

Masterarbeit

Analyse der zellfreien zirkulierenden Tumor DNA bei Patienten mit EGFR – mutiertem, nicht kleinzelligem Lungenkarzinom unter Tyrosinkinaseinhibitor Therapie

eingereicht von

Dr. Ulrike Setinek

Zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

(Msc)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Humangenetik

Unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr. rer. nat. Ellen Heitzer

Wien, 1.9.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Wien, am 1.9.2017

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	4
Zusammenfassung	5
Abstract	7
1 Einleitung	9
1.1 Epidemiologie des Lungenkarzinoms	9
1.2 Histologische Klassifikation der Lungentumore	9
1.3 Genetische Aspekte des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms	11
1.3.1 EGFR Mutationen	11
1.3.2 Arten von EGFR Inhibitoren	13
1.3.3 Der T790M Resistenzmechanismus	14
1.3.4 Resistenz nach TKI Therapie	15
1.3.5 Nachweismethoden der EGFR Mutationen	16
1.3.6 Zellfreie zirkulierende Tumor DNA	18
1.4 Ziel der Arbeit	20
2 Material und Methoden	20
2.1 Gewerbeentnahme und histologische Diagnostik	20
2.2 EGFR Mutationstestung aus Gewebe	21
2.3 EGFR Mutationstestung aus Plasmaproben	23
2.3.1 Blutprobengewinnung	23
2.3.2 EGFR Mutationstestung aus Plasmaproben	24
2.4 Statistik	26
3 Ergebnisse	26
3.1 Ergebnisse der EGFR Mutationsanalyse aus Gewebeproben	27
3.2 Ergebnisse der EGFR Mutationsanalyse aus Rebiopsie Gewebe	28

3.3 Ergebnisse der EGFR Mutationsanalyse aus Liquid Biopsy	30
3.3.1 Aktivierende EGFR Mutationen aus Liquid Biopsy	31
3.3.2 EGFR Resistenzmutationen aus Liquid Biopsy	31
3.3.3 Ergebnisse von T790M Nachweis mittels Histologie – cobas® EGFR Mutation Testv2 und ddPCR	35
3.3.4 Vergleiche der EGFR Mutationsanalyse aus Gewebe und Liquid Biopsy	37
4 Diskussion	38
5 Literatur	48

Abkürzungen

SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom
NSCLC	nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
<i>EGFR</i>	epidermales Wachstumsfaktor Rezeptor Gen
TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
RTK	Rezeptor Tyrosinkinase
ATP	Adenosin Triphosphat
IPASS	Iressa Pan Asia Studie
ddPCR	digitale droplet Polymerase Ketten Reaktion
ctDNA	zellfreie zirkulierende Tumor DNA
cfDNA	zellfreie zirkulierende DNA
°C	Grad Celsius
ng	Nanogramm
µl	Microliter
K3EDTA	Tri- Kalium-Ethylendiamintetraacetat
rpm/min	revolutions per minute
ml	Milliliter
SQI	semiquantitativer Index
DNA	Desoxyribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ZP	Zeitpunkt

Zusammenfassung

Lungenkrebs ist sowohl in Österreich als auch weltweit eine der häufigsten Krebserkrankungen bei Männern und Frauen. Bei der histologischen Untergruppe der Adenokarzinome konnte die Wirksamkeit von zielgerichteten Therapien, welche den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) blockieren, in zahlreichen Studien belegt werden. Es kommt jedoch nach initialem Ansprechen durchschnittlich nach 8-16 Monaten zu einer Tumorprogression, die in etwa 60% der Fälle durch das Auftreten einer Punktmutation im Exon20 (T790M) des *EGFR* Gens bedingt ist. Um eine entsprechende Therapieänderung rechtzeitig einzuleiten, ist es wichtig die Resistenzursache frühzeitig nachzuweisen. Neben einer neuerlichen Gewebeentnahme wurden in den letzten Jahren vermehrt Nachweismöglichkeiten von Mutationen aus zellfreier zirkulierender Tumor DNA (ctDNA) aus dem Blutplasma publiziert. Die Analyse solcher molekularen Marker aus dem Plasma wird häufig als Liquid Biopsy bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht ob der cobas® EGFR Mutation Testv2 zum Therapiemonitoring von Patienten mit *EGFR* Mutationen und zielgerichteter Therapie geeignet ist, eine Resistenzentwicklung in Form der T790M Mutation nachzuweisen.

Von 142 Patienten mit *EGFR* mutiertem Lungenkarzinom wurden 479 Blutproben im Zeitraum Jänner 2016 bis Juni 2017 untersucht. Bei 120 Patienten war der Mutationsstatus aus der Gewebebiopsie bekannt. Die Häufigkeitsverteilung der aktivierenden *EGFR* Mutationen in Gewebe -, und Blutproben waren vergleichbar. Die T790M Resistenzmutation konnte allerdings nur bei 16% der Patienten detektiert werden. Die Menge an mutierter DNA, die mit dem semiquantitativen Index (SQI) angegeben wird, zeigte nach Therapiestart einen deutlichen Abfall. Ein Vergleich der Ergebnisse des cobas® EGFR Mutation Testv2 mit den Ergebnissen einer extern durchgeführten digitalen droplet PCR zeigte, dass die *EGFR* Mutationen im Bereich der vom Testsystem angegebenen Detektionslimits verlässlich detektiert werden. Die Sensitivität (25%-48%) und Spezifität (99%-100%) des Bluttests beziehen sich auf das Ergebnis der Mutationstestung der Gewebeprobe und

entsprechen bereits publizierten Werten. Die Frage ob ein niedrigeres Detektionslimit nicht zu einem vermehrten Nachweis falsch positiver Resistenzmutationen führt, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Als klinisch relevante Konsequenz ergibt sich aus dieser Studie, dass Ergebnisse von Mutationstestungen aus Gewebe und Blutproben im klinisch- pathologisch- molekulargenetischen Tumorboard gemeinsam besprochen werden sollten, um die beste Therapieentscheidung zu treffen.

Abstract

Lung cancer is one of the common cancers worldwide among both men and women. In the histologic subgroup of adenocarcinomas, the efficacy of targeted therapy, which selectively blocks the epidermal growth factor receptor (EGFR), has been proven in numerous studies. However, after an initial response tumour progression occurs within 8-16 months. The major cause of treatment failure is the occurrence of a point mutation in the exon20 (T790M) of the *EGFR* gene, which is observed in approximately 60% of the cases. An early detection of the resistance mechanism is of outmost interest, to identify early in order to alter the therapy adequately. As an alternative to a rebiopsy, mutation detection from cell free circulating tumour DNA (ctDNA) in blood plasma has been described in the last years. The analysis of molecular markers from blood is referred to as liquid biopsy.

Here we investigated whether the cobas® EGFR Mutation Testv2 is suitable for monitoring *EGFR* mutations in blood from patients with targeted therapy and if the occurrence of the T790M mutation can predict the early phase of resistance.

A total of 479 blood samples from 142 patients with *EGFR* mutated lung cancer were investigated from January 2016 to June 2017. For 120 patients, the results of *EGFR* mutation testing from a tissue biopsy were known. The frequency of activating *EGFR* mutations in tissue and blood was highly consistent comparable. However, the T790M mutation was detected in only 16% of the patients. The amount of mutated DNA, which is indicated by the Semi Quantitative Index (SQI), showed a dramatic decrease after the start of the target therapy. The results of the cobas® EGFR Mutation Testv2 were compared to a digital droplet PCR assay that was performed in an external laboratory. It could be shown that the mutations are reliably detected in the range of the detection limits indicated by the cobas® EGFR Mutation Test V2. When using the mutation status of the tissue as a reference, the diagnostic sensitivity (25%-48%) and the specificity (99%-100%) of the blood test for the activating *EGFR* mutations was comparable to published data.

The question whether a lower detection limit would increase the detection of false-positive resistance mutations remains to be investigated in further studies.

Taken together, these data indicated that in order to find the best therapy options for the patients, results from mutation testing of tissue and blood should be discussed in a multidisciplinary tumour board including clinicians, pathologists as well as molecular biologists.

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Lungenkarzinoms

Lungenkrebs ist weltweit die häufigste durch Krebs bedingte Todesursache (Travis et al. 2015). In Österreich ist Lungenkrebs die zweithäufigste Krebserkrankung bei Männern und die dritthäufigste bei Frauen. Bei Männern ist Lungenkrebs die häufigste Krebstodesursache, bei Frauen die zweithäufigste. Die Entwicklung der Lungenkrebserkrankungen bei Frauen zeigt im vergangenen Jahrzehnt einen deutlichen Anstieg sowohl der Neuerkrankungen als auch der Sterberate um 21% bzw. 22%. Bei Männern hingegen zeigte sich eine Abnahme um 13% beziehungsweise 14%. Zum Diagnosezeitpunkt finden sich bei mindestens einem Drittel der Betroffenen bereits Fernmetastasen.

Tabakrauch ist neben anderen inhalativen Noxen die häufigste Lungenkrebsursache. Das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken steigt mit der Dauer des Rauchens und der Zahl der pro Tag gerauchten Zigaretten. Das Erkrankungsrisiko sinkt zwar nach Beendigung des Rauchens, erreicht aber nie das Risiko eines Nie-Rauchers (Travis et al., 2015). Das Lungenkrebsrisiko von Nichtrauchern ist verglichen mit Rauchern 20-30mal geringer. In dieser Population sind die Hauptrisikofaktoren das Passivrauchen, Radon, Strahlenexposition, Asbest sowie die berufliche Exposition inhalativer Noxen (Travis et al., 2015).

1.2 Histologische Klassifikation der Lungentumore

Die aktuelle Klassifikation der Lungentumore wurde 2015 von der Weltgesundheitsbehörde (WHO) publiziert und zeigt folgende histologische Klassifikation der epithelialen Lungentumore (Travis et al., 2015).

- Adenokarzinom
- Plattenepithelkarzinom
- Neuroendokrine Tumore

- Großzelliges Karzinom
- Adenosquamöses Karzinom
- Pleomorphes Karzinom
- Spindelzelliges Karzinom
- Riesenzelliges Karzinom
- Karzinosarkom
- Andere und unklassifizierte Karzinome
- Speicheldrüsenartige Tumore
- Papillome
- Adenome

Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen histologischen Typen hat sich seit Ende der 1970er Jahre geändert. Der Anteil der Plattenepithelkarzinome sank von 32% im Beobachtungszeitraum 1977-1988 auf 20% in den Jahren 2006-2010. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der Adenokarzinome von unter 30% (1977-1988) auf über 40% (2006-2010). Ähnliche Häufigkeitsveränderungen finden sich auch bei den anderen histologischen Typen. Eine hypothetische Erklärung für die geänderte Häufigkeitsverteilung ist die Änderung der Zusammensetzung der Zigaretteninhaltsstoffe. Unter anderem hat die Einführung von Filterzigaretten, und somit eine Dosisreduktion von Teer und Nikotin bewirkt, dass der Tabakrauch weiter in die Peripherie der Atemwege gelangt. Das führt zu einem höheren Anteil von Adenokarzinomen, die im Gegensatz zu Plattenepithelkarzinomen zumeist in den peripheren Atemwegen entstehen (Travis et al., 2015).

1.3 Genetische Aspekte des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms

Vor der 2004 erschienenen WHO Klassifikation der Lungenkarzinome hatte eine genaue histologische Zuordnung der Tumore keine therapeutische Implikation. Aus klinisch-therapeutischer Sicht war die Unterscheidung kleinzelliges (SCLC) oder nicht kleinzelliges (NSCLC) Lungenkarzinom ausreichend (Travis et al., 2015).

Ab 2004 erschienen Arbeiten, die ein Ansprechen von Adenokarzinomen mit Mutationen im epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor Gen (*EGFR*), auf zielgerichtete Therapien mit Tyrosinkinase Inhibitoren (TKI) beschrieben.

Bezogen auf die Häufigkeit von *EGFR* Gen mutierten NSCLC finden sich deutliche ethnische / geographische Unterschiede. Während die Mutationsrate in Europa und Nordamerika mit 10-15% beziehungsweise 7-8% relativ gering ist, findet man in Asien bei 30-40% der NSCLC *EGFR* Mutationen. Zudem sind auch geschlechtsspezifische Unterschiede beschrieben. Während bei Frauen die *EGFR* Gen Mutationsrate bei 22-60% liegt, ist sie bei Männern zwischen 8-37%. Auch der Raucherstatus beeinflusst die Mutationsrate. Sie liegt bei 32-64% bei Nichtrauchern und bei 6-33% bei Rauchern (Shigematsu et al., 2005).

1.3.1 *EGFR* Mutationen

Der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) gehört zur Familie der Rezeptor Tyrosinkinasen (RTK), die vier Mitglieder umfasst – EGFR (HER1/ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4). In ihrer physiologischen Funktion regulieren sie zahlreiche Entwicklungs- und Stoffwechselprozesse (Gazdar, 2009). Sie besitzen eine signifikante Homologie in der Kinase Domäne, unterscheiden sich jedoch in den codierenden Regionen für die extrazelluläre Domäne und den c-terminalen Abschnitt. Der EGFR ist ein 170-kDa transmembranes Glykoprotein mit einer großen extrazellulären Region, einer transmembranen Domäne und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase Aktivität (Normanno et al., 2006). Nach Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne erfolgt die Dimerisierung des ErbB Rezeptors, wobei zwei Moleküle entweder ein Homodimer oder Heterodimer

bilden. Durch Autophosphorylierung erfolgt die Aktivierung der Tyrosinkinase und nachgeschaltete Signalwege werden aktiviert. Am besten untersucht sind der RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK und der PI3k-AKT-MTOR Signaltransduktionsweg (Normanno et al., 2006). Verschiedene Mechanismen führen zu einer erhöhten EGFR Aktivität und in Folge zu einer erhöhten Zellproliferation. Oft liegt in Tumorzellen eine Überexpression des EGFR vor aber auch durch autokrine oder parakrine Bildung von Wachstumsfaktoren kann eine konstante Stimulierung der Signaltransduktionswege stattfinden.

Im Lungenkarzinom werden die RTK über unterschiedliche Mechanismen aktiviert. Unter anderem sind Amplifikation der RTK Gene, Mutationen der RTK Gene, Inversion/Translokation von Genen mit nachfolgender Aktivierung oder Inaktivierung von Regulator Proteinen beschrieben (Popper et al., 2014). Die abnorme Aktivierung von EGFR in Tumorzellen führt zu längerem Überleben, erhöhter Zellproliferation, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen. Eine EGFR Überexpression kann in über 60% der Tumore von Patienten mit metastasiertem NSCLC beobachtet werden (Sharma et al., 2007). Alle aktivierenden Mutationen des *EGFR* Gens liegen in der Adenosintriphosphat (ATP) Bindungsstelle der RTK Domäne (Kumar et al., 2008). Sogenannte „aktivierende Mutationen“ führen zu einer von Liganden unabhängigen, konstitutionellen Aktivierung der Tyrosinkinase (Gazdar, 2009).

In einer Arbeit von Shigematsu et al. wurde die Tyrosinkinase Domäne des *EGFR* Gens von 96 unselektierten NSCLC sequenziert. Alle Mutationen fanden sich in den ersten 4 Exons (Exon18 bis 21) der Tyrosinkinase Domäne. Drei unterschiedliche Typen von Mutationen wurden gefunden. Am häufigsten fanden sich 11 unterschiedliche Deletionen im Exon 19, bezeichnet mit 1-11. Die Deletionen umfassten 3 bis 7 Codons, wobei die Codons 747 bis 749 konstant deletiert waren. An zweiter Stelle fanden sich Missense Mutationen in den Exons 18, 20 und 21 bezeichnet mit M1 bis M9. Am häufigsten wurde die L858R Mutation im Exon 21 gefunden, welche die Nukleotidposition 2573 betrifft und eine Transversion von T>G ist wodurch es zu einem Aminosäuretausch von Arginin nach Leucin an der Position 858 kommt. Seltener Substitutionen führen zu einer Substitution von Glycin an

Position 719 nach Alanin (G719A), Cystein (G719C) oder Serin (G719S). Zudem kann es zu einer Stoppmutation an dieser Position kommen (G719X). An dritter Stelle fanden sich 8 unterschiedliche Duplikationen und/oder Deletionen von 1 bis 3 Codons im Exon 20, welche die Aminosäuren 770 bis 776 betrafen (Gazdar, 2009; Shigematsu et al., 2005). Deletionen im Exon19 (44% aller *EGFR* Mutationen) und die Punktmutation L858R im Exon21 (41% aller *EGFR* Mutationen) werden am häufigsten beobachtet (Gazdar, 2009).

1.3.2 Arten von EGFR Inhibitoren

EGFR kann am extrazellulären Abschnitt über monoklonale Antikörper, wie Cetuximab oder Panitumumab inhibiert werden. Alternativ kann die intrazelluläre Domäne des Rezeptors mittels sogenannter „small molecules“, wie zum Beispiel Erlotinib und Gefitinib, die als kompetitive Hemmer von ATP wirken, reversibel oder irreversibel blockiert werden. Diese Wirkstoffe werden als TKI bezeichnet (Paez et al., 2004).

Die ersten EGFR TKI Studien mit Erlotinib und Gefitinib wurden in unselektierten Patientengruppen angewandt und zeigten verglichen mit den Placebo Gruppen eine bessere Ansprechrate, besseres Gesamtüberleben, sowie verminderte Tumorassoziierte Symptome wie Husten, Schmerzen und Atemnot. In diesen Studien wurde noch keine molekulargenetische Testung des Tumorgewebes durchgeführt. Trotzdem zeigten sich bestimmte klinische Merkmale wie weibliches Geschlecht, asiatische Ethnizität, Nie-Raucher, histologischer Tumortyp mit einem besseren Ansprechen assoziiert (Shepherd et al., 2005; Thatcher et al., 2005). Die Iressa Pan-Asia Studie (IPASS) zeigte erstmals, dass Patienten mit Nachweis einer *EGFR* Mutation im Tumorgewebe unter Gefitinib Therapie eine bessere Ansprechrate und ein längeres progressionsfreies Überleben im Vergleich zu Chemotherapie aufweisen (Fukuoka et al., 2011). Erlotinib und Gefitinib sind die erste Generation von TKI und binden reversibel an die Tyrosinkinase Domäne des EGFR. Die Bindung an die mutierte Tyrosinkinase ist stärker als an die Wildtyp Form. Zusätzlich wird die Affinität der Tyrosinkinase für ATP, dem kompetitiven Bindungsmolekül, herabgesetzt (Carey

et al., 2006). Afatinib, Dacomitinib, Neratinib gehören zur zweiten Generation von TKI. Sie binden irreversibel an die Tyrosinkinase Domäne und haben in vitro eine zusätzliche Aktivität gegen die T790M Resistenzmutation (Li et al., 2008). TKI der dritten Generation haben eine stärkere Wirksamkeit gegen die T790M Mutation. Osimertinib bindet irreversibel an den EGFR mit L858R Mutation, Exon 19 Deletion, T790M Mutation und Doppelmutationen, die eine T790M Mutation beinhalten. Derzeit ist Osimertinib die einzige zugelassene Substanz aus dieser Gruppe. Die Zulassung durch die europäische Zulassungsbehörde erfolgte im Februar 2016 unter der Voraussetzung des positiven Nachweises der T790M Mutation (Saad et al., 2017).

1.3.3 Der T790M Resistenzmechanismus

Obwohl die meisten EGFR positiven Patienten von einer EGFR Blockade mittels TKI profitieren, kommt es nach 8-16 Monaten, aufgrund sekundärer Mutationen im *EGFR* Gen zu Resistenzen (Camidge et al., 2014; T. S. K. Mok et al., 2009; Yu et al., 2013). Diese Resistenzmutationen sind vor allem im Exon 20 beschrieben, welches für die Kinase Domäne codiert. Am häufigsten wird eine Transition von Cytosin zu Thymin an der Nucleotidposition 2369 im Exon 20 gefunden, woraus eine Aminosäuresubstitution an der Position 790 von Threonin nach Methionin (T790M) resultiert (Yun et al., 2008). Das führt zu einer erhöhten Affinität des Rezeptors für ATP, welches wiederum zu einer kompetitiven Hemmung für die reversible Bindung von Erlotinib und Gefitinib führt (Yun et al., 2008). Die T790M Mutation entsteht in den meisten Fällen als Folge einer Therapie mit TKI.

Allerdings wurden auch de novo *EGFR* T790M Mutationen vor Einleitung einer TKI Therapie beschrieben. Zumeist treten sie gemeinsam mit einer aktivierenden Mutation auf (Yu et al., 2014). Die Häufigkeit ist in der Literatur von unter 1% (Inukai et al., 2006) bis zu 79% (Fujita et al., 2012) angegeben und von der verwendeten Nachweismethode abhängig. Sensitive Tests, wie die digitale droplet PCR (ddPCR), können kleine, resistente Tumorzellsubklone in einer größeren Population sensitiver Tumorzellen detektieren (Watanabe et al., 2015). So ist es möglich ein *EGFR* T790M mutiertes Allel unter 500 *EGFR* Wildtyp Allelen nachzuweisen. Der Nachweis eines

resistenten T790M Subklons vor Therapiestart führt allerdings nicht zu einem vollständigen Therapieversagen einer TKI Therapie, jedoch sind Ansprechraten mit 57%-70% geringer als bei ausschließlichem Vorliegen einer aktivierenden Mutation (Maheswaran et al., 2008; Rosell et al., 2011). Die T790M Mutation kann in seltenen Fällen auch als Keimbahnmutation vorkommen und sollte in diesen Fällen auch mit weniger sensitiven molekularen Routinetests nachweisbar sein, da man von einer 50 prozentigen Allelfrequenz ausgehen kann (Oxnard et al., 2012).

1.3.4 Resistenz nach TKI Therapie

Die Mehrzahl der Patienten, die mit einem EGFR TKI behandelt werden, zeigen nach 8 -16 monatiger Therapiedauer einen Progress (Cortot and Jänne, 2014). Von klinischer Seite wird zwischen primärer und sekundärer EGFR TKI Resistenz unterschieden.

Eine primäre Resistenz besteht, wenn Patienten unter TKI Therapie eine Tumorprogression zeigen beziehungsweise Stabilität der Tumorerkrankung der am besten erzielbare Therapieeffekt ist. Für ein fehlendes Ansprechen werden einerseits Patientenfaktoren wie fortlaufender Zigarettenkonsum genannt. Auch das Vorliegen einer verminderten Expression auf mRNA Ebene von BIM, einem pro-apoptotisch wirkenden Protein der BCL-2 Familie, wurde als ursächlicher Faktor beschrieben (Costa et al., 2007). Andererseits gibt es auch Tumorabhängige Faktoren für eine primäre Resistenz. So sind nicht alle aktivierenden *EGFR* Mutationen gleich sensitiv für eine TKI Therapie. Bei einigen Exon 20 Insertionen, die ca. 5-10% aller *EGFR* Mutationen ausmachen, findet sich eine intrinsische Resistenz (Arcila et al., 2013). Auch das Vorliegen einer isolierten T790M Mutation in Therapie-naiven Tumoren führt zu einer primären Resistenz (Yu et al., 2014).

Eine sekundäre Resistenz besteht, wenn eine Tumorprogression nach initialem Therapieansprechen oder längerer stationärer Erkrankung vorliegt (Cortot and Jänne, 2014). Um in dieser Situation den Resistenzmechanismus zu erfassen, werden zumeist Gewebeproben nach Therapieversagen molekulargenetisch analysiert und

mit den Ergebnissen der prätherapeutischen Proben verglichen. Mehrere größere Rebiopsie Serien sind publiziert (Kuiper et al., 2014; Yu et al., 2013). Möglichkeiten für eine Gewebegewinnung sind CT gezielte Biopsien, bronchoskopisch oder mediastinoskopisch gewonnenes Tumormaterial oder Pleurapunktate bei Pleuraerguss sowie Biopsien von extrathorakalen Metastasen. Die Auswahl der Entnahmelokalisation sollte den geringst möglichen invasiven Eingriff darstellen. In **Abbildung 1** sind die Hauptmechanismen einer TKI Resistenz angegeben.

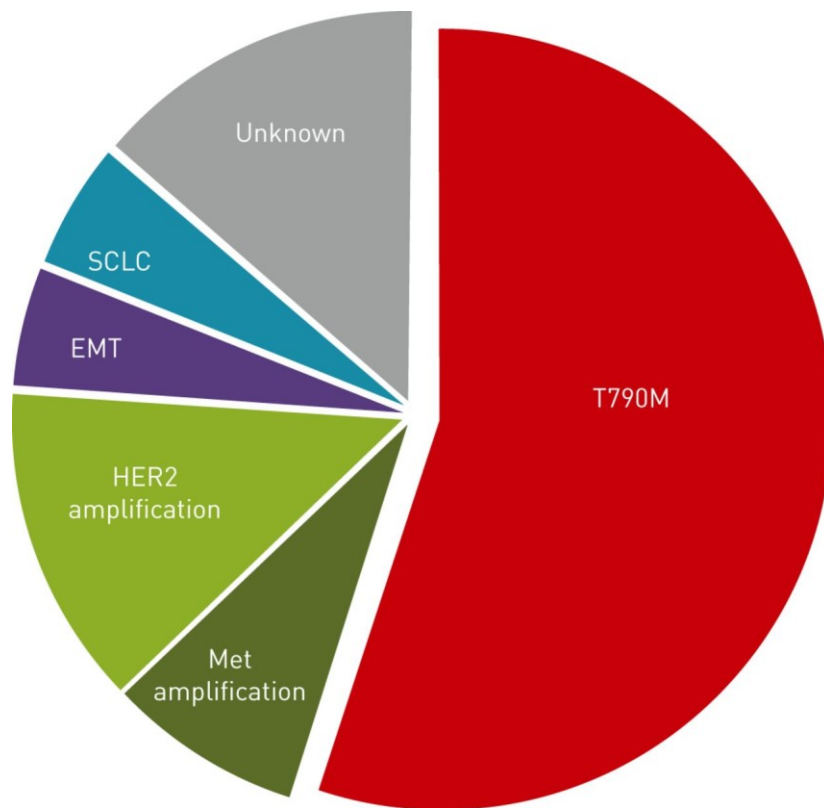


Abbildung 1: Hauptmechanismen der erworbenen EGFR TKI Resistenz bei EGFR mutierten NSCLC; SCLC: kleinzelliges Lungenkarzinom, EMT: epithelial – mesenchymal transition (adaptiert aus Cortot AB, Jänne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. Eur Respir Rev 2014;23:356-366)

1.3.5 Nachweismethoden der **EGFR** Mutationen

Der Nachweis einer EGFR Mutation erfolgt meistens aus histologischem oder zytologischem Material. Zum Mutationsnachweis steht eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden zur Verfügung. Prinzipiell unterscheidet man zwischen Screening-, und

zielgerichteten Methoden. Screeningmethoden werden zum Nachweis bekannter und unbekannter *EGFR* Mutationen angewandt. Dazu werden zumeist Sequenziertechniken verwendet, die in vielen Labors zur Verfügung stehen. Der Nachteil der Sequenziermethoden ist die Sensitivität, die im Vergleich zu zielgerichteten Methoden wesentlich geringer ist, und häufig ein Anreicherungsverfahren wie Makro-, oder Mikrodissektion benötigt. Zusätzlich ist erfahrenes Personal erforderlich und die Methoden sind zumeist laborintensiv und zeitaufwändig.

Im Gegensatz dazu werden zielgerichtete Methoden zum Nachweis bekannter Mutationen eingesetzt. Die Vorteile dieser Verfahren sind der geringere Zeitaufwand, die höhere Sensitivität und leicht zu etablierende Technologien. Der Nachteil besteht darin, dass nur bekannte, im Testsystem enthaltene Mutationen detektiert werden können und die Reagenzien oft teuer sind (Ellison et al., 2013).

Es gibt zahlreiche publizierte Empfehlungen von Expertenkonsortien unterschiedlicher Länder zur *EGFR* Mutationstestung. Eine internationale Empfehlung des College of American Pathologists, der International Society for the Study of Lung Cancer und der Association for Molecular Pathology aus 2013 empfiehlt eine *EGFR* Mutationstestung bei allen fortgeschrittenen Adenokarzinomen der Lunge sowie Tumoren mit Adenokarzinomkomponente unabhängig von klinischen Charakteristika wie Geschlecht, Raucherstatus oder Ethnie. Die Testung kann sowohl aus dem Primärtumor als auch aus Metastasen erfolgen. Die Methodik sowie die Gewebeanforderungen müssen allerdings von jedem Testlabor validiert werden. Die etablierte Methode soll *EGFR* Mutationen bei einem Tumorzellgehalt über 10% verlässlich nachweisen können. Aktivierende *EGFR* Mutationen die in 1% der Tumorzellen vorliegen, sollten zusätzlich im Befund angegeben werden (Lindeman et al., 2013). Die Arbeitsgruppe Lungenpathologie der österreichischen Gesellschaft für Pathologie hat 2017 aktuelle Empfehlungen für prädiktive molekulare und immunhistochemische Testung bei NSCLC publiziert. Im Gegensatz zur amerikanischen Empfehlung wird eine *EGFR* Reflextestung unabhängig vom Tumorstadium durchgeführt. Der Vorteil bei dieser Vorgehensweise liegt darin, dass

zum Zeitpunkt einer späteren Metastasierung die geforderte Mutationstestung bereits vorliegt. Die Testung soll Mutationen in den Exons 18 – 21 des *EGFR* Gens nachweisen, die mit einer Häufigkeit von 8 - 12 % auftreten. Die verwendeten Tests müssen vom jeweiligen Labor validiert werden. Die Gewebeauswahl für die Testung soll von einem Pathologen mit Erfahrung in Thoraxpathologie erfolgen. Die Ergebnisse der molekularen Testung sowie der histologischen Befundung sollen in einem Befund integriert sein. Zur Qualitätssicherung soll an internationalen Ringversuchen teilgenommen werden (Popper et al., 2016).

Die Angabe von Sensitivität und Spezifität ist essentiell, da ultra-hoch sensitive Methoden anfälliger für falsch positive Artefakte sind. So kann bei massenspektrometrischen Methoden ein geringer DNA Gehalt oder eine schlechte DNA Qualität eine Mutation vortäuschen, die von einer echten Mutation nicht zu unterscheiden sein kann (Yu et al., 2014). Bei Formalin fixierten, Paraffin eingebetteten Probenmaterial kann es durch die Fixierung zu Sequenzalterationen mit C-T und G-A Transitionen kommen, analog zur Veränderung der T790M Mutation (Williams et al., 1999).

1.3.6 Zellfreie zirkulierende Tumor DNA

Da die Durchführung einer Rebiopsie beim progredienten Lungenkarzinom oft als problematisch angesehen wird, wurde in den letzten Jahren die Untersuchung von zellfreier zirkulierender Tumor DNA (ctDNA), als nicht invasive Alternative zur Rebiopsie erforscht. Diese Vorgangsweise wird als Liquid Biopsy bezeichnet. Die Untersuchung von ctDNA wird auch als Alternative zur primären Gewebebiopsie beschrieben, wenn aufgrund eines schlechten Performance Status, einer ungeeigneten Gewebeprobe oder zu langer Dauer der molekularen Analyse eine Mutationstestung nicht durchgeführt werden kann (Fenizia et al., 2015). Es wird auch diskutiert, dass die ctDNA im Gegensatz zur Gewebebiopsie die genetischen Veränderungen aller Tumorlokalisationen repräsentiert.

Die erste Beschreibung von zellfreier DNA (cfDNA) im Blut ist aus dem Jahr 1948 (Mandel and Metais, 1948). In einer Arbeit von Leon et al. wurde gezeigt, dass Karzinompatienten höhere Plasmaspiegel an cfDNA haben als gesunde Kontrollpersonen. In weiteren Studien zeigte sich, dass metastasierte Patienten zumeist höhere Mengen an cfDNA aufweisen als nicht metastasierte Patienten (Bettegowda et al., 2014; Leon et al., 1977). Als Quelle der ctDNA werden Nekrose und Apoptose angenommen. Durch schnelleres Wachstum von Tumorzellen im Vergleich zu den versorgenden Blutgefäßen entsteht Hypoxie, die zu Apoptose führen kann und somit maßgeblich zur DNA- Freisetzung beiträgt. Aber auch Tumorzellnekrose führt zu Freisetzung von Tumor DNA. Dass beide Mechanismen eine Rolle spielen erkennt man aus den Fragmentlängen der ctDNA. So stammen Fragmente in der Länge von 180bp beziehungsweise ein Vielfaches davon von Apoptosevorgängen, während Nekrose zu längeren Fragmenten führt. Beide Typen von DNA Fragmenten findet man im Plasma von Tumorpatienten (Jahr et al., 2001). Auch eine aktive Sekretion der DNA von Tumoren in die Zirkulation wurde beschrieben (Stroun et al., 2001).

2009 publizierten Kuang et al. den Nachweis einer *EGFR* T790M Mutation aus ctDNA nach Entwicklung einer TKI Resistenz (Kuang et al., 2009). Seither gibt es eine Vielzahl an Publikationen über Sensitivität und Spezifität unterschiedlicher Nachweismethoden von ctDNA (Thress et al., 2015). Im Rahmen der AURA Studie wurde die Wirksamkeit von Osimertinib (AZD9291) bei aktivierenden (Exon19 Deletionen, L858R Punktmutation) und Resistenzmutationen (T790M) des *EGFR* Gens nachgewiesen. Im Rahmen der Studie wurde ein Vergleich mehrerer Plattformen zum Nachweis von *EGFR* Mutationen mittels ctDNA aus Plasma durchgeführt (Thress et al., 2015).

Im Jahr 2016 wurde der cobas® *EGFR* Mutation Testv2 (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA, USA) von der FDA (Food and Drug Administration) als erster Test zum Nachweis von *EGFR* Mutationen aus dem Plasma zugelassen (Malapelle et al., 2017).

1.4 Ziel der Arbeit

Aufgrund zahlreicher Publikationen über Sensitivität und Spezifität der unterschiedlichen Nachweisverfahren von *EGFR* Mutationen aus ctDNA wurde im Rahmen dieser Studie untersucht, ob der cobas® *EGFR* Mutation Testv2 zum Therapiemonitoring von NSCLC Patienten mit *EGFR* Mutationen unter TKI Therapie geeignet ist, eine Resistenzentwicklung in Form der T790M Mutation, nachzuweisen.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebeentnahme und histologische Diagnostik

Bei Patienten mit radiologischem Verdacht auf das Vorliegen eines Lungenkarzinoms wurde Gewebe mittels unterschiedlichen, invasiven Methoden (Bronchoskopie, EBUS, CT, Ultraschall gezielte Punktion, videoassistierte thorakoskopisch-chirurgische Entnahme) zur histologischen Diagnostik entnommen.

Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Entnahme mit 4%, gepuffertem Formaldehyd fixiert. Die Fixierdauer betrug zwischen 6 und 12 Stunden. Die in Paraffin eingebetteten Proben wurden nach Anfertigung von 5µm dicken Schnitten routinemäßig mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Bei Vorliegen von Tumorgewebe wurden immunhistochemische Färbungen angeschlossen, um einerseits ein primäres Lungenkarzinom von einer Metastasierung eines extrapulmonalen Primärtumors abzugrenzen und andererseits die einzelnen histologischen Entitäten der Lungenkarzinome verlässlich differenzieren zu können. Bei morphologischem Nachweis drüsiger und/oder papillärer Tumorzellverbände und positivem Färbeergebnis von Cytokeratin 7, TTF1 und Napsin A wurde die Diagnose Adenokarzinom der Lunge gestellt. Bei fehlenden morphologischen Adenokarzinomstrukturen aber positiven immunhistochemischen Färbeergebnissen für Adenokarzinome (Positivität für Cytokeratin 7, TTF1 und NapsinA) wurde ein

NSCLC mit immunhistochemischem Färbemuster für ein Adenokarzinom diagnostiziert.

2.2 *EGFR* Mutationstestung aus Gewebe

Nach Diagnosestellung erfolgte reflexmäßig die *EGFR* Mutationsanalyse mit dem cobas® *EGFR* Mutation Testsv2. Der Test eignet sich für den *EGFR* Mutationsnachweis in Gewebe- und Plasmaproben.

1. Vom Pathologen wurde in jeder untersuchten Gewebeprobe die Tumorprozentzahl ermittelt. Diese ergibt sich aus dem Anteil der Tumorzellen im Vergleich zum Anteil von Stroma und nicht neoplastischen Gewebe. Bei einem Tumoranteil unter 10% wurde eine Makrodissektion durchgeführt. Dafür wurde das relevante Tumorareal am HE gefärbten Schnitt unter Lichtmikroskop bei 20facher Vergrößerung markiert. Der korrespondierende Bereich wurde am ungefärbten Paraffinschnitt markiert, mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein Tube übergeführt.
2. Nach Entparaffinierung mit Xylol und absolutem Alkohol wurde das Pellet nach Entfernung des flüssigen Überstandes für 30 Minuten bei 56°C getrocknet. Nach Resuspendierung mit DNA Tissue Lysis Buffer und Zugabe von Proteinase K wurde bei 56°C über Nacht inkubiert.
3. Die DNA Extraktion erfolgte manuell mit dem im Kit enthaltenen cobas® DNA Sample Preparation Kit.
4. Anschließend erfolgte die photometrische DNA Quantifizierung mittels NanoDrop, wobei eine DNA Konzentration des Eluates über 2ng/μl für eine zuverlässige Testung mit dem cobas®*EGFR* Test v2 erforderlich ist.
5. Im nächsten Schritt wurde die DNA auf eine Konzentration von 2ng/μl verdünnt.
6. Jeweils 25μl der 3 unterschiedlichen Mastermixe des cobas® *EGFR* Test v2 wurde entsprechend einer Pipettierschablone in eine Microtiterplatte pipettiert. Positiv und Negativkontrollen wurden auf jeder Platte mitgeführt. Anschließend wurden 25μl der verdünnten DNA dazu pipettiert. Zuletzt wurde die Platte mit

einem Kunststofffilm abgedeckt und der Amplifikations/Detektionslauf am cobas® Z480 Plattencycler innerhalb einer Stunde gestartet.

7. Die vom cobas® EGFR Test v2 ausgegebenen Testergebnisse sind in **Tabelle 1** dargestellt.

Tabelle 1: Testparameter des cobas® EGFR MutationTestv2

Test Result	Mutation Result	Interpretation
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (Mehr als eine Mutation kann vorliegen)	EGFR Mutation in der speziellen Zielregion nachweisbar
No Mutation Detected	N/A	Keine Mutation in den speziellen Zielregionen nachweisbar
Invalid	N/A	Ergebnis der Probe invalid
Failed	N/A	Lauf wegen Software oder Hardware Fehler fehlgeschlagen

Tabelle adaptiert nach Gebrauchsanweisung cobas® EGFR Mutation Test v2, Doc.Rev.4.0, 07384351001-04EN, S.30

Das vom Hersteller angegebene Detektionslimit des Tests liegt bei 5% mutierte Tumorzellen unter Wildtyp DNA.

2.3 *EGFR* Mutationstestung aus Plasmaproben

2.3.1 Blutprobengewinnung

Die Blutabnahmen für die Plasma DNA Analyse erfolgten bei Patienten mit nachgewiesener *EGFR* Mutation im Tumorgewebe zu den jeweiligen Kontrollterminen in der Onkologischen Ambulanz der 1. und 2. Lungenabteilung des Otto-Wagner-Spital. Das untersuchte Patientenkollektiv umfasst neu diagnostizierte Patienten vor Therapiebeginn mit einem TKI, Patienten die vor Einführung des cobas® *EGFR* Mutation Testv2 bereits eine oder mehrere unterschiedliche TKI Therapien erhalten haben, sowie operierte Patienten mit *EGFR* mutierten Tumoren, die zur Verlaufskontrolle die onkologische Ambulanz aufsuchten.

Das Blut wurde mittels Cell-Free DNA Collection Tube der Firma Roche abgenommen. Das Sammelröhrchen ist ein steriles Unterdruckröhrchen, das K3EDTA zur Verhinderung der Blutgerinnung, sowie ein Zellkonservierungsmittel zur Verhinderung der Lyse kernhaltiger Blutzellen, enthält. Laut Arbeitsanleitung muss das abgenommene Blutvolumen zwischen den Markierungslinien für Mindestfüllung und Nennfüllung liegen, um einen Analysefehler aufgrund eines falschen Verhältnisses von Blut und Additiv zu vermeiden. Nach der Blutabnahme muss das Röhrchen 8-10mal geschwenkt werden, um eine Hämolyse zu vermeiden. Anschließend kann das Röhrchen bis zu 7 Tagen bei Raumtemperatur gelagert werden bevor die DNA Extraktion durchgeführt wird.

Die Blutproben der untersuchten Patientengruppe wurden täglich an das Institut für Pathologie gesendet. Dort wurde unmittelbar nach Eintreffen das Plasma gewonnen. Dazu wurden die Cell-Free DNA Collection Tubes 10 Minuten bei 2000 rpm/min und 10 Minuten bei 3000 rpm/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abgehoben und bei minus 20° Grad bis zur DNA Extraktion gelagert.

Ein zweites Cell-Free DNA Collection Tube zum Nachweis der T790M Mutation mittels ddPCR wurde von den Ambulanzen an ein Labor der Medizinischen Universität Wien, Institute of Cancer Research, Department of Medicine I, Comprehensive Cancer Center (Leiter: Prof. Dr. Filipits) gesandt. Die Untersuchung

erfolgte mit einem QX-100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad). Das Ergebnis der Mutationsanalyse wurde in Kopien/ml angegeben. Auf diese Ergebnisse wird in den Resultaten und der Diskussion Bezug genommen.

2.3.2 EGFR Mutationstestung aus Plasmaproben

Der cobas® EGFR Mutation Test v2 ist seit Jänner 2016 auch für den Nachweis von ctDNA zugelassen. Das Testsystem wurde im Molekularpathologischen Labor des Otto-Wagner-Spitals im Rahmen eines von Roche organisierten Ringversuchs etabliert: RING Study (EGFR): International inter-laboratory comparison of Roche cobas® EGFR Mutation Test v2 used for detection of EGFR Mutations in Plasma.

Seit Jänner 2016 wurde der cobas® EGFR Mutation Test v2 im Otto-Wagner-Spital zum *EGFR* Mutationsnachweis aus ctDNA in Plasmaproben von Patienten mit *EGFR* mutierten Lungenkarzinom verwendet.

Nach einem gemeinsamen Testtraining aller Teilnehmer im Oktober 2015 in Zürich, wurden im Jänner-Februar 2016 gespikete Plasmaproben in den Studienzentren ausgewertet.

Die Ergebnisse dieses Ringversuchs wurden als Poster bei der World Lung Cancer Conference, 7.12.2016 in Wien präsentiert (Keppens et al., 2017).

Die einzelnen Schritte für die Testung sind nachfolgend angeführt.

1. Die DNA Extraktion erfolgte aus der erforderlichen Ausgangsmenge von 2ml Plasma mit dem cobas® cf DNA Sample Preparation Kit.
2. Plasma, Proteinase K und Puffer, der die zellfreie DNA vor dem Abbau durch DNasen schützt, wurden bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert.
3. Nach Zugabe von Isopropanol wurde die Flüssigkeit durch ein Gefäß mit Glasfiltereinsatz zentrifugiert, wobei die zellfreie DNA an die Glasoberfläche gebunden wurde.
4. Die adsorbierte DNA wurde über mehrere Waschschrte in ein Sammelgefäß eluiert.

5. Anschließend wurde der PCR Ansatz vorbereitet. Die Multiplex PCR umfasst die gleichen 3 Mastermix wie der Gewebetest. Zu je 25µl Mastermixlösung wurden 25µl Plasma pipettiert. Ebenso wurden die im Testkit enthaltenen Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.
6. Die Amplifikation und Detektion erfolgte am cobas® Z480 Plattencycler mit der integrierten Analysis Package Software

Die vom Hersteller genannten Detektionslimits des cobas® EGFR MutationTestv2 für Plasmaproben bei Einsatz von 25µl Plasma sind in **Tabelle 2** dargestellt.

Tabelle 2: Detektionslimits des cobas® EGFR Mutation Testv2 für Plasmaproben

EGFR Exon	EGFR Mutation Gruppe	EGFR Aminosäuresequenz	Detektionslimit (Kopienzahl/ml)
18	G719X	2156 G>C	100
19	Exon 19 Deletion	2235_2249del15	75
20	T790M	2369 C>T	100
20	S768I	2303 G>T	25
20	Exon 20 Insertion	2307_2308insGCCAGCGTG	25
21	L858R	2573 T>G	100
21	L861Q	2582 T>A	30

Tabelle adaptiert nach Gebrauchsanweisung cobas® EGFR Mutation Test v2, Doc.Rev.4.0, 07384351001-04EN, S.62

Im Falle einer *EGFR* Mutation wird von der Auswertesoftware zum Ergebnis ein semiquantitativer Index angegeben (SQI). Dieser wurde entwickelt, um das Verhältnis von mutierten versus Wildtyp Kopien des *EGFR* Gens widerzuspiegeln. Entwickelt wurde der SQI aus einer Verdünnungsserie mit bekannter Kopienzahl mutierter

EGFR und einer definierten Menge an Wildtyp *EGFR* (Marchetti et al., 2015). Ein hoher SQI entspricht einer hohen Anzahl an mutierten Allelen, ein niedriger SQI entspricht einer geringen Anzahl mutierter Allele.

2.4 Statistik

Mittels deskriptiver Statistik erfolgte eine Charakterisierung des PatientInnenkollektivs sowie eine Zusammenfassung der Mutationsdaten. Änderungen der SQI Indices wurden in Form von Boxplots mit dem Statistikprogramm R grafisch dargestellt. Korrelationen sowie Wilcoxon – Rangsummen – Test für Gruppenvergleiche wurden in dem Statistikprogramm R gerechnet (R Core Team, 2017).

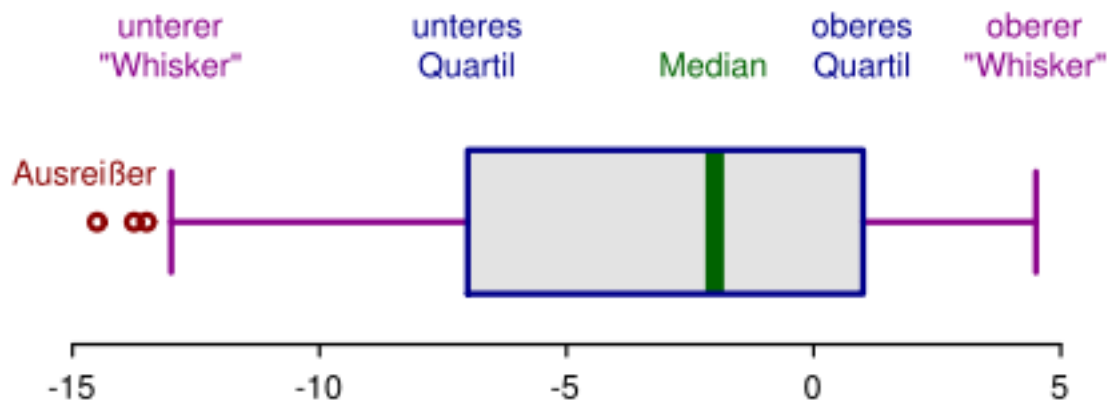


Abbildung 2: Im Boxplot entspricht das Rechteck den mittleren 50% der Daten (1. Quartil bis 3. Quartil). Der Median ist mit einem stärkeren horizontalen Strich gekennzeichnet. Die Länge des oberen und unteren Whiskers (die beiden vertikalen Linien) beträgt höchstens 1.5-mal dem Interquartilsabstand. Beobachtungen oberhalb des oberen Whiskers (bzw. unterhalb des unteren Whiskers) werden als extreme Ausreißer bezeichnet und durch Punkte dargestellt.

3 Ergebnisse

Im Zeitraum Jänner 2016 bis Juni 2017 wurden Blutproben von 142 Patienten auf das Vorliegen von *EGFR* Mutationen in ctDNA untersucht. Das Geschlechtsverhältnis war mit 79% (n=112) Frauen im Gegensatz zu 21% (n=30) Männer verschoben. Das mediane Alter betrug 71 Jahre (36-89). Während des Untersuchungszeitraums

verstarben 16 Patienten (11%). Die mediane Anzahl der untersuchten Blutproben war 3. Von 120 Patienten (84%) lagen zum Zeitpunkt der ersten Blutabnahme bereits die Ergebnisse der Mutationsanalysen aus Gewebeproben vor.

3.1 Ergebnisse der *EGFR* Mutationsanalyse aus Gewebeproben

Von 120 (84%) Patienten waren Ergebnisse der *EGFR* Mutationsanalyse mit dem cobas® *EGFR* v2 Test von histologischen Gewebeproben, die zum Diagnosezeitpunkt entnommen wurden, verfügbar. Davon konnte in 59 Proben (49%) eine Deletion im Exon 19 und in 40 Proben (33%) die Punktmutation L858R im Exon 21 nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte die G719X Mutation in 6 Proben (5%), die L861Q Mutation in 3 Proben (2,5%) detektiert werden. Bei einem Patienten wurde in der Gewebeprobe eine aktivierende Doppelmutation im Exon 18 (G719X) und Exon 21 (L861Q) nachgewiesen. Bei 4 Patienten (3%) fanden sich in der Gewebeprobe zum Diagnosezeitpunkt eine Kombination aus aktivierender Mutation und Resistenzmutation, wobei in 3 Fällen (2,5%) die Punktmutation S768I im Exon 20 und in einem Fall die T790M Punktmutation im Exon 20 nachgewiesen wurde. Bei 3 weiteren Patienten (2,5%) wurde in der Gewebeprobe zum Diagnosezeitpunkt ausschließlich eine Resistenzmutation ohne gleichzeitiges Vorliegen einer aktivierenden Mutation nachgewiesen. Hier fand sich in 2 Fällen eine Exon 20 Insertion und einmal die S768I Punktmutation im Exon 20. In 3 Gewebeproben (2,5%) wurde zum Diagnosezeitpunkt keine *EGFR* Mutation gefunden. Die Mutationsverteilung zum Diagnosezeitpunkt ist in **Abbildung 3** dargestellt.

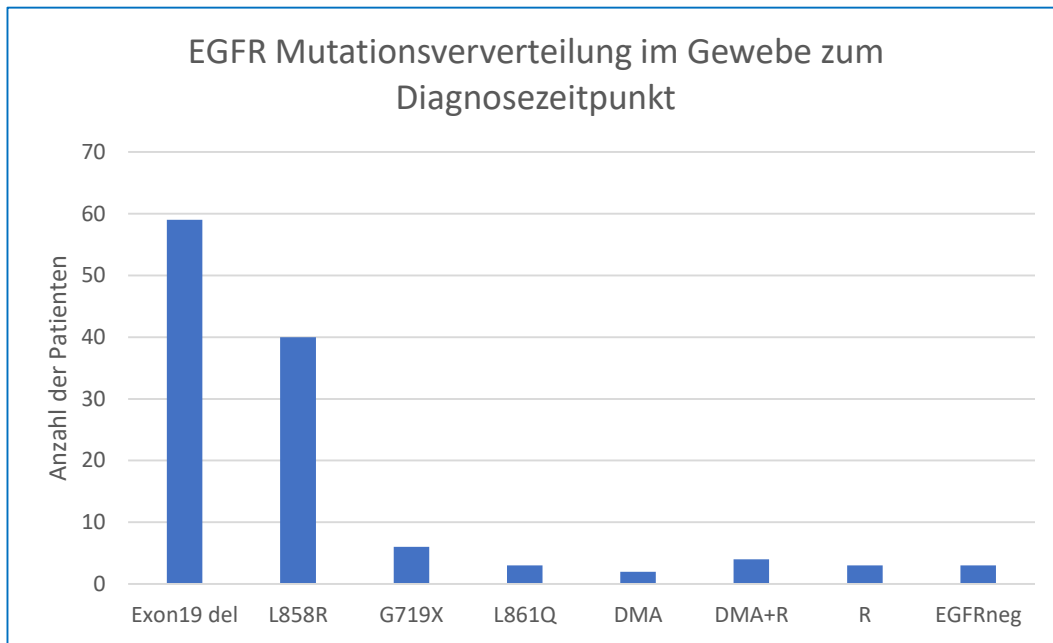


Abbildung 3: EGFR Mutationsverteilung in Gewebeproben zum Diagnosezeitpunkt.
 DMA: Doppelmutation aktivierend, DMA+R: Doppelmutation: Aktivierend +Resistenzmutation,
 R: Resistenzmutation, EGFR neg: EGFR negativ

3.2 Ergebnisse der EGFR Mutationsanalyse aus Rebiopsie Gewebe

Bei 37 Patienten (30%) wurde im Untersuchungszeitraum aufgrund eines klinisch-radiologischen Tumorprogresses eine Rebiopsie mit anschließender EGFR Mutationsanalyse durchgeführt. Von diesen erfolgte die Gewebeentnahme bei 17 Patienten (45%) durch eine Bronchoskopie, bei 16 Patienten (43%) durch Punktion eines Pleuraerguss und bei 4 Patienten (10%) mittels einer videoassistierten thorakoskopischen Gewebeentnahme.

In einem Rebiopsiegewebe war keine ausreichende Menge an Tumor DNA zur Durchführung einer Mutationsanalyse vorhanden. In 15 Proben wurden ausschließlich aktivierende Mutationen nachgewiesen, die in allen Fällen mit der Mutation aus dem Primärgewebe übereinstimmte. Zwölf Proben zeigten zusätzlich zur aktivierenden Mutation eine T790M Resistenzmutation. In je einem Fall wurde eine Exon 20 T790M Mutation sowie eine Exon 20 S768I Mutation ohne aktivierende Mutation nachgewiesen. Zwei Fälle zeigten histologisch im Rebiopsiematerial ein kleinzelliges Lungenkarzinom, wobei in der Mutationsanalyse jeweils eine Exon 19 Deletion,

nachweisbar war. In fünf Proben fand sich keine *EGFR* Mutation. In **Abbildung 4** ist ersichtlich, dass zum Zeitpunkt der Rebiopsie die Zahl der aktivierenden *EGFR* Mutationen im Gewebe abnimmt (90% Diagnosezeitpunkt, 40% Rebiopsiezeitpunkt), bei gleichzeitiger Zunahme der *EGFR* Resistenzmutation. Dies war sowohl im Falle einer gleichzeitigen aktivierenden Mutation (3% Diagnosezeitpunkt, 32% Rebiopsiezeitpunkt) also auch bei isoliertem Nachweis einer Resistenzmutation (3% Diagnosezeitpunkt, 10% Rebiopsiezeitpunkt) zu beobachten.

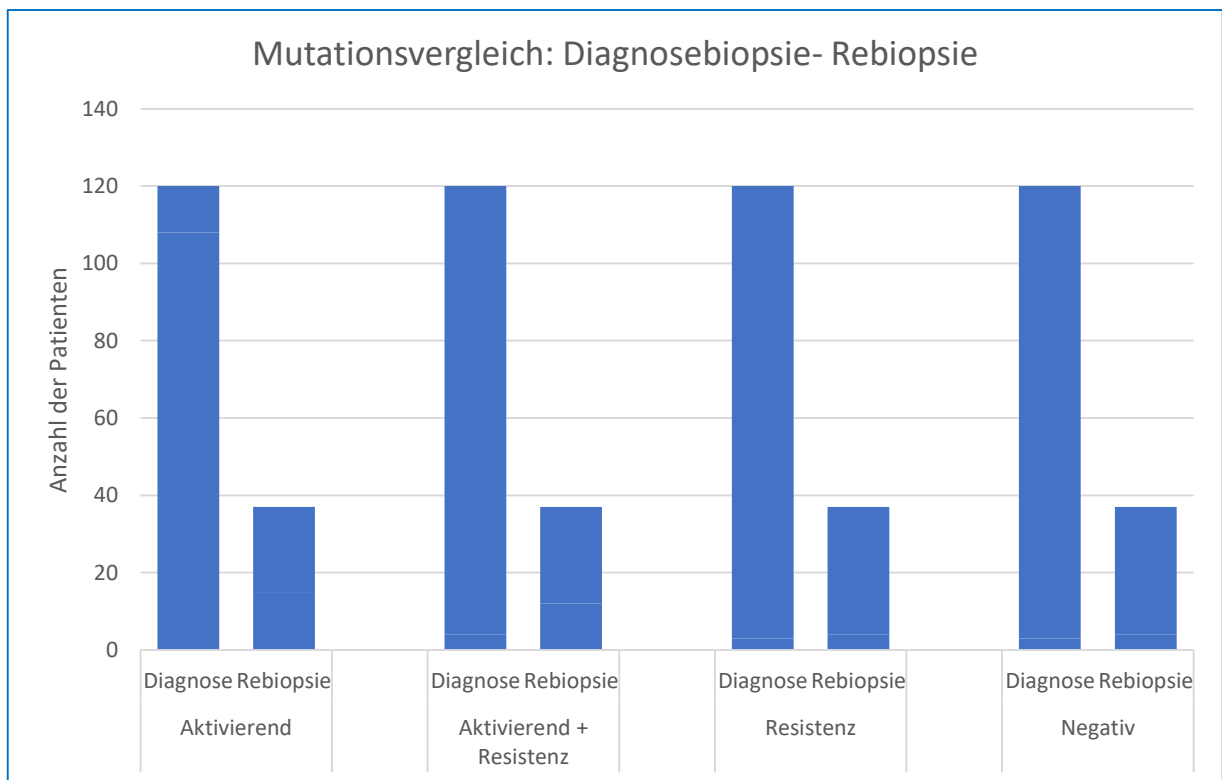


Abbildung 4: Mutationsvergleich: Gewebeprobe zum Diagnosezeitpunkt (120 Gewebeprobe) und Gewebeprobe zum Rebiopsiezeitpunkt (37 Gewebeprobe) – jeweils im hellblauen Säulenanteil dargestellt. Die Zahl der jeweils gefundenen Mutationen sind im dunkelblauen Säulenanteil dargestellt.

Bei fünf Patienten wurde eine zweite Rebiopsie durchgeführt. Die Gewebeentnahme erfolgte 2-mal durch Pleuraergusspunktion, 2-mal bronchoskopisch und 1-mal über videoassistierte thorakoskopische Gewebeentnahme. Je 2 Patienten zeigten eine aktivierende Exon 19 Deletion beziehungsweise eine Exon 21 L858R Punktmutation. Bei 2 Patienten fand sich keine Änderung des Mutationsstatus, während bei einem

Patienten die T790M Mutation aus der Vorbiopsie nicht mehr nachweisbar war. Bei einem anderen Patienten wurde die aktivierende Mutation, die zum Diagnosezeitpunkt nachweisbar war, in der 2. Rebiopsie im Gegensatz zur ersten Rebiopsie neuerlich nachgewiesen. In einem Fall wurde neben der Exon19 Deletion eine Exon20 T790M Resistenzmutation gefunden, die in den beiden vorangegangenen Biopsien nicht detektiert wurde.

3.3 Ergebnisse der *EGFR* Mutationsanalyse aus Liquid Biopsy

Im Untersuchungszeitraum Jänner 2016 bis Juni 2017 wurden zum Zeitpunkt der ambulanten Kontrolltermine Blutabnahmen von 142 Patienten zur *EGFR* Mutationsanalyse entnommen. Die Blutabnahmen erfolgten bei allen Patienten die in der Gewebeprobe einen positiven *EGFR* Mutationsnachweis hatten, sowie bei 4 Patienten mit negativen *EGFR* Mutationsnachweis im Gewebe, bei denen jedoch aus klinischer Sicht das Vorliegen einer *EGFR* Mutation vermutet wurde. Insgesamt wurden 479 Blutproben untersucht. Die Anzahl der Blutabnahmen war Median 3 (Minimum 1, Maximum 8). Die Anzahl der Patienten mit 1 bis 8 Blutabnahmen ist aus **Abbildung 5** ersichtlich.

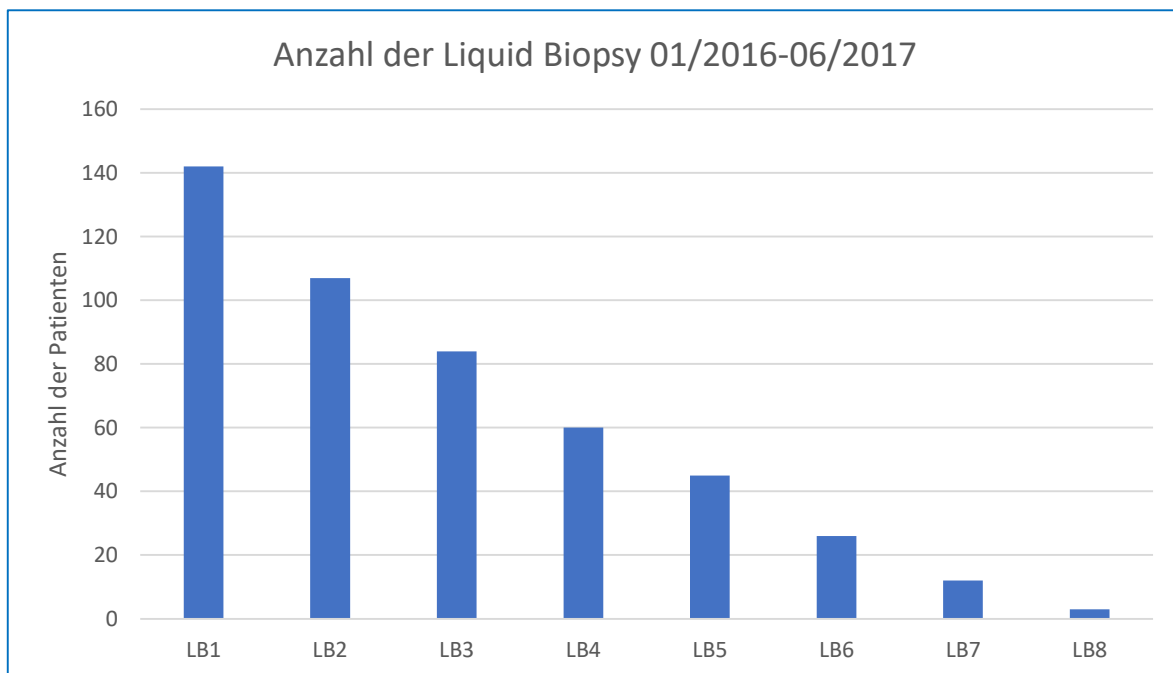


Abbildung 5: Anzahl der Patienten mit 1 Liquid Biopsy (LB1), 2 (LB2)...bis maximal 8 Liquid Biopsy (LB8) im untersuchten Zeitraum 01/2016-06/2017, gesamt: 479 Blutproben

3.3.1 Aktivierende *EGFR* Mutationen aus Liquid Biopsy

Die Häufigkeitsverteilung der aktivierenden *EGFR* Mutationen in der Liquid Biopsy der 142 Patienten ist in **Abbildung 6** dargestellt. Bei 70 Patienten (49%) konnte eine *EGFR* Mutation im Plasma nachgewiesen werden. 72 Patienten (51%) hatten im Untersuchungszeitraum zumindest eine Blutprobe ohne Nachweis einer aktivierenden *EGFR* Mutation. Wie bei den Gewebeproben wurden Exon 19 Deletionen mit 30% (42 Patienten) am häufigsten im Untersuchungszeitraum nachgewiesen, gefolgt von 15% (22 Patienten) L858R Mutation und 3% (4 Patienten) L861Q Mutation. Bei 2 Patienten (1%) wurde die Exon 18 Punktmutation G719X nachgewiesen.

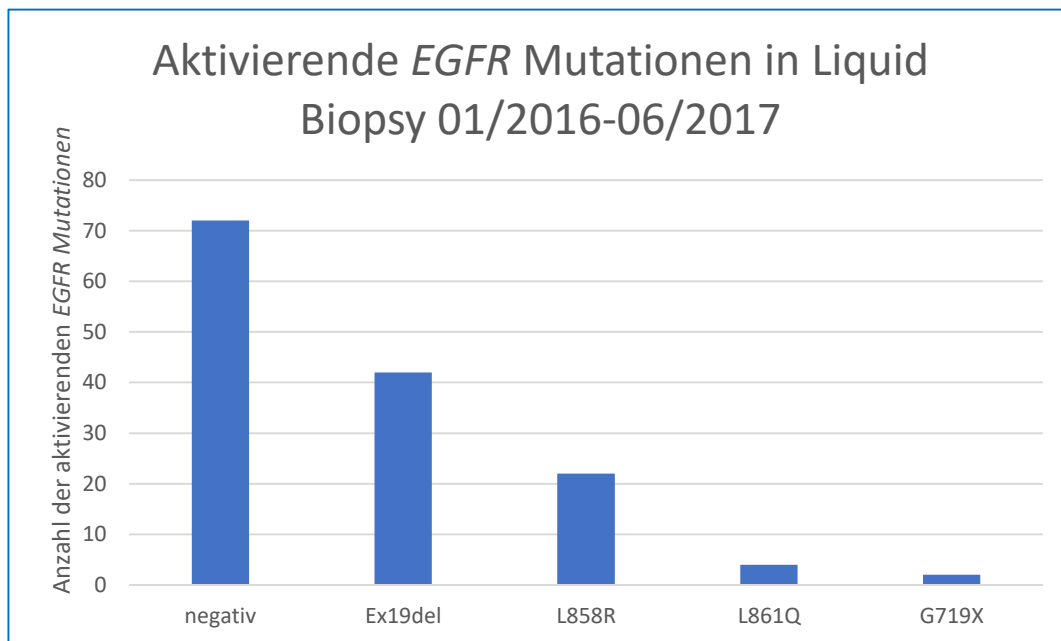


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung der aktivierenden *EGFR* Mutationen in den Liquid Biopsy Proben über den Untersuchungszeitraum 01/2016-06/2016. 72 Patienten hatten zumindest 1 Mal eine negative Probe (negativ). 70 Patienten hatten eine aktivierende Mutation (Ex 19del, L858R, L861Q, G719X).

3.3.2 *EGFR* Resistenzmutationen aus Liquid Biopsy

Die Häufigkeitsverteilung der Resistenzmutationen in der Liquid Biopsy sind in **Abbildung 7** dargestellt. Im Gegensatz zu den Gewebeproben zum Diagnosezeitpunkt und 1. und 2. Rebiopsiezeitpunkt, in denen bei 22 Patienten eine Resistenzmutation detektiert wurde, konnte im Plasma mit dem cobas® *EGFR*

Mutation Testv2 bei 23 Patienten (16%) eine Resistenzmutation nachgewiesen werden. Die Exon 20 T790M Mutation wurde bei 19 Patienten (12%) nachgewiesen. Drei Patienten (3%) hatten eine Exon 20 S768I Punktmutation, bei einem Patienten (1%) war eine Exon 20 Insertion nachweisbar. In den restlichen 119 Patienten (84%) konnte keine Resistenzmutation nachgewiesen werden.

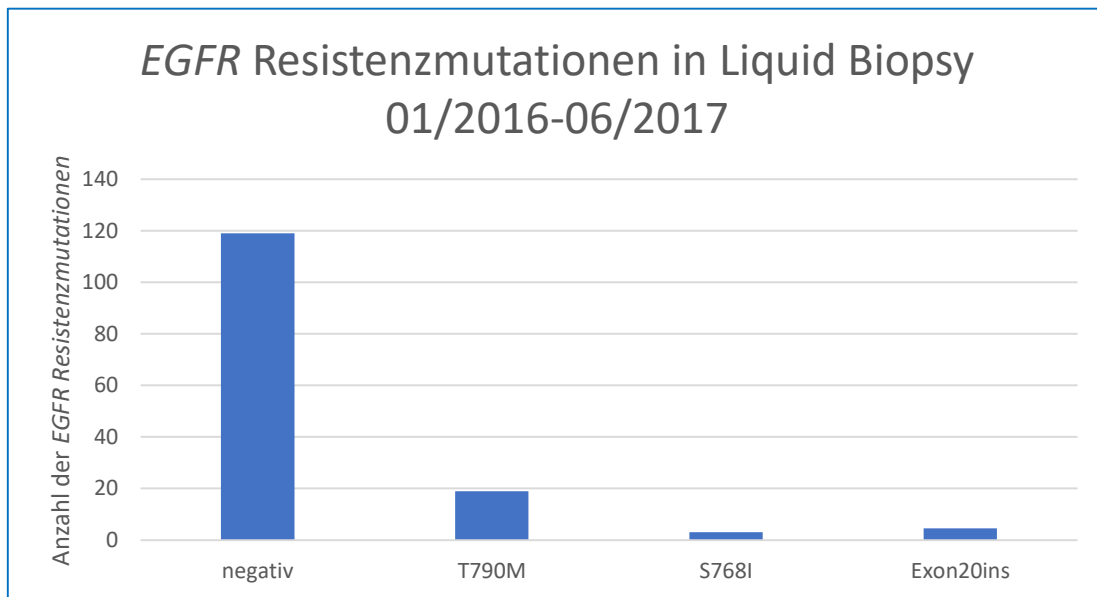


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der EGFR Resistenzmutationen in den Liquid Biopsy Proben über den Untersuchungszeitraum. 119 Patienten waren negativ, 24 Patienten hatten eine Resistenzmutation.

Über den Beobachtungszeitraum ist erkennbar, dass die Anzahl der Patienten mit nachgewiesener aktivierender *EGFR* Mutation vom 1. Abnahmezeitpunkt, der zumeist auch dem Beginn der TKI Therapie entspricht, zum 2. Abnahmezeitpunkt deutlich abfällt. Dies ist in **Abbildung 8** anhand der beiden häufigsten Mutationen (Exon 19 Deletion, Exon 21 Punktmutation L858R) dargestellt.

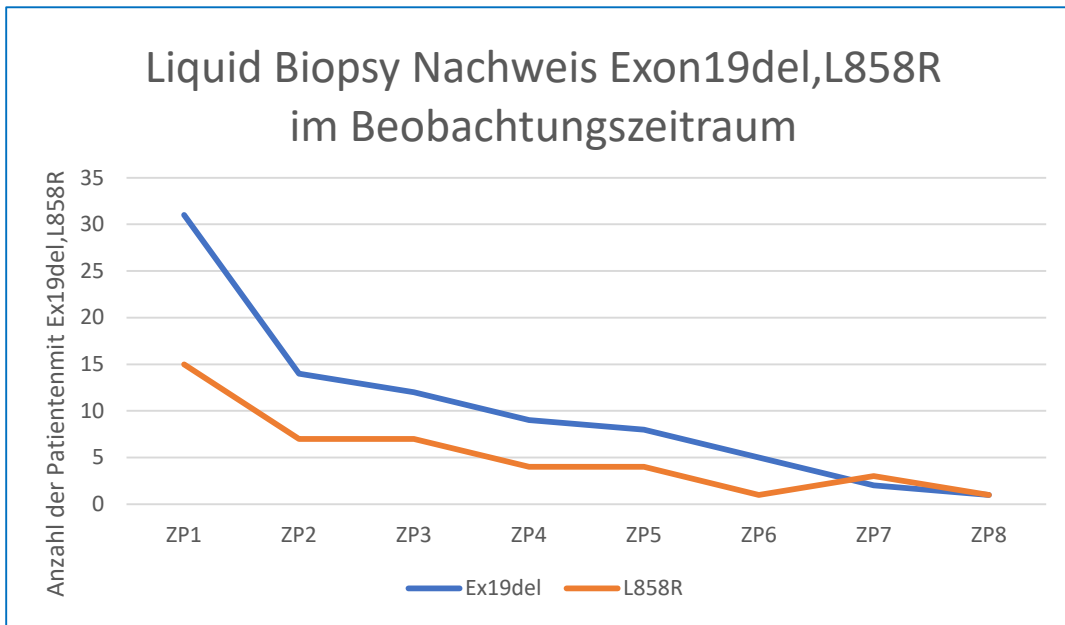


Abbildung 8: Die Abnahme der Patientenzahl mit nachweisbarer aktivierender EGFR Mutation im Therapieverlauf zu den Abnahmezeitpunkten (ZP1 bis ZP8) über den Untersuchungszeitraum. Die blaue Linie stellt den Verlauf für die Exon 19 Deletion, die orange Linie den Verlauf für die L858R Punktmutation im Exon 21 dar.

Ebenso kam es im Verlauf des Beobachtungszeitraums bei den Patienten zu einer Abnahme des SQI, welcher das Ansprechen auf die TKI Therapie widerspiegelt. Die Daten sind in Form von Boxplots dargestellt, der in **Abbildung 2** erklärt wird. Exemplarisch sind die Änderungen der Exon19 Deletion sowie der Exon21 L858R Punktmutation in den **Abbildungen 9 und 10** dargestellt, wobei eine klare Abnahme der SQI der aktivierenden Mutation erkennbar ist.

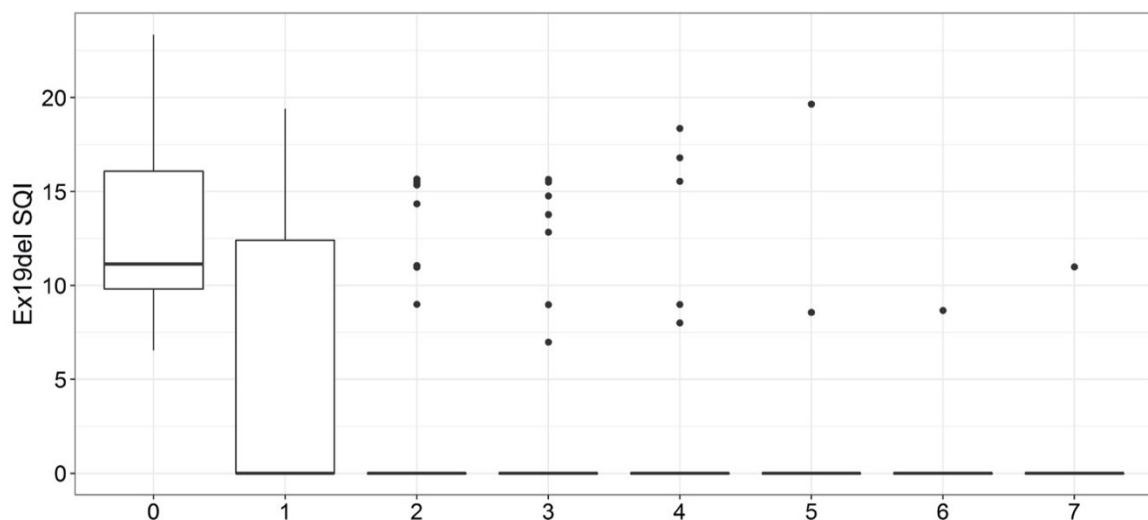


Abbildung 9: Boxplots der SQI der Exon19 Deletion. 0 ist der Zeitpunkt (ZP) zu dem der cobas® EGFR Mutation Test v2 das erste Mal positiv war. 1 bis 7 die nachfolgenden Zeitpunkte. Anzahl der Messungen: ZP0 – 42 Proben, ZP1 – 42 Proben, ZP2 41 Proben, ZP3 – 40 Proben, ZP4 – 40 Proben, ZP5 – 39 Proben, ZP6 – 37 Proben, ZP 7 – 31 Proben. Der Median zum ZP0 liegt bei 12, beim ZP1 und den nachfolgenden bis auf wenigen Ausreißer bei 0.

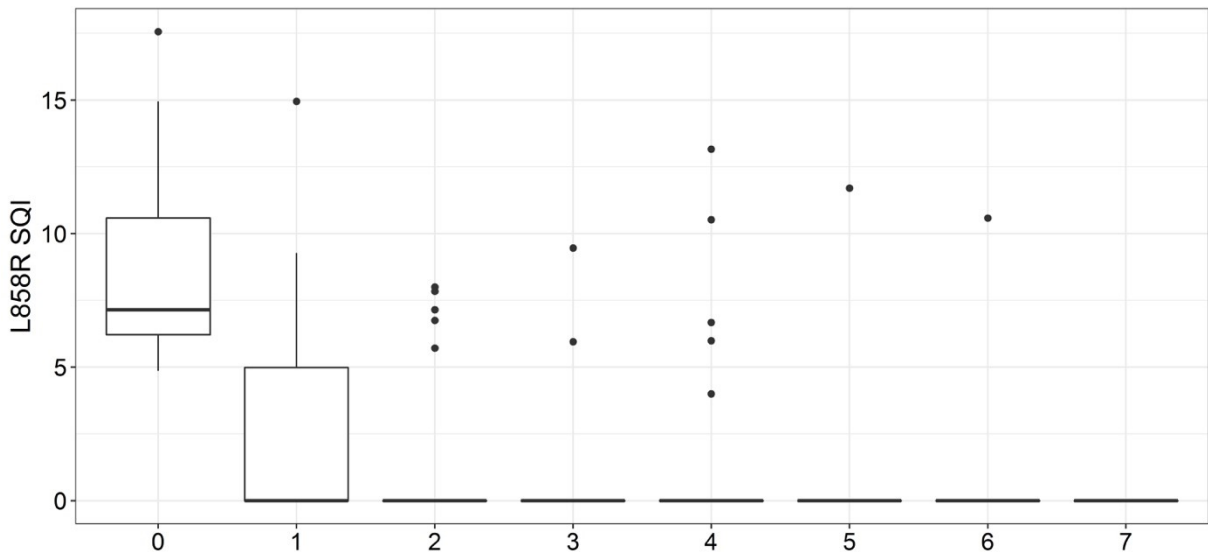


Abbildung 10: Boxplots der SQI der Exon21 L858R Punktmutation. 0 ist der Zeitpunkt (ZP) zu dem der cobas® EGFR Mutation Test v2 das erste Mal positiv war. 1 bis 7 die nachfolgenden Zeitpunkte. Anzahl der Messungen: ZP0 – 21 Proben, ZP1 – 21 Proben, ZP2 – 21 Proben, ZP3 – 21 Proben, ZP4 – 21 Proben, ZP5 – 20 Proben, ZP6 – 18 Proben, ZP7 – 13. Der Median zum ZP0 liegt bei 7, beim ZP1 und den nachfolgenden bis auf wenigen Ausreißer bei 0.

Bei Nachweis einer T790M Resistenzmutation wurde die TKI Therapie geändert und ein TKI der 3. Generation eingesetzt. Es zeigte sich wie bei den aktivierenden Mutationen eine starke, therapieinduzierte Abnahme der SQI Werte zwischen dem ersten und zweiten Messpunkt. Die T790M Mutation war in den nachfolgenden Zeitpunkten in der überwiegenden Anzahl der Patienten nicht mehr nachweisbar, der mediane SQI ist bis auf wenige Ausreißer bei 0.

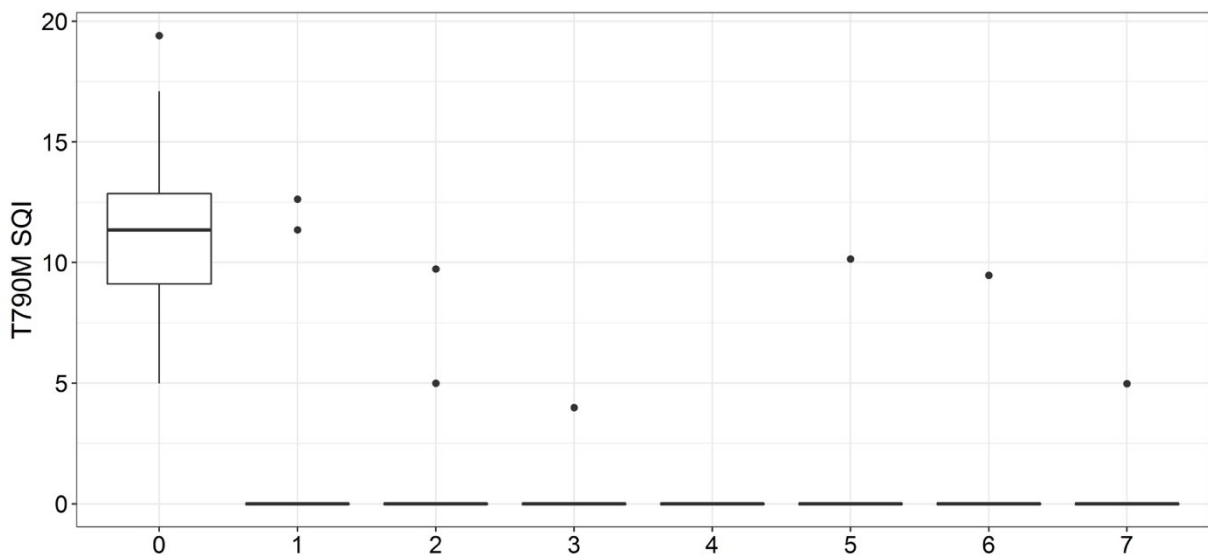


Abbildung 11: Boxplots der SQI der Exon20 T790M Punktmutation 0 ist der Zeitpunkt (ZP) zu dem der cobas® EGFR Mutation Test v2 das erste Mal positiv war. 1 bis 7 die nachfolgenden Zeitpunkte. Anzahl der Messungen: ZP0 – 19 Proben, ZP1 – 19 Proben, ZP2 – 19 Proben, ZP3 – 19 Proben, ZP4 – 18 Proben, ZP5 – 16 Proben, ZP6 – 16 Proben, ZP7 – 15. Der Median zum ZP0 liegt bei 12, beim ZP1 und den nachfolgenden bis auf wenigen Ausreißer bei 0.

3.3.3 Ergebnisse von T790M Nachweis mittels Histologie - cobas® EGFR Mutation Testv2 und ddPCR

Aus klinisch therapeutischer Sicht ist der Nachweis der T790M Mutation als Zeichen einer Therapieresistenz ein wichtiger Parameter. Da im Rahmen dieser Studie eine zweite Blutprobe im Labor Prof. Dr. Filipits am AKH Wien mittels einer hoch auflösenden digitalen PCR auf das Vorhandensein einer T790M Mutation überprüft wurde, wurden die Ergebnisse der ddPCR und des cobas® EGFR Mutation Test v2 miteinander verglichen. In 64 Fällen erfolgte der Nachweis ausschließlich durch die ddPCR und in nur 19 Proben gelang der Nachweis mit der ddPCR und dem cobas® EGFR Mutation Test v2, sowie 2mal durch den cobas EGFR Mutation Test v2 und Histologie. Betrachtet man den Nachweis der T790M Mutation im untersuchten Patientenkollektiv mit beiden Nachweismethoden so findet man bei 90 von 142 Patienten (63%) eine T790M Mutation.

Tabelle 3: Vergleich des T790M Nachweis mittels unterschiedlicher Testverfahren

	ddPCR	cobas	
ddPCR	64	1	cobas
ddPCR + cobas	19	19	cobas + ddPCR
ddPCR + Histologie	4	2	cobas + Histologie
n (ddPCR)	87	22	n (cobas)

ddPCR = digitale droplet PCR, cobas = cobas®EGFR Mutation Test v2

Die mediane Kopienzahl (laut ddPCR) der T790M Mutation der Proben, bei denen die Mutation mit beiden Untersuchungsverfahren nachgewiesen werden konnte betrug 184,5 (Range 36,5-454,1) Kopien/ml. Im Gegensatz zeigten jene Proben, in denen der T790M Nachweis ausschließlich mit ddPCR erfolgte, eine signifikant geringere Kopienzahl mit einem Median von 4,4 Kopien/ml Plasma (Range 2,0-17,0) (**Abbildung 12**).

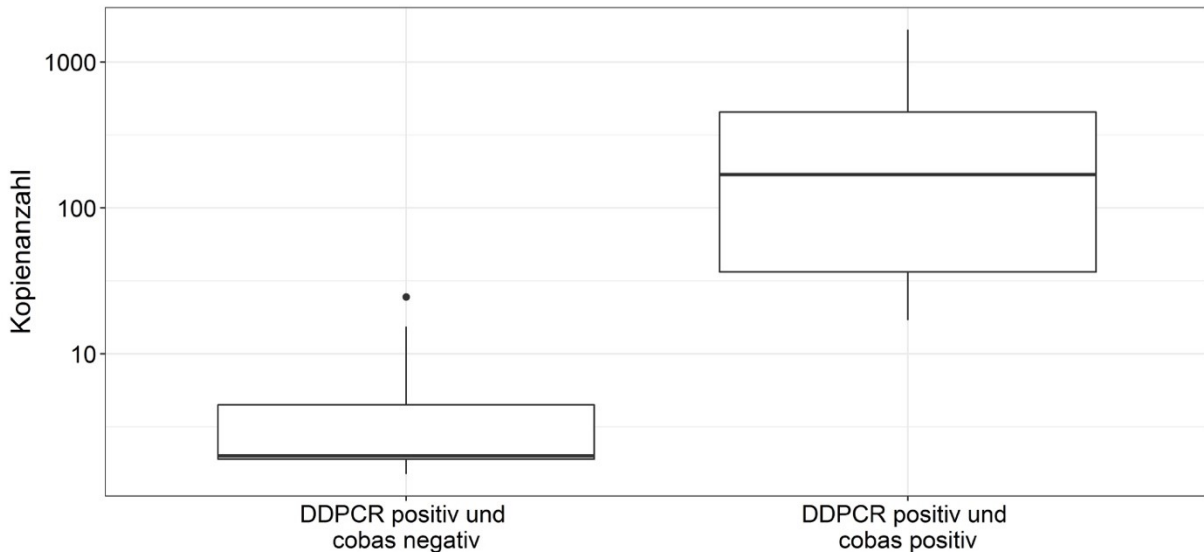


Abbildung 12: Vergleich der T790M Kopienzahl in Proben, die nur mit ddPCR bzw. mit ddPCR und cobas® EGFR Mutation Test v2 positiv waren. Dargestellt ist die Verteilung der Kopienzahl in einem Boxplot, der für jede Gruppe den Median, den Quartilsabstand, sowie das Minimum und Maximum anzeigt (Wilcoxon-Rangsummen-test $p < 0,0001$)

Jene Proben, die nur mit ddPCR positiv, nicht aber mit dem cobas® EGFR Mutation Testv2, getestet wurden, zeigten in der ddPCR signifikant niedrigere Kopienzahl (1,5-24,6 mutierte Kopien) als Proben, die mit beiden Testverfahren als positiv bewertet wurden (17-1671 mutierte Kopien) ($p < 0,0001$)

Die aus ddPCR ermittelten Kopienzahlen/ml Plasma und die SQI Werte des cobas® EGFR Mutation Test v2 zeigten eine starke positive Korrelation ($r = 0.78$). Je höher der SQI, desto höher ist auch die Kopienzahl in der ddPCR (**Abbildung 13**).

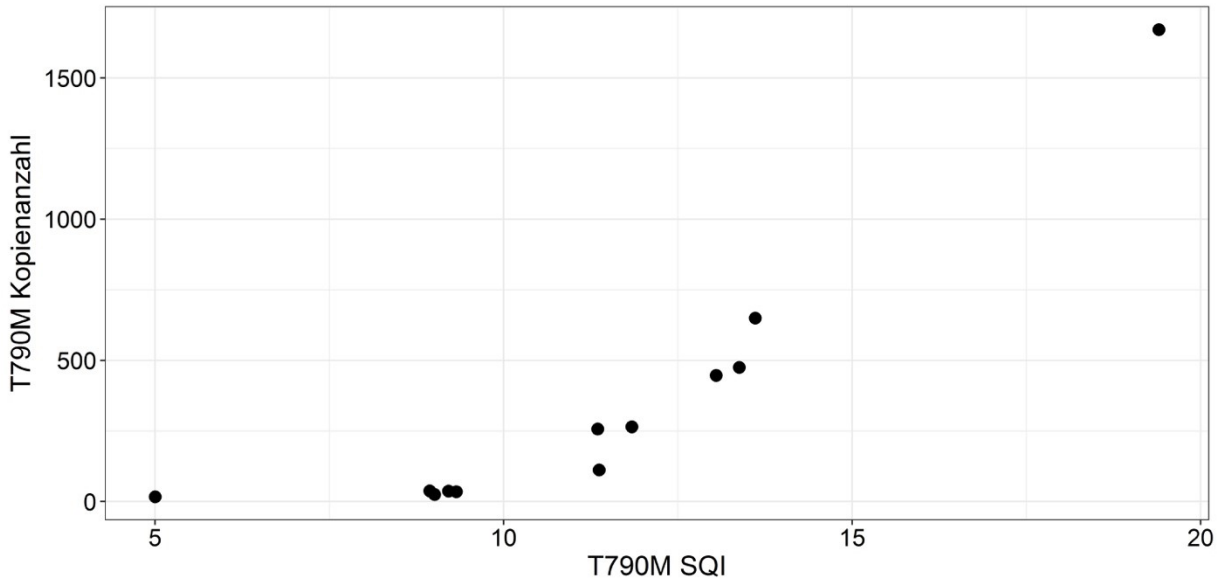


Abbildung 13: Korrelation von Kopienzahl (ddPCR)/ SQI Werte (cobas® EGFR Mutation Testv2) (Spearman $r=0.78$)

3.3.4 Vergleich der *EGFR* Mutationsanalyse aus Gewebe und Liquid Biopsy

Im Gegensatz zur Liquid Biopsy ist die *EGFR* Mutationsanalyse aus Gewebeproben seit vielen Jahren etabliert. Vergleicht man in der vorliegenden Patientenserie das Ergebnis der *EGFR* Mutationsanalyse aus dem Gewebe, das zum Diagnosezeitpunkt mittels cobas® EGFR Mutation Testv2 ermittelt wurde, mit dem Ergebnis der Plasmauntersuchungen über den gesamten Zeitraum, zeigt sich für die aktivierenden *EGFR* Mutationen eine Spezifität von 99-100%. Die Sensitivität liegt jedoch nur zwischen 25 und 50%. **(Tabelle 4)**

Tabelle 4: Mutationsnachweis cobas® EGFR MutationTestv2 - Vergleich Histologie und Plasma

N=120	Sensitivität	Spezifität	Übereinstimmung
Ex19del	48% (29/60)	100 % (60/60)	74% (89/120)
L858R	40% (17/42)	100 % (78/78)	79% (95/120)
L861Q	50% (2/4)	99%(115/116)	98% (117/120)
G719X	25% (2/8)	100% (112/112)	95% (89/120)

(Histologie zum Diagnosezeitpunkt ist das Referenzmaß).

4 Diskussion

Traditionellerweise basiert die Tumordiagnose auf der histologischen Aufarbeitung von Gewebeproben und deren morphologischen Beurteilung. Neben einer Basisdiagnostik am Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitt, werden zunehmend immunhistochemische Färbungen in der Routinediagnostik eingesetzt, um eine exakte Zuordnung des Tumortyps zu erreichen. Zusätzlich dient die immunhistochemische Untersuchung auch der Differenzierung von Primärtumor versus Metastase. In weiterer Folge ist die histologische Diagnostik Voraussetzung für die molekulargenetische Tumoranalyse zum Nachweis therapierbarer, genetischer Veränderungen. Kommt es nach initialem Ansprechen auf eine zielgerichtete Therapie zum Tumorprogress, ist eine neuerliche Gewebeentnahme zur wiederholten molekulargenetischen Analyse nicht immer durchführbar. Zusätzlich gibt es Publikationen über genetische Heterogenität innerhalb einer Tumorlokalisierung sowie zwischen Primärtumor und Metastase (Gerlinger et al., 2012; Tomonaga et al., 2013). Die Entwicklung von minimal invasiven Tests aus dem Blutplasma zum Nachweis von Mutationen in therapierelevanten Genen scheint eine vielversprechende Alternative zur Tumorbiopsie zu sein, um Patienten zu identifizieren, die von einer zielgerichteten Therapie profitieren können. Diese Tests werden unter dem Begriff „Liquid Biopsy“ zusammengefasst. Neben zirkulierenden Tumorzellen, Exosomen, „tumour educated platelets“ umfasst der Begriff auch ctDNA. Da cfDNA aus allen Tumorlokalisierungen in die Zirkulation gelangt, ergibt ihre molekulargenetische Analyse einen kompletteren Überblick über die Tumorgenetik als eine, nur wenige Millimeter umfassende, Gewebebiopsie. Mittlerweile ist eine Vielzahl an Methoden mit unterschiedlichen Sensitivitäten und Spezifitäten zum Nachweis von ctDNA beschrieben. Allerdings sind nur wenige dieser Testverfahren, wie beispielsweise der cobas® EGFR Mutation testv2, auch für eine Diagnostik zugelassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der cobas® EGFR Mutation Testv2 zum Therapiemonitoring von Patienten mit *EGFR* Mutationen und TKI Therapie geeignet ist, und eine Resistenzentwicklung in Form der T790M Mutation frühzeitig

nachweisen kann. Der Test kann sowohl für den *EGFR* Mutationsnachweis aus Gewebeproben als auch aus Plasmaproben verwendet werden.

In dieser Studie wurden Plasmaproben von 142 Patienten, auf das Vorliegen von *EGFR* Mutationen untersucht. Das Geschlechtsverhältnis zeigt, wie auch in der Literatur beschrieben einen erhöhten Frauenanteil mit 79% (n=112), gegenüber 21% (n= 30) an Männern (Shigematsu et al., 2005). Von 120 (84%) dieser Patienten waren die *EGFR* Mutationsergebnisse aus den Gewebeproben bekannt, was im Vergleich zu anderen Studien einen hohen Prozentsatz darstellt. In der IPASS Studie gab es nur bei 42% der Patienten Tumorgewebe, das geeignet für eine molekulare Testung war, in der Interest Studie lag der Prozentsatz überhaupt nur bei 31% (Kim et al., 2008; T. S. K. Mok et al., 2009). Ein Grund für den hohen Prozentsatz an *EGFR* Mutationsergebnissen von Gewebeproben, ist die Empfehlung der Arbeitsgruppe Pulmopathologie der österreichischen Gesellschaft für Pathologie eine molekulargenetische Reflextestung bei allen Adenokarzinomen und allen „NSCLC not otherwise specified“ auf das Vorliegen therapierbarer genetischer Veränderungen zum Diagnosezeitpunkt durchzuführen (Popper et al., 2016). Deletionen im Exon 19 gefolgt von der Punktmutation L858R im Exon 21 konnten, wie in der Literatur beschrieben, am Häufigsten nachgewiesen werden (Gazdar, 2009; Kumar et al., 2008). Der Nachweis einer isolierten Resistenzmutation oder als Doppelmutation mit einer aktivierenden Mutation wurden bei 7 Patienten (6%) gefunden, wobei die T790M Mutation nur in einer Gewebeprobe vorlag. Die T790M Mutation im Exon 20 ist als de novo Mutation selten (1%) und kann Ausdruck einer Keimbahnmutation sein. Trotz ihrer Seltenheit, ist der Nachweis in der prätherapeutischen Gewebeprobe wichtig, da die TKI Therapie entsprechend gewählt werden muss. Die Entwicklung von sensitiven Nachweismethoden, wie die digitale PCR, zeigt, dass die de novo T790M Mutation mit einer niedrigen Allelfrequenz in einem höheren Prozentsatz nachweisbar ist als primär angenommen. So konnte die T790M Mutation in einer Arbeit von Watanabe et al. in 79,9% TKI-naiver Lungenkarzinome nachgewiesen werden (Watanabe et al., 2015). Auch andere Studien, die hoch sensitive Tests verwendeten, haben primäre T790M Positivitätsraten von 35-45% beschrieben (Maheswaran et al., 2008; Rosell et al., 2011; Su et al., 2012). Diese hohen

Prozentsätze an T790M Mutationen können auch wichtig für die Auswahl des TKI sein. In diesen Fällen kann die Verwendung eines TKI der 2. Generation in der 1. Linientherapie die TKI Resistenzentwicklung möglicherweise verzögern (Ye et al., 2013). Zu beachten ist in diesem Zusammenhang aber, dass in Formalin-fixierten Gewebeproben fixationsbedingte Sequenzveränderungen, C-T oder G-A Transitionen beschrieben sind, die eine artifizielle T790M Mutation verursachen (Williams et al., 1999). Vergleichsuntersuchungen an Formalin-fixierten und nativen, eingefrorenen Gewebeproben zeigten, dass der Nachweis einer T790M Mutation im Formalin-fixierten Gewebe bei 41,7% im Tumor und bei 48,5% im tumorfreien umgebenden Parenchym positiv war, während die T790M Nachweisrate an unfixierten, gefrorenen Proben bei 2,8% im Tumorgewebe lag. Im tumorfreien Parenchym war keine Probe T790M positiv (Ye et al., 2013).

Zum Zeitpunkt der Tumorprogression wurden in der vorliegenden Arbeit 37 Patienten (30%) rebiopsiert. Analog zur primären Gewebeentnahme wurden unterschiedliche invasive Entnahmetechniken angewandt, wobei primär die am leichtesten zugängliche Läsion biopsiert wurde. Bei 14 Patienten (35%) wurde eine Resistenzmutation im Rebiopsiegewebe nachgewiesen. In 12 Patienten war die aktivierende *EGFR* Mutation zusätzlich nachweisbar. Bei je einem Patienten wurde nur die T790M Mutation bzw. eine Exon 20 S768I Mutation nachgewiesen. Bei 15 Patienten (40%) war auch im Rebiopsiegewebe ausschließlich die aktivierende *EGFR* Mutation der Erstbiopsie nachweisbar. Bei 5 Patienten konnte weder eine aktivierende noch eine Resistenzmutation detektiert werden. Nur in einem Fall war keine ausreichende Tumormenge zur Durchführung einer Mutationsanalyse vorhanden. Bei 2 Patienten lag im Rebiopsiegewebe ein kleinzelliges Lungenkarzinom vor, wobei in der Mutationsanalyse eine Exon19 Deletion, wie im primären Adenokarzinom, nachweisbar war. In der Literatur werden Rebiopsieraten zum Zeitpunkt der Tumorprogression zwischen 60% und 84% der *EGFR* mutierten Patienten angegeben (Arcila et al., 2011; Chouaid et al., 2014). Die niedrige Rebiopsierate von 30% im Vergleich zu publizierten Arbeiten ist möglicherweise durch das fortgeschrittene Krankheitsstadium zum Progressionszeitpunkt sowie auf Komorbiditäten zurückzuführen, die einen invasiven Eingriff nicht möglich machten.

Erkennbar ist aber dennoch, dass zum Rebiopsiezeitpunkt die Zahl der T790M Mutationspositiven Gewebeproben im Vergleich zum primären Mutationsnachweis deutlich ansteigt (42% versus 6%). In der Literatur wird die T790M Mutation in 60% der Fälle als Ursache für die Resistenzentwicklung angegeben (Arcila et al., 2011; T. S. Mok et al., 2009; Sequist et al., 2011). Eine mögliche Erklärung für den niedrigeren Prozentsatz in der vorliegenden Untersuchung ist die inhomogene Mutationsverteilung im Tumorgewebe, wie sie sowohl im Primärtumor als auch zwischen Primärtumor und Metastase beschrieben ist (Gerlinger et al., 2012; Tomonaga et al., 2013). Möglicherweise wurde in einem, wenige Millimeter umfassenden Biopsiegewebe der resistente Tumorzellklon nicht erfasst (Han et al., 2011). Bei 2 Patienten wurde im Rebiopsiegewebe ein kleinzelliges Lungenkarzinom nachgewiesen. Die Transformation von *EGFR* mutierten Adenokarzinomen zu kleinzelligen Lungenkarzinomen ist in der Literatur in einzelnen Fallbeschreibungen als ein möglicher Resistenzmechanismus nach TKI Therapie beschrieben (Sequist et al., 2011). Die in einer Literaturübersicht von Jiang 2016 zusammengefassten Arbeiten zeigten, wie in den beiden hier nachgewiesenen Patienten mit kleinzelligen Lungenkarzinomen, dass in mehr als der Hälfte der Patienten die aktivierende *EGFR* Mutation des primären Adenokarzinoms nachweisbar ist (Jiang et al., 2016). Über den zugrundeliegenden pathogenetischen Mechanismus wird spekuliert. Eine Überlegung geht davon aus, dass bereits im Primärtumor ein kombiniertes Karzinom aus Adenokarzinom und kleinzelligem Lungenkarzinom vorgelegen ist und im primären Biopsiematerial nur eine Komponente getroffen wurde (Jiang et al., 2016). Eine andere Erklärung geht von einer gemeinsamen Karzinom-Vorläuferzelle aus, wobei die Aktivierung bestimmter Signalwege die ruhende Stammzelle in Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms transformiert (D'Angelo and Pietanza, 2010). Die Möglichkeit des Auftretens eines kleinzelligen Lungenkarzinoms als Resistenzmechanismus bei TKI Therapie sollte jedoch immer in Betracht gezogen werden, wenn keine andere Ursache für eine Tumorprogression eines *EGFR* mutierten Adenokarzinoms gefunden werden. Dieser Resistenzmechanismus unterstreicht auch die Wichtigkeit der Rebiopsie sowie der morphologischen Gewebediagnostik zum Zeitpunkt der Tumorprogression (Hofman and Popper, 2016).

Da es nicht immer möglich ist eine Gewebeprobe zum Diagnosezeitpunkt oder zum Zeitpunkt der Tumorprogression zu entnehmen, wird die Mutationsdiagnostik vermehrt aus zirkulierenden Tumorzellen oder ctDNA durchgeführt (Sundaresan et al., 2016). Die Verwendung der Liquid Biopsy in der klinischen Routine wird seit einigen Jahren evaluiert (Karachaliou et al., 2015; Malapelle et al., 2016; Thress et al., 2015). In der vorliegenden Untersuchung wurde untersucht ob der cobas® EGFR Mutation Test v2 zum Therapiemonitoring von Patienten mit aktivierenden *EGFR* Mutationen und TKI Therapie geeignet ist und der Nachweis einer T790M Resistenzmutation frühzeitig möglich ist. Von 142 Patienten mit nachgewiesener *EGFR* Mutation und 4 Patienten mit negativem *EGFR* Mutationsstatus aus Gewebeproben wurden 479 Plasmaproben untersucht. Das Intervall der Blutabnahmen betrug durchschnittlich 3 Monate. Die mediane Anzahl der Blutabnahmen lag bei 3. Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen aktivierenden Mutationen entspricht den Gewebeproben. Über den Untersuchungszeitraum wurde bei 49% der Patienten eine *EGFR* Mutation nachgewiesen, wobei aber in 51% der Patienten im gesamten Untersuchungszeitraum zumindest eine Blutprobe negativ war. Das zeigt, dass die Level an ctDNA Änderungen unterliegt. So zeigte die Serie, dass zum ersten Abnahmezeitpunkt, der dem Beginn der TKI Therapie entspricht, die Zahl der Patienten mit nachgewiesener aktivierender *EGFR* Mutation viel höher ist als zum Zeitpunkt der 2. Blutabnahme. Die Auswertung der SQI für die beiden häufigsten aktivierenden Mutationen (Exon 19 Deletion und L858R Punktmutation), zeigt bei den meisten untersuchten Proben eine deutliche Abnahme der SQI nach TKI Therapiestart und nur einzelne Patienten zeigen keine Reduktion des SQI. Diese Dynamik reflektiert das Ansprechen auf die TKI Therapie und entspricht einer Reduktion der Tumorlast. In einer Studie von Marchetti A et al., (2015), die ebenfalls mit dem cobas® EGFR Mutation Testv2 an 203 Plasmaproben von 69 Patienten durchgeführt wurde, konnte die rasche Abnahme der SQI bei 95% der Patienten gezeigt werden. Patienten bei denen es in dieser Studie zu keiner Abnahme der ctDNA unter die Nachweisgrenze kam, wurden als „slow responder“ bezeichnet. In diesen Fällen kam es zu einer frühzeitigen Resistenzentwicklung (Marchetti et al., 2015). In einer Studie von Wei Z et al. (2017) wurde bei 200 untersuchten Patienten

mittels digitaler PCR ebenfalls eine rasche Reduktion der aktivierenden *EGFR* Mutation nach TKI Therapie nachgewiesen (Wei et al., 2017). In einer Arbeit von Xiong L et al. (2017) konnte ebenfalls eine Abnahme der aktivierenden *EGFR* Mutation nach TKI Therapiestart mittels digitaler PCR nachgewiesen werden und mit Ergebnissen der Bildgebung korreliert werden (Xiong et al., 2017). Im Juni 2016 wurde der cobas® EGFR Mutation Test v2 von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) als Companion Diagnostik test zum Nachweis der Exon19 Deletion und der L858R Mutation aus Plasma zugelassen. Die Zulassung basierte auf Ergebnissen der ENSURE Studie. Die Übereinstimmung der Ergebnisse aus der Gewebetestung und der Plasmatestung für die Exon 19 Deletion und der L858R Punktmutation war 76,6% in „Gewebe -positiven“ Fällen (Wu et al., 2015). Werden die Ergebnisse des Mutationsnachweises aus Gewebe und Plasma für die aktivierenden *EGFR* Mutationen in der vorliegenden Untersuchung verglichen, ergibt sich für die Exon 19 Deletion und die Punktmutationen L858R und G719X eine Spezifität von 100%, sowie eine Spezifität von 99%, für die L861Q Punktmutation, wenn das Mutationsergebnis aus dem Gewebe zum Diagnosezeitpunkt als Referenzmaß gewertet wird. Die Übereinstimmung liegt bei 74% für die Exon 19 Deletion, bei 79% für die L858R Punktmutation, bei 95% für die G719X und bei 98% für L861Q Punktmutation. Mok et al. haben in einer 2015 publizierten Studie eine vergleichbare Spezifität von 96% für den Nachweis der aktivierenden *EGFR* Mutationen mittels cobas ® EGFR Mutation Testv2 beschrieben (Mok et al., 2015). Die Auswertung der vorliegenden Ergebnisse betreffend die Sensitivität für die aktivierenden *EGFR* Mutationen liegt bei den Punktmutationen jedoch nur bei 25% für die G719X, bei 40% für die L858R und bei 50% für die L861Q Mutation. Für die Exon19 Deletion lag die Sensitivität bei 48%. Ähnliche Sensitivitäten für den cobas® EGFR Mutation Testv2 sind in einer Arbeit von Xu et al. beschrieben, in der 4 unterschiedliche Technologien verglichen wurden (Xu et al., 2017). In einer Arbeit von Thress et al. wurde ein ähnlicher Vergleich durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine, mit den eigenen Daten vergleichbare, Spezifität von 100% für die aktivierenden Mutationen (Exon 19 Deletion, L858R Punktmutation). Die Sensitivität lag jedoch mit 86% für die Exon 19 Deletion und 90% für die L858R Punktmutation deutlich höher.

Allerdings wurden in der Untersuchung von Thress und Kollegen nur 38 Plasma- und Gewebeprobeen verglichen. Beim Vergleich einer größeren Probenanzahl lagen die Sensitivität und Spezifität für die beiden Mutationen einige Prozentpunkte niedriger (Thress et al., 2015). Das Detektionslimit (Kopienzahl/ml) des cobas® EGFR Mutation Test v2 liegt für die Exon 19 Deletion bei 75 Kopien/ml, bei der L858R Mutation bei 100 Kopien/ml. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die geringere Sensitivität in der vorliegenden Untersuchung auf eine zu geringe Kopienzahl unterhalb des Detektionslimits bei einigen Patienten zurückzuführen ist. In einer Studie von Oxnard et al wurde gezeigt, dass die Sensitivität der Genotypisierung aus Plasma für aktivierende *EGFR* Mutationen höher ist wenn eine extrathorakale Metastasierung vorliegt als bei Plasmaproben ohne extrathorakale Metastasierung (Oxnard et al., 2016).

Neben dem Nachweis der aktivierenden Mutationen aus dem Plasma, ist auch der Nachweis der T790M Resistenzmutation als Biomarker zur Therapieentscheidung von klinischem Interesse, da TKI der 3. Generation, wie Osimertinib, bei Patienten mit Tumoren die T790M Mutationspositiv sind ein besseres Ansprechen und längeres progressionsfreies Überleben zeigen als bei Patienten mit T790M Mutationsnegativen Tumoren (Jänne et al., 2015). Im Gegensatz zur Blutabnahme ist der Nachweis der T790M Mutation aus wiederholter Gewebebiopsie ein invasiver Eingriff mit möglichen Komplikationen. Ebenso dauert das Ergebnis der Gewebetestung oft länger und repräsentiert nicht die gesamte Tumormasse.

In der vorliegenden Untersuchung konnte bei 19 Patienten (13%) eine T790M Mutation im Plasma detektiert werden und erfolgte somit wesentlich seltener als der T790M Nachweis im Gewebe. Eine niedrigere Nachweisrate an T790M Mutation im Plasma versus Gewebe ist auch von Jenkins et al. (2017) beschrieben worden, in deren Ergebnissen 40% der Patienten mit nachgewiesener T790M Mutation im Gewebe, keine detektierbaren Mengen an T790M im Plasma aufwiesen (Jenkins et al., 2017). Auch in dieser Studie wurde für den Plasmanachweis der cobas® EGFR Mutation Testv2 eingesetzt. Daher sollte bei Tumorprogression und negativem

Nachweis der T790M Mutation aus der Blutprobe, eine Gewebeprobe angestrebt werden um das Risiko eines falsch negativen Plasmatests zu minimieren.

Im Rahmen dieses Projektes wurde bei jeder Blutabnahme ein 2. Röhrchen im Labor Prof. Dr. Filipits auf das Vorliegen auf eine Exon20 T790M Resistenzmutation mittels ddPCR untersucht. Diese Methodik ist in wissenschaftlichen Studien aufgrund ihrer Sensitivität zwischen 0,004% - 0,1% und des quantitativen Ergebnisses weit verbreitet (Watanabe et al., 2015). Die Limitierung liegt darin, dass pro Reaktion nur ein Locus detektiert werden kann. Eine FDA Zulassung liegt noch nicht vor.

Erfolgte in der vorliegenden Untersuchung ein T790M Mutationsnachweis, wurde die Therapie, unabhängig von der Nachweismethode, geändert und ein TKI der 3. Generation eingesetzt. In der Blutprobe nach Therapiewechsel zeigte sich analog zu den aktivierenden *EGFR* Mutationen ein Abfall der SQI von Median 12 auf 0.

Vergleicht man im untersuchten Kollektiv den Nachweis der T790M Mutation durch ddPCR und den cobas® EGFR Mutation Testv2, erfolgte der Nachweis in 64 Fällen ausschließlich durch ddPCR und nur in einem Fall ausschließlich durch den cobas® EGFR Mutation Testv2. Bei 19 Fällen wurde die Resistenzmutation mit beiden Testsystemen detektiert. Im untersuchten Patientenkollektiv ergibt sich gesamt ein T790M Nachweis von 63%, was der in der Literatur berichteten Rate von 60% in der Resistenzsituation entspricht. Die Zahl der Patienten, bei denen mit cobas® EGFR Mutation Testv2 eine Resistenzmutation nachgewiesen werden konnte ist mit 11% allerdings sehr gering und liegt weit unter dem in der Literatur beschriebenen Prozentsatz. Allerdings muss bei den Ergebnissen in Betracht gezogen werden, dass mit der ddPCR und dem cobas® EGFR Mutation Testv2 zwei Nachweissysteme mit unterschiedlicher Sensitivität eingesetzt wurden. Betrachtet man die Höhe der medianen Kopienzahl/ml bei den 19 Patienten die mit beiden Testsystemen positiv waren, so liegt diese bei 184,5 mutierten Kopien. Somit liegen diese Werte innerhalb des angegebenen Detektionslimits von 100 Kopien/ml des cobas® EGFR Mutation Testv2. Proben, die nur mit ddPCR positiv für T790M Mutation waren hatten eine signifikant geringere Kopienzahl mit einem Median von 4,4 Kopien/ml Plasma (Range 2,0-17,0). Diese Werte liegen unterhalb des Detektionslimits für den cobas® EGFR

Mutation Test v2. Vergleicht man die Kopienzahl /ml der ddPCR mit den SQI Werten des cobas® EGFR Mutation Test v2 ergibt sich dennoch eine deutlich positive Korrelation. Man kann spekulieren, dass ohne sofortige Therapieänderung, eine Plasmabestimmung zu einem späteren Zeitpunkt, wenn eine Kopienzahl über 100 Kopien/ml erreicht worden wäre, die Anzahl der T790M positiven Proben auch mit dem cobas® EGFR Mutation Testv2 angestiegen wäre. Es gibt zahlreiche Publikationen über Methodenvergleiche zum Nachweis von *EGFR* Mutationen aus ctDNA (Karlovich et al., 2016; Li and Zhou, 2017; Thress et al., 2015; Xu et al., 2017). Die Arbeit von Thress et al. 2015 verglich den cobas® EGFR Mutation Testv2 unter anderem mit ddPCR (Bio-Rad/Molecular MD, Hercules, CA, USA) und beads, emulsions, amplification and magnetics (BEAM)ing dPCR (Sysmex Inostics, INC., Mundelein, IL, USA). Bei einer Probenzahl von 72 ergaben der cobas® EGFR Mutation Test v2 und die BEAMing dPCR vergleichbare Ergebnisse mit einer Sensitivität von 73% - 81% für den Nachweis der T790M Resistenzmutation. In 20 Fällen wurden diskordante Ergebnisse zwischen T790M Mutationsnachweis aus Gewebe und Plasma gefunden. In Fällen mit positivem Nachweis im Plasma, bei fehlendem Mutationsnachweis im Gewebe lag die Menge an nachgewiesener T790M DNA zumeist an der unteren Nachweisgrenze des Testsystems. Ähnliche Beobachtungen sind auch in einer Publikation von Karlovich et al. beschrieben. Alle Fälle mit positivem T790M Mutationsnachweis durch Beaming und negativem cobas® EGFR Mutation Testv2 lagen im niedrigen Kopienzahlbereich (<6 Kopien/ml) und somit unter der angegebenen Nachweisgrenze für den cobas Test (Karlovich et al., 2016). In einer Arbeit von Xu et al. wurde der cobas® EGFR Mutation Testv2 unter anderem mit ddPCR (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) und einer Next Generation Sequencing Plattform verglichen. Es wurde die Sensitivität der unterschiedlichen Plattformen in Abhängigkeit der Allelfrequenz ausgewertet. Bei hoher Allelfrequenz (> 1%) zeigten die unterschiedlichen Methoden ähnliche Plasmadetektionsraten für aktivierende -, und T790M Resistenzmutation zwischen 83,3 % und 100%. Bei einer Allelfrequenz unter 1% gab es in der Nachweisrate deutliche Unterschiede, wobei der cobas® EGFR Mutation Testv2 und die digitale PCR eine 91% Übereinstimmung ergab, allerdings bei einer geringen Probenanzahl

von 5 Plasmaproben. In dieser Untersuchung traten diskordante Ergebnisse bei Nachweis der T790M Resistenzmutation auf. Als mögliche Ursache wird auf eine Arbeit von Lin et al. hingewiesen, in der im Rahmen einer Validierungsuntersuchung für Next Generation Sequencing ein 0,5% Hintergrundsignal für die T790M Mutation im Blut von gesunden Probanden und tumorfreien Lymphknoten nachgewiesen haben, die möglicherweise auf eine Cytosin Deaminierung, welche zu einer Transition von C>T zurückzuführen ist. Als mögliche Erklärung dafür wird ein Polymerase induzierter Fehler, eine Störung im DNA Reparatursystem, eine spontane Deaminierung oder eine artifizielle, hitzeinduzierte Ursache im Rahmen des thermocyclings diskutiert (Lin et al., 2014).

Im Verlauf der vorliegenden Untersuchung gab es in einem Fall einer jungen Patientin mit Lungenrundherden und unklarem Primärtumor neben einer Gewebeprobe aus dem Dickdarm eine Liquid Biopsy zur *EGFR* Mutationstestung, da wegen des schlechten Allgemeinzustandes eine bronchoskopische Biopsieentnahme aus einem Lungenherd zum damaligen Zeitpunkt nicht möglich war. Der cobas® *EGFR* Mutation Test v2 war negativ. Die ddPCR ergab das Vorliegen einer T790M Mutation mit einer Kopienzahl von 26 Kopien/ml. Nach Transferierung an eine pulmologische Abteilung des Otto-Wagner-Spitals konnte eine Gewebeprobe aus einem Lungenrundherd entnommen werden. Die histologische und immunhistochemische Untersuchung führte zur Diagnose eines Adenokarzinoms vom intestinalen Typ, mit Verdacht auf metastatische Absiedelung aus dem Gastrointestinal Trakt. Die *EGFR* Mutationsanalyse aus dem Biopsiegewebe mit dem cobas® *EGFR* Mutation Test v2 war negativ.

Xu et al. diskutieren in ihrer Publikation, dass ein positiver T790M Mutationsnachweis mit niedriger Allelfrequenz in einem kurzen Follow-up entweder durch eine zweite Methode oder in einer zweiten Blutprobe bestätigt werden sollte, bevor eine therapeutische Entscheidung getroffen wird (Xu et al., 2017).

In der Literatur wie auch in der vorliegenden Untersuchung zeigen die unterschiedlichen Methoden zum Nachweis der *EGFR* Mutation aus Plasmaproben unterschiedliche Sensitivität und Spezifität, wobei die digitalen PCR Systeme

gegenüber Allel-spezifischer PCR zumeist eine höhere Sensitivität aufweisen, da bereits niedrige Kopienzahlen im Plasma detektiert werden können, während die Spezifität als gleichwertig anzusehen ist.

Zusammenfassend kann aus der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass der cobas® EGFR Mutation Testv2 die aktivierenden *EGFR* Mutationen und die T790M Resistenzmutation aus Plasmaproben im Bereich der angegebenen Detektionslimits verlässlich detektieren kann. Die Frage ob die Detektion einer geringeren Kopienzahl, wie sie zum Beispiel mit der ddPCR möglich ist, allerdings mit dem Nachteil einer geringeren Spezifität, für den Patienten vorteilhaft wäre ist unklar.

Um die im klinischen Setting und somit in der Patientenbetreuung am besten geeignete Testplattform zu bestimmen, fehlen noch große Studien. Vorläufig erscheint es wichtig, die Limitationen des im jeweiligen Labor eingesetzten Testsystems zu kennen und durch multidisziplinäre (klinisch – pathologisch-molekulargenetische Tumorboards) gemeinsam die bestmögliche Therapieentscheidung zu treffen.

5 Literatur

Arcila, M.E., Nafa, K., Chaff, J.E., Rekhtman, N., Lau, C., Reva, B.A., Zakowski, M.F., Kris, M.G., Ladanyi, M., 2013. EGFR exon 20 insertion mutations in lung adenocarcinomas: prevalence, molecular heterogeneity, and clinicopathologic characteristics. *Mol. Cancer Ther.* 12, 220–229. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0620

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., 2011. 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 1169–1180. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2277

Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R.J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B.R., Wang, H., Lubner, B., Alani, R.M., Antonarakis, E.S., Azad, N.S., Bardelli, A., Brem, H., Cameron, J.L., Lee, C.C., Fecher, L.A., Gallia, G.L., Gibbs, P., Le, D., Giuntoli, R.L., Goggins, M., Hogarty, M.D., Holdhoff, M., Hong, S.-M., Jiao, Y., Juhl,

H.H., Kim, J.J., Siravegna, G., Laheru, D.A., Lauricella, C., Lim, M., Lipson, E.J., Marie, S.K.N., Netto, G.J., Oliner, K.S., Olivi, A., Olsson, L., Riggins, G.J., Sartore-Bianchi, A., Schmidt, K., Shih, Ie-M., Oba-Shinjo, S.M., Siena, S., Theodorescu, D., Tie, J., Harkins, T.T., Veronese, S., Wang, T.-L., Weingart, J.D., Wolfgang, C.L., Wood, L.D., Xing, D., Hruban, R.H., Wu, J., Allen, P.J., Schmidt, C.M., Choti, M.A., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Diaz, L.A., 2014. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* 6, 224ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3007094

Camidge, D.R., Pao, W., Sequist, L.V., 2014. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11, 473–481. doi:10.1038/nrclinonc.2014.104

Carey, K.D., Garton, A.J., Romero, M.S., Kahler, J., Thomson, S., Ross, S., Park, F., Haley, J.D., Gibson, N., Sliwkowski, M.X., 2006. Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Res.* 66, 8163–8171. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0453

Chouaid, C., Dujon, C., Do, P., Monnet, I., Madroszyk, A., Le Caer, H., Auliac, J.B., Berard, H., Thomas, P., Lena, H., Robinet, G., Baize, N., Bizieux-Thaminy, A., Fraboulet, G., Locher, C., Le Treut, J., Hominal, S., Vergnenegre, A., 2014. Feasibility and clinical impact of re-biopsy in advanced non small-cell lung cancer: a prospective multicenter study in a real-world setting (GFPC study 12-01). *Lung Cancer Amst. Neth.* 86, 170–173. doi:10.1016/j.lungcan.2014.08.016

Cortot, A.B., Jänne, P.A., 2014. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* 23, 356–366. doi:10.1183/09059180.00004614

Costa, D.B., Halmos, B., Kumar, A., Schumer, S.T., Huberman, M.S., Boggon, T.J., Tenen, D.G., Kobayashi, S., 2007. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med.* 4, 1669–1679; discussion 1680. doi:10.1371/journal.pmed.0040315

D'Angelo, S.P., Pietanza, M.C., 2010. The molecular pathogenesis of small cell lung cancer. *Cancer Biol. Ther.* 10, 1–10.

Ellison, G., Zhu, G., Moulis, A., Dearden, S., Speake, G., McCormack, R., 2013. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. *J. Clin. Pathol.* 66, 79–89. doi:10.1136/jclinpath-2012-201194

Fenzia, F., De Luca, A., Pasquale, R., Sacco, A., Forgione, L., Lambiase, M., Iannaccone, A., Chicchinelli, N., Franco, R., Rossi, A., Morabito, A., Rocco, G., Piccirillo, M.C., Normanno, N., 2015. EGFR mutations in lung cancer: from tissue testing to liquid biopsy. *Future Oncol. Lond. Engl.* 11, 1611–1623.

doi:10.2217/fon.15.23

Fujita, Y., Suda, K., Kimura, H., Matsumoto, K., Arao, T., Nagai, T., Saijo, N., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., Nishio, K., 2012. 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. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 7, 1640–1644. doi:10.1097/JTO.0b013e3182653d7f

Fukuoka, M., Wu, Y.-L., Thongprasert, S., Sunpaweravong, P., Leong, S.-S., Sriuranpong, V., Chao, T.-Y., Nakagawa, K., Chu, D.-T., Saijo, N., Duffield, E.L., Rukazenkov, Y., Speake, G., Jiang, H., Armour, A.A., To, K.-F., Yang, J.C.-H., Mok, T.S.K., 2011. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 2866–2874.

doi:10.1200/JCO.2010.33.4235

Gazdar, A.F., 2009. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 28 Suppl 1, S24-31. doi:10.1038/onc.2009.198

Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N.Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C.R., Nohadani, M., Eklund, A.C., Spencer-Dene, B., Clark, G., Pickering, L., Stamp, G., Gore, M., Szallasi, Z., Downward, J., Futreal, P.A., Swanton, C., 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* 366, 883–892. doi:10.1056/NEJMoa1113205

Han, H.-S., Eom, D.-W., Kim, J.H., Kim, K.-H., Shin, H.-M., An, J.Y., Lee, K.M., Choe, K.H., Lee, K.H., Kim, S.T., Koo, J.H., Lee, H., Lee, O.-J., 2011. EGFR mutation status in primary lung adenocarcinomas and corresponding metastatic lesions: discordance in pleural metastases. *Clin. Lung Cancer* 12, 380–386. doi:10.1016/j.clcc.2011.02.006

Hofman, P., Popper, H.H., 2016. Pathologists and liquid biopsies: to be or not to be? *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 469, 601–609. doi:10.1007/s00428-016-2004-z

Inukai, M., Toyooka, S., Ito, S., Asano, H., Ichihara, S., Soh, J., Suehisa, H., Ouchida, M., Aoe, K., Aoe, M., Kiura, K., Shimizu, N., Date, H., 2006. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 66, 7854–7858. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1951

Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F.O., Hesch, R.D., Knippers, R., 2001. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 61, 1659–1665.

- Jänne, P.A., Yang, J.C.-H., Kim, D.-W., Planchard, D., Ohe, Y., Ramalingam, S.S., Ahn, M.-J., Kim, S.-W., Su, W.-C., Horn, L., Haggstrom, D., Felip, E., Kim, J.-H., Frewer, P., Cantarini, M., Brown, K.H., Dickinson, P.A., Giorghiu, S., Ranson, M., 2015. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 372, 1689–1699. doi:10.1056/NEJMoa1411817
- Jenkins, S., Yang, J.C.-H., Ramalingam, S.S., Yu, K., Patel, S., Weston, S., Hodge, R., Cantarini, M., Jänne, P.A., Mitsudomi, T., Goss, G.D., 2017. Plasma ctDNA Analysis for Detection of the EGFR T790M Mutation in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 12, 1061–1070. doi:10.1016/j.jtho.2017.04.003
- Jiang, S.-Y., Zhao, J., Wang, M.-Z., Huo, Z., Zhang, J., Zhong, W., Xu, Y., 2016. Small-Cell Lung Cancer Transformation in Patients With Pulmonary Adenocarcinoma: A Case Report and Review of Literature. *Medicine (Baltimore)* 95, e2752. doi:10.1097/MD.0000000000002752
- Karachaliou, N., Mayo-de las Casas, C., Queralt, C., de Aguirre, I., Melloni, B., Cardenal, F., Garcia-Gomez, R., Massuti, B., Sánchez, J.M., Porta, R., Ponce-Aix, S., Moran, T., Carcereny, E., Felip, E., Bover, I., Insa, A., Reguart, N., Isla, D., Vergnenegre, A., de Marinis, F., Gervais, R., Corre, R., Paz-Ares, L., Morales-Espinosa, D., Viteri, S., Drozdowskyj, A., Jordana-Ariza, N., Ramirez-Serrano, J.L., Molina-Vila, M.A., Rosell, R., Spanish Lung Cancer Group, 2015. Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial. *JAMA Oncol.* 1, 149–157. doi:10.1001/jamaoncol.2014.257
- Karlovich, C., Goldman, J.W., Sun, J.-M., Mann, E., Sequist, L.V., Konopa, K., Wen, W., Angenendt, P., Horn, L., Spigel, D., Soria, J.-C., Solomon, B., Camidge, D.R., Gadgeel, S., Paweletz, C., Wu, L., Chien, S., O'Donnell, P., Matheny, S., Despain, D., Rolfe, L., Raponi, M., Allen, A.R., Park, K., Wakelee, H., 2016. Assessment of EGFR Mutation Status in Matched Plasma and Tumor Tissue of NSCLC Patients from a Phase I Study of Rociletinib (CO-1686). *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 2386–2395. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1260
- Keppens, C., Scudder, S., Das, P., Palma, J., Wen, W., Normanno, N., Krieken, H.V., Dequeker, E., 2017. P3.02b-043 Inter-Laboratory Comparison of the Roche Cobas EGFR Mutation Test v2 in Plasma. *J. Thorac. Oncol.* 12, S1213. doi:10.1016/j.jtho.2016.11.1710
- Kim, E.S., Hirsh, V., Mok, T., Socinski, M.A., Gervais, R., Wu, Y.-L., Li, L.-Y., Watkins, C.L., Sellers, M.V., Lowe, E.S., Sun, Y., Liao, M.-L., Osterlind, K., Reck, M., Armour, A.A., Shepherd, F.A., Lippman, S.M., Douillard, J.-Y., 2008. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet Lond. Engl.* 372, 1809–1818. doi:10.1016/S0140-6736(08)61758-4

Kuang, Y., Rogers, A., Yeap, B.Y., Wang, L., Makrigiorgos, M., Vetrand, K., Thiede, S., Distel, R.J., Jänne, P.A., 2009. Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 2630–2636. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2592

Kuiper, J.L., Heideman, D. a. M., Thunnissen, E., Paul, M.A., van Wijk, A.W., Postmus, P.E., Smit, E.F., 2014. Incidence of T790M mutation in (sequential) rebiopsies in EGFR-mutated NSCLC-patients. *Lung Cancer Amst. Neth.* 85, 19–24. doi:10.1016/j.lungcan.2014.03.016

Kumar, A., Petri, E.T., Halmos, B., Boggon, T.J., 2008. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 1742–1751. doi:10.1200/JCO.2007.12.1178

Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M., Yaros, M.J., 1977. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 37, 646–650.

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., 2008. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 27, 4702–4711. doi:10.1038/onc.2008.109

Li, X., Zhou, C., 2017. Comparison of cross-platform technologies for EGFR T790M testing in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* doi:10.18632/oncotarget.19007

Lin, M.-T., Mosier, S.L., Thiess, M., Beierl, K.F., Debeljak, M., Tseng, L.-H., Chen, G., Yegnasubramanian, S., Ho, H., Cope, L., Wheelan, S.J., Gocke, C.D., Eshleman, J.R., 2014. Clinical validation of KRAS, BRAF, and EGFR mutation detection using next-generation sequencing. *Am. J. Clin. Pathol.* 141, 856–866. doi:10.1309/AJCPMWGWGO34EGOD

Lindeman, N.I., Cagle, P.T., Beasley, M.B., Chitale, D.A., Dacic, S., Giaccone, G., Jenkins, R.B., Kwiatkowski, D.J., Saldivar, J.-S., Squire, J., Thunnissen, E., Ladanyi, M., College of American Pathologists International Association for the Study of Lung Cancer and Association for Molecular Pathology, null, 2013. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J. Mol. Diagn. JMD* 15, 415–453. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.03.001

Maheswaran, S., Sequist, L.V., Nagrath, S., Ulkus, L., Brannigan, B., Collura, C.V., Inserra, E., Diederichs, S., Iafrate, A.J., Bell, D.W., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Irimia, D., Settleman, J., Tompkins, R.G., Lynch, T.J., Toner, M., Haber, D.A., 2008. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N. Engl. J. Med.* 359, 366–377. doi:10.1056/NEJMoa0800668

Malapelle, U., Pisapia, P., Rocco, D., Smeraglio, R., di Spirito, M., Bellevicine, C., Troncone, G., 2016. Next generation sequencing techniques in liquid biopsy: focus on non-small cell lung cancer patients. *Transl. Lung Cancer Res.* 5, 505–510. doi:10.21037/tlcr.2016.10.08

Malapelle, U., Sirera, R., Jantus-Lewintre, E., Reclusa, P., Calabuig-Fariñas, S., Blasco, A., Pisapia, P., Rolfo, C., Camps, C., 2017. Profile of the Roche cobas® EGFR mutation test v2 for non-small cell lung cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 17, 209–215. doi:10.1080/14737159.2017.1288568

Mandel, P., Metais, P., 1948. [Not Available]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 142, 241–243.

Marchetti, A., Palma, J.F., Felicioni, L., De Pas, T.M., Chiari, R., Del Grammastro, M., Filice, G., Ludovini, V., Brandes, A.A., Chella, A., Malorgio, F., Guglielmi, F., De Tursi, M., Santoro, A., Crinò, L., Buttitta, F., 2015. Early Prediction of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors by Quantification of EGFR Mutations in Plasma of NSCLC Patients. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 10, 1437–1443. doi:10.1097/JTO.0000000000000643

Mok, T., Wu, Y.-L., Lee, J.S., Yu, C.-J., Sriuranpong, V., Sandoval-Tan, J., Ladrera, G., Thongprasert, S., Srimuninnimit, V., Liao, M., Zhu, Y., Zhou, C., Fuerte, F., Margono, B., Wen, W., Tsai, J., Truman, M., Klughammer, B., Shames, D.S., Wu, L., 2015. Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 21, 3196–3203. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2594

Mok, T.S., Wu, Y.-L., Thongprasert, S., Yang, C.-H., Chu, D.-T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., Nishiwaki, Y., Ohe, Y., Yang, J.-J., Chewaskulyong, B., Jiang, H., Duffield, E.L., Watkins, C.L., Armour, A.A., Fukuoka, M., 2009. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* 361, 947–957. doi:10.1056/NEJMoa0810699

Mok, T.S.K., Wu, Y.-L., Yu, C.-J., Zhou, C., Chen, Y.-M., Zhang, L., Ignacio, J., Liao, M., Srimuninnimit, V., Boyer, M.J., Chua-Tan, M., Sriuranpong, V., Sudoyo, A.W., Jin, K., Johnston, M., Chui, W., Lee, J.-S., 2009. Randomized, placebo-controlled, phase II study of sequential erlotinib and chemotherapy as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 5080–5087. doi:10.1200/JCO.2008.21.5541

Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., Salomon, D.S., 2006. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366, 2–16. doi:10.1016/j.gene.2005.10.018

Oxnard, G.R., Miller, V.A., Robson, M.E., Azzoli, C.G., Pao, W., Ladanyi, M., Arcila,

M.E., 2012. Screening for germline EGFR T790M mutations through lung cancer genotyping. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 7, 1049–1052. doi:10.1097/JTO.0b013e318250ed9d

Oxnard, G.R., Thress, K.S., Alden, R.S., Lawrance, R., Paweletz, C.P., Cantarini, M., Yang, J.C.-H., Barrett, J.C., Jänne, P.A., 2016. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 34, 3375–3382. doi:10.1200/JCO.2016.66.7162

Paez, J.G., Jänne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M.J., Sellers, W.R., Johnson, B.E., Meyerson, M., 2004. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497–1500. doi:10.1126/science.1099314

Popper, H., Gruber-Mösenbacher, U., Hutarew, G., Hochmair, M., Absenger, G., Brcic, L., Müllauer, L., Dekan, G., Setinek, U., Krenbek, D., Vesely, M., Pirker, R., Hilbe, W., Kolb, R., Webersinke, G., Hernler, T., Pall, G., Lax, S., Mohn-Staudner, A., 2016. Recommendations of the Austrian Working Group on Pulmonary Pathology and Oncology for predictive molecular and immunohistochemical testing in non-small cell lung cancer. *Memo* 9, 191–200.

Popper, H.H., Ryska, A., Tímár, J., Olszewski, W., 2014. Molecular testing in lung cancer in the era of precision medicine. *Transl. Lung Cancer Res.* 3, 291–300. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2014.10.01

R Core Team, 2017. *Statistikprogramm R*. R Foundation of Statistical Computing, Vienna.

Rosell, R., Molina, M.A., Costa, C., Simonetti, S., Gimenez-Capitan, A., Bertran-Alamillo, J., Mayo, C., Moran, T., Mendez, P., Cardenal, F., Isla, D., Provencio, M., Cobo, M., Insa, A., Garcia-Campelo, R., Reguart, N., Majem, M., Viteri, S., Carcereny, E., Porta, R., Massuti, B., Queralt, C., de Aguirre, I., Sanchez, J.M., Sanchez-Ronco, M., Mate, J.L., Ariza, A., Benlloch, S., Sanchez, J.J., Bivona, T.G., Sawyers, C.L., Taron, M., 2011. Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 1160–1168. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2158

Saad, N., Poudel, A., Basnet, A., Gajra, A., 2017. Epidermal growth factor receptor T790M mutation-positive metastatic non-small-cell lung cancer: focus on osimertinib (AZD9291). *OncoTargets Ther.* 10, 1757–1766. doi:10.2147/OTT.S100650

Sequist, L.V., Waltman, B.A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A.B., Fidias, P., Bergethon, K., Shaw, A.T., Gettinger, S., Cosper, 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., 2011. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci. Transl. Med.* 3, 75ra26. doi:10.1126/scitranslmed.3002003
- Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J., Haber, D.A., 2007. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 169–181. doi:10.1038/nrc2088
- Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E.H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., van Kooten, M., Dediu, M., Findlay, B., Tu, D., Johnston, D., Bezjak, A., Clark, G., Santabárbara, P., Seymour, L., National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, 2005. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 353, 123–132. doi:10.1056/NEJMoa050753
- Shigematsu, H., Lin, L., Takahashi, T., Nomura, M., Suzuki, M., Wistuba, I.I., Fong, K.M., Lee, H., Toyooka, S., Shimizu, N., Fujisawa, T., Feng, Z., Roth, J.A., Herz, J., Minna, J.D., Gazdar, A.F., 2005. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 339–346. doi:10.1093/jnci/dji055
- Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A., Anker, P., 2001. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 313, 139–142.
- Su, K.-Y., Chen, H.-Y., Li, K.-C., Kuo, M.-L., Yang, J.C.-H., Chan, W.-K., Ho, B.-C., Chang, G.-C., Shih, J.-Y., Yu, S.-L., Yang, P.-C., 2012. Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 433–440. doi:10.1200/JCO.2011.38.3224
- Sundaesan, T.K., Sequist, L.V., Heymach, J.V., Riely, G.J., Jänne, P.A., Koch, W.H., Sullivan, J.P., Fox, D.B., Maher, R., Muzikansky, A., Webb, A., Tran, H.T., Giri, U., Fleisher, M., Yu, H.A., Wei, W., Johnson, B.E., Barber, T.A., Walsh, J.R., Engelman, J.A., Stott, S.L., Kapur, R., Maheswaran, S., Toner, M., Haber, D.A., 2016. Detection of T790M, the Acquired Resistance EGFR Mutation, by Tumor Biopsy versus Noninvasive Blood-Based Analyses. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 1103–1110. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1031
- Thatcher, N., Chang, A., Parikh, P., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., von Pawel, J., Thongprasert, S., Tan, E.H., Pemberton, K., Archer, V., Carroll, K., 2005. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet Lond. Engl.* 366, 1527–1537. doi:10.1016/S0140-6736(05)67625-8
- Thress, K.S., Brant, R., Carr, T.H., Dearden, S., Jenkins, S., Brown, H., Hammett, T., Cantarini, M., Barrett, J.C., 2015. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC

patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. *Lung Cancer Amst. Neth.* 90, 509–515. doi:10.1016/j.lungcan.2015.10.004

Tomonaga, N., Nakamura, Y., Yamaguchi, H., Ikeda, T., Mizoguchi, K., Motoshima, K., Doi, S., Nakatomi, K., Iida, T., Hayashi, T., Nagayasu, T., Tsukamoto, K., Kohno, S., 2013. Analysis of intratumor heterogeneity of EGFR mutations in mixed type lung adenocarcinoma. *Clin. Lung Cancer* 14, 521–526. doi:10.1016/j.clcc.2013.04.005

Travis, W., Brambilla, E., Burke, A., Marx, A., Nicholson, A., 2015. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart 4th Edition. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Watanabe, M., Kawaguchi, T., Isa, S., Ando, M., Tamiya, A., Kubo, A., Saka, H., Takeo, S., Adachi, H., Tagawa, T., Kakegawa, S., Yamashita, M., Kataoka, K., Ichinose, Y., Takeuchi, Y., Sakamoto, K., Matsumura, A., Koh, Y., 2015. Ultra-Sensitive Detection of the Pretreatment EGFR T790M Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with an EGFR-Activating Mutation Using Droplet Digital PCR. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 21, 3552–3560. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2151

Wei, Z., Wang, W., Shu, Z., Zhou, X., Zhang, Y., 2017. Correlation Between Circulating Tumor DNA Levels and Response to Tyrosine Kinase Inhibitors (TKI) Treatment in Non-Small Cell Lung Cancer. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 23, 3627–3634.

Williams, C., Pontén, F., Moberg, C., Söderkvist, P., Uhlén, M., Pontén, J., Sitbon, G., Lundeberg, J., 1999. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am. J. Pathol.* 155, 1467–1471. doi:10.1016/S0002-9440(10)65461-2

Wu, Y.-L., Zhou, C., Liang, C.-K., Wu, G., Liu, X., Zhong, Z., Lu, S., Cheng, Y., Han, B., Chen, L., Huang, C., Qin, S., Zhu, Y., Pan, H., Liang, H., Li, E., Jiang, G., How, S.H., Fernando, M.C.L., Zhang, Y., Xia, F., Zuo, Y., 2015. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 26, 1883–1889. doi:10.1093/annonc/mdv270

Xiong, L., Cui, S., Ding, J., Sun, Y., Zhang, L., Zhao, Y., Gu, A., Chu, T., Wang, H., Zhong, H., Ye, X., Gu, Y., Zhang, X., Hu, M., Jiang, L., 2017. Dynamics of EGFR mutations in plasma recapitulates the clinical response to EGFR-TKIs in NSCLC patients. *Oncotarget.* doi:10.18632/oncotarget.19139

Xu, T., Kang, X., You, X., Dai, L., Tian, D., Yan, W., Yang, Y., Xiong, H., Liang, Z., Zhao, G.Q., Lin, S., Chen, K.-N., Xu, G., 2017. Cross-Platform Comparison of Four Leading Technologies for Detecting EGFR Mutations in Circulating Tumor DNA from

Non-Small Cell Lung Carcinoma Patient Plasma. *Theranostics* 7, 1437–1446.
doi:10.7150/thno.16558

Ye, X., Zhu, Z.-Z., Zhong, L., Lu, Y., Sun, Y., Yin, X., Yang, Z., Zhu, G., Ji, Q., 2013. High T790M detection rate in TKI-naive NSCLC with EGFR sensitive mutation: truth or artifact? *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 8, 1118–1120.
doi:10.1097/JTO.0b013e31829f691f

Yu, H.A., Arcila, M.E., Hellmann, M.D., Kris, M.G., Ladanyi, M., Riely, G.J., 2014. Poor response to erlotinib in patients with tumors containing baseline EGFR T790M mutations found by routine clinical molecular testing. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 25, 423–428. doi:10.1093/annonc/mdt573

Yu, H.A., Arcila, M.E., Rekhtman, N., Sima, C.S., Zakowski, M.F., Pao, W., Kris, M.G., Miller, V.A., Ladanyi, M., Riely, G.J., 2013. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 2240–2247.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2246

Yun, C.-H., Mengwasser, K.E., Toms, A.V., Woo, M.S., Greulich, H., Wong, K.-K., Meyerson, M., Eck, M.J., 2008. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2070–2075. doi:10.1073/pnas.0709662105