.G., Janne P.A., et al. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28(2): 357-60.
3. Park K., Yu C.J., Kim S.W., Lin M.C., Sriuranpong V., Tsai C.M., et al. First-Line Erlotinib Therapy Until and Beyond Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Progression in Asian Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: The ASPIRATION Study. *JAMA Oncol*. 2016; 2(3): 305-12.
4. Burrell R.A., Swanton C. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Mol Oncol*. 2014; 8(6): 1095-111.
5. de Bruin E.C., McGranahan N., Mitter R., Salm M., Wedge D.C., Yates L., et al. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science*. 2014; 346(6206): 251-6.
6. Schuler M., Paz-Ares L., Sequist L.V., Hirsh V., Lee K.H., Wu Y.L., et al. First-line afatinib for advanced EGFRm+ NSCLC: Analysis of long-term responders in the LUX-Lung 3, 6, and 7 trials. *Lung Cancer*. 2019; 133: 10-9.

7. Chen Z.Y., Zhong W.Z., Zhang X.C., Su J., Yang X.N., Chen Z.H., et al. EGFR mutation heterogeneity and the mixed response to EGFR tyrosine kinase inhibitors of lung adenocarcinomas. *Oncologist*. 2012; 17(7): 978-85.
8. Taniguchi K., Okami J., Kodama K., Higashiyama M., Kato K. Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib. *Cancer Sci*. 2008; 99(5): 929-35.
9. Jiang S.X., Yamashita K., Yamamoto M., Piao C.J., Umezawa A., Saegusa M., et al. EGFR genetic heterogeneity of nonsmall cell lung cancers contributing to acquired gefitinib resistance. *Int J Cancer*. 2008; 123(11): 2480-6.
10. Bai H., Wang Z., Wang Y., Zhuo M., Zhou Q., Duan J., et al. Detection and clinical significance of intratumoral EGFR mutational heterogeneity in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2013; 8(2): e54170.
11. Zito Marino F., Liguori G., Aquino G., La Mantia E., Bosari S., Ferrero S., et al. Intratumor Heterogeneity of ALK-Rearrangements and Homogeneity of EGFR-Mutations in Mixed Lung Adenocarcinoma. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0139264.
12. McGranahan N., Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*. 2017; 168(4): 613-28.
13. Laurent-Puig P., Pekin D., Normand C., Kotsopoulos S.K., Nizard P., Perez-Toralla K., et al. Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(5): 1087-97.
14. Blokzijl F., de Ligjt J., Jager M., Sasselli V., Roerink S., Sasaki N., et al. Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. *Nature*. 2016; 538(7624): 260-4.
15. Bae T., Tomasini L., Mariani J., Zhou B., Roychowdhury T., Franjic D., et al. Different mutational rates and mechanisms in human cells at pregastrulation and neurogenesis. *Science*. 2018; 359(6375): 550-5.
16. Reiter J.G., Makobon-Moore A.P., Gerold J.M., Heyde A., Attiyeh M.A., Kobutek Z.A., et al. Minimal functional driver gene heterogeneity among untreated metastases. *Science*. 2018; 361(6406): 1033-7.
17. Almendro V., Cheng Y.K., Randles A., Itzkovitz S., Marusyk A., Ametller E., et al. Inference of tumor evolution during chemotherapy by computational modeling and in situ analysis of genetic and phenotypic cellular diversity. *Cell Rep*. 2014; 6(3): 514-27.
18. Rosenbloom D.I.S., Camara P.G., Chu T., Rabadan R. Evolutionary scalpels for dissecting tumor ecosystems. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017; 1867(2): 69-83.
19. Merlo L.M., Pepper J.W., Reid B.J., Maley C.C. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(12): 924-35.
20. Martincorena I., Campbell P.J. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*. 2015; 349(6255): 1483-9.
21. Maley C.C., Galipeau P.C., Li X., Sanchez C.A., Paulson T.G., Reid B.J. Selectively advantageous mutations and hitchhikers in neoplasms: p16 lesions are selected in Barrett's esophagus. *Cancer Res*. 2004; 64(10): 3414-27.
22. Shi W., Ng C.K.Y., Lim R.S., Jiang T., Kumar S., Li X., et al. Reliability of Whole-Exome Sequencing for Assessing Intratumor Genetic Heterogeneity. *Cell Rep*. 2018; 25(6): 1446-57.
23. Jamal-Hanjani M., Wilson G.A., McGranahan N., Birkbak N.J., Watkins T.B.K., Veeriah S., et al. Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017; 376(22): 2109-21.
24. Maley C.C., Aktipis A., Grabam T.A., Sottoriva A., Boddy A.M., Janiszewska M., et al. Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nat Rev Cancer*. 2017; 17(10): 605-19.
25. Bozic I., Antal T., Ohtsuki H., Carter H., Kim D., Chen S., et al. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(43): 18545-50.
26. Beerenwinkel N., Antal T., Dingli D., Traulsen A., Kinzler K.W., Velculescu V.E., et al. Genetic progression and the waiting time to cancer. *PLoS Comput Biol*. 2007; 3(11): e225.
27. de Visser J.A., Rozen D.E. Clonal interference and the periodic selection of new beneficial mutations in *Escherichia coli*. *Genetics*. 2006; 172(4): 2093-100.
28. Blakely C.M., Watkins T.B.K., Wu W., Gini B., Chabon J.J., McCoach C.E., et al. Evolution and clinical impact of co-occurring genetic alterations in advanced-stage EGFR-mutant lung cancers. *Nat Genet*. 2017; 49(12): 1693-704.
29. Yu H.A., Suzawa K., Jordan E., Zehir A., Ni A., Kim R., et al. Concurrent Alterations in EGFR-Mutant Lung Cancers Associated with Resistance to EGFR Kinase Inhibitors and Characterization of MTOR as a Mediator of Resistance. *Clin Cancer Res*. 2018; 24(13): 3108-18.
30. Jakobsen J.N., Santoni-Rugiu E., Graustlund M., Melchior L., Sorensen J.B. Concomitant driver mutations in advanced EGFR-mutated non-small-cell lung cancer and their impact on erlotinib treatment. *Oncotarget*. 2018; 9(40): 26195-208.
31. Hong S., Gao F., Fu S., Wang Y., Fang W., Huang Y., et al. Concomitant Genetic Alterations With Response to Treatment and Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients With EGFR-Mutant Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2018; 4(5): 739-42.
32. Rachiglio A.M., Fenizia F., Piccirillo M.C., Galetta D., Crino L., Vincenzi B., et al. The Presence of Concomitant Mutations Affects the Activity of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(3).
33. Bria E., Pilotto S., Amato E., Fassan M., Novello S., Peretti U., et al. Molecular heterogeneity assessment by next-generation sequencing and response to gefitinib of EGFR mutant advanced lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2015; 6(14): 12783-95.
34. Lim S.M., Kim H.R., Cho E.K., Min Y.J., Ahn J.S., Ahn M.J., et al. Targeted sequencing identifies genetic alterations that confer primary resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitor (Korean Lung Cancer Consortium). *Oncotarget*. 2016; 7(24): 36311-20.

35. Lee T, Lee B, Choi Y.L., Han J, Abn M.J., Um S.W. Non-small Cell Lung Cancer with Concomitant EGFR, KRAS, and ALK Mutation: Clinicopathologic Features of 12 Cases. *J Pathol Transl Med.* 2016; 50(3): 197-203.
36. Oxnard G.R., Hu Y, Mileham K.F., Husain H., Costa D.B., Tracy P., et al. Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients With EGFR T790M-Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib. *JAMA Oncol.* 2018; 4(11): 1527-34.
37. Liu Y, Sun L., Xiong Z.C., Sun X, Zhang S.L., Ma J.T., et al. Meta-analysis of the impact of de novo and acquired EGFR T790M mutations on the prognosis of patients with non-small cell lung cancer receiving EGFR-TKIs. *Onco Targets Ther.* 2017; 10: 2267-79.
38. Testa U, Castelli G., Pelosi E. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel).* 2018; 10(8).
39. Robinson D.R., Wu Y.M., Lonigro R.J., Vats P., Cobain E., Everett J., et al. Integrative clinical genomics of metastatic cancer. *Nature.* 2017; 548(7667): 297-303.
40. Kim E.S., Roy U.B., Ersek J.L., King J., Smith R.A., Martin N., et al. Updates Regarding Biomarker Testing for Non-Small Cell Lung Cancer: Considerations from the National Lung Cancer Roundtable. *J Thorac Oncol.* 2019; 14(3): 338-42.
41. Imielinski M., Berger A.H., Hammerman P.S., Hernandez B., Pugh T.J., Hodis E., et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell.* 2012; 150(6): 1107-20.
42. Offin M., Chan J.M., Tenet M., Rizvi H.A., Shen R., Riely G.J., et al. Concurrent RB1 and TP53 Alterations Define a Subset of EGFR-Mutant Lung Cancers at risk for Histologic Transformation and Inferior Clinical Outcomes. *J Thorac Oncol.* 2019; 14(10): 1784-93.
43. Planchard D. Have We Really MET a New Target? *J Clin Oncol.* 2018; JCO2018793455.
44. Bean J., Brennan C., Shib J.Y., Riely G., Viale A., Wang L., et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(52): 20932-7.
45. Schildhaus H.U., Schulteis A.M., Ruschhoff J., Binot E., Merkelbach-Bruse S., Fassunke J., et al. MET amplification status in therapy-naïve adeno- and squamous cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(4): 907-15.
46. Noro R., Seike M., Zou F., Soeno C., Matsuda K., Sugano T., et al. MET FISH-positive status predicts short progression-free survival and overall survival after gefitinib treatment in lung adenocarcinoma with EGFR mutation. *BMC Cancer.* 2015; 15: 31.
47. Morgillo F., Della Corte C.M., Fasano M., Ciardiello F. Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer. *ESMO Open.* 2016; 1(3): e000060.
48. Ramalingam S.S., Yang J.C., Lee C.K., Kurata T., Kim D.W., John T., et al. Osimertinib As First-Line Treatment of EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2018; 36(9): 841-9.
49. Tetsu O., Hangauer M.J., Phucbareon J., Eisele D.W., McCormick F. Drug Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer. *Chemotherapy.* 2016; 61(5): 223-35.
50. Piotrowska Z., Iozaki H., Lennerz J.K., Gainor J.F., Lennerz I.T., Zhu V.W., et al. Landscape of Acquired Resistance to Osimertinib in EGFR-Mutant NSCLC and Clinical Validation of Combined EGFR and RET Inhibition with Osimertinib and BLU-667 for Acquired RET Fusion. *Cancer Discov.* 2018; 8(12): 1529-39.
51. Minari R., Bordi P., Tiseo M. Third-generation epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer: review on emerged mechanisms of resistance. *Transl Lung Cancer Res.* 2016; 5(6): 695-708.
52. Camidge D.R., Davies K.D. MET Copy Number as a Secondary Driver of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2019; 37(11): 855-7.
53. Turke A.B., Zejnullahu K., Wu Y.L., Song Y., Dias-Santagata D., Lifshits E., et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell.* 2010; 17(1): 7-88.
54. Wei Z., An T., Wang Z., Chen K., Bai H., Zhu G., et al. Patients harboring epidermal growth factor receptor (EGFR) double mutations had a lower objective response rate than those with a single mutation in non-small cell lung cancer when treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Thorac Cancer.* 2014; 5(2): 126-32.
55. Santoni-Rugiu E., Melchior L.C., Urbanska E.M., Jakobsen J.N., Stricker K., Grauslund M., et al. Intrinsic resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Differences and Similarities with Acquired Resistance. *Cancers (Basel).* 2019; 11(7).
56. Kobayashi S., Boggon T.J., Dayaram T., Janne P.A., Kocher O., Meyerson M., et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2005; 352(8): 786-92.
57. Pao W., Miller V.A., Politi K.A., Riely G.J., Somwar R., Zakowski M.F., et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* 2005; 2(3): e73.
58. Arcila M.E., Oxnard G.R., Nafa K., Riely G.J., Solomon S.B., Zakowski M.F., et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(5): 1169-80.
59. Sequist L.V., Waltman B.A., Dias-Santagata D., Digumarthy S., Turke A.B., Fidias P., et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med.* 2011; 3(75): 75ra26.
60. Oxnard G.R., Arcila M.E., Chmielecki J., Ladanyi M., Miller V.A., Pao W. New strategies in overcoming acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(17): 5530-7.



61. Kwak E.L., Sordella R., Bell D.W., Godin-Heymann N., Okimoto R.A., Brannigan B.W., et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(21): 7665-70.
62. Li D., Ambrogio L., Shimamura T., Kubo S., Takahashi M., Chirieac L.R., et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene.* 2008; 27(34): 4702-11.
63. Engelman J.A., Zejnullahu K., Gale C.M., Lifshits E., Gonzales A.J., Shimamura T., et al. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. *Cancer Res.* 2007; 67(24): 11924-32.
64. Reckamp K.L., Giaccone G., Camidge D.R., Gadgeel S.M., Khuri F.R., Engelman J.A., et al. A phase 2 trial of dacomitinib (PF-00299804), an oral, irreversible pan-HER (human epidermal growth factor receptor) inhibitor, in patients with advanced non-small cell lung cancer after failure of prior chemotherapy and erlotinib. *Cancer.* 2014; 120(8): 1145-54.
65. Müller V.A., Hirsch V., Cadranel J., Chen Y.M., Park K., Kim S.W., et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13(5): 528-38.
66. Camidge D.R., Pao W., Sequist L.V. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014; 11(8): 473-81.
67. Yun C.H., Mengwasser K.E., Toms A.V., Woo M.S., Greulich H., Wong K.K., et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(6): 2070-5.
68. Chmielecki J., Foo J., Oxnard G.R., Hutchinson K., Ohashi K., Somwar R., et al. Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling. *Sci Transl Med.* 2011; 3(90): 90ra59.
69. Ichihara E., Lovly C.M. Shades of T790M: Intratumor Heterogeneity in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2015; 5(7): 694-6.
70. Tian P., Wang Y., Wang W., Li Y., Wang K., Cheng X., et al. High-throughput sequencing reveals distinct genetic features and clinical implications of NSCLC with de novo and acquired EGFR T790M mutation. *Lung Cancer.* 2018;124:205-10.
71. Fujita Y., Suda K., Kimura H., Matsumoto K., Arai T., Nagai T., et al. Highly sensitive detection of EGFR T790M mutation using colony hybridization predicts favorable prognosis of patients with lung cancer harboring activating EGFR mutation. *J Thorac Oncol.* 2012; 7(11): 1640-4.
72. Lettig L., Sabnane N., Pepe F., Cerutti R., Albeni C., Franzi F., et al. EGFR T790M detection rate in lung adenocarcinomas at baseline using droplet digital PCR and validation by ultra-deep next generation sequencing. *Transl Lung Cancer Res.* 2019; 8(5): 584-92.
73. Ricciuti B., Baglivo S., Pagliarunga L., De Giglio A., Bellezza G., Chiari R., et al. Osimertinib in patients with advanced epidermal growth factor receptor T790M mutation-positive non-small cell lung cancer: rationale, evidence and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol.* 2017; 9(6): 387-404.
74. Hata A., Katakami N., Kaji R., Yokoyama T., Kaneda T., Tamiya M., et al. Does afatinib plus bevacizumab combination therapy induce positive conversion of T790M in previously-negative patients? *Oncotarget.* 2018; 9(78): 34765-71.
75. Turner N.C., Reis-Filho J.S. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol.* 2012; 13(4): e178-85.
76. Piotrowska Z., Niederst M.J., Karlovich C.A., Wakelee H.A., Neal J.W., Mino-Kenudson M., et al. Heterogeneity Underlies the Emergence of EGFR T790 Wild-Type Clones Following Treatment of T790M-Positive Cancers with a Third-Generation EGFR Inhibitor. *Cancer Discov.* 2015; 5(7): 713-22.
77. Leonetti A., Sharma S., Minari R., Perego P., Giovannetti E., Tiseo M. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2019; 121(9): 725-37.
78. Yarden Y., Sliwkowski M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2(2): 127-37.
79. Sharma S.V., Gajowniczek P., Way I.P., Lee D.Y., Jiang J., Yuza Y., et al. A common signaling cascade may underlie "addiction" to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes. *Cancer Cell.* 2006; 10(5): 425-35.
80. Takeuchi K., Ito F. EGF receptor in relation to tumor development: molecular basis of responsiveness of cancer cells to EGFR-targeting tyrosine kinase inhibitors. *FEBS J.* 2010; 277(2): 316-26.
81. Dragowska W.H., Weppler S.A., Wang J.C., Wong L.Y., Kapanen A.I., Rawji J.S., et al. Induction of autophagy is an early response to gefitinib and a potential therapeutic target in breast cancer. *PLoS One.* 2013; 8(10): e76503.
82. Venugopalan A., Lee M.J., Niu G., Medina-Echeverez J., Tomita Y., Lizak M.J., et al. EGFR-targeted therapy results in dramatic early lung tumor regression accompanied by imaging response and immune infiltration in EGFR mutant transgenic mouse models. *Oncotarget.* 2016; 7(34): 54137-56.
83. Costa D.B., Halmos B., Kumar A., Schumer S.T., Huberman M.S., Boggon T.J., et al. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med.* 2007; 4(10): 1669-79; discussion 80.
84. Kleiman L.B., Maiwald T., Conzelmann H., Lauffenburger D.A., Sorger P.K. Rapid phospho-turnover by receptor tyrosine kinases impacts downstream signaling and drug binding. *Mol Cell.* 2011; 43(5): 723-37.
85. Regales L., Gong Y., Shen R., de Stanchina E., Vivanco I., Goel A., et al. Dual targeting of EGFR can overcome a major drug resistance mutation in mouse models of EGFR mutant lung cancer. *J Clin Invest.* 2009; 119(10): 3000-10.
86. Politi K., Zakowski M.F., Fan P.D., Schonfeld E.A., Pao W., Varmus H.E. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev.* 2006; 20(11): 1496-510.

87. Chen Z., Cheng K., Walton Z., Wang Y., Ebi H., Shimamura T., et al. A murine lung cancer co-clinical trial identifies genetic modifiers of therapeutic response. *Nature*. 2012; 483(7391): 613-7.
88. de Jong M., Essers J., van Weerden W.M. Imaging preclinical tumour models: improving translational power. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(7): 481-93.
89. Rosell R., Carcereny E., Gervais R., Vergnenegre A., Massuti B., Felip E., et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012; 13(3): 239-46.
90. Janjigian Y.Y., Smit E.F., Groen H.J., Horn L., Gettinger S., Camidge D.R., et al. Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations. *Cancer Discov*. 2014; 4(9): 1036-45.
91. Kris M.G., Natale R.B., Herbst R.S., Lynch T.J., Jr., Prager D., Belani C.P., et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA*. 2003; 290(16): 2149-58.
92. Chang J.W., Hou M.M., Hsieh J.J., Cheung Y.C., Wang H.M., Chen J.S., et al. Early radiographic response to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor in non-small cell lung cancer patients with epidermal growth factor receptor mutations: A prospective study. *Biomed J*. 2015; 38(3): 221-8.
93. Salvador-Coloma C., Lorente D., Palanca S., Simarro J., Mancheno N., Sandoval J., et al. Early radiological response as predictor of overall survival in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor mutations. *J Thorac Dis*. 2018; 10(3): 1386-93.
94. Kappers I., Klomp H.M., Burgers J.A., Van Zandwijk N., Haas R.L., van Pel R. Neoadjuvant (induction) erlotinib response in stage IIIA non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26(25): 4205-7.
95. Hisbida T., Nagai K., Mitsudomi T., Yokoi K., Kondo H., Horinouchi H., Salvage surgery for advanced non-small cell lung cancer after response to gefitinib. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010; 140(5): e69-71.
96. Zhong W.Z., Chen K.N., Chen C., Gu C.D., Wang J., Yang X.N., et al. Erlotinib Versus Gemcitabine Plus Cisplatin as Neoadjuvant Treatment of Stage IIIA-N2 EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer (EMERGING-CTONG 1103): A Randomized Phase II Study. *J Clin Oncol*. 2019; 37(25): 2235-45.
97. Aukema T.S., Kappers I., Olmos R.A., Codrington H.E., van Tinteren H., van Pel R., et al. Is 18F-FDG PET/CT useful for the early prediction of histopathologic response to neoadjuvant erlotinib in patients with non-small cell lung cancer? *J Nucl Med*. 2010; 51(9): 1344-8.
98. Weber B., Sorensen B.S., Knap M.M., Madsen H.H., Nexø E., Meldgaard P. Complete pathologic response in lung tumors in two patients with metastatic non-small cell lung cancer treated with erlotinib. *J Thorac Oncol*. 2011; 6(11): 1946-9.
99. Funakoshi Y., Takeuchi Y., Maeda H. Pneumonectomy after response to gefitinib treatment for lung adenocarcinoma. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2013; 21(4): 482-4.
100. Lopez-Gonzalez A., Almagro E., Salas C., Varela A., Provencio M. Use of a tyrosine kinase inhibitor as neoadjuvant therapy for non-small cell lung cancer: A case report. *Respir Med Case Rep*. 2013; 9: 8-10.
101. Provencio-Pulla M., Nadal-Alforja E., Cobo M., Insa A., Rivas M.C., Majem M., et al. Neoadjuvant chemo/immunotherapy for the treatment of stages IIIA resectable non-small cell lung cancer (NSCLC): A phase II multicenter exploratory study—NADIM study-SLCG. *Journal of Clinical Oncology*. 2018; 36(15\_suppl): 8521-.
102. Shu C.A., Grigg C., Chiuzan C., Garofano R.F., Patel V., Hernandez S., et al. Neoadjuvant atezolizumab + chemotherapy in resectable non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology*. 2018; 36(15\_suppl): 8532.
103. Kwiatkowski D.J., Rusch V.W., Chaff J.E., Johnson B.E., Nicholas A., Wistuba I.I., et al. Neoadjuvant atezolizumab in resectable non-small cell lung cancer (NSCLC): Interim analysis and biomarker data from a multicenter study (LCMC3). *Journal of Clinical Oncology*. 2019; 37(15\_suppl): 8503-.
104. Lara-Guerra H., Chung C.T., Schwock J., Pintilie M., Hwang D.M., Leighl N.B., et al. Histopathological and immunohistochemical features associated with clinical response to neoadjuvant gefitinib therapy in early stage non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2012; 76(2): 235-41.
105. Mazzoni F., Petreni P., Perna M., Scotti V., Bongiolatti S., Livi L., et al. Afatinib with subsequent surgery in stage III NSCLC with EGFR mutation: Lessons learned from two clinical experiences. *Tumori*. 2018; 104(6): NP5-NP9.
106. Siegmund K.D., Marjoram P., Woo Y.J., Tavaré S., Shibata D. Inferring clonal expansion and cancer stem cell dynamics from DNA methylation patterns in colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(12): 4828-33.
107. Varley K.E., Mutch D.G., Edmonston T.B., Goodfellow P.J., Mitra R.D. Intra-tumor heterogeneity of MLH1 promoter methylation revealed by deep single molecule bisulfite sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37(14): 4603-12.
108. Sharma S.V., Lee D.Y., Li B., Quinlan M.P., Takabashi F., Maheswaran S., et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*. 2010; 141(1): 69-80.
109. Ramirez M., Rajaram S., Steininger R.J., Osipchuk D., Roth M.A., Morinishi L.S., et al. Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nat Commun*. 2016; 7: 10690.
110. Guler G.D., Tindell C.A., Pitti R., Wilson C., Nichols K., KaiWai Cheung T., et al. Repression of Stress-Induced LINE-1 Expression Protects Cancer Cell Subpopulations from Lethal Drug Exposure. *Cancer Cell*. 2017; 32(2): 221-37 e13.
111. Mok T.S., Wu Y.L., Abn M.J., Garassino M.C., Kim H.R., Ramalingam S.S., et al. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017; 376(7): 629-40.

112. Wu Y.L., Sequist L.V., Hu C.P., Feng J., Lu S., Huang Y., et al. EGFR mutation detection in circulating cell-free DNA of lung adenocarcinoma patients: analysis of LUX-Lung 3 and 6. *Br J Cancer*. 2017; 116(2): 175-85.
113. Wu Y.L., Zhou C., Hu C.P., Feng J., Lu S., Huang Y., et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014; 15(2): 213-22.
114. Tanaka K., Babic I., Nathanson D., Akhavan D., Guo D., Gini B., et al. Oncogenic EGFR signaling activates an mTORC2-NF-kappaB pathway that promotes chemotherapy resistance. *Cancer Discov*. 2011; 1(6): 524-38.
115. Song Z., Zhu H., Guo Z., Wu W., Sun W., Zhang Y. Correlation of EGFR mutation and predominant histologic subtype according to the new lung adenocarcinoma classification in Chinese patients. *Med Oncol*. 2013; 30(3): 645.
116. Wu S.G., Shib J.Y. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2018; 17(1): 38.
117. Nakamura H., Kawasaki N., Taguchi M., Kabasawa K. Survival impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Thorax*. 2006; 61(2): 140-5.