



**UNIVERSITÀ  
DI PARMA**

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE MEDICHE**

**CICLO XXX**

**ANALISI MUTAZIONALE DEL DNA TUMORALE CIRCOLANTE  
PLASMATICO NELLE NEOPLASIE POLMONARI EGFR MUTATE.  
RISULTATI DI UNO STUDIO PROSPETTICO**

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. **Riccardo Bonadonna**

Tutore:  
Chiar.mo Prof. **Marcello Tiseo**

Dottoranda:  
Dott.ssa **Paola Bordi**

ANNI 2014/2017

## **Indice**

Introduzione .....	4
I tumori del polmone con mutazione di EGFR .....	8
Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR).....	8
Trattamento delle neoplasie polmonari EGFR mutate.....	10
Resistenza a EGFR-TKI.....	13
Il DNA tumorale circolante.....	19
Detezione delle mutazioni attivanti EGFR.....	20
Detezione della mutazione di resistenza T790M.....	23
Razionale dello studio .....	26
Pazienti e metodi .....	26
Pazienti.....	26
Disegno dello studio.....	27
Raccolta del plasma ed estrazione del DNA.....	28
Analisi delle mutazioni su DNA circolante.....	29
Analisi su biopsia tissutale.....	30
Analisi statistica.....	31
Risultati .....	32
Pazienti EGFR mutati trattati in prima linea con inibitore di prima o seconda generazione.....	32
Pazienti EGFR mutati con resistenza T790M-mediata trattati con osimertinib.....	47

Discussione.....	70
Bibliografia.....	83

## **Introduzione**

Il tumore del polmone costituisce una delle neoplasie più frequentemente diagnosticate nel mondo occidentale. Le statistiche americane stimano un'incidenza di circa 117000 nuovi casi nel sesso maschile e 105000 nuovi casi nel sesso femminile per l'anno 2017, mentre i dati nazionali AIRTUM (Associazione Italiana Registri Tumori) collocano questa neoplasia al terzo posto come nuove diagnosi di tumore stimate sia negli uomini (28200 casi, 15% di tutti i tumori) e che nelle donne (13600 casi, 6% di tutti i tumori) [1, 2]. La crescita spesso asintomatica di questo tumore comporta che la diagnosi venga posta nella maggior parte dei casi in stadio avanzato che si traduce in un grave impatto sulla prognosi di questa malattia. Infatti, il tumore del polmone ad oggi rappresenta la principale causa di morte cancro-correlata e negli Stati Uniti sono stimati per l'anno in corso 155870 decessi, di cui 84590 negli uomini e 71280 nelle donne. In Italia, costituisce la prima causa di morte per cancro in qualsiasi fascia d'età negli uomini, la seconda nelle donne fino a 70 anni e la terza nelle donne ultra settantenni [1, 2].

Il principale fattore di rischio nell'insorgenza del tumore polmonare è il fumo di sigaretta, associato allo sviluppo di circa l'85-90% dei tumori polmonari. Il rischio è direttamente proporzionale alla durata di esposizione al fumo, al numero di sigarette fumate e al contenuto di catrame [3]. Il rischio relativo dei fumatori rispetto ai non fumatori è 14 volte maggiore e sale a 20 nei forti fumatori (oltre 20 sigarette/die). Il periodo di latenza necessario per il verificarsi del processo di carcinogenesi tra esposizione e insorgenza di tumori fumo-correlati è 15-20 anni,

lo stesso lasso di tempo necessario per riavvicinare il rischio dell'ex-fumatore a quello del non fumatore. Numerose evidenze vedono implicato nel rischio di insorgenza di tumore polmonare anche il fumo passivo, ritenuto responsabile di circa il 20% dei tumori del non fumatore attivo. Altri fattori di rischio sono l'esposizione ambientale e professionale a cancerogeni quali ad esempio asbesto e cadmio, l'inquinamento atmosferico e processi infiammatori cronici come la tubercolosi.

Da un punto di vista istologico, il riferimento per la classificazione delle neoplasie polmonari è la classificazione proposta dalla WHO (World Health Organization), di cui l'ultimo aggiornamento risale al 2015 e che distingue fra tumori non a piccole cellule (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC), circa l'85% di tutte le diagnosi, e tumori a piccole cellule (Small Cell Lung Cancer, SCLC) che rappresentano il restante 15%. A sua volta, il NSCLC comprende 3 diversi istotipi che necessitano di essere identificati e caratterizzati al fine di fornire tutti gli elementi necessari al corretto approccio terapeutico. I sottotipi del NSCLC sono:

- l'adenocarcinoma, che costituisce il 50% dei tumori polmonari ed è l'istotipo più diagnosticato in entrambi i sessi e nei pazienti senza esposizione tabagica, si presenta in genere come una lesione periferica con frequente coinvolgimento della pleura;
- il carcinoma squamoso, 20% di tutti i tumori polmonari, più frequente nel fumatore, a sede tipicamente centrale, ilare o parailare;
- il carcinoma grandi cellule, 10% dei tumori polmonari, rappresenta una diagnosi di esclusione con gli altri istotipi.

Il corretto approccio terapeutico dopo nuova diagnosi di NSCLC deve essere valutato alla luce dell'istotipo e del grado di estensione della malattia, studiato mediante tecniche di imaging (TAC total body, PET) volte ad individuare l'estensione del tumore primitivo, nonché la presenza o meno di metastasi a distanza.

Indipendentemente dall'istotipo, se le condizioni cliniche del paziente lo consentono, tumori diagnosticati in stadio iniziale (I, II, in casi selezionati IIIa) sono trattati con intervento chirurgico ad intento curativo, eventualmente preceduto da chemioterapia pre-operatoria in caso di malattia localmente avanzata con coinvolgimento mediastinico. In caso di non effettuabilità dell'intervento chirurgico, una valida alternativa è rappresentata dalla radioterapia. Successivamente all'intervento chirurgico, sulla base delle rischio di recidiva, può essere valutato un approccio chemioterapico e/o radioterapico post-operatorio [4, 5].

Sfortunatamente però, la maggior parte dei tumori polmonari NSCLC viene diagnosticata in stadio avanzato fin dall'esordio. In questo caso, l'approccio terapeutico che deve essere guidato sulla base delle caratteristiche anatomo-patologiche e molecolari della malattia, è esclusivamente farmacologico, e si propone come finalità il prolungamento della sopravvivenza, il miglioramento della qualità di vita e il controllo dei sintomi.

Il beneficio di un trattamento chemioterapico a base di platino quale prima linea di trattamento in pazienti con malattia avanzata è emerso già negli anni '90 ed è stato successivamente confermato dagli studi che hanno dimostrato maggior tollerabilità ed efficacia delle associazioni fra platino e i nuovi farmaci di terza

generazione (gemcitabina, vinorelbina, docetaxel, paclitaxel) [6-8]. In particolare, per quanto riguarda l'istologia non-squamosa, negli ultimi anni l'armamentario terapeutico si è arricchito di un nuovo antimetabolita, pemetrexed, il quale, associato a platino, si è dimostrato la miglior opzione terapeutica in prima linea, e di un farmaco biologico antiangiogenetico, bevacizumab, che, associato alla chemioterapia, ha determinato un vantaggio in sopravvivenza libera da malattia e globale [9-11]. Nel complesso, tali trattamenti hanno portato la mediana di sopravvivenza di questi pazienti oltre l'anno. Recentemente, diversi studi hanno valutato strategie di mantenimento ad un trattamento di induzione di prima linea dimostrando un vantaggio in sopravvivenza globale [12-14]. Infine, diversi sono i farmaci registrati per il trattamento di seconda linea del NSCLC avanzato tra cui docetaxel da solo e in associazione a nintedanib (inibitore dell'angiogenesi), erlotinib (inibitore tirosin- chinasi dell'Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR) e pemetrexed [15-18].

L'ultimo capitolo in termini di innovazioni farmacologiche nella cura del tumore al polmone riguarda l'impiego dell'immunoterapia, termine che identifica molecole in grado di agire su target molecolari espressi dalle cellule del sistema immunitario potenziando l'attività di quest'ultimo nei confronti del tumore. Il Pembrolizumab, anticorpo monoclonale diretto contro PD-1 (programmed death-1) ha mostrato eccellenti risultati in confronto alla chemioterapia standard in pazienti con NSCLC avanzato selezionati positivamente per l'alta espressione (>50%) di PD-L1 (programmed death-ligand 1) al prescindere dall'istotipo [19]. Nel trattamento di seconda linea, pembrolizumab è registrato nei pazienti con espressione di PD-L1 >1% e affiancato a nivolumab (anticorpo anti PD-1) che può

essere somministrato sia nei pazienti con adenocarcinoma che nei pazienti con carcinoma squamoso a prescindere dall'espressione di PD-L1 [20-22].

## **I tumori del polmone con mutazione di EGFR**

Nelle popolazioni occidentali, circa il 15% dei pazienti affetti da NSCLC presenta una mutazione a carico del gene codificante per EGFR in grado di conferire particolare sensibilità al trattamento con specifici inibitori quali gefitinib, erlotinib ed afatinib. L'identificazione di EGFR quale possibile bersaglio in pazienti selezionati affetti da neoplasia polmonare ha rappresentato la più importante svolta in termini di caratterizzazione molecolare e conseguente approccio terapeutico degli ultimi anni nel campo dell'oncologia toracica. In seguito, tale scoperta ha aperto la strada all'individuazione di altri target molecolari quali la traslocazione di ALK e il riarrangiamento di ROS1.

### **Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)**

EGFR è una glicoproteina transmembrana di 170 kDa appartenente alla superfamiglia dei recettori ad attività tirosin-chinasica intrinseca ErbB, (comprendente anche HER2, HER3 ed HER4) ed è codificata da un gene localizzato sul cromosoma 7p12, espresso nei tessuti epiteliali, mesenchimali e nervosi. Si compone di:

- un dominio extracellulare in grado di legare specifici ligandi tra cui EGF, TGF- $\alpha$  (Transforming Growth Factor- $\alpha$ ), anfiregulina, neuregulina;
- una porzione transmembranaria;

- una porzione intracellulare in grado di esercitare attività tirosin-chinasica.

Il legame di uno dei ligandi specifici con EGFR ne comporta la dimerizzazione e la successiva auto-fosforilazione dei residui tirosinici presenti nel dominio intracellulare. Il recettore così attivato recluta proteine intracellulari attivando cascate di segnale, tra cui quelle la via delle MAP-chinasi, la via di PI3K (via di mTOR) e la via di JAK-STAT3, il cui effetto si traduce in una aumentata capacità proliferativa e angiogenetica e in una inibizione dei processi di apoptosi con conseguente maggior potenzialità metastatizzante da parte della cellula neoplastica [23-27].

EGFR è espresso in tessuti sani ma anche in diverse neoplasie tra cui colon- retto, testa-collo, ovaio, pancreas, cervice, mammella, encefalo, rene, vescica e polmone [28-31]. Nelle neoplasie polmonari EGFR è risultato essere iperespresso nel 40-80% dei casi mentre in altri casi ne è stato evidenziato l'aumento di copie del gene o la sua amplificazione: tali caratteristiche inizialmente erano state identificate e come elementi in grado di predire la risposta agli specifici farmaci inibitori del recettore [32, 33]. Successivamente alcune mutazioni localizzate a carico degli esoni 19 (delezione), 21 (mutazione L858R e L861Q) e 18 (mutazione G719A/C) del gene per EGFR si sono rivelate essere il più importante fattore predittivo di risposta ai farmaci EGFR-TKI (Tyrosin Kinase Inhibitor). In pratica, tali mutazioni, definite attivanti, sono responsabili dell'attivazione costitutiva del recettore indipendentemente dal legame con il ligando, diventando così un meccanismo critico per la crescita e la sopravvivenza della neoplasia. Tuttavia, la presenza della mutazione si traduce un una modifica conformazionale del recettore e in particolare del il sito di legame per l'ATP, che presenta così

aumentata affinità per i TKI a discapito dell'ATP stesso [34-36]. La delezione dell'esone 19 (del19) e la mutazione L858R dell'esone 21 rappresentano le alterazioni attivanti più frequenti, costituendo circa il 85-90% della casistica, ed è dimostrato che esse siano più frequenti nei seguenti sottogruppi di pazienti: donne, non-fumatori, istotipo adenocarcinoma ed etnia asiatica (20-40% dei casi vs 10-15% nei pazienti caucasici) [37]. Sebbene il ruolo prognostico delle mutazioni di EGFR non sia ancora stato chiarito, essendoci studi che portano a risultati contrastanti in popolazioni di pazienti operati, il ruolo come predittrici di risposta e attività degli EGFR-TKI è ormai consolidato [38].

Meritano un breve cenno le mutazioni di KRAS, che presentandosi nel 20-25% dei casi, sono le alterazioni molecolari più frequenti nei pazienti con NSCLC. Il gene KRAS codifica per una proteina ad attività GTPasica coinvolta in molteplici pathway di trasduzione del segnale e, in circa il 90% dei casi, le mutazioni a suo carico, più frequenti nei fumatori, interessano i codoni 12 e 13 dell'esone 2 [39, 40]. Tali mutazioni sono considerate come fattore predittivo negativo di risposta a terapie con EGFR-TKI sulla base dei risultati di una meta-analisi del 2010 che ha evidenziato un tasso di risposta a EGFR-TKI in pazienti KRAS-mutati del 3% versus 26% nei pazienti KRAS-wild type ( $p < 0.01$ ) [39]. Va segnalato che, sebbene la maggior parte della letteratura riporti che le mutazioni di KRAS e EGFR sono mutualmente esclusive, alcuni autori hanno invece segnalato casi di pazienti con doppia mutazione di EGFR e KRAS e responsivi a EGFR-TKI [39, 40].

### **Trattamento delle neoplasie polmonari EGFR-mutate**

In virtù della peculiare sensibilità conferita dalle alterazioni molecolari, il trattamento delle neoplasie polmonari avanzate EGFR-mutate differisce dalle

corrispettive wild-type e si avvale dell'impiego di farmaci biologici orali inibitori tirosin-chinasici (gefitinib, erlotinib, afatinib) a 'bersaglio molecolare' dotati alta efficacia e migliore tolleranza rispetto ai trattamenti chemioterapici standard. La migliore efficacia si esplica sia in termini di risposte obiettive che di sopravvivenza globale e libera da progressione. Quest'ultima si assesta in media fra i 10-13 mesi.

Il trial IPASS è stato il primo studio che, sebbene condotto in pazienti non selezionati per la mutazione di EGFR, ha dimostrato, nelle analisi di sottogruppo, la netta superiorità di gefitinib in termini di risposte obiettive (71% vs 47%), tempo libero dalla progressione (9.5 mesi vs 6.3, Hazard Ratio-HR 0.48, Intervallo Confidenza-IC 95% 0.36-0.64) e qualità di vita rispetto ad una chemioterapia con carboplatino e paclitaxel in prima linea in pazienti EGFR-mutati con malattia avanzata [41]. Sulla base di questo risultato, e di altri studi che hanno portato a conclusioni analoghe, gefitinib è stato registrato per il trattamento di pazienti affetti da NSCLC avanzato EGFR-mutato [42, 43].

Analogamente, erlotinib è stato studiato in prima linea in confronto ad un trattamento chemioterapico standard in pazienti mutati. In particolare due studi, OPTIMAL e EURTAC, hanno confermato la superiorità di erlotinib in una popolazione cinese e caucasica, rispettivamente [44, 45]. Nello studio OPTIMAL, il tasso di risposte obiettive (response rate, RR) e il tempo libero da progressione (progressione free survival, PFS) sono stati rispettivamente 83% vs 36% e 13.7 vs 4.6 mesi (HR 0.16, IC 95% 0.10-0.26) a favore di erlotinib, mentre nello studio EURTAC le risposte sono state 58% vs 15% e la sopravvivenza libera da progressione 9.7 mesi vs 5.2 (HR 0.37, IC 95% 0.25-0.44).

Infine, anche afatinib, inibitore irreversibile di EGFR, ha dimostrato di conferire vantaggio in termini di response rate e sopravvivenza libera da progressione come è risultato dalla pooled analysis sui dati congiunti degli studi LUX-Lung 3 e LUX-Lung 6 che lo avevano testato verso chemioterapia in prima linea in pazienti portatori di mutazione. Inoltre, specificamente nei pazienti portatori della delezione dell'esone 19, afatinib ha dimostrato anche un vantaggio in sopravvivenza globale rispetto alla chemioterapia [46].

Gefitinib, erlotinib e afatinib presentano un profilo di tossicità estremamente differente rispetto alla chemioterapia standard. I principali effetti collaterali riscontrati in corso di trattamento sono la diarrea e il rash cutaneo, presenti in maniera sensibilmente più elevata come frequenza e gravità in corso di afatinib (inibitore irreversibile) piuttosto che erlotinib o gefitinib (inibitori reversibili) [41, 44, 46]. In termini di confronto diretto fra inibitori, lo studio LUX-Lung7 ha visto il confronto tra gefitinib e afatinib come prima linea di trattamento in pazienti affetti da NSCLC avanzato EGFR mutato [47]. Lo studio ha dimostrato differenze significative a favore dell'inibitore di seconda generazione afatinib per quanto riguarda la sopravvivenza libera da malattia (11 vs 10.9 mesi, HR 0.73, IC 95% 0.57-0.95; p=0.017) e tempo di fallimento al trattamento (13.7 vs 11.5 mesi, HR 0.73, IC 95% 0.58-0.92; p=0.0073), ma non ha mostrato differenze significative in termini di sopravvivenza globale (overall survival, OS) (27.9 vs 24.5 mesi, HR 0.87, IC 95% 0.66-1.15; p=0.33). Entrambi i farmaci sono stati ben tollerati, ma per afatinib sono stati registrati effetti collaterali mediamente più severi rispetto a gefitinib. Questo ha determinato nella maggior parte dei pazienti la necessità di una riduzione di dose che, sebbene non abbia avuto ripercussioni sull'efficacia, ha sottolineato una maggiore tossicità di afatinib.

Alla luce dei tassi di risposta, degli indici di sopravvivenza e della buona tollerabilità di questi farmaci, i pazienti con NSCLC avanzato EGFR-mutato sono candidati a ricevere un trattamento con EGFR-TKI in prima linea. Dalle evidenze ottenute, ad oggi non è possibile stabilire la netta superiorità di un inibitore rispetto all'altro, pertanto la scelta è guidata essenzialmente dalle caratteristiche cliniche del paziente.

### **Resistenza a EGFR-TKI**

La resistenza acquisita ai farmaci EGFR inibitori è purtroppo un evento inevitabile e viene distinta dalla resistenza primaria che è sostenuta dall'assenza delle mutazioni attivanti di EGFR o dalla presenza di altre mutazioni di EGFR non sensibili (ad esempio le inserzioni dell'esone 20) oppure a carico di geni diversi, come ad esempio KRAS. La resistenza acquisita si sviluppa dopo un'iniziale risposta alla terapia e dopo in media 12 mesi di trattamento con EGFR-TKI [48]. La comparsa di resistenza sarebbe da ascrivere all'insorgenza, sotto la pressione selettiva del TKI, di cloni caratterizzati da aberrazioni genomiche che conferiscono alla cellula la capacità di proliferare e sopravvivere nonostante la presenza del farmaco [49]. Pazienti progrediti a EGFR-TKI sono stati studiati per individuare, tramite re-biopsia alla progressione e successiva caratterizzazione molecolare, le alterazioni genomiche responsabili della resistenza.

La comparsa di una seconda mutazione T790M a carico dell'esone 20 di EGFR è la più frequente causa di resistenza acquisita, con una prevalenza fra il 49% e il 63% a seconda delle casistiche [48-50]. La mutazione T790M interferisce con la capacità degli EGFR-TKI di prima e seconda generazione, quali erlotinib, gefitinib e afatinib, di legarsi al sito ATPasico e quindi di svolgere la loro attività

inibitoria. Inoltre, in un lavoro pubblicato da Oxnard et al. la presenza della T790M sembra, rispetto ad altri meccanismi di resistenza, essere associata a una miglior prognosi in quanto i pazienti portatori hanno presentato una minor incidenza di nuovi siti metastatici, miglior performance status e maggiore sopravvivenza [51]. Alcuni lavori pubblicati hanno segnalato come la T790M possa essere presente anche all'esordio della malattia, associata alla presenza della mutazione attivante [52-54]. I pazienti con questa caratteristica sarebbero caratterizzati da un peggior outcome. Il riscontro della T790M in pazienti TKI-naïve depone a favore dell'ipotesi che il clone di cellule T790M positive possa essere presente in fasi precoci della malattia e accrescersi quantitativamente sotto la pressione selettiva del farmaco.

Altri meccanismi meno frequenti ritenuti essere responsabili della resistenza acquisita sono l'amplificazione di HER2 (12-13% dei casi), l'amplificazione di MET (5-11% dei casi), mutazioni a carico di PIK3CA (fino al 5% dei casi) e la mutazione di BRAF V600E (1% dei casi) [50, 55].

Una situazione particolare è rappresentata dal viraggio istotipico. E' stato riportato infatti che in alcuni casi, tumori esorditi come adenocarcinomi EGFR mutati alla resistenza mostrino fenotipi istologici diversi: tumore a piccole cellule (SCLC), carcinoma squamoso, aspetti di transizione epitelio-mesenchimale [56].

La trasformazione a SCLC è un evento che secondo le casistiche si verifica tra il 3 e il 14% dei casi [48, 50, 55]. In questo caso, la resistenza a EGFR-TKI sarebbe causata dall'emergenza di un clone di cellule virate verso una differenziazione istotipica di tipo tumore a piccole cellule con conseguenti caratteristiche di maggiore aggressività e rapidità evolutiva. Una possibile spiegazione potrebbe

risiedere nella eterogeneità tumorale: cellule con caratteristiche di SCLC esistenti fin dall'inizio, anche se in numero esiguo, potrebbero riuscire a proliferare sotto la spinta selettiva dei TKIs che vanno a colpire selettivamente le cellule EGFR mutate. Altre ipotesi sono a favore della differenziazione di cellule di SCLC a partire da un pool di cellule EGFR mutate; da questo pool originario eventi genetici ed epigenetici porterebbero allo sviluppo di cloni differenti. All'interno della stessa malattia, siti metastatici diversi possono presentare istologie differenti. Tutte le cellule trasformate mantengono comunque la mutazione attivante di EGFR, come evidenzia lo studio di Suda et al, che ha visto che le cellule con istologia adenocarcinoma erano caratterizzate dalla presenza contemporanea della mutazione attivante e della T790M; quelle di SCLC mantenevano l'attivante, ma erano T790M negative (in alcuni casi attivavano altre vie di segnalazione quali PTEN) [57]. In ogni caso, per la trasformazione in SCLC, sembra necessaria la perdita di funzione del gene RB1 e della relativa proteina. A tal proposito lo studio di Lee et al. ha evidenziato come le cellule di adenocarcinoma, a differenza di quelle SCLC, vedano una completa inattivazione di RB1 e di TP53 [58]. Questo apre alla possibilità di valutare tali caratteristiche molecolari nei pazienti trattati con TKIs, in modo tale da cercare di predire il cambio di istologia.

La transizione epitelio-mesenchimale è caratterizzata da cambiamenti nell'espressione di proteine del citoscheletro e in proteine che mediano l'adesione cellulare: perdita di espressione di E-caderina a fronte di una sovraespressione di proteine mesenchimali come vimentina, fibronectina e N-caderina. Diversi studi hanno cercato di capire come tale trasformazione potesse determinare resistenza ai TKIs. Fra questi è da segnalare uno studio condotto da Kanda et al. che ha

identificato nel pathway di segnalazione integrina beta1/Src/Akt un ruolo chiave nel meccanismo di resistenza ai TKIs [59].

Al momento, la diagnosi di resistenza è una diagnosi clinico-radiologica, basata sulla comparsa o peggioramento di sintomi o sulla progressione di malattia come indicato dai criteri RECIST 1.1 [60]. L'approccio gestionale a un paziente con resistenza acquisita può essere però significativamente diverso a seconda che la progressione sia avvenuta solo in una sede di malattia (oligo-progressione) o che, al contrario, riguardi diffuse sedi. Infatti, nel caso di oligo-progressione, diversi autori concordano nel ritenere necessaria la prosecuzione del TKI associata all'impiego di terapie locali, quali ad esempio la radioterapia, sulla sede in progressione [61-63]. Tale approccio ridurrebbe anche il rischio di *flare*, cioè la rapida evoluzione della malattia che può verificarsi alla sospensione del trattamento per effetto della cessata attività inibitoria del TKI sul clone ancora sensibile [64]. Al contrario, quando la resistenza acquisita si manifesta con un quadro di progressione in più sedi di malattia, è necessario un approccio terapeutico sistemico. Recentemente, sono stati presentati i dati di uno studio che ha valutato la prosecuzione di gefitinib oltre la progressione in associazione a una chemioterapia di prima linea [65]. Purtroppo, lo studio ha dato risultati negativi, rafforzando il concetto che la scelta terapeutica alla progressione non può prescindere dall'individuazione del meccanismo alla base della resistenza [66]. Questa intuizione è stata successivamente confermata dagli studi AURA che hanno dimostrato come l'impiego di osimertinib (AZD9291), inibitore irreversibile tirosin chinasi selettivo per EGFR T790M positivo, determinasse risultati estremamente favorevoli. In particolare, nello studio AURA3, trial di fase 3 che ha confrontato osimertinib versus chemioterapia in pazienti resistenti a TKI

di prima linea con resistenza T790M-mediata, il TKI di terza generazione ha mostrato miglior tasso di risposte obiettive (71% vs 31%) e miglior sopravvivenza libera da progressione (10.1 vs 4.4 mesi, HR 0.30 IC 95% 0.23-0.41,  $p < 0.001$ ) [67]. Al contrario, in caso di comparsa di clone SCLC è evidente la necessità di intraprendere un trattamento chemioterapico con platino ed etoposide che ha dimostrato, benché su casistica limitata, tassi di risposta paragonabili alla malattia SCLC d'emblée [68]. Sono invece in corso di sperimentazione farmaci in grado di agire specificatamente sulle altre alterazioni di resistenza individuate [55].

La ricerca in ogni singolo caso dell'aberrazione genomica associata a resistenza presuppone tuttavia la re-biopsia del tumore alla progressione al TKI. Nel caso delle neoplasie polmonari, re-biopsiare il paziente per ottenere nuovo tessuto tumorale su cui eseguire le indagini può rappresentare una seria limitazione. Recentemente, Bosc e colleghi hanno pubblicato uno studio che dimostra come nella loro casistica solo 39 pazienti su 84 siano stati re-biopsiati alla progressione a TKI e, dopo revisione delle immagini, hanno dimostrato che la re-biopsia era tecnicamente proponibile in 30 dei 45 pazienti non re-biopsiati [69]. In questo studio, la maggior parte delle re-biopsie è stata effettuata su lesioni toraciche, tuttavia la fibrobroncoscopia e l'agoaspirato TC-guidato sono procedure che spesso non ottengono adeguata compliance da parte del paziente e che non sono scevre da eventi avversi, quali sanguinamento o pneumotorace, i quali possono verificarsi fino nel 17% dei casi [70]. Inoltre, essendo le biopsie toraciche spesso poco ricche di tessuto tumorale, non è trascurabile il rischio che il campione prelevato risulti inadeguato o insufficiente per la caratterizzazione molecolare. Bisogna considerare inoltre che in caso di progressione cerebrale, la rebiopsia diventa impraticabile mentre diversi autori concordano nel rilevare come i prelievi

da metastasi ossee siano a rischio di inadeguatezza per la genotipizzazione soprattutto quando si rendono necessarie procedure di decalcificazione [71, 72]. E' altresì vero che alcuni pazienti presentano localizzazioni metastatiche più facilmente raggiungibili ai fini del campionamento. Tuttavia, differenti metastasi nello stesso paziente potrebbero essere portatrici di differenti alterazioni molecolari (*eterogeneità spaziale*), nonché le alterazioni presenti in un sito potrebbero variare nel tempo, anche in relazione ai trattamenti eseguiti (*eterogeneità temporale*). Questo potrebbe comportare che il campione ottenuto non sia rappresentativo di tutto lo spettro di alterazioni molecolari presenti nella neoplasia [73].

E' emersa pertanto la necessità di una metodica meno invasiva e meglio tollerata della re-biopsia tissutale in grado di fornire le informazioni molecolari necessarie per la miglior scelta terapeutica. Per tale motivo, l'impiego del DNA tumorale circolante quale alternativa alla re-biopsia tissutale ha preso il nome di 'biopsia liquida' e consente l'individuazione e il monitoraggio nel tempo di anomalie genetiche correlate al tumore. La 'biopsia liquida' trova particolare utilità nel NSCLC, dove il riscontro alterazioni molecolari sensibili a specifici farmaci-target è il cardine per la scelta terapeutica. Tuttavia, la maggior parte delle tecniche oggi utilizzate è in grado, mediante amplificazione del DNA di rilevare alterazioni semplici e note, come mutazioni puntiformi, piccole delezioni o inserzioni, ma non alterazioni geniche complesse, alcune già di rilevanza clinica quali il riarrangiamento di ALK. Questo punto potrebbe essere superato da più complesse tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS), non ancora però entrate nella routine di laboratorio. Per quanto riguarda lo studio dell'evoluzione molecolare di NSCLC EGFR mutato, molte speranze sono riposte nell'analisi

molecolare su DNA circolante, in particolare per la detezione della mutazione T790M. Tuttavia, bisogna sottolineare come la biopsia tissutale rimanga oggi uno strumento complementare, fondamentale in caso di mancata rilevazione della mutazione su plasma e per la ricerca degli altri meccanismi di resistenza.

## **Il DNA tumorale circolante**

Frammenti di DNA circolante sono stati descritti nel sangue già nel 1948 e da allora sono state studiate le sue possibili applicazioni in numerosi campi della medicina [74]. Diversi autori hanno studiato il comportamento dei livelli di DNA circolante in seguito a infarto miocardico, trauma, esercizio rilevando che i frammenti di DNA normalmente si trovano nel plasma in concentrazioni stabili che aumentano in conseguenza a necrosi o danno cellulare [73]. Analogamente, anche il DNA tumorale può essere individuato nel sangue di pazienti affetti da neoplasia, i quali presentano livelli di DNA circolante più alti rispetto ai soggetti sani [73]. Infatti, l'elevato turnover cellulare comporta un aumentato numero di cellule apoptotiche e necrotiche che superano la capacità di clearance dei fagociti. Pertanto, frammenti cellulari si accumulano e inevitabilmente si riversano nel circolo ematico [75]. L'evidenza che i frammenti di DNA sono presenti come multipli di 180 paia di basi sarebbe coerente con l'origine da processi apoptotici mentre il quantitativo di DNA rilasciato passivamente in circolo dipenderebbe da localizzazione, dimensione e vascolarizzazione del tumore, responsabili della variabilità dei livelli di DNA circolante. Il DNA tumorale circolante (ctDNA) viene distinto dalla controparte normale tramite la presenza di mutazioni e alterazioni genetiche caratteristiche delle cellule cancerose o pre-cancerose e che non sono evidenziabili nel DNA derivante da cellule sane. Le nuove tecnologie,

tra cui digital-PCR, in grado di rilevare ctDNA anche quando rappresenta una minima parte del DNA totale circolante, rendono il ctDNA un biomarcatore specifico e sensibile, fruibile per differenti scopi tra cui:

- Diagnosi precoce
- Studio dell'eterogeneità molecolare di una malattia tumorale
- Monitoraggio della dinamica tumorale
- Identificazione di alterazioni geniche per terapie biologiche
- Valutazione di risposte precoci ai trattamenti
- Controllo dei residui di malattia dopo chirurgia
- Monitoraggio dell'insorgenza di resistenza al trattamento [73].

### **Detezione delle mutazioni attivanti EGFR**

Per la prima volta nel 2006, Kimura et al segnarono la possibilità di identificare mutazioni di EGFR in ctDNA estratto da pazienti affetti da NSCLC [76]. Un anno dopo, gli stessi autori pubblicavano i risultati di uno studio in cui il dato mutazionale su tessuto veniva confrontato con quello su ctDNA dimostrando una concordanza del 93%. [77]. Moltissimi altri autori hanno lavorato per studiare i livelli di concordanza fra mutazioni attivanti EGFR su sangue e tessuto [78-80]. La grande quantità di dati presenti in letteratura ha quindi spinto alla conduzione di due metanalisi [81, 82]. Entrambe hanno rilevato l'elevata sensibilità della

biopsia liquida mediante analisi di ctDNA e sottolineato l'enorme vantaggio della non invasività che caratterizza la metodica. Tuttavia, è emersa una difficoltà nell'interpretazione dei risultati dovuta principalmente all'enorme varietà di tecniche utilizzate nei diversi studi esaminati. Due grossi trial condotti successivamente alle metanalisi, e pertanto non inclusi, sono giunti alle stesse considerazioni [83, 84]. Ad esempio, in un sottogruppo di pazienti arruolati nello studio ASSESS nel quale è stata usata la stessa metodica (Kit Therascreen PCR) nel confronto tessuto/plasma, i risultati sono stati: concordanza tessuto-plasma 94.9%, sensibilità del 72.7%, specificità 99.1%.

Diversi autori hanno sottolineato come la concentrazione di ctDNA sia proporzionalmente associata all'estensione della malattia e al numero di siti metastatici [85-88]. Inoltre, nell'analisi condotta sui pazienti arruolati negli studi LUX-Lung 3 e 6 che hanno testato l'efficacia di afatinib in prima linea, la presenza di mutazioni nel sangue è risultata correlata a specifici siti di metastasi, in particolare fegato e osso [87].

In un lavoro pubblicato nel 2011, Zhou e colleghi hanno evidenziato come elevate quantità di mutazione nel tessuto di pazienti con NSCLC EGFR mutato predicessero migliori risultati dalla terapia con EGFR-TKI, sia in termini di RR, PFS che OS, rispetto a chi presentava basse quantità o assenza di mutazione [89]. Il valore prognostico e predittivo delle mutazioni di EGFR è stato quindi anche studiato sul sangue. Diversi studi sono stati pubblicati al tal proposito negli ultimi 10 anni e per chiarire meglio il ruolo di prognostico, due metanalisi sono state condotte. La prima è stata pubblicata nel 2015 e ha incluso 25 studi [90]. Gli autori hanno evidenziato come la pazienti con presenza di mutazioni attivanti EGFR nel sangue trattati con TKI presentassero miglior PFS (HR 0.72, IC 95%

0.64-0.80), migliori risposte obiettive (RR: 4.08, IC 95% 2.48-6.70) e miglior OS (HR 0.71, IC95% 0.50-0.99). Per tutte e tre le misure di outcome, la differenza è risultata essere statisticamente rilevante. Inoltre, sulla base dei dati raccolti, gli autori hanno sottolineato come l'analisi mutazionale condotta su siero presenti valore predittivo positivo maggiore rispetto a quella condotta su plasma, ipotizzando quindi il siero come miglior surrogato del tessuto tumorale. Analogamente, un'altra metanalisi ha selezionato 13 studi, confermando come la presenza di mutazioni di EGFR nel sangue in pazienti trattati predica miglior PFS [91]. Tuttavia, non è stato confermato il valore prognostico in OS, pur osservando un trend a favore dei pazienti positivi su sangue. Al contrario, il riscontro di ctDNA positivo per mutazioni di EGFR è risultato essere un fattore prognostico negativo nello studio pubblicato da Wu et al. riguardante i pazienti trattati nei trial LUX-Lung 3 e 6 [87].

Grande interesse è attualmente rivolto anche alla valutazione dinamica (o *longitudinale*) dell'andamento delle mutazioni detettabili su sangue nel corso della terapia con TKI.

Infatti, a partire dalle prime osservazioni in cui si è evinto che la quantità di mutazione attivante nel sangue si riduceva in corso di terapia per poi aumentare di nuovo alla progressione, unitamente alla comparsa dell'eventuale T790M, diversi filoni di ricerca sono stati sviluppati nel tentativo di investigare il ruolo predittivo delle variazioni mutazionali [92-94]. Ad oggi tuttavia, il monitoraggio plasmatico non trova impiego nella pratica clinica dove le decisioni terapeutiche vengono prese sulla base di dati clinici e/o strumentali.

### *Detezione della mutazione di resistenza T790M*

La specificità della biopsia liquida mediante analisi del ctDNA è risultata prossima al 100%, per cui la detezone della T790M su plasma non necessita una conferma da parte della biopsia tissutale. Oxnard e colleghi hanno condotto uno studio retrospettivo sui pazienti del trial AURA per i quali erano disponibili sia campioni di tessuto che di sangue. Lo studio ha rilevato che la risposta a osimertinib in pazienti che avevano intrapreso la terapia sulla base della positività su plasma era sovrapponibile a quella dei pazienti in cui la positività per T790M era stata determinata su tessuto (rispettivamente RR 62%vs 63% e PFS 9.7 mesi in entrambi i gruppi) [95].

Lo stesso studio sottolinea come la sensibilità della biopsia liquida per T790M sia invece pari a circa il 70%, per cui tralascerebbe circa un 30% di pazienti potenzialmente suscettibili di terapia con inibitori della T790M. In questo caso, la re-biopsia tissutale diventa indispensabile per l'avvio alla terapia target.

Incerto è invece il comportamento da tenere nel caso in cui la T790M sia evidenziata su plasma, ma non su tessuto. Questo risultato potrebbe essere dovuto ad un piccolo pool di cellule T790M positive non campionate dalla biopsia, ma che hanno rilasciato in circolo DNA tumorale. Una durevole risposta ad inibitori di terza generazione in alcuni di questi pazienti sembrerebbe supportare questa ultima ipotesi. È anche vero che la presenza di T790M solo su plasma potrebbe essere riflesso di un basso carico di malattia esprimente il target, per cui la terapia mirata potrebbe essere meno efficace. Sempre il gruppo di Oxnard ha cercato una possibile correlazione tra lo stato mutazionale di EGFR al prelievo basale e la risposta al farmaco mediante un'analisi anche qualitativa e quantitativa misurando

la T790M, le mutazioni attivanti, e il rapporto tra le due (T790M/attivante) come frazioni alleliche (AF).

In particolare, i risultati su plasma erano considerati positivi se la mutazione veniva detectata uguale o superiore ai limiti di approvazione:  $AF \geq 0.04\%$  per esone 19 ed L858R, e  $AF \geq 0.06\%$  per la T790M.

Tra i 164 pazienti T790M positiva su plasma, 18 avevano un tessuto negativo. Tutti i pazienti avevano risposto ad osimertinib, ma con significative differenze sia in termini di risposta oggettiva che di progressione libera da malattia: se il gruppo con mutazione presente sia su plasma che su tessuto aveva visto un ORR di 64% e una PFS di 9.3 mesi, il gruppo caratterizzato da plasma positivo/tessuto negativo aveva visto invece un ORR pari a 28% e una PFS di 4.2 mesi. Gli autori suggeriscono che, per inquadrare meglio la possibile risposta agli inibitori di III generazione, nel sottogruppo di pazienti con queste caratteristiche potrebbe essere utile calcolare il rapporto tra la frazione allelica della T790M e la frazione allelica dell'attivante. La frazione allelica relativa era infatti maggiore nei pazienti positivi anche su tessuto; in particolare pazienti con una ratio  $\geq$  al 10% mostravano una profondità di risposta ad osimertinib maggiore rispetto a quelli con una ratio  $\leq$  al 10%.

Un altro studio condotto da Chabon et al. è arrivato a conclusioni simili andando a studiare i livelli delle mutazioni, sempre espressi in frazioni alleliche, al prelievo basale e dopo terapia con rociletinib (EGFR-TKI di terza generazione di cui è stato interrotto lo sviluppo clinico), correlando poi l'andamento della T790M con la risposta al trattamento. La mutazione attivante era riscontrata al basale nel 95% dei casi e alla progressione nel 93%; la mutazione T790M nel 95% dei casi al basale e nel 77% alla progressione. Nei casi in cui erano disponibili entrambi i dati

sia al basale che alla progressione è stata calcolata la ratio, come nello studio di Oxnard: il rapporto T790M/attivante era significativamente più basso alla progressione rispetto al basale. È stato quindi ipotizzato che il valore della ratio al basale possa predire la risposta agli inibitori di III generazione. Più nel dettaglio, identificando una ratio mediana di 0.5, lo studio ha evidenziato come tutti i pazienti con una ratio  $\leq 0.5$  andassero incontro a uno shrinkage tumorale minore rispetto ai pazienti con una ratio  $\geq 0.5$  [96].

Da questi due studi sembra quindi che, più che una valutazione binaria in termini di positività e negatività della T790M, potrebbe essere utile la determinazione quantitativa delle frequenze alleliche; inoltre sembra che la ratio misurata al prelievo basale possa costituire un marcatore predittivo di profondità di risposta ai TKI di terza generazione.

Non si tratta comunque di risultati definitivi; intorno a questi dati vi sono ancora molte incertezze. Ad esempio, lo studio di Remon et al, sembra in parte smentire i lavori appena citati: pur riferendosi a un numero limitato di casi, ha anch'esso indagato l'outcome clinico di pazienti in trattamento con osimertinib in relazione agli stessi possibili fattori predittivi – AF di T790M, AF dell'attivante, ratio. Nessuna correlazione è risultata statisticamente significativa, ma il lavoro ha osservato una risposta tendenzialmente migliore nei casi di bassa AF della T790M al prelievo basale (AF < 0.25%) [97].

Tutte queste considerazioni chiamano quindi la necessità di ulteriori studi di approfondimento.

## **Razionale dello studio**

Lo studio ha come obiettivo la valutazione dell'accuratezza diagnostica dell'analisi molecolare su plasma condotta mediante Digital Droplet – PCR sia nei confronti dell'analisi condotta su tessuto tumorale (gold standard) sia nei confronti dell'analisi condotta mediante Scorpion-ARMS (Therascreen) sempre su plasma.

Un'altra finalità della presente ricerca è quella di monitorare dinamicamente le variazioni dei livelli di mutazioni dosabili nel sangue in relazione alla risposta al farmaco TKI, al fine di studiare il potenziale impatto prognostico delle variazioni dei livelli mutazionali nell'identificazione di sottogruppi di pazienti che traggono maggior beneficio dal trattamento farmacologico e che presentano migliori parametri di outcome, quali la risposta, la sopravvivenza libera da progressione (Progression Free Survival, PFS) e la sopravvivenza globale (Overall Survival, OS).

## **Pazienti e metodi**

### **Pazienti**

Lo studio ha incluso pazienti che presentassero le seguenti caratteristiche cliniche:

- diagnosi citologica o istologica di neoplasia polmonare avanzata (stadio IIIB o IV) o localmente avanzata (IIIA) ma non suscettibile di terapia multimodale;
- presenza di mutazione di EGFR;
- indicazione a trattamento con inibitore tirosin-chinasico specifico;
- nessuna precedente terapia con inibitore tirosin chinasico;
- firma del consenso informato;
- capacità di intendere e di volere;

- età > 18.

Questi criteri di inclusione hanno consentito l'arruolamento di due categorie di pazienti:

- quelli con prima diagnosi di neoplasia polmonare avanzata o localmente avanzata con mutazione attivante EGFR che venivano avviati a trattamento con inibitore specifico di prima o seconda generazione (gefitinib, erlotinib o afatinib);
- quelli con neoplasia polmonare EGFR mutata e che fossero progrediti al trattamento di prima linea con EGFR-TKI in relazione alla comparsa di mutazione di resistenza T790M.

Infatti, in seguito alla disponibilità di un TKI di terza generazione altamente selettivo per la mutazione di resistenza T790M (osimertinib) tali pazienti sono stati considerati, analogamente ai pazienti TKI-naive, come pazienti sottoposti a terapia specifica per l'alterazione molecolare espressa e quindi sono stati sottoposti a monitoraggio plasmatico.

Verranno di seguito riportati i risultati relativi ad entrambe le casistiche esaminate.

### **Disegno dello studio**

Si tratta di uno studio osservazionale prospettico. Al momento dell'inclusione nello studio doveva essere presente una valutazione strumentale basale di malattia con TC, RM o TC/PET.

La rivalutazione strumentale è stata eseguita ogni 12 settimane, utilizzando i criteri RECIST v.1.1. I criteri RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) valutano radiologicamente la risposta ai trattamenti oncologici nei tumori solidi attraverso la misurazione della variazione di lesioni target. Le risposte al trattamento sono state così codificate come:

- risposta completa (CR): scomparsa di tutte le lesioni target;
- risposta parziale (PR): diminuzione di almeno il 30% nella somma dei diametri;
- stabilità di malattia (SD): diminuzione inferiore al 30%, o aumento non superiore al 20% nella somma dei diametri;
- progressione di malattia (PD): aumento di almeno il 20% nella somma dei diametri o comparsa di nuove lesioni.

La PFS è calcolata come il tempo intercorso fra l'inizio del trattamento target e la progressione di malattia, mentre l'OS come tempo intercorso tra l'inizio del trattamento e la data di decesso. I pazienti che non hanno presentato eventi di progressione o morte sono stati censorizzati al momento della chiusura della raccolta dei dati clinici, avvenuta il 22 settembre 2017.

Ogni procedura è stata eseguita previa firma del consenso informato. Lo studio, con acronimo DiNAmic, è stato approvato dai Comitati Etici dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana e dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma.

I pazienti sono stati arruolati a partire da Settembre 2015 fino a Febbraio 2017.

#### **Raccolta del plasma ed estrazione del DNA**

I campioni di plasma per l'analisi del DNA tumorale circolante sono stati prelevati prima dell'inizio del trattamento specifico (basale) e successivamente a cadenza fissa. In particolare, nei pazienti trattati in prima linea i campioni successivi sono stati raccolti ogni due mesi e ad ogni rivalutazione radiologica di malattia. Nei pazienti T790M-positivi in terapia con osimertinib, i prelievi successivi sono stati raccolti ogni 3 mesi in occasione della rivalutazione TC.

Per ogni paziente sono stati prelevati 6ml di sangue in provette contenenti EDTA. E' stata eseguita una doppia centrifugata, 2000g per 10 minuti ciascuna, per la separazione del plasma. Il plasma ottenuto è stato aliquotato e stoccato a -80°C fino al momento dell'estrazione.

L'estrazione di cfDNA è stata eseguita mediante kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) partendo da 2 ml di plasma secondo le indicazioni del protocollo ed eluito in un volume finale di 6ul.

### **Analisi delle mutazioni su DNA circolante**

L'analisi dello stato mutazionale di EGFR su cfDNA è stata eseguita utilizzando due metodiche: digital droplet PCR (ddPCR, BioRad®, Hercules, CA, USA) e Therascreen EGFR Plasma RGQ PCR kit (Qiagen®, Valencia, CA, USA).

Per la ddPCR (ddPCR, BioRad®, Hercules, CA, USA) sono state utilizzati i saggi mutazionali ddPCR Mutation Assay (BioRad®) secondo protocollo. Sono state impiegate due sonde relative alle delezioni dell'esone 19, una per la mutazione p.L858R (esone 21), e una per la mutazione di resistenza p.T790M (esone 20) del gene EGFR. La reazione di PCR è stata assemblata in accordo al seguente protocollo: 20ng di DNA (4ul), 1 ul di saggio 20X primer/sonda target-specifico (FAM), 1 ul di saggio 20X primer/sonda per l'allele wild-type (HEX), 10ul di 2X ddPCR Super Mix e 4ul di DNase-RNase free per un volume finale di 20ul. Sono stati aggiunti 70ul di olio ad ogni campione e la cartuccia è stata inserita nello strumento per generare le bolle, droplet generator (Biorad®). 40 ul di mix di campione/olio sono stati trasferiti nel termociclatore per l'amplificazione secondo le seguenti condizioni: 95°C × 10 min, 94°C × 30 s e 55°C × 60 s (35 cycles),

98°C × 10 min. Per la quantificazione del segnale fluorescente è stato utilizzato il droplet reader.

Per la seconda analisi mutazionale è stato utilizzato il kit Therascreen EGFR Plasma RGQ PCR kit (Qiagen®, Valencia, CA, USA) che prevede l'utilizzo di quattro sonde: una per il controllo, una per la rilevazione delle delezioni nell'esone 19, una per la T790M (esone 20) e una per la L858R (esone 21). Il kit utilizza due tecnologie, ARMS (Amplification Refractory Mutation System) e Scorpions, per l'individuazione delle mutazioni tramite PCR Real-time. La reazione di PCR è stata assemblata, per ogni sonda, secondo il seguente protocollo: 5 ul di DNA, 19.5 ul di miscela di reazione sonda-specifica e 0.5 ul di Taq Polymerase per un volume finale di 20ul. Tutte le miscele delle reazioni contengono reagenti sufficienti per rilevare i target marcati con il fluoroforo FAM™, più un saggio di un controllo interno marcato con il fluoroforo HEX™. La mix di reazione è stata quindi caricata sullo strumento Rotor-Gene Q MDx per l'amplificazione secondo le seguenti condizioni: 95°C × 15 min, 95°C × 30 s e 60°C × 60 s (40 cicli). L'acquisizione dei segnali di fluorescenza avviene durante la fase a 60°C durante ogni ciclo. L'interpretazione dei dati relativi alla valutazione delle mutazioni è stata fatta in accordo alle specifiche del kit.

### **Analisi su biopsia tissutale**

Per quanto riguarda il sottogruppo di pazienti trattati in prima linea i dati raccolti dalle analisi sul DNA circolante sono stati confrontati con il dato mutazionale di riferimento (gold standard) espresso su tessuto. L'analisi mutazionale su tessuto è stata condotta mediante kit Therascreen EGFR RGQ PCR kit (Qiagen®, Valencia, CA, USA) che prevede l'utilizzo di 8 sonde specifiche per i seguenti target:

controllo (esone 2), delezioni dell'esone 19, T790M (esone 20), L858R (esone 21), G719X (esone 18), S768I (esone 20), L861Q (esone 21) e inserzioni dell'esone 20.

### *Analisi statistica*

Sono stati stabiliti i livelli di concordanza fra dato mutazionale tissutale e dato mutazionale su plasma mediante ddPCR. Inoltre, è stata studiata la concordanza fra le due metodiche di analisi su plasma.

L'associazione fra caratteristiche cliniche e livelli di mutazioni del DNA circolante plasmatici e misure di outcome quali miglior risposta, PFS e OS è stata esaminata mediante regressione di Cox. Successivamente, in caso di associazioni significative, o al limite della significatività, sono state confrontate le curve di sopravvivenza mediante logrank test (Mantel-Cox) in caso di variabili categoriche, mentre è stata usata l'analisi della varianza (Anova) per variabili continue.

Per valutare la capacità dei livelli plasmatici del DNA circolante nel predire la risposta al trattamento è stato ricercato un cut-off e testato sugli eventi di progressione di malattia. Per valutare e comparare la capacità dei livelli plasmatici del DNA circolante nel predire la risposta al trattamento sono state costruite delle curve ROC (Receiver operating Characteristic).

L'analisi statistica è stata condotta mediante software SPSS.

## **Risultati**

### **Pazienti EGFR mutati trattati in prima linea con inibitore di prima o seconda generazione**

#### **Caratteristiche generali**

Per quanto concerne il sottogruppo di pazienti trattati in prima linea, sono stati studiati complessivamente 37 pazienti. Le caratteristiche cliniche e i dati relativi alla situazione basale di malattia sono riassunti nella Tabella 1.

L'età mediana dei pazienti è risultata pari a 68 anni (range 41 – 86). La maggior parte dei pazienti è rappresentata da donne (26 su 37, 70.3%). Relativamente all'abitudine tabagica, i pazienti erano stati per lo più non fumatori (22, 59.5%), mentre 13 (28.3%) erano gli ex-fumatori e solo 2 (5.4%) i fumatori attivi. Tutti i pazienti presentavano una diagnosi istologica di adenocarcinoma, ad eccezione di 2 su 37 che hanno avuto diagnosi di carcinoma a grande cellule. Ad eccezione di un solo paziente con PS 2, gli altri pazienti sono equamente distribuiti fra PS 0 e 1 (entrambi 18, 48.6%). Quasi tutti i pazienti (34, 91.9%) hanno presentato malattia in stadio IV e i restanti 3 erano in stadio IIIB alla diagnosi. La sede di metastasi più frequentemente coinvolta è stata l'osso (45.9%), a seguire la pleura (35.1%), l'encefalo (16.2%), il surrene e i linfonodi addominali (10.8%) e infine il fegato (13.5%). Tenendo conto della sede di origine polmonare del tumore, la maggior parte dei pazienti ha presentato 2 sedi di malattia (45.9%), 10 pazienti avevano 3 sedi di malattia (27%), mentre 7 pazienti presentavano malattia solo a livello polmonare (18.9%).

Quasi tutti i pazienti hanno ricevuto EGFR-TKI upfront come prima linea di trattamento, mentre solo un paziente era stato pre-trattato con chemioterapia. La

mutazione attivante più frequente è stata la del19 (51.4%), seguita dalla L858R (40.5%). Tre pazienti hanno presentato alla diagnosi 3 mutazioni rare di EGFR: del19 associata a T790M *de novo*, L861Q, G719X+S781I. Il 70.3% dei pazienti ha ricevuto gefitinib, e il 21.6% afatinib. Tre pazienti sono stati arruolati in protocollo sperimentale FLAURA che prevedeva la randomizzazione in cieco fra gefitinib e osimertinib.

Sei pazienti (16.2%) hanno avuto progressione di malattia come miglior risposta al trattamento (resistenza primaria). Al contrario, 1 paziente ha avuto risposta completa, 21 (56.8%) pazienti risposta parziale e 9 (24.3%) pazienti stabilità di malattia. Il disease control rate è stato quindi pari al 83.8%.

I pazienti con resistenza primaria hanno presentato le seguenti caratteristiche: 2 su 6 presentavano istologia a grandi cellule, solo 1 paziente era di sesso maschile, 3 pazienti erano del19 positivi, 2 positivi per L858R e una era positiva per del19 e mutazione T790M *de novo*. Quest'ultima è stata l'unica ad essere trattata con afatinib, mentre gli altri 5 hanno ricevuto gefitinib. In questo sottogruppo, la mediana di PFS è stata 2.3 mesi, e il sito di progressione più frequente è risultato essere il polmone (4 pazienti su 6), seguito da osso (3 su 6), pleura (2 su 6) e encefalo (1 su 6).

Al momento dell'analisi statistica di questa tesi, i pazienti sono stati seguiti per un follow-up mediano di 17.6 mesi (IC 95% 11.5 – 23.8). Con 21 eventi di progressione accertati, la PFS globale è pari a 13 mesi (IC 95% 4.8 – 21.1). Al contrario, essendosi verificati solo 11 decessi, la mediana per la sopravvivenza globale non è stata raggiunta: la sopravvivenza a 12 e 24 mesi, infatti, è rispettivamente del 79% e 58%.

**Tabella 1.** Caratteristiche dei pazienti del sottogruppo trattato in prima linea (NR: non raggiunta)

<b>CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI</b>	<b>N (%)</b>
Età mediana anni (range)	68 (41 – 86)
Sesso	
Maschi	11 (29.7%)
Femmine	26 (70.3%)
Abitudine tabagica	
Fumatori	2 (5.4%)
Non-fumatori	22 (59.5%)
Ex-fumatori	13 (28.3%)
Performance Status PS	
0	18 (48.6%)
1	18 (48.6%)
2	1 (2.8%)
Stadio	
IIIB	3 (8.1%)
IV	34 (91.9%)
Siti di malattia (extra polmonari)	
Pleura	13 (35.1%)
Encefalo	6 (16.2%)
Osso	17 (45.9%)
Surrene	4 (10.8%)
Fegato	5 (13.5%)
Linfonodi addominali	4 (10.8%)
Numero siti di malattia	
1	7 (18.9%)
2	17 (45.9%)
3	10 (27%)
4	2 (5.4%)
>5	1 (2.7%)
Linea di trattamento	

1	36 (97.3%)
2	1 (2.7%)
Tipo di mutazione EGFR	
Delezione esone 19	19 (51.4%)
L858R	15 (40.5%)
Altre	3 (8.1%)
TKI	
Gefitinib	26 (70.3%)
Afatinib	8 (21.6%)
Altro	3 (8.1%)
Risposta obiettiva	
CR	1 (2.7%)
PR	21 (56.8%)
SD	9 (24.3%)
PD	6 (16.2%)
Progression Free Survival mediana (IC 95%)	13 (4.8 – 21.1)
Overall Survival mediana (IC 95%)	NR

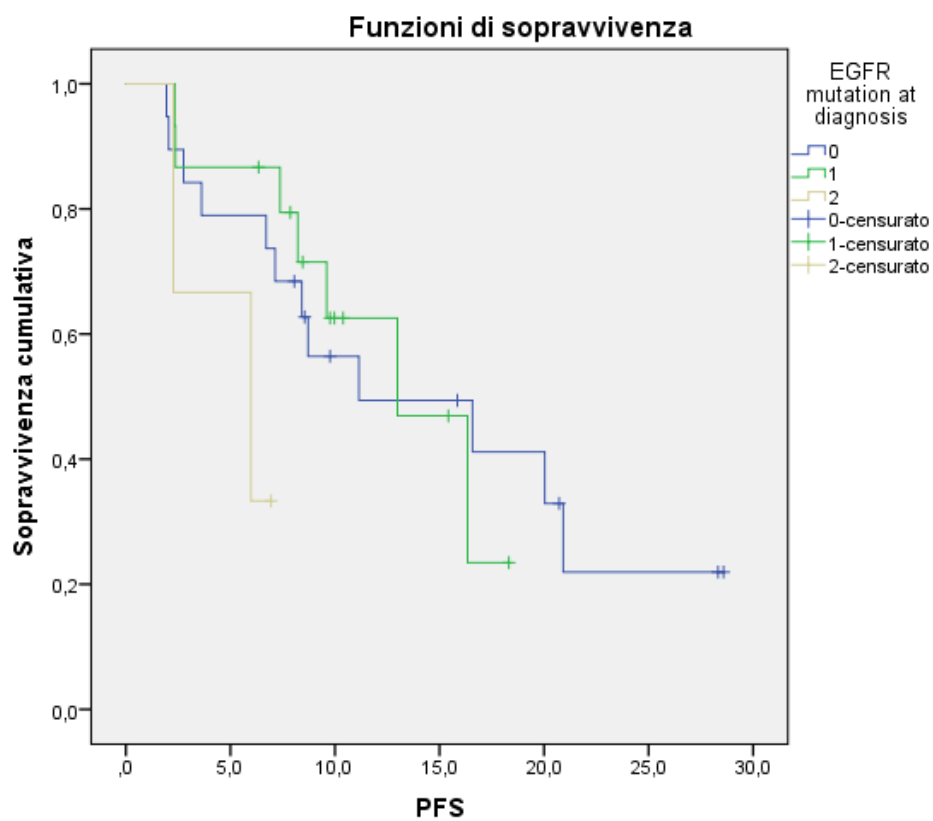
#### Analisi di fattori clinici predittivi di risposta

La miglior risposta al trattamento con TKI non risulta essere influenzata in modo statisticamente significativo da nessuno dei fattori clinici presi in esame (età, sesso, abitudine tabagica, sede delle metastasi, numero di siti di malattia, tipo di mutazione attivante EGFR, tipo di TKI scelto per il trattamento).

Analogamente, nessuno dei fattori sopradescritti ha dimostrato di essere associato in modo statisticamente significativo con la PFS, ad eccezione del tipo di mutazione attivante EGFR presente alla diagnosi. Infatti, le curve di PFS dimostrano che la presenza di mutazioni rare si accompagna a una ridotta

sopravvivenza libera da progressione. In particolar modo, la differenza è statisticamente significativa nei confronti dei pazienti con mutazione L858R ( $p = 0.03$ ) (Figura 1). E' invece sovrapponibile l'andamento dei pazienti con delezione dell'esone 19 o mutazione L858R.

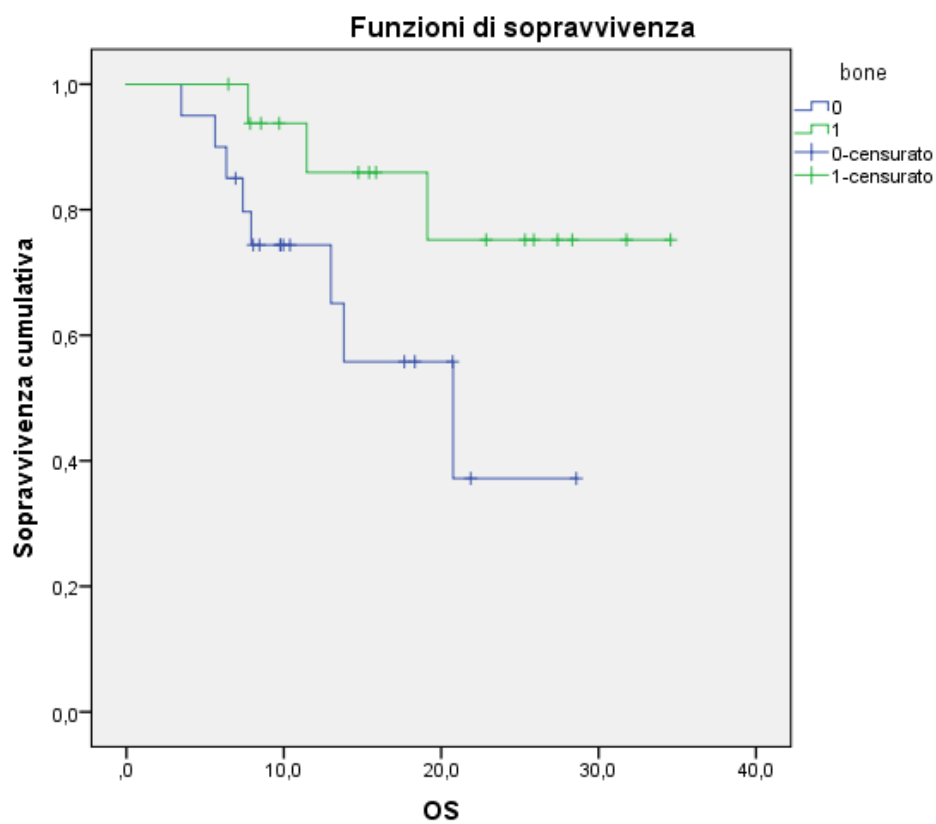
**Figura 1.** Curve di Kaplan-Meier per PFS e mutazione attivante EGFR presente alla diagnosi (su tessuto). Delezione esone 19 (blu), mutazione L858R (verde), mutazioni rare (giallo).



Al contrario, alcuni fattori sono stati associati in modo statisticamente significativo all'OS. Uno di questi è l'età del paziente, che è associata in modo inversamente proporzionale alla sopravvivenza (HR 1.13, IC 95% 1.05 – 1.23,  $p = 0.002$ ). Altro fattore con impatto positivo e al limite della significatività sulla OS è

rappresentato dalla presenza di metastasi ossee, condizione che è associata a una sopravvivenza più lunga ( $p = 0.07$ ). La successiva stima mediante curve di Kaplan-Meier ha confermato l'effetto positivo della presenza di metastasi ossee ai limiti della significatività ( $p = 0.06$ ) (Figura 2).

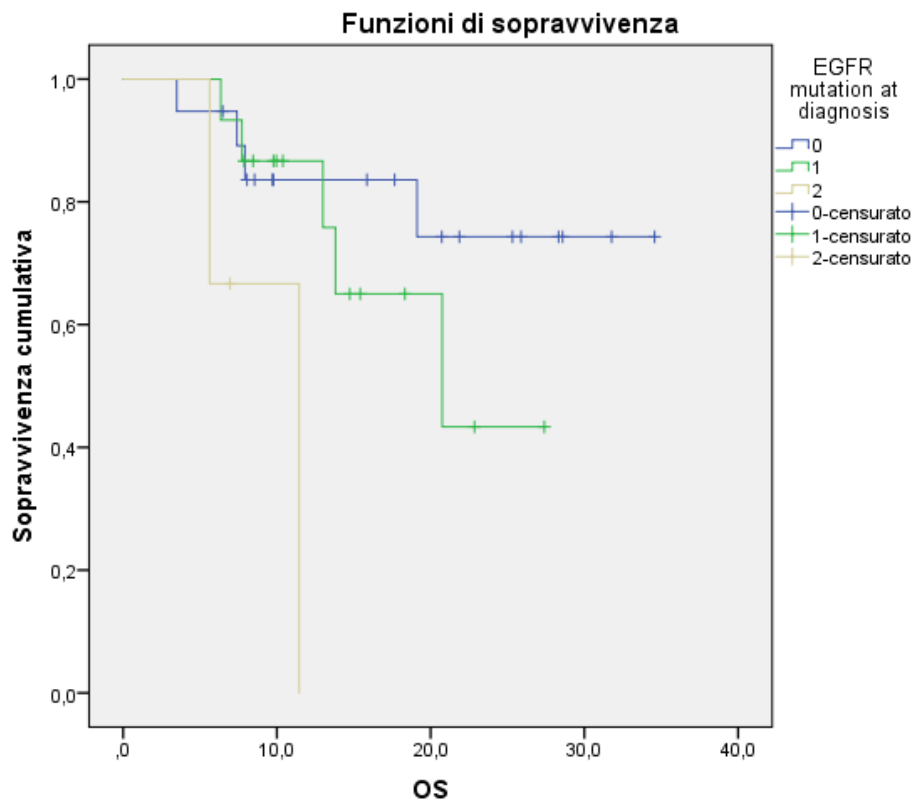
**Figura 2.** Curve di Kaplan-Meier per OS e la presenza metastasi ossee (verde) e l'assenza di metastasi ossee (blu) al basale.



Oltre che sulla PFS, come già esposto, le diverse mutazioni attivanti presenti alla diagnosi su tessuto tumorale hanno avuto impatto statisticamente significativo anche sulla sopravvivenza complessiva ( $p = 0.045$ ). La successiva analisi con Kaplan-Meier, ha confermato il dato, mostrando un trend a favore della delezione dell'esone 19, sebbene non ci sia differenza statisticamente significativa con la mutazione L858R, mentre i pazienti con mutazioni rare hanno un sopravvivenza

statisticamente inferiore sia ai pazienti con del19 ( $p = 0.019$ ) sia ai pazienti con L858R ( $p = 0.015$ ) (Figura 3).

**Figura 3.** Curve di Kaplan-Meier per OS e mutazione attivante EGFR presente alla diagnosi (su tessuto). Delezione esone 19 (blu), mutazione L858R (verde), mutazioni rare (giallo).



L'analisi multivariata che ha preso in esame tutti i fattori associati alla sopravvivenza globale (età, metastasi ossee, mutazione attivante alla diagnosi) ha confermato che l'età alla diagnosi resta il fattore con impatto più significativo ( $p = 0.007$ ), seppur emerge un ruolo al limite della significatività per la presenza di mutazioni attivanti rare ( $p = 0.080$ ).

### Correlazione fra analisi del DNA plasmatici e misure di outcome

Per quanto concerne i livelli di mutazione espressi al basale nel DNA circolante plasmatico mediante metodica ddPCR, 19 pazienti sono risultati positivi per la del19, 12 per la mutazione L858R mentre 6 sono risultati wild-type.

In termini quantitativi, la mediana dei livelli di mutazione attivante espressi in copie/mL al basale è risultata essere 520 (range 80 – 198000) mentre la mediana delle frequenze alleliche al basale è stata pari a 1,3% (range 0,13% - 80,1%) (Tabella 2). Per quanto concerne solo i pazienti con del19, la mediana dei livelli di mutazione è stata 450 copie/mL (range 80 – 115000) corrispondenti a 1,3% di frequenza all'elica (range 0,13% - 53,6%). Parallelamente, per i pazienti L858R positivi la mediana in copie/mL è stata di 950 (range 100 – 198000) e in frequenza all'elica 1,9% (range 0,15% - 80,1%).

E' emersa una correlazione fra la positività alla ddPCR basale, ma non il dato "quantitativo" di mutazione, e la presenza di metastasi ossee alla diagnosi ( $p = 0.026$ ). Al contrario, non sono emerse altre significative correlazioni i dati mutazionali plasmatici, sia qualitativi che quantitativi, e le altre caratteristiche clinico-patologiche.

Al basale, tutti i pazienti hanno avuto campione di sangue adeguato e valutabile per ddPCR, di cui 6 sono risultati wild-type (Tabella 2). Il prelievo dopo due mesi è risultato non valutabile mediante ddPCR in 6 pazienti. Quasi tutti i pazienti con campione valutabile hanno presentato DNA wild-type, che corrisponde alla scomparsa della mutazione detettata in precedenza.

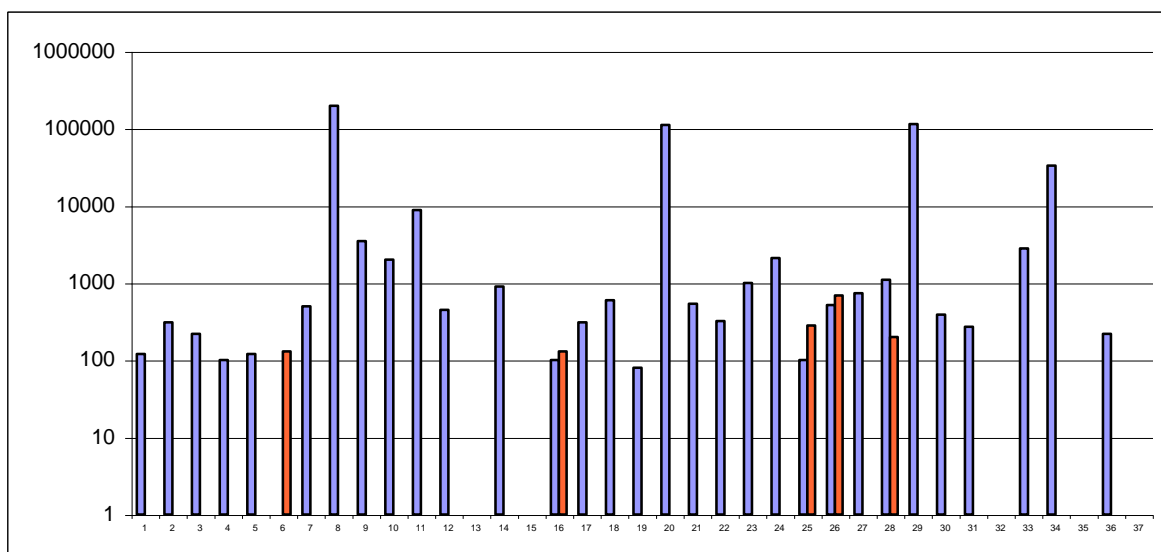
**Tabella 2.** Risultati delle analisi molecolari condotte su plasma per ogni singolo paziente (NV: non valutabile).

N. PAZIENTE	BIOPSIA TISSUTALE	THERASCREEN	ddPCR-BASALE (copie/mL) [AF]	ddPCR-DOPO2 MESI (copie/mL) [AF]	Clearance
1	del19	NV	del19 (120) [1.3%]	WT	✓
2	L858R	NV	L858R (310) [1%]	WT	✓
3	del19	NV	del19 (220) [1.3%]	NV	
4	del19	WT	del19 (100) [0.7%]	WT	✓
5	L858R	WT	L858R (120) [0.6%]	NV	
6	del19	WT	WT	del19 (130) [2.9%]	
7	del19	del19	del19 (500) [1.4%]	WT	✓
8	L858R	L858R	L858R (198000) [80.1%]	WT	✓
9	del19	del19	del19 (3500) [9.3%]	WT	✓
10	L858R	L858R	L858R (2000) [8.3%]	WT	✓
11	del19	del19	del19 (8800) [26.3%]	WT	✓
12	del19	WT	del19 (450) [0.6%]	WT	✓
13	del19 + T790M	WT	WT	WT	
14	L858R	L858R	L858R (900) [1.3%]	WT	✓
15	del19	WT	WT	WT	
16	L858R	WT	L858R (100) [0.2%]	L858R (130) [0.06%]	
17	del19	WT	del19 (310) [0.8%]	WT	✓
18	L858R	L858R	L858R (600)	WT	✓

			[2.4%]		
19	del19	WT	del19 (80) [0.13%]	WT	✓
20	L858R	L858R	L858R (111000) [39.6%]	NV	
21	L861Q	WT	del19 (540) [2.8%]	NV	
22	del19	WT	del19 (320) [1.1%]	WT	✓
23	L858R	L858R	L858R (1000) [3.2%]	WT	✓
24	del19	WT	del19 (2100) [0.27%]	WT	✓
25	L858R	WT	L858R (100) [0.15%]	L858R (280) [0.8%]	
26	del19	WT	del19 (520) [1.1%]	del19 (690) [3.2%]	
27	del19	del19	del19 (740) [2.4%]	WT	✓
28	L858R	L858R	L858R (1100) [1.4%]	L858R (200) [0.04%]	
29	del19	del19	del19 (115000) [42%]	WT	✓
30	del19	WT	del19 (390) [1.8%]	NV	
31	L858R	WT	del19 (270) [1%]	NV	
32	L858R	WT	WT	WT	
33	L858R	L858R	L858R (2800) [6.5%]	WT	✓
34	del19	del19	del19 (33200) [53.6%]	WT	✓
35	L858R	WT	WT	WT	
36	del19	WT	del19 (220) [1.3%]	WT	✓
37	G719X+S781I	WT	WT	WT	

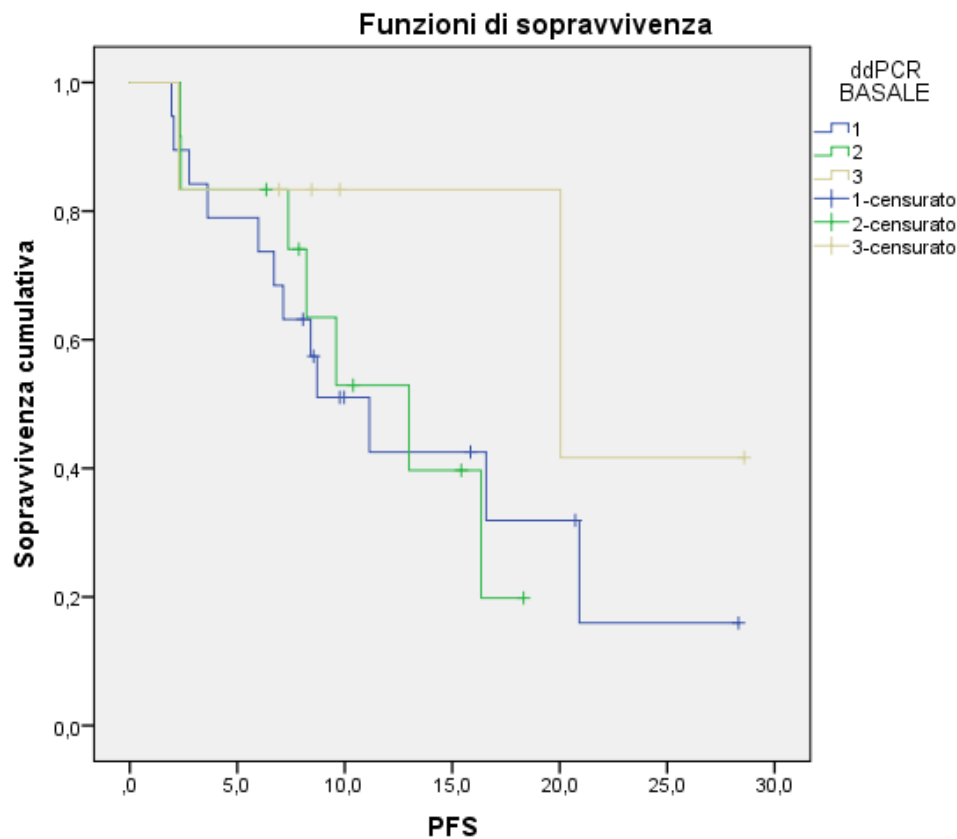
Solo 5 pazienti infatti sono risultati positivi al secondo prelievo per la mutazione attivante: 3 per la L858R, 2 per la del19 (Figura 4). Nessun paziente è risultato positivo al basale e nel secondo prelievo a 2 mesi per la mutazione di resistenza T790M.

**Figura 4.** Livelli di mutazione attivante (espressi in copie/mL) al basale (colonna viola) e al secondo prelievo (colonna arancione) per ogni singolo paziente.



Per quanto riguarda il dato di positività mutazionale rilevato su plasma al basale sia alla ddPCR che al Therascreen, questo non ha inciso in modo significativo né sulla best response né sulle sopravvivenze (PFS e OS). Tuttavia si segnala un trend a favore dei pazienti WT mediante ddPCR al basale, i quali risulterebbero presentare miglior PFS, seppur la differenza non sia statisticamente significativa (Figura 5).

**Figura 5.** Curve di Kaplan-Meier per PFS e positività per mutazione attivante EGFR su sangue mediante ddPCR. Del19 (blu), mutazione L858R (verde), WT (giallo).



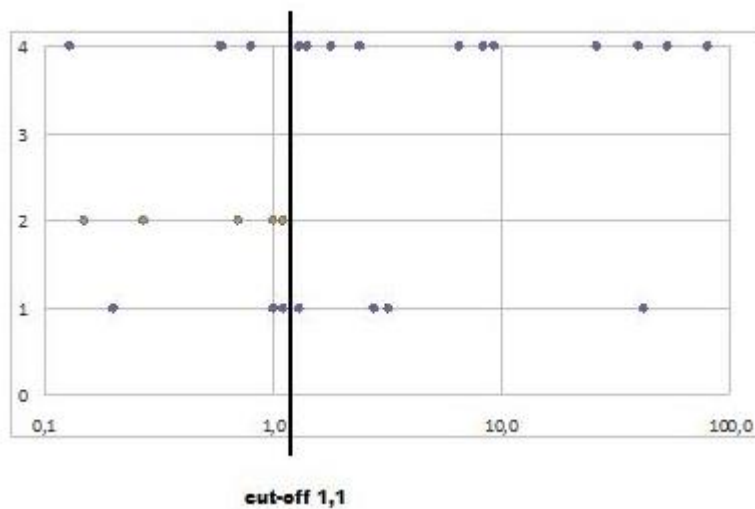
Neppure i livelli di mutazione attivante calcolati con ddPCR al basale e alla rivalutazione dopo 2 mesi, sia espressi in copie/mL che in frequenza allelica, hanno dimostrato di influenzare le misure di sopravvivenza.

Unica eccezione è rappresentata dalla frequenza allelica al basale che è positivamente associata a miglior risposta al trattamento (intesa come assenza di progressione) con valori al limite della significatività statistica ( $p = 0.05$ ) mentre nessuna correlazione si evidenzia con i livelli di mutazione attivante espressi in termini di copie/mL ( $p = 0.52$ ).

Analizzando i valori di frequenza allelica, è stato identificato un cut-off pari al 1.1%. Infatti, tutti i pazienti che hanno mostrato progressione di malattia come

miglior risposta al trattamento hanno registrato valori  $\leq 1.1\%$  (ad eccezione di una paziente, risultata WT), mentre pazienti con frequenza allelica maggiore hanno avuto controllo sulla malattia (Figura 6). Un valore al di sotto di 1.1% ha quindi una sensibilità del 100% e una specificità del 73% nell'identificare pazienti che andranno in progressione al trattamento.

**Figura 6.** Distribuzione dei pazienti in base ai valori di frequenza allelica basale della mutazione attivante (ascisse) e la miglior risposta al trattamento (ordinate: 1, stabilità; 2, progressione; 3 risposta completa; 4 risposta parziale).



Per ogni paziente arruolato è stato misurato il massimo shrinkage del carico tumorale avvenuto nel corso del trattamento e correlato con il livello basale delle mutazioni e con quello dopo 2 mesi.

Lo shrinkage tumorale in corso di terapia ha mostrato di essere positivamente correlato con la negatività alla ddPCR dopo 2 mesi di terapia ( $p = 0.029$ ) e con la clearance plasmatica ( $p = 0.043$ ). Nello specifico, sono stati confrontati fra di loro i seguenti sottogruppi: quelli che hanno presentato clearance, quelli che non l'hanno avuta e quelli nei la clearance non era determinabile per presenza di almeno un campione non valutabile. E' stata confermata una differenza

statisticamente significativa in termini di shrinkage tumorale fra i pazienti con clearance e quelli senza clearance ( $p = 0.041$ ) mentre il confronto diretto fra pazienti senza/con clearance e quelli non valutabili è risultato non significativo.

Confronto fra tessuto e metodiche di analisi su plasma

L'analisi dei campioni plasmatici con metodica Therascreen è stata condotta solo al basale: 20 campioni su 37 sono risultati wild-type, 8 positivi per L858R e 6 positivi per del19 (3 campioni non valutabili) (Tabella 2).

Per quanto riguarda la concordanza fra mutazione attivante individuata su tessuto (gold standard) e quella individuata su plasma la concordanza complessiva si assesta all'85.2% (Tabella 3). Nei pazienti con del19 su tessuto, la ddPCR su sangue ha classificato correttamente il 89.5% dei pazienti (17 su 19) mentre la corretta classificazione dei pazienti L858R su tessuto è scesa all'80% (12 su 15) per la presenza di 2 casi risultati WT e uno risultato del19.

**Tabella 3.** Livelli di concordanza fra mutazione attivante EGFR individuata su biopsia tissutale e su sangue mediante ddPCR (WT: wild-type).

		ddPCR -BASALE			concordanza
		del19	L858R	WT	
EGFR ANALISI SU BIOPSIA TISSUTALE	del19	17	-	2	89.5%
	L858R	1	12	2	80%
	del19 + T790M	-	-	1	0
	L861Q	1	-	-	0
	G719X+S781I	-	-	1	0
					85.2%

La concordanza è nulla nei pazienti con riscontro di mutazioni rare alla diagnosi su tessuto. Infatti, un paziente con del19 e T790M *de novo* è risultato wild-type,

così come un paziente con doppia mutazione G719X+S781I. In quest'ultimo caso, la discordanza è legata al fatto che la metodica ddPCR non prevedeva l'impiego di sonde per le mutazioni rare. Al contrario, nel caso della paziente con L861Q, la metodica ddPCR ha isolato su sangue la del19.

Prendendo in considerazione la metodica Therascreen, la sua performance come capacità di detezione su sangue nei confronti della ddPCR appare piuttosto negativa per i pazienti risultati positivi per del19 (35.3% di concordanza) mentre sembra più convincente per la mutazione L858R (72.7%) (Tabella 4). La discordanza è sostenuta dall'ampia presenza di pazienti WT al Therascreen, a causa della differente sensibilità delle due metodiche a vantaggio della ddPCR. Sempre per questo motivo, i casi WT con ddPCR risultano tutti WT al Therascreen, portando al 100% il livello di concordanza di questo sottogruppo.

**Tabella 4.** Livelli di concordanza fra mutazione attivante EGFR individuata su sangue mediante ddPCR e Therascreen (WT: wild-type).

		THERASCREEN			concordanza
		del19	L858R	WT	
ddPCR	del19	6	-	11	35.3%
	L858R	-	8	3	72.7%
	WT	-	-	6	100%
					58.8%

## Pazienti EGFR mutati con resistenza T790M-mediata trattati con osimertinib

### Caratteristiche generali

Nel periodo compreso tra il 09.10.15 e il 01.12.16, presso il centro di Parma, sono stati avviati a terapia con osimertinib, nell'ambito del protocollo internazionale ASTRIS, 40 pazienti con età mediana di 65 anni (range 36-87), 12 uomini e 28 donne. Si trattava per lo più di pazienti non fumatori o ex fumatori, con un PS secondo ECOG di 0-1 nell'85% dei casi.

Tutti i pazienti erano affetti da *NSCLC avanzato EGFR mutato-T790M positivo*, di istologia non squamosa, la maggior parte in stadio IV (Tabella 5), ed erano andati incontro a progressione di malattia dopo una precedente linea di TKI di I (33 pazienti) o II (7 pazienti) generazione.

**Tabella 5.** Caratteristiche generali dei pazienti trattati in seconda linea con osimertinib.

Caratteristiche		Pazienti
Sesso	Maschi	12 (30%)
	Femmine	28 (70%)
Stadio di malattia	Stadio IV	35 (87.5%)
	Stadio IIIb	3 (7.5%)
	Stadio IIIa	2 (5%)
PS	PS=0	8 (20%)
	PS=1	26 (65%)
	PS=2	5 (12.5%)
	PS=3	1 (2.5%)
Abitudine tabagica	Non fumatori	25 (62.5%)
	Ex fumatori	13 (32.5%)
	Fumatori	2 (5%)

L'inibitore più utilizzato è stato Gefitinib; 31 pazienti avevano ricevuto un TKI come prima linea di terapia, 9 invece avevano ricevuto il farmaco biologico solo successivamente ad un trattamento chemioterapico. La miglior risposta ai TKIs di I-II generazione è stata per i 39 pazienti valutabili: una RP per 33 pazienti (84.5%), una RC per 2 pazienti (5%), una SD per 1 paziente (2.5%), PD per 3 pazienti (8%) (Tabella 6).

**Tabella 6.** Trattamento con TKI di I-II generazione ricevuto in prima linea

Trattamento con TKI I-II generazione		Pazienti
TKI in prima linea	Si	31 (77.5%)
	No	9 (22.5%)
Tipo di TKI	gefitinib	23 (57.5%)
	afatinib	7 (17.5%)
	erlotinib	10 (25%)
Miglior risposta al TKI	SD	1 (2.5%)
	RP	33 (84.5%)
	RC	2 (5%)
	PD	3 (8%)

Prima di iniziare il trattamento con osimertinib, la T790M è stata cercata con tempistiche differenti in base alla storia di ciascun paziente: in più della metà dei pazienti (n=23) la ricerca della T790M è stata condotta dopo una prima linea di trattamento con TKIs, in 13 dopo terapia con TKIs e una linea di CT, in 4 dopo TKIs e più linee di CT.

Per quanto riguarda il materiale su cui è stata ricercata la T790M per iniziare la terapia con l'inibitore di III generazione (Tabella 7), in 27 pazienti è stata trovata su sangue, mentre 13 hanno ripetuto una biopsia tissutale o eseguito un agoaspirato con prelievo di materiale citologico. Per 3 pazienti erano disponibili sia sangue che tessuto/materiale citologico. Per i pazienti che hanno ripetuto una

biopsia tissutale o un agoaspirato, questi sono stati eseguiti sulla lesione primitiva in 4 casi e su una lesione secondaria nei restanti 12.

**Tabella 7.** Materiale per la detezione della T790M

Ricerca della T790M		Pazienti
Tipo di campione	Tessuto	8 (20%)
	Sangue	24 (60%)
	Citologico	5 (12.5%)
	Sangue + citologico	1 (2.5%)
	Sangue + istologico	2 (5%)

Al momento di iniziare osimertinib le sedi di malattia erano: torace in 35 pazienti, surrene in 6, osso in 12, encefalo in 16, pleura in 14, fegato in 6, pancreas in 1, linfonodi addominali in 3 (Tabella 8).

**Tabella 8.** Sedi di malattia prima di iniziare osimertinib.

Sede	Torace	Surrene	Osso	Encefalo	Pleura	Fegato	Pancreas	Linfonodi addominali
Pazienti	35 (87.5%)	6 (15%)	12 (30%)	16 (40%)	14 (35%)	6 (15%)	1 (2.5%)	3 (7.5%)

Osimertinib rappresentava la seconda linea di trattamento per 21 pazienti, la terza linea per 15, la quarta per 3 pazienti, solo un paziente aveva ricevuto il TKI di III generazione come quinta linea di trattamento.

Una volta verificata la presenza della T790M, tutti i pazienti hanno iniziato il trattamento con osimertinib ricevendo un dosaggio di 80 mg/die; solo in due casi si è reso necessario sospendere il farmaco per tossicità polmonare fino alla risoluzione del quadro, poi proseguito ad un dosaggio ridotto di 40 mg/die; solo

un paziente ha dovuto interrompere osimertinib in modo definitivo a causa di una tossicità polmonare di grado severo (evento che si era peraltro già manifestato con il TKI di più vecchia generazione). Un paziente ha sviluppato un quadro di interstiziopatia associata ad embolia polmonare che hanno portato al decesso. In generale osimertinib è stato un farmaco ben tollerato: la tossicità è stata per la maggior parte dei pazienti di grado lieve-moderato (G 1-2) ed è consistita principalmente in diarrea (n=13), rash cutaneo (n=10), paronichia (n=6).

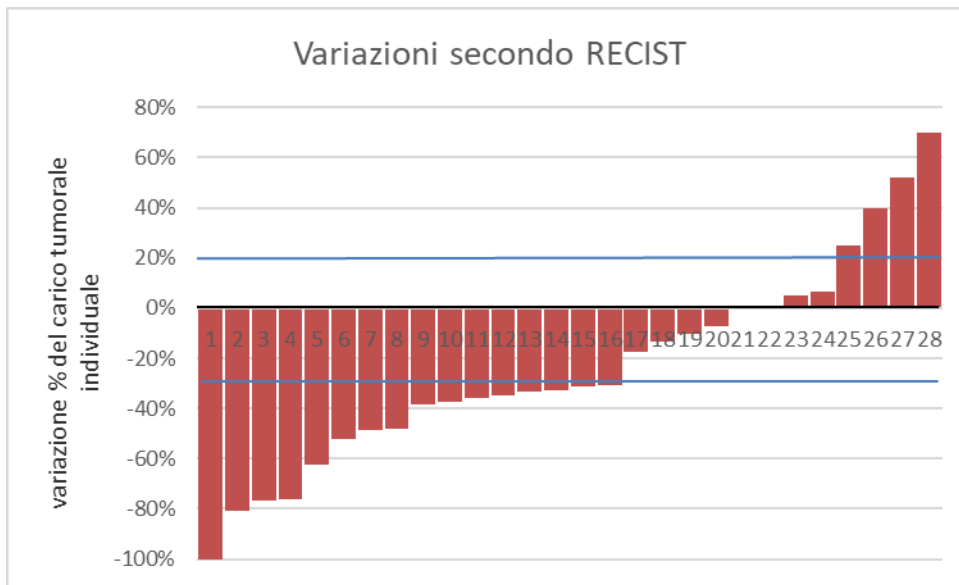
La rivalutazione strumentale a 12 settimane dall'inizio della terapia è stata possibile per 36 pazienti, perché 4 sono andati incontro ad un rapido deterioramento clinico poco dopo aver iniziato il trattamento. Nei pazienti valutati, Osimertinib ha consentito un controllo della malattia nel 70% dei casi; la miglior risposta è stata una RP nel 36% dei casi; una PD nel 30%, una SD nel 17%, una RC nel 17% (Tabella 9).

**Tabella 9.** Miglior risposta ad osimertinib.

<b>Best response ad Osimertinib</b>	<b>Pazienti</b>
RC	6 (17%)
RP	13 (36%)
SD	6 (17%)
PD	11 (30%)

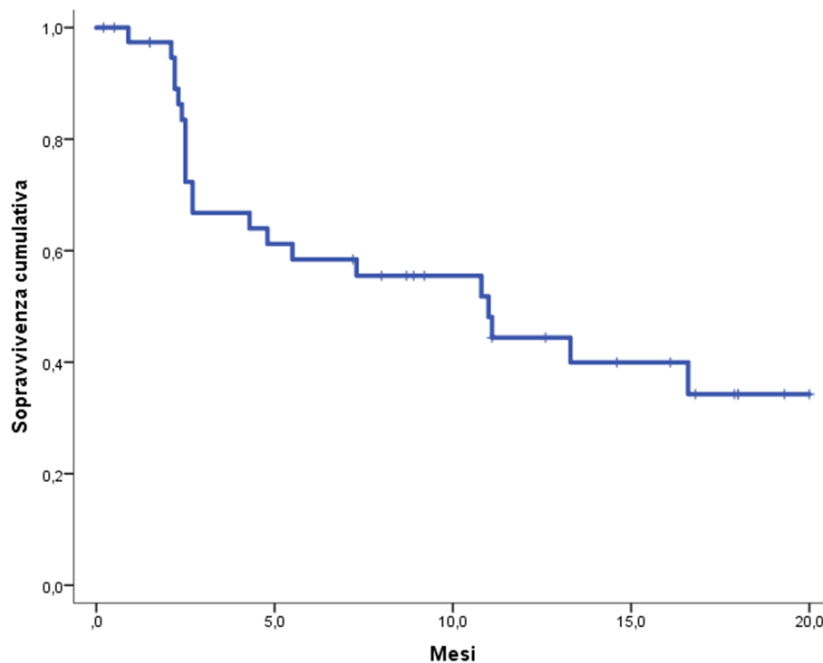
Per 28 pazienti è stato possibile procedere alla valutazione delle variazioni del carico tumorale (Figura 7); nei restanti 8 non è stato possibile o per mancanza delle immagini (n=3) o perché rivalutati con esame PET (n=5).

**Figura 7.** Variazione del carico tumorale secondo criteri RECIST nei 28 pazienti valutabili.



La durata mediana della sopravvivenza libera da progressione (PFS) è stata di 11 mesi (Figura 8; 95% CI: 5.2 – 16.8). La OS mediana è stata di 15.4 mesi (Figura 9; 95% CI: 11.4 – 19.4).

**Figura 8.** Curva della PFS nella popolazione di questo sottogruppo.



Dei 40 pazienti avviati a terapia con osimertinib, al momento della raccolta dei dati 16 stavano ancora assumendo l'inibitore. In linea con la comune pratica clinica, oltre ai pazienti con controllo di malattia, un paziente ha continuato ad assumere il farmaco per beneficio clinico, nonostante una progressione alla rivalutazione strumentale.

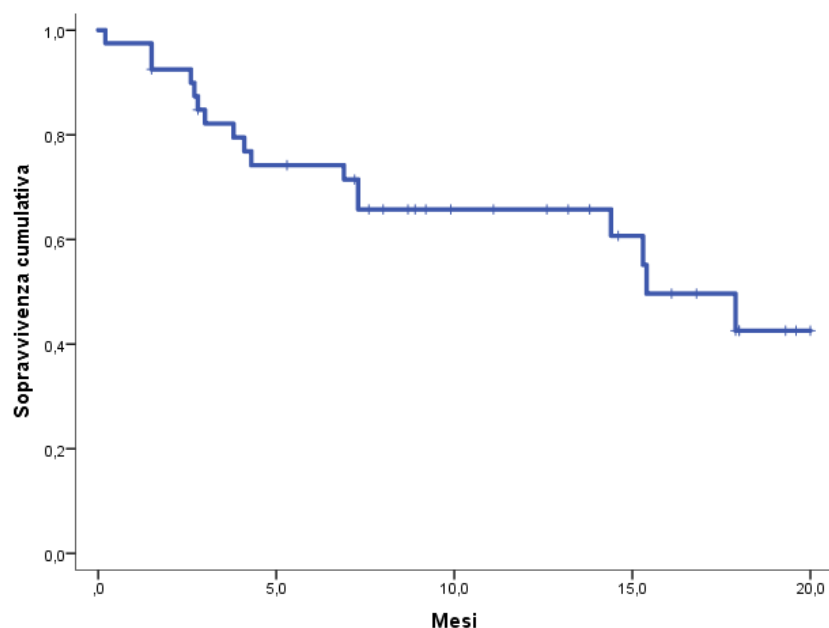
Nella nostra casistica abbiamo osservato che i pazienti di sesso maschile mostravano una minore probabilità di controllo della malattia con osimertinib; infatti, un controllo di malattia è stato osservato nel 36.4% dei maschi vs nell'84% delle femmine ( $p=0.015$ ).

Simile risultato è stato evidenziato per i pazienti che avevano assunto afatinib rispetto agli inibitori di I generazione, andati tutti incontro a progressione di malattia alla prima rivalutazione strumentale (controllo di malattia pari a 0% vs 80% nei pazienti trattati con afatinib vs pazienti trattati con gefitinib/erlotinib;  $p=0.002$ ).

I pazienti che avevano ricevuto afatinib hanno mostrato una PFS ed una OS più brevi rispetto a chi aveva assunto un inibitore di I generazione: in particolare è stata osservata una PFS di 2.2 mesi nei pazienti che avevano assunto afatinib vs 16.6 mesi nei pazienti che avevano assunto erlotinib e 11 mesi nei pazienti che avevano assunto gefitinib ( $p < 0.0001$ ); una OS di 3 mesi nei pazienti che avevano assunto afatinib vs mediana non raggiunta nei pazienti che avevano assunto erlotinib, 15.4 mesi nei pazienti che avevano assunto gefitinib ( $p=0.014$ ).

Altre caratteristiche cliniche basali non hanno evidenziato un impatto statisticamente significativo sull'outcome dei pazienti in corso di terapia con osimertinib.

**Figura 9.** Curva della OS nella popolazione di questo sottogruppo.



DNA circolante: livelli basali e correlazioni con risposta e sopravvivenza

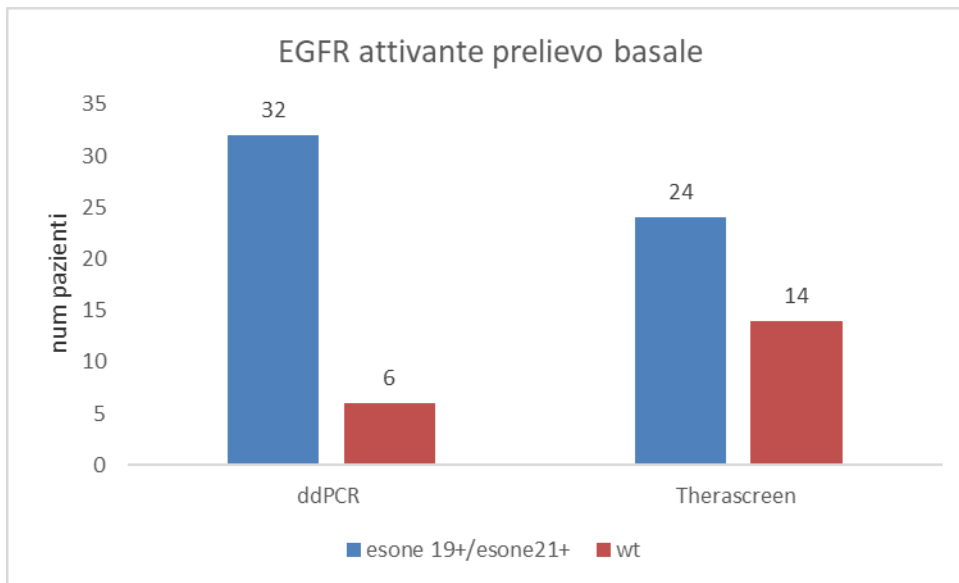
Al prelievo basale lo stato mutazionale di EGFR è stato valutabile su plasma in 38 pazienti.

Dei 2 non valutabili, un paziente aveva una precedente biopsia liquida eseguita presso altra sede positiva per T790M + mutazione attivante dell'esone 20, mentre l'altro paziente presentava un esame istologico positivo anch'esso per T790M + delezione dell'esone 19.

Sia la T790M che le mutazioni attivanti sono state analizzate su cfDNA con entrambe le metodiche, ddPCR e Therascreen.

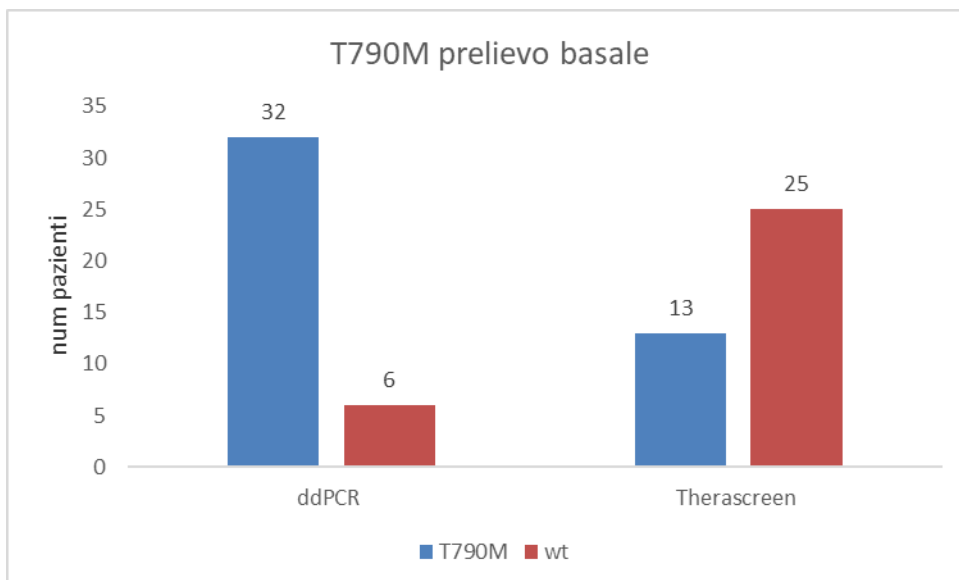
Per quanto riguarda le mutazioni attivanti: con la ddPCR 32 pazienti sono risultati positivi (24 per l'esone 19 e 8 per l'esone 21) e 6 wt; con Therascreen 24 pazienti sono risultati positivi (16 per l'esone 19, 8 per l'esone 21), 14 wt (Figura 10).

**Figura 10.** EGFR attivanti prelievo basale (38 pazienti valutabili).

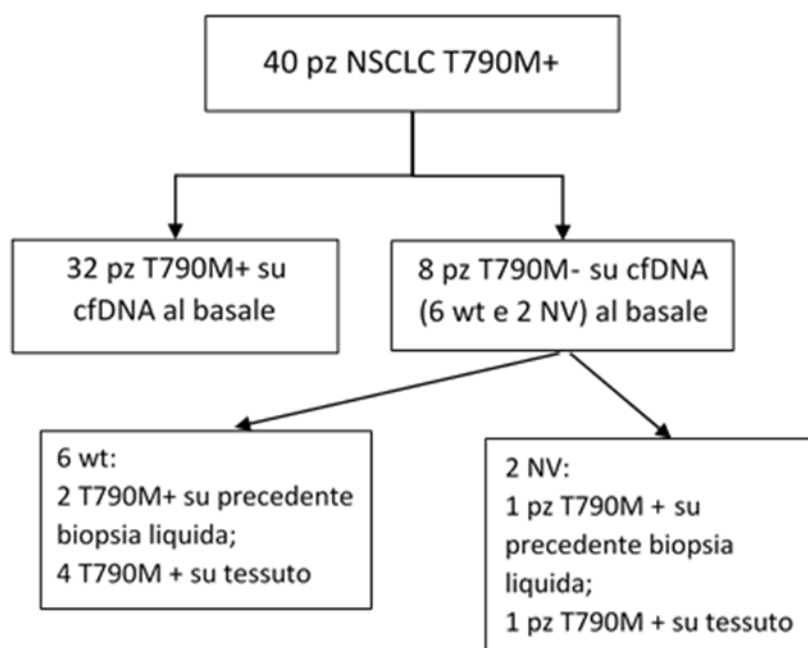


Per quanto riguarda invece la T790M: con la ddPCR 32 pazienti sono risultati positivi, 6 wt. Con Therascreen 13 sono risultati positivi, 25 wt (Figura 11).

**Figura 11.** T790M prelievo basale (38 pazienti valutabili).



**Figura 12.** Flow-chart riassuntiva dello stato mutazionale della T790M al prelievo basale (ddPCR)



Considerando i 16 casi che avevano il corrispondente dato cito-istologico, è stato possibile valutare la sensibilità del test su plasma condotto con ddPCR risultata del 62.5% (10/16 casi), con una concordanza fra cito-istologico e plasma di 9/10 casi pari al 90%.

Mediante ddPCR sono stati misurati i livelli delle mutazioni attivanti e di resistenza e il rapporto T790M/attivante (ratio) espressi in termini di copie/ml e di FA, e sono state determinate le relative mediane (Tabella 10).

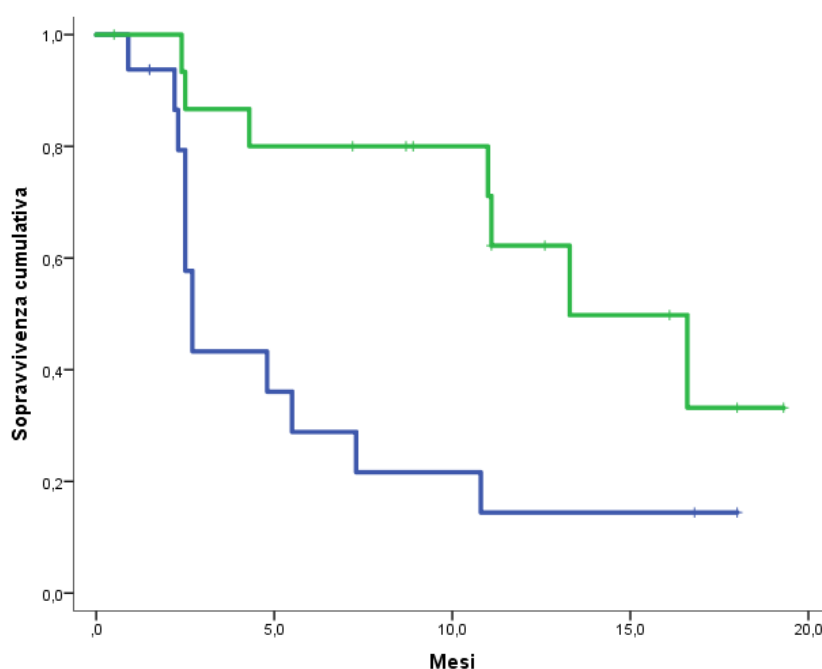
**Tabella 10.** Mediane mutazioni di EGFR in FA e copie/ml – prelievo basale (ddPCR).

Tipo di mutazione	FA mediana	Mediana in Copie/ml
EGFR attivante	9.8%	4910
T790M	1.4%	590
Ratio	0.25	

Le mediane sono poi state correlate con la risposta ad osimertinib, la PFS e la OS.

Considerando la FA mediana dell'attivante, è stato osservato un miglior controllo della malattia nei pazienti con  $FA < 9.8\%$  rispetto ai pazienti con  $FA \geq 9.8\%$  (87.5% vs 42.8%;  $p=0.019$ ), e PFS e OS sono state significativamente più lunghe: PFS di 13.3 vs 2.7 mesi (Figura 13;  $p=0.012$ ); OS: NR vs 7.3 mesi (Figura 14;  $p=0.009$ ).

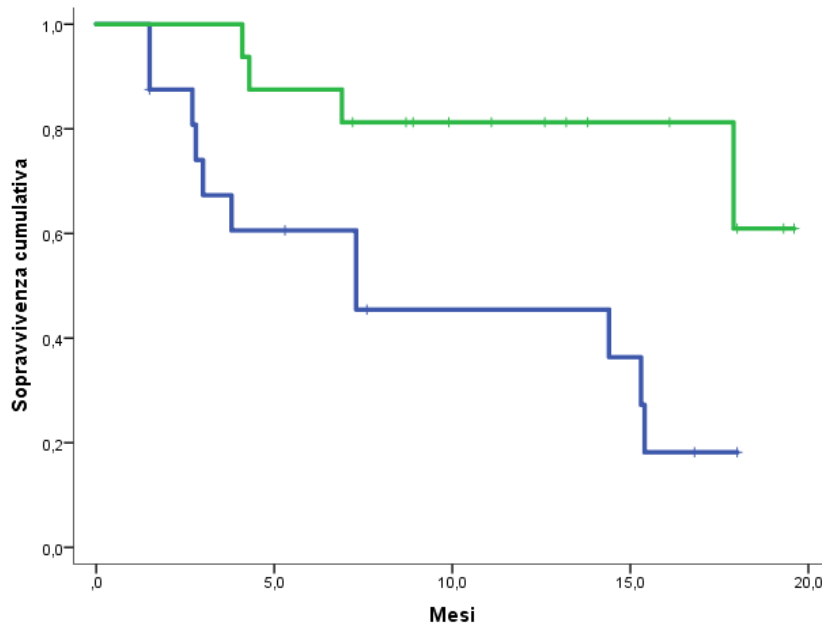
**Figura 13.** Curve di PFS in accordo alla FA mediana dell'attivante.



Per quanto riguarda la FA mediana della ratio, anche se al limite della significatività ( $p=0.066$ ), nei pazienti caratterizzati da una  $FA \geq 0.25$  è stato riscontrato un miglior controllo della malattia rispetto a quelli con  $FA < 0.25$ : 85.7% vs 50%. PFS e OS non hanno mostrato invece differenze significative nei due gruppi.

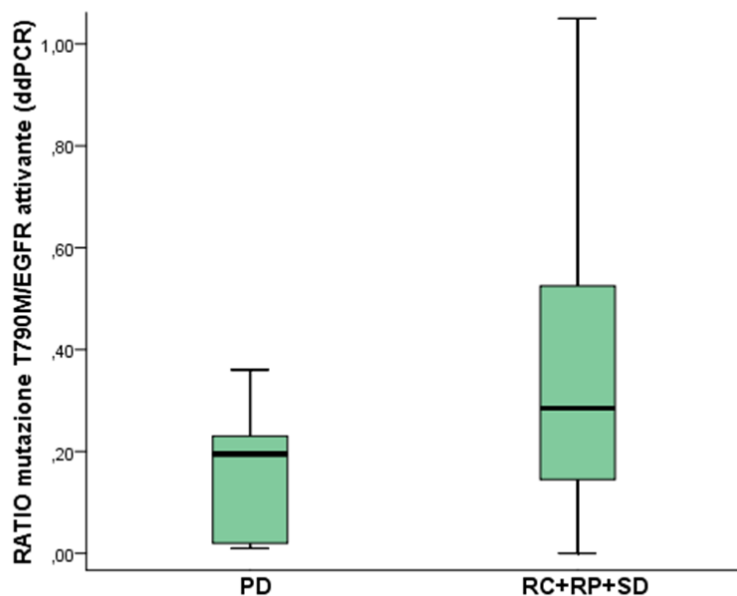
Considerando i pazienti con FA maggiore o minore alla FA mediana della T790M non sono state riscontrate differenze significative né per quanto riguarda la risposta né per quanto riguarda la sopravvivenza.

**Figura 14.** Curve di OS in accordo alla FA mediana dell'attivante.



Abbiamo poi confrontato la distribuzione dei livelli di mutazioni nei pazienti che avevano risposto ad osimertinib e nei pazienti andati in progressione, al fine di evidenziare eventuali differenze nei due gruppi: abbiamo riscontrato che i pazienti che avevano avuto beneficio da osimertinib erano caratterizzati, prima di iniziare il trattamento, da valori della ratio più elevati (Figura 15;  $p=0.024$ ). Non significativamente diverse sono apparse invece le distribuzioni delle mutazioni attivanti e della T790M considerate singolarmente.

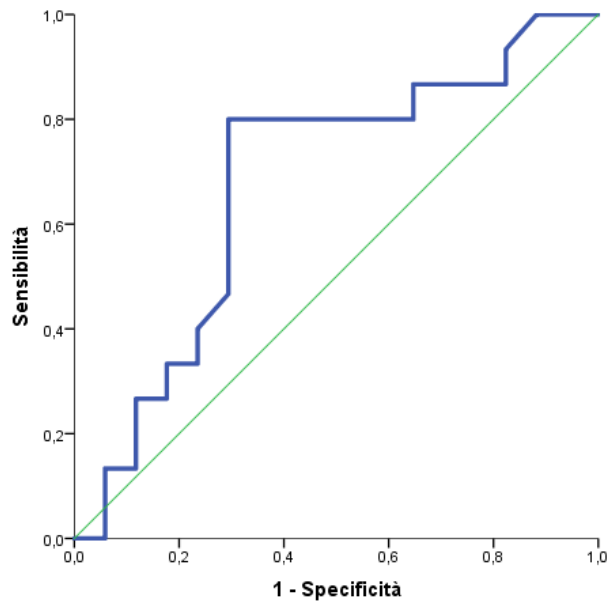
**Figura 15.** Distribuzione dei valori della ratio prima dell'inizio del trattamento, in accordo alla risposta.



Abbiamo anche provato a correlare i livelli mutazionali misurati al prelievo basale con la profondità di risposta ad osimertinib intesa come variazione percentuale del carico di malattia secondo criteri RECIST, ma non sono emersi risultati significativi.

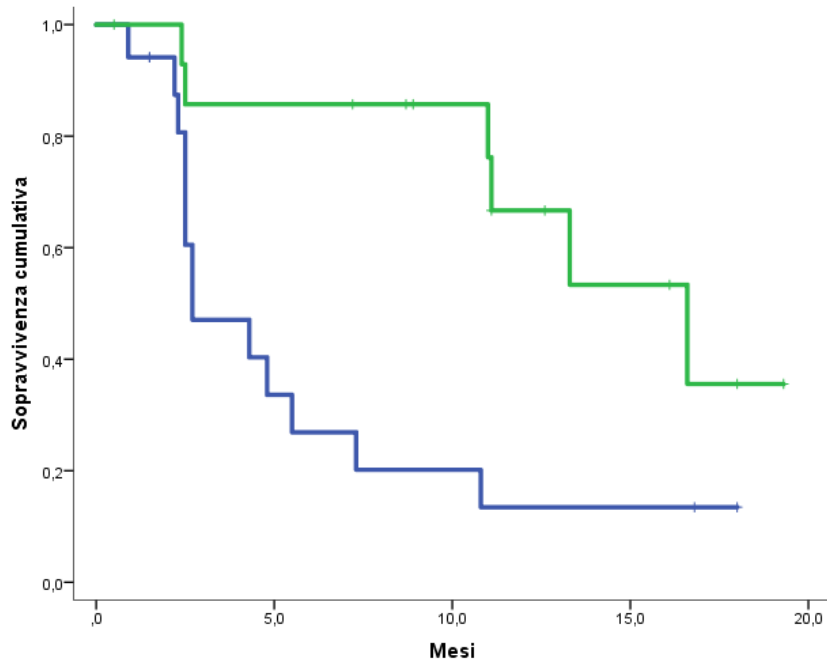
Per stabilire il migliore cut-off per la predittività della risposta e della sopravvivenza ad osimertinib sono state costruite curve ROC (Figura 16).

**Figura 16.** Curva ROC per la determinazione del cut-off della FA attivante.

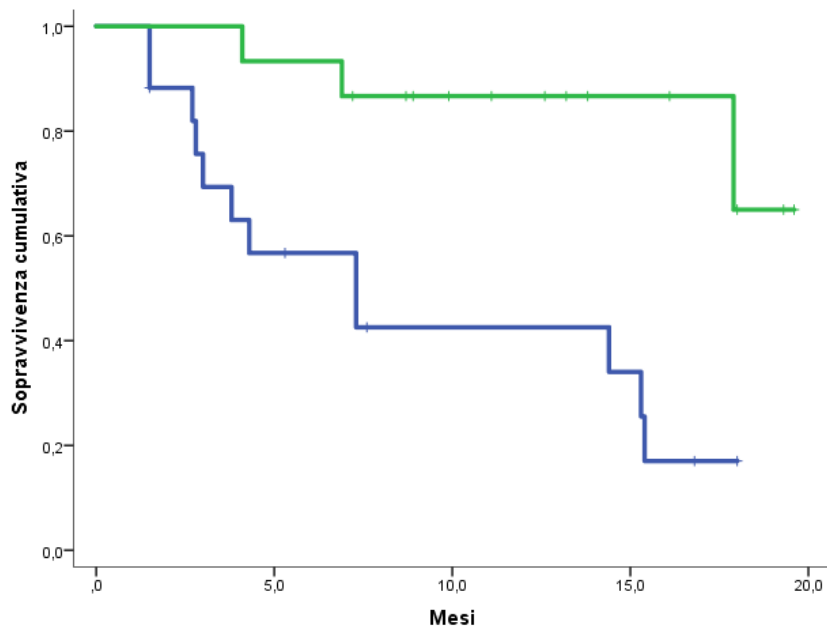


In merito alla risposta, considerando un cut-off della FA dell'attivante di 8.9%, più basso quindi rispetto alla FA mediana, è stato osservato un trend a favore dei pazienti con più bassa quantità di FA attivante ( $p= 0.09$ ): 86.6% nei pazienti con cut-off  $< 8.9\%$ . vs 46.6% nei pazienti con cut off  $\geq 8.9\%$ . Sempre in accordo al cut-off di 8.9%, la differenza in sopravvivenza nei due gruppi è invece risultata statisticamente significativa: in particolare è stata osservata una PFS di 16.6 mesi nei pazienti con  $FA < 8.9$  vs 2.7 mesi nei pazienti con  $FA \geq 8.9\%$  (Figura17;  $p= 0.005$ ); OS: non raggiunta nei pazienti con  $FA < 8.9\%$  vs 7.3 mesi per  $FA \geq 8.9\%$  (Figura 18;  $p=0.003$ ).

**Figura 17.** Curve di PFS in accordo al cut-off della FA attivante = 8.9%.



**Figura 18.** Curve di OS in accordo al cut-off della FA dell'attivante = 8.9%.



I pazienti risultati wt per le mutazioni attivanti e di resistenza mediante analisi con la metodica Therascreen erano più responsivi ed avevano una PFS e una OS significativamente più lunghe. In particolare i pazienti risultati wt al Therascreen (n=14) hanno avuto beneficio dal trattamento nel 92% dei casi, mentre i pazienti risultati mutati al Therascreen nel 55%. (OR 1.69; 95% CI: 1.12 – 2.56; p=0.027); PFS: mediana non raggiunta vs 4.8 mesi (p= 0.007); OS: non raggiunta vs 14.4 mesi (p=0.003).

Abbiamo infine fatto un confronto fra le due metodiche di analisi del cfDNA; in particolare abbiamo verificato se ci fosse una correlazione fra i livelli mutazionali misurati con la ddPCR ed il risultato ottenuto con Therascreen. È emersa una differenza significativa nei due gruppi per quanto riguarda la FA dell'attivante: il gruppo wt al Therascreen aveva infatti livelli di FA dell'attivante più bassi rispetto al gruppo in cui era stata riscontrata la mutazione anche al Therascreen (media FA 3.54% nei pazienti wt al Therascreen vs media FA 20.44% nei pazienti positivi al Therascreen, p= 0.001); lo stesso per quanto riguarda la T790M sia se misurata in copie/ml che in FA: rispettivamente la media dei livelli di mutazione di resistenza è stata nei due gruppi di 196.25 copie/ml vs 11284.58 copie/ml (p= 0.014) e FA pari a 0.67% vs FA pari a 4.82% (p= 0.001). La ratio non è invece apparsa significativamente diversa nei due gruppi.

#### DNA circolante: livelli in corso di terapia e correlazioni con risposta e sopravvivenza

Dei 32 casi positivi al prelievo basale, in 23 è risultato disponibile e valutabile anche il secondo prelievo a 12 settimane. Anche in questo caso sono stati misurati

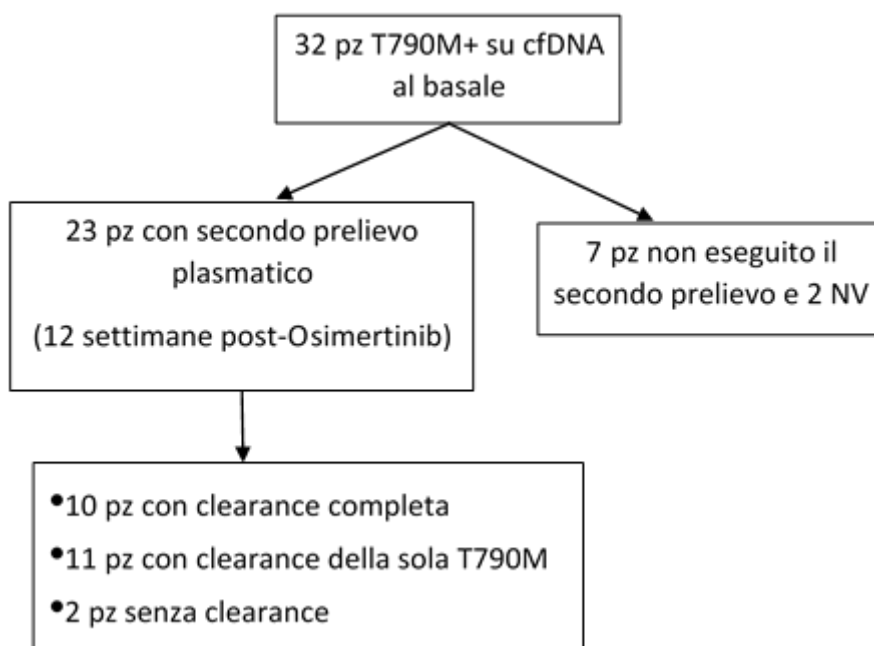
i livelli delle mutazioni attivanti e della T790M e sono state ricavate le relative mediane (Tabella 11).

**Tabella 11.** Mediane mutazioni di EGFR in FA e copie/ml – secondo prelievo (ddPCR).

Tipo di mutazione	FA mediana	Mediana in copie/ml
<b>EGFR attivante</b>	0.40%	330
<b>T790M</b>	0.06%	90
<b>Ratio</b>	0.29	

È stata valutata la clearance sia delle mutazioni attivanti che della mutazione di resistenza, poi correlata con il controllo di malattia e messa in relazione con la PFS e la OS.

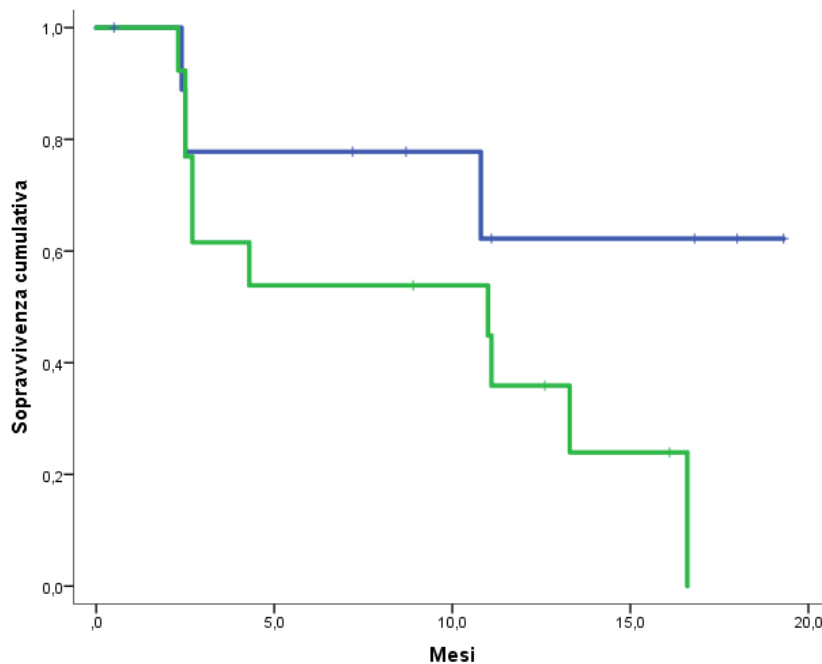
**Figura 19.** Flow-chart riassuntiva dello stato mutazionale della T790M al secondo prelievo (ddPCR).



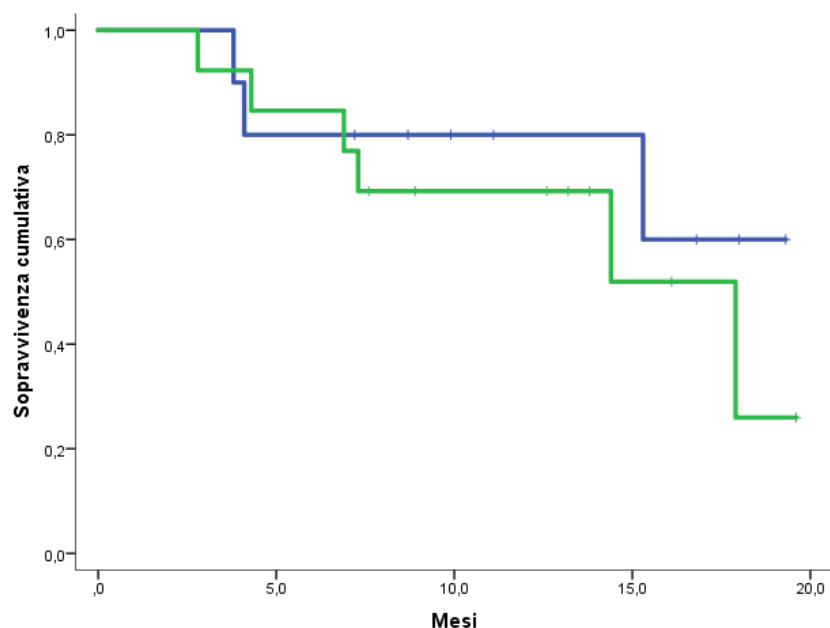
Nei pazienti che vedevano la scomparsa di una o entrambe le mutazioni non sono emerse differenze significative rispetto a chi ne manteneva una o entrambe;

tuttavia, anche se la p non risulta significativa, abbiamo una netta evidenza a favore della clearance totale in termini di controllo di malattia e sopravvivenza: infatti è stato riscontrato un beneficio nell'80% dei pazienti con clearance totale vs 61.5% (p=0.405), PFS non raggiunta nei pazienti con clearance totale vs 11 mesi, (Figura 20; p=0.097), OS non raggiunta vs 17.9 mesi, (Figura 21; p=0.45). Andando ad analizzare nello specifico l'andamento clinico dei 10 pazienti con clearance totale, è emerso che solo due sono andati incontro a PD, 4 hanno avuto una RP, 3 una RC e un paziente una SD. Valutando invece gli 11 pazienti con clearance della sola T790M (in cui rimaneva rilevabile nel plasma l'attivante) è emerso che 5 pazienti sono andati incontro a progressione di malattia, ed in 3 di questi è stato riscontrato un meccanismo di resistenza a osimertinib (cambio di istotipo con trasformazione in SCLC e amplificazione di MET). Dei 2 pazienti che mantenevano entrambe le mutazioni uno ha avuto una RP, l'altro una SD.

**Figura 20.** Curve di PFS in accordo alla clearance (clearance totale vs presenza di mutazioni).



**Figura 21.** Curve di OS in accordo alla clearance (clearance totale vs presenza di mutazioni).



### Casi clinici di rilievo

In 5 pazienti andati incontro a progressione di malattia dopo l'inizio del trattamento con osimertinib è stato possibile eseguire una rebiopsia tissutale che ha consentito di identificare il meccanismo di resistenza. Di questi, 3 hanno visto una progressione già alla prima rivalutazione strumentale: in 2 è stato riscontrato un cambio di istologia in SCLC, nell'altro caso l'amplificazione di MET. I restanti 2 pazienti hanno inizialmente risposto all'inibitore, ma hanno poi sviluppato un'ulteriore mutazione a carico del gene codificante per EGFR, la sostituzione C797S, responsabile della progressione di malattia.

Di seguito la descrizione di due casi clinici.

Caso clinico1 (Figura 22):

è il caso di un paziente maschio di 59 anni, ex fumatore, sottoposto ad accertamenti per tosse insistente e comparsa di linfadenomegalia sovraclaveare. Le indagini strumentali (TAC e PET) hanno evidenziato una massa polmonare sinistra sospetta per neoplasia primitiva e lesioni a carico di linfonodi mediastinici, di linfonodi addominali e del surrene sinistro compatibili con secondarismi. Una volta eseguita una biopsia del linfonodo sovraclaveare che ha posto la diagnosi di adenocarcinoma polmonare, il paziente è stato sottoposto ad un trattamento chemioterapico con Cisplatino e Pemetrexed. Visto il riscontro di una risposta parziale alla rivalutazione strumentale dopo 3 e 6 cicli di chemioterapia, il paziente ha poi proseguito con il solo Pemetrexed come mantenimento per 3 cicli, quando è stato riscontrato un aumento dimensionale della lesione polmonare. Una rebiopsia tissutale risultata positiva per la delezione 19 di EGFR ha determinato la scelta di proseguire con una terapia biologica (Gefitinib 250mg/die). La prima rivalutazione dopo l'inizio del trattamento con il TKI ha mostrato una risposta parziale. Dopo 14 mesi è stato documentato un incremento dimensionale della sola lesione polmonare. Trattandosi di un'unica sede di progressione, questa è stata trattata con RT e il paziente ha proseguito il trattamento con Gefitinib che ha consentito un controllo globale della malattia per un totale di 25 mesi. A questo punto, per un'ulteriore progressione della malattia, è stato eseguito un prelievo di sangue per ricercare l'eventuale presenza della mutazione T790M. Il prelievo è risultato positivo per la delezione dell'esone 19 di EGFR (2400 copie/ml) e per la T790M (90 copie/ml), determinando così l'inizio del trattamento con osimertinib. La prima rivalutazione radiologica ha però subito mostrato una progressione di malattia con comparsa di metastasi epatiche. Sono stati eseguiti sia una biopsia

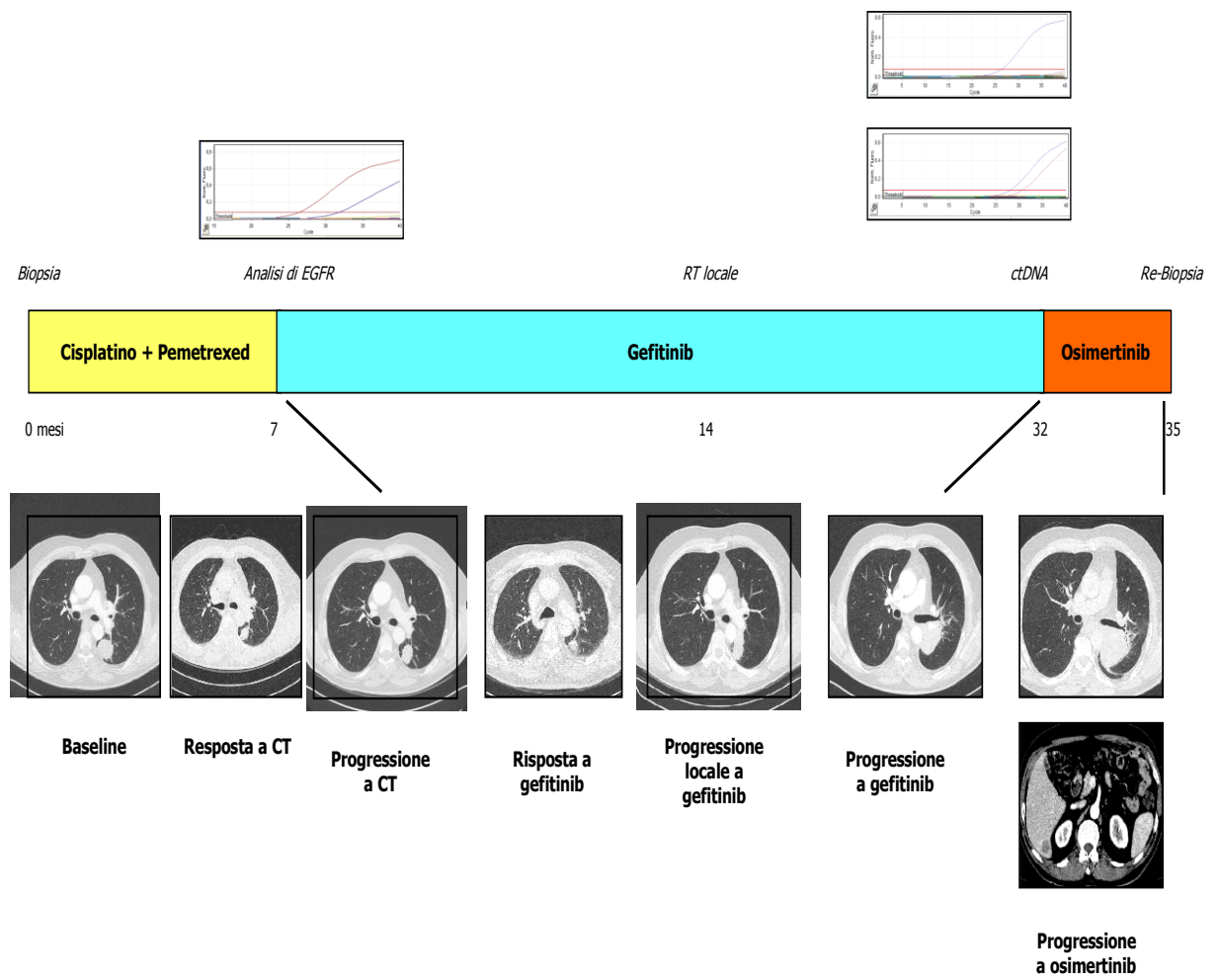
epatica che un secondo prelievo di sangue: la biopsia tissutale ha mostrato la sola presenza della mutazione attivante e la trasformazione fenotipica in SCLC; la biopsia liquida ha confermato la presenza della sola mutazione attivante, con livelli aumentati rispetto al prelievo precedente (17000 copie/ml). Viste le mutate caratteristiche della malattia, il paziente ha sospeso osimertinib per iniziare un trattamento chemioterapico con Carboplatino ed Etoposide. Il decorso della malattia, in linea con la maggiore aggressività dell'istologia a piccole cellule, è stato rapidamente progressivo, portando al decesso del paziente dopo dieci mesi.

Caso clinico 2 (Figura 23):

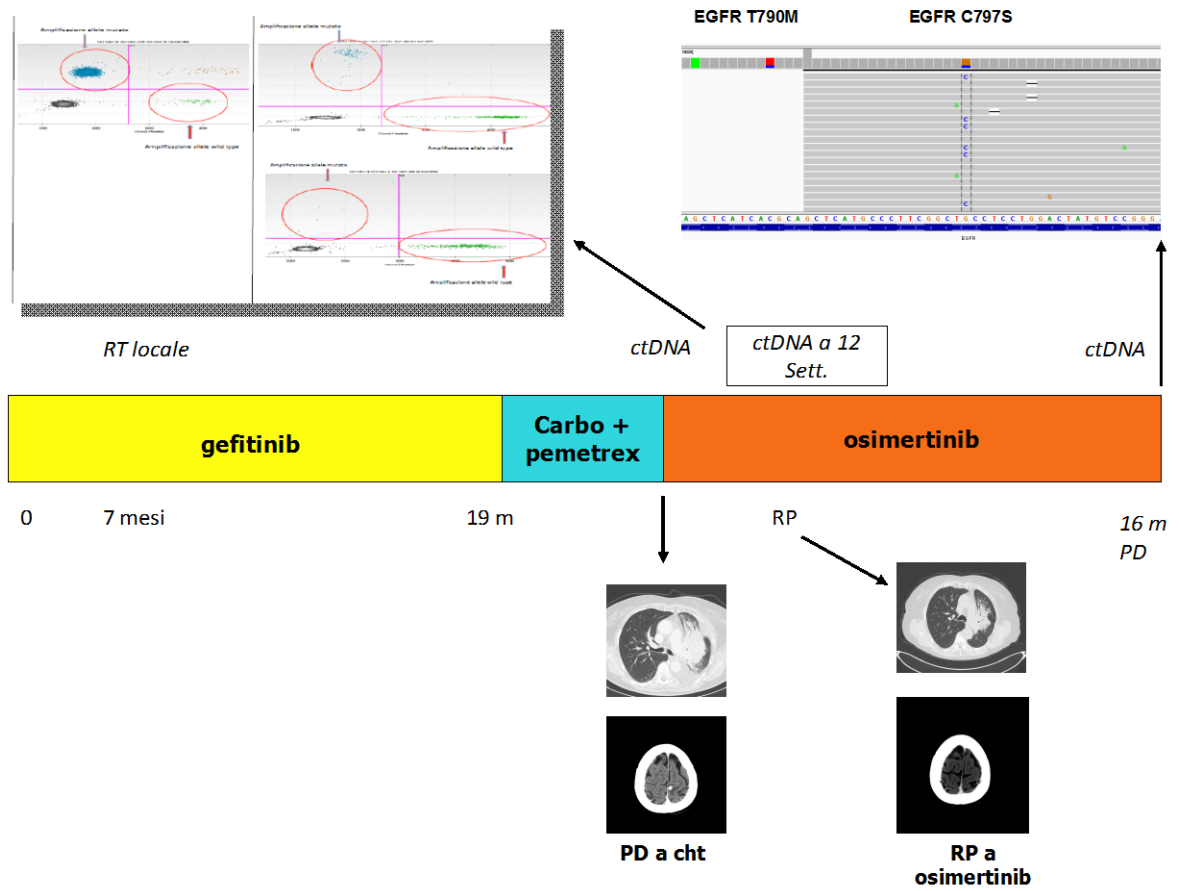
è il caso di una donna di 77 anni, non fumatrice, sottoposta ad accertamenti per tosse stizzosa persistente. Gli esami strumentali TAC e PET hanno mostrato una massa polmonare sospetta per neoplasia primitiva e interessamento di linfonodi mediastinici. La paziente è stata sottoposta a broncoscopia che ha posto diagnosi di adenocarcinoma polmonare EGFR mutato per l'esone 19, risultato che ha determinato l'avviamento a terapia con TKI (Gefitinib 250 mg/die). La prima rivalutazione strumentale ha mostrato una risposta parziale. Dopo 7 mesi dall'inizio del trattamento è stato riscontrato un aumento dimensionale della sola lesione primitiva che è stata quindi irradiata. Gefitinib ha consentito un controllo della malattia per un totale di 19 mesi, quando è stata registrata nuovamente una progressione, per cui il TKI è stato sospeso a favore di un trattamento chemioterapico con Carboplatino e Pemetrexed. La paziente ha eseguito però un solo ciclo di CT per progressione a livello polmonare e comparsa di metastasi ossee ed encefaliche. È stata quindi eseguita una biopsia liquida con riscontro della mutazione attivante dell'esone 19 (410 copie/ml) e della T790M (100 copie/ml). Il riscontro della mutazione di resistenza ha comportato l'inizio della

terapia con osimertinib. Contestualmente alla prima rivalutazione strumentale, che ha mostrato una risposta parziale al trattamento, è stato eseguito un secondo prelievo ematico che ha documentato la persistenza della sola mutazione attivante. osimertinib è stato continuato per un totale di 16 mesi, quando, per progressione di malattia alla rivalutazione radiologica, la paziente è stata sottoposta a toracosopia con biopsia tissutale, che ha evidenziato la comparsa della mutazione di resistenza C797S. In considerazione dell'età e delle condizioni cliniche, la paziente è stata avviata a trattamento chemioterapico in monoterapia con Gemcitabina, che ha sostenuto per soli due cicli, a causa di un rapido peggioramento clinico che ne ha portato al decesso poco dopo.

**Figura 22.** Caso clinico 1.



**Figura 23.** Caso clinico 2.



## **Discussione**

Questo studio ha coinvolto un casistica piuttosto numerosa, composta da 77 pazienti afferiti presso il centro oncologico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, con diagnosi di neoplasia polmonare avanzata con mutazione di EGFR. In particolare, lo studio ha incluso 37 pazienti trattati in prima linea con EGFR-TKI e ulteriori 40 pazienti progrediti alla prima linea e positivi per mutazione T790M e pertanto trattati con osimertinib nell'ambito di un protocollo internazionale (ASTRIS).

Per quanto riguarda i pazienti trattati in prima linea, la maggior parte di essi ha ricevuto gefitinib come trattamento. Tale decisione, che era a discrezione del medico oncologo referente del paziente, è stata sostenuta sostanzialmente dalla maggior tollerabilità e maneggevolezza del farmaco rispetto agli altri TKI [41, 45, 46]. Negli 8 pazienti trattati con afatinib, infatti, la scelta è stata giustificata dalla giovane età, dalle ottime condizioni cliniche o dalla presenza di mutazioni rare (T790M *de novo* e G719X+S781I), per le quali afatinib presenta dati di maggior attività [98]. Inoltre, 3 pazienti sono stati trattati in prima linea all'interno di protocollo di fase 3 FLAURA che prevedeva la randomizzazione fra osimertinib e gefitinib. Trattandosi di protocollo in cieco, non è possibile sapere quale farmaco questi pazienti abbiano ricevuto, tuttavia si segnala che uno di essi ha dovuto interrompere la terapia dopo un mese per allungamento del QTc, proseguita con afatinib al di fuori del protocollo. Relativamente al sottogruppo di pazienti trattati in prima linea, la PFS globale è risultata pari a 13 mesi, dato coerente con quanto presente in letteratura, mentre la OS mediana non è raggiunta. Il tasso di risposta

obiettiva e il disease control rate si sono assestati rispettivamente al 60% e 84%, in linea con i dati presenti in letteratura.

Sei sono i pazienti progrediti alla prima rivalutazione strumentale. In questo gruppo erano presenti due pazienti con carcinoma a grandi cellule, un'istologia infrequentemente associata alla mutazione EGFR e spesso non inclusa negli studi registrativi e che, nella nostra esperienza seppur basata su numeri molto piccoli, parrebbe quindi associata a peggior prognosi. Vale la pena inoltre menzionare che un altro dei pazienti rapidamente progrediti era positivo per mutazione T790M *de novo*, elemento questo già noto per essere associato a peggior prognosi [99]. Se si escludono quindi questi casi particolari, residuano 3 (9%) pazienti progrediti alla prima rivalutazione (resistenza intrinseca o primaria), percentuale coerente con i dati di letteratura.

Relativamente al gruppo di pazienti trattati con osimertinib, dai nostri dati è emersa una PFS mediana di 11 mesi in linea con i dati di letteratura [67]. Il profilo di tossicità di osimertinib valutato per la nostra casistica conferma la buona tollerabilità del farmaco come espresso dai dati dello studio registrativo [67], essendosi verificato un solo caso di tossicità polmonare di grado tre, in una paziente che aveva già manifestato lo stesso evento avverso al precedente TKI.

Dei 40 pazienti, sono stati valutati per risposta al trattamento 36 pazienti (ovvero i pazienti valutabili per aver ricevuto almeno una dose di farmaco ed aver effettuato almeno una rivalutazione strumentale di malattia) ed è emerso un tasso di risposta obiettiva al trattamento del 53%, un po' al di sotto dell'atteso sulla base di quanto disponibile in letteratura [67]. Tre pazienti con rapida progressione dopo prima rivalutazione sono stati re-biopsiati e sono stati evidenziati meccanismi di

resistenza alternativi (quale cambio di istologia in SCLC e co-esistenza di amplificazione di MET), probabilmente già presenti al momento dell'inizio del trattamento con osimertinib e che ne hanno inficiato la risposta.

In questi pazienti si osservava una risposta dissociata di malattia con sedi di malattia rimaste stabili e altri siti metastatici andati incontro a progressione. Questa caratteristica supporta la presenza di un'eterogeneità tumorale. In due di questi pazienti è stato possibile eseguire una biopsia tissutale a livello di un sito metastatico (rispettivamente lesione epatica e lesione surrenalica destra) e la diagnosi istologica ha deposto per una trasformazione in carcinoma a piccole cellule; le analisi molecolari condotte sia su tessuto che su plasma continuavano a rivelare la presenza della mutazione attivante di EGFR riscontrata alla diagnosi (rispettivamente delezione dell'esone 19 e L858R) ma l'assenza della T790M. Il riscontro della mutazione attivante all'interno della componente a piccole cellule suggerisce che quest'ultima derivi da una trasformazione fenotipica del clone cellulare iniziale e che non si tratti di un tumore *de novo*. Nel terzo paziente invece il meccanismo di resistenza a osimertinib riscontrato riguardava l'amplificazione del gene MET. Al momento della progressione al TKI di I generazione, insieme alla mutazione attivante (delezione dell'esone 19) si era riscontrata la mutazione T790M. Per tale motivo era stato intrapreso il trattamento con osimertinib. Tuttavia alla progressione, verificatasi dopo tre mesi, la biopsia tissutale ha mostrato la clearance totale della mutazione T790M, la persistenza dell'attivante e la comparsa di amplificazione di MET. Considerando questi tre casi si potrebbe ipotizzare che ci sia un clone cellulare derivante dal primitivo (per cui sempre EGFR mutato) che, non presentando la mutazione di resistenza T790M, bensì altri

meccanismi di escape, sia in grado di proliferare sotto la spinta selettiva dei farmaci TKIs. Anche questo a sostegno dell'ipotesi di un'eterogeneità tumorale.

All'interno della nostra casistica, meritano un breve accenno anche altri due altri casi, andati in progressione dopo iniziale beneficio dal trattamento, in cui è stato riscontrato un meccanismo di resistenza al TKI di III generazione. Entrambi erano positivi su sangue alla mutazione attivante (delezione dell'esone 19 in un caso ed L858R nell'altro) e alla mutazione di resistenza T790M, pre-osimertinib. Alla rivalutazione entrambi i pazienti mantenevano la mutazione attivante originaria, ma perdevano la T790M. La risposta di malattia è stata in un caso RP e nell'altro SD.. Al momento della progressione a livello tissutale è comparsa una terza mutazione a carico del gene di EGFR, ovvero C797S. Tale mutazione impedisce il legame covalente di tutti i TKIs irreversibili, e rappresenta il più comune meccanismo di resistenza ad osimertinib, verificandosi in circa il 32% dei pazienti [100]. Il sequenziamento del dominio chinasi del recettore per EGFR, in linee cellulari resistenti a TKI di III generazione ha permesso di identificare una mutazione puntiforme ovvero una cisteina al posto di una serina in posizione 797. C797 è localizzato sempre all'interno della tasca di legame con l'ATP ed è fondamentale per determinare il legame covalente con i TKIs di III generazione che determinano così l'inibizione del dominio chinasi del recettore EGFR [100].

Altra caratteristica importante di tale meccanismo di resistenza, oggetto di diversi studi pre-clinici, è l'allele in cui si determina la mutazione C797S, ovvero se si verifica *in cis* (sullo stesso allele) o *in trans* (su un allele diverso), rispetto all'allele della mutazione T790M. Questo sembrerebbe infatti influenzare l'efficacia dei trattamenti successivi con altri TKIs [101].

Relativamente ai pazienti trattati in prima linea, non sono emerse correlazioni fra il tipo di risposta al trattamento e i principali fattori clinico patologici. Tuttavia, è emerso un ruolo prognosticamente peggiore per i pazienti portatori di mutazioni attivanti rare. Questi pazienti hanno presentato una PFS e una OS significativamente inferiori rispetto ai pazienti con mutazioni attivanti comuni (del19 e L858R). Questa evidenza trova riscontro con quanto già documentato in letteratura. Infatti, per quanto le mutazioni attivanti rare siano effettivamente un evento infrequente, costituendo circa il 5% dei casi, sono sempre state associate a peggior outcome [102]. Nel nostro studio, un altro fattore, oltre all'età, che è stato associato a impatto sulla sopravvivenza, seppur ai limiti della significatività, è la presenza di metastasi ossee. Questo dato che non trova riscontri in letteratura, è verosimilmente determinato dalla scarsa numerosità campionaria. Tuttavia, per quanto in modo del tutto speculativo, tenuto conto che su 17 pazienti con metastasi ossee alla diagnosi, 11 presentavano l'osso come unico sito di malattia extratoracica e 9 sono stati sottoposti a terapia specifica (bifosfonati, radioterapia, anticorpi anti-RANKL) si potrebbe ipotizzare che, similmente a quanto accade per le neoplasie mammarie, i tumori con interessamento scheletrico quando trattati con la appropriata terapia anti-tumorale e di supporto presentino un andamento più favorevole.

Analizzando i fattori in grado di influenzare l'outcome del trattamento con osimertinib, sono emersi il sesso maschile ed il precedente trattamento con afatinib quali potenziali fattori predittivi negativi; tuttavia, considerando quanto disponibile in letteratura e la mancanza di una giustificazione biologica, riteniamo tale associazione da attribuire alla scarsa numerosità della nostra popolazione.

**Un altro focus della tesi ha riguardato invece le analisi qualitative e quantitative delle mutazioni, sia attivanti che di resistenza, nei pazienti trattati e la loro correlazione con il controllo di malattia e la sopravvivenza.**

Questo riflette l'interesse della comunità scientifica nel voler identificare un possibile valore di cut-off dei livelli mutazionali detettabili su plasma che fungano da predittori di risposta e di sopravvivenza, identificando quei pazienti che potrebbero trarre maggior beneficio dalla terapia con EGFR-TKI. Per fare ciò abbiamo eseguito in ciascun paziente, al tempo zero, cioè prima dell'inizio del trattamento, e alla prima rivalutazione, una biopsia liquida per la ricerca delle mutazioni su DNA circolante.

Nel gruppo dei pazienti trattati in prima linea, è emersa una correlazione fra la positività su plasma della mutazione attivante mediante ddPCR al basale e la presenza di localizzazioni metastatiche ossee. Questo riscontro è in parte supportato dalle evidenze presenti in letteratura. Infatti, Wu e colleghi hanno riportato maggiori livelli di mutazione attivante detettabili in pazienti con localizzazioni ossee o epatiche [87]. Sebbene nel nostro studio la correlazione sia di tipo qualitativo e non quantitativo, sembrerebbe tuttavia che la presenza di metastasi ossee si accompagni a un maggior rilascio di DNA tumorale in circolo, forse imputabile a particolari fattori di microambiente. Sono state ricercate correlazioni tra i livelli di mutazione attivante e altre caratteristiche clinico-patologiche, compreso il numero di siti di malattia alla diagnosi, ma purtroppo le associazioni sono risultate statisticamente non significative, in relazione al basso numero di casi studiati. Nello stesso lavoro di Wu e colleghi succitato, si riporta come pazienti che al basale fossero negativi per mutazioni plasmatiche avessero miglior outcome. Questi risultati sono stati riportati anche da altri colleghi [45,

103-105]. Infatti, da un'analisi di sottogruppo dello studio EURTAC è emerso che i pazienti positivi per mutazioni plasmatiche presentassero minor PFS. Inoltre, ulteriori analisi sulla stessa casistica sono state condotte da Karachaliou et al. e hanno confermato una peggior OS in pazienti L858R mutati con positività plasmatica, mentre al contrario sarebbe emersa una maggior OS per i pazienti del19 mutati plasma positivi. Nel 2011, Lee et al. hanno evidenziato come pazienti con alta carica mutazionale plasmatica avessero minor sopravvivenza mentre nello studio FASTACT-2 i pazienti con plasma positivo trattati con erlotinib hanno avuto miglior PFS rispetto a quelli trattati con placebo. In una letteratura non ancora uniforme, seppur non raggiungendo la significatività statistica, il nostro studio si colloca a sostegno del miglior outcome per i pazienti con plasma negativo, poiché emerge un trend in PFS a favore dei pazienti risultati wild-type al prelievo basale. Si potrebbe ipotizzare che pazienti con minor DNA tumorale circolante abbiano minor carico di malattia e maggior probabilità di controllo sulla malattia, mediante trattamento con EGFR-TKI. Inoltre, dai nostri dati si evincerebbe che, nei pazienti che hanno prelievo basale positivo per mutazioni attivanti, maggiore è la frequenza allelica, maggiore è la probabilità di controllo di malattia (risposta o stabilità) in corso di trattamento con TKI. Tale evidenza non si conferma con il dato mutazionale espresso in termini assoluti (copie/mL), suggerendo come, più che la quantità di DNA tumorale, sia rilevante la sua frazione rispetto al DNA totale presente nel plasma. Infatti, se il clone mutato rappresenta una frazione minore dell'intero tumor burden del paziente, ci si attenderebbe che la sua frazione circolante nel plasma fosse minore rispetto al DNA totale, e parallelamente anche minore l'effetto della terapia con TKI sul controllo della malattia. Infatti, nel nostro studio è stato identificato anche un

valore di frequenza allelica pari al 1.1% come cut-off in grado di identificare quei pazienti che non beneficiano dal trattamento, poiché pazienti con valori uguali o inferiori hanno avuto tutti progressione di malattia al primo controllo radiologico. Analogamente il gruppo di Wang ha valutato 22 pazienti EGFR mutati segnalando come una frequenza di mutazione attivante EGFR > 6.76% nel prelievo basale identificasse un sottogruppo di pazienti con miglior risposta a gefitinib, supportando quindi il ruolo predittivo della frequenza allelica [106]. In base alla nostra esperienza, seppur limitata, si potrebbe quindi affermare che il riscontro di mutazioni attivanti plasmatiche al basale possa essere un fattore prognostico sfavorevole, tuttavia maggiori sono i livelli delle stesse, in termini di frequenza allelica, maggiori sono le probabilità di risposta al trattamento.

Relativamente al gruppo di pazienti resistenti e trattati con osimertinib, al prelievo basale 32 pazienti sono risultati positivi per la T790M, mentre 8 erano negativi. Dei 16 pazienti che, oltre al DNA circolante, avevano anche il corrispettivo cito/istologico, la concordanza è stata del 90%, dimostrando pertanto che le due metodiche di ricerca delle mutazioni, biopsia tissutale e biopsia liquida, presentano un'ottima concordanza, seppur a fronte di una sensibilità del DNA tumorale circolante del 62.5%, come già evidenziato in letteratura. L'importanza di un'analisi anche quantitativa deriva da precedenti studi in cui veniva valutata la correlazione tra il tasso di risposte e la presenza o meno della mutazione di resistenza T790M su plasma al momento dell'inizio del trattamento con osimertinib. Di fatto questi risultati non avevano mostrato differenze significative tra i due gruppi, come emerso ad esempio dal lavoro di Oxnard et al. [95] in cui l'ORR era del 63% nei pazienti T790M positivi rispetto al 46% (sorprendentemente elevato rispetto all'atteso) nei pazienti T790M wild-type, e la

PFS mediana era di 9.7 mesi nei pazienti T790M positivi rispetto a 8.2 mesi nei pazienti T790M wild-type. Si è quindi ipotizzato, come sostenuto anche da Piotrowska et al. [107] che un semplice risultato positivo o wild-type della T790M non fosse sufficiente come biomarker predittivo in grado di identificare i pazienti con maggiore probabilità di risposta, ma che fosse quindi necessaria una quantificazione delle frequenze alleliche delle mutazioni. In altre parole, se all'interno di un tumore solo una piccola minoranza delle cellule è T790M positiva, anche se queste risultano sensibili ad un inibitore di III generazione, la risposta obiettiva potrebbe essere minima.

Nel nostro studio, considerando quindi le tre variabili quantitative FA EGFR attivante, FA T790M e la ratio relativa, è emersa la possibilità di identificare i pazienti con maggiore probabilità di controllo della malattia e con una PFS e OS più prolungate considerando il valore mediano della FA EGFR attivante, nella nostra popolazione pari a 9.8% (in particolare risultati migliori sono stati osservati nei pazienti con FA attivante minore della FA mediana). Mediante curva ROC abbiamo identificato simile cut-off, risultato in grado di identificare sottogruppi di pazienti con differente controllo di malattia e sopravvivenza.

Questo risultato trova un riscontro con quanto emerso dal lavoro di Remon et al. [97] in cui è descritto un trend di risposta nei pazienti con livelli più bassi di FA EGFR attivante.

Per quanto riguarda la FA della T790M non abbiamo rilevato differenze statisticamente significative nei due gruppi con valori al di sopra o al di sotto della mediana. Abbiamo invece osservato un trend a favore dei pazienti con una ratio

maggiore della mediana ottenuta nella nostra popolazione, pari a 0.25, in merito alla probabilità di controllo di malattia.

Tale risultato emerge anche in relazione al tipo di risposta tumorale presentato dai pazienti. Infatti, valutando la distribuzione dei valori della ratio in base alla risposta, distinguendo fra pazienti con disease control rate (risposta parziale + completa + stabilità di malattia) e coloro che avevano avuto una progressione, è emerso che i pazienti che avevano risposto ad Osimertinib erano caratterizzati da una ratio al prelievo basale più elevata. Tale risultato è confermato da alcuni dati presenti attualmente in letteratura [96], dai quali è emerso che pazienti con una ratio più elevata (nel caso del lavoro di Chabon et al. > 0.5) sperimentano una miglior risposta al trattamento con un maggior shrinkage tumorale, anche se non confermato da altri lavori. Nel nostro studio non sono emerse correlazioni con la riduzione dimensionale del tumore, tuttavia bisogna a questo proposito tenere in considerazione il limite legato al fatto che tale valutazione è stata possibile in un numero limitato di pazienti (28 in totale).

**Un'altra aspetto della tesi, ha riguardato la correlazione dei tassi di risposta, di PFS e OS con la clearance delle mutazioni.**

Il primo gruppo di pazienti, quello trattato in prima linea, ha mostrato una clearance pressoché completa delle mutazioni attivanti nel prelievo di controllo dopo 2 mesi di trattamento, con solo 5 pazienti risultati positivi per l'attivante al secondo prelievo. Di questi 5 pazienti positivi, uno era risultato wild-type al prelievo basale, ma la positivizzazione non si è tradotta in una progressione di malattia. L'andamento dei valori plasmatici è stato quindi correlato con il tumor shrinkage, cioè la riduzione del carico tumorale misurata secondo criteri RECIST.

E' emerso che pazienti con clearance della mutazione attivante presentavano maggior riduzione del carico tumorale e considerando che, in questo sottogruppo, il prelievo plasmatico antecedeva di circa un mese la rivalutazione radiologica, si potrebbe supporre che la clearance plasmatica possa essere elemento predittore di shrinkage e quindi di risposta al trattamento. Tuttavia, a causa della scarsa numerosità del campione, non sono poi emerse significative correlazioni fra clearance, risposta, PFS e OS. Diverse esperienze di ricerca pubblicate supportano tuttavia l'impiego del monitoraggio plasmatico come elemento utile alla valutazione della risposta e della prognosi. Infatti, in altro lavoro pubblicato da Zhu e colleghi è emersa una correlazione, seppur in un campione piccolo di pazienti, fra livelli basali di mutazione attivante e riduzione del tumor burden in corso di terapia con TKI [108]. Ancora, Tseng et al hanno pubblicato una casistica di 72 pazienti che eseguivano prelievi per analisi ctDNA al basale e dopo 10 settimane di trattamento. L'assenza di clearance plasmatica delle mutazioni è emersa essere fattore indipendente predittivo di minor risposta (odds ratio 5.26, IC 95% 1.13-24.44,  $p = 0.034$ ), minor PFS (HR 1.97, IC95% 1.33-2.91,  $p = 0.001$ ) e minor OS (HR 1.82, IC95% 1.04-3.18,  $p = 0.036$ ) [86]. Analogamente, la clearance plasmatica ha predetto miglior PFS e OS anche nel lavoro di Mok et al. in pazienti trattati con erlotinib e chemioterapia intercalata [104]. Ancora, due studi hanno monitorato pazienti trattati con afatinib in prima e seconda linea [109, 110]. Nel primo caso, la clearance plasmatica mediante dPCR è stata associata a miglior PFS, mentre nel secondo caso la riduzione del 10% della quantità di ctDNA è bastata a predire migliore outcome. Invece, nel sottostudio di pazienti trattati con osimertinib, dalle nostre analisi non è emersa nessuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo con clearance totale e il gruppo con la sola clearance

della T790M o con clearance assente. Tuttavia, nonostante la p non significativa, abbiamo una netta evidenza a favore della clearance totale in termini sia di beneficio che di sopravvivenza. Questo trend è in linea con il dato ottenuto nel lavoro di Thress et al. [111] presentato all'ASCO 2017, in cui la clearance totale correlava con un miglior outcome clinico, sia in termini di ORR che di PFS. La differenza in termini di significatività statistica tra i due risultati potrebbe essere dovuta in particolar modo alla diversa numerosità campionaria, la nostra popolazione per l'analisi della clearance era infatti di soli 23 pazienti.

**Infine abbiamo posto a confronto due metodiche con diversa sensibilità circa la determinazione delle mutazioni di EGFR a livello del cfDNA, ossia ddPCR e Therascreen.**

Nel gruppo di pazienti trattati in prima linea, la ddPCR su campioni plasmatici ha mostrato un buon livello di concordanza con il dato tissutale per quanto riguarda le mutazioni comuni, soprattutto per i pazienti con delezione dell'esone 19. Incerto rimane il ruolo della metodica sulle mutazioni rare, visto che non vi erano disponibili sonde per lo studio di queste particolari mutazioni. In entrambe le casistiche, prima linea e pazienti trattati con osimertinib, il confronto fra ddPCR e Therascreen ha confermato la maggiore sensibilità della prima metodica e abbiamo evidenziato come ad un risultato wt al Therascreen corrispondessero livelli più bassi delle mutazioni EGFR alla ddPCR. Inoltre, nel gruppo trattato con osimertinib, un minore carico di malattia e quindi un livello di DNA circolante più basso, in particolare di mutazione attivante, non identificato con il Therascreen

rappresentano un fattore associato a maggiore probabilità di controllo di malattia e di più lunga sopravvivenza.

In conclusione, seppur con i limiti della nostra numerosità, abbiamo confermato la fattibilità dello studio molecolare del gene EGFR, sia come mutazioni attivanti che come T790M, a livello di DNA circolante. In particolare, il nostro studio ha consentito di mettere in evidenza un potenziale ruolo predittivo dei livelli di cfDNA, in particolare della mutazione attivante, determinati con metodica ad elevata sensibilità, quale la ddPCR. Ha inoltre mostrato la potenziale utilità di un monitoraggio delle mutazioni di EGFR in corso di terapia, al fine di meglio definire l'outcome dei pazienti trattati con EGFR-TKI.

## **Bibliografia**

- [1] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, *Cancer Statistics, 2017*, CA: a cancer journal for clinicians 67(1) (2017) 7-30.
- [2] A.I.R.T.A.e.A.I.d.O.M. (AIOM), *I numeri del cancro in Italia*, Intermedia Ed. (2017).
- [3] K.M. Freund, A.J. Belanger, R.B. D'Agostino, W.B. Kannel, The health risks of smoking. The Framingham Study: 34 years of follow-up, *Annals of epidemiology* 3(4) (1993) 417-24.
- [4] W.E. Eberhardt, D. De Ruyscher, W. Weder, C. Le Pechoux, P. De Leyn, H. Hoffmann, V. Westeel, R. Stahel, E. Felip, S. Peters, 2nd ESMO Consensus Conference in Lung Cancer: locally advanced stage III non-small-cell lung cancer, *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 26(8) (2015) 1573-88.
- [5] M.G. Kris, L.E. Gaspar, J.E. Chaft, E.B. Kennedy, C.G. Azzoli, P.M. Ellis, S.H. Lin, H.I. Pass, R. Seth, F.A. Shepherd, D.R. Spigel, J.R. Strawn, Y.C. Ung, M. Weyant, Adjuvant Systemic Therapy and Adjuvant Radiation Therapy for Stage I to IIIA Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancers: American Society of Clinical Oncology/Cancer Care Ontario Clinical Practice Guideline Update, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35(25) (2017) 2960-2974.
- [6] Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group, *BMJ (Clinical research ed.)* 311(7010) (1995) 899-909.
- [7] M. Reck, S. Popat, N. Reinmuth, D. De Ruyscher, K.M. Kerr, S. Peters, Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 25 Suppl 3 (2014) iii27-39.
- [8] G.A. Masters, S. Temin, C.G. Azzoli, G. Giaccone, S. Baker, Jr., J.R. Brahmer, P.M. Ellis, A. Gajra, N. Rackear, J.H. Schiller, T.J. Smith, J.R. Strawn, D. Trent, D.H. Johnson, Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33(30) (2015) 3488-515.
- [9] G.V. Scagliotti, P. Parikh, J. von Pawel, B. Biesma, J. Vansteenkiste, C. Manegold, P. Serwatowski, U. Gatzemeier, R. Digumarti, M. Zukin, J.S. Lee, A. Mellempgaard, K. Park, S. Patil, J. Rolski, T. Goksel, F. de Marinis, L. Simms, K.P. Sugarman, D. Gandara, Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26(21) (2008) 3543-51.
- [10] A. Sandler, R. Gray, M.C. Perry, J. Brahmer, J.H. Schiller, A. Dowlati, R. Lilenbaum, D.H. Johnson, Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer, *The New England journal of medicine* 355(24) (2006) 2542-50.
- [11] M. Reck, J. von Pawel, P. Zatloukal, R. Ramlau, V. Gorbounova, V. Hirsh, N. Leigh, J. Mezger, V. Archer, N. Moore, C. Manegold, Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27(8) (2009) 1227-34.
- [12] L.G. Paz-Ares, F. de Marinis, M. Dediu, M. Thomas, J.L. Pujol, P. Bidoli, O. Molinier, T.P. Sahoo, E. Laack, M. Reck, J. Corral, S. Melemed, W. John, N. Chouaki, A.H. Zimmermann, C. Visseren-Grul, C. Gridelli, PARAMOUNT: Final overall survival results of the phase III study of maintenance pemetrexed versus placebo immediately after induction treatment with

pemetrexed plus cisplatin for advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31(23) (2013) 2895-902.

[13] T. Ciuleanu, T. Brodowicz, C. Zielinski, J.H. Kim, M. Krzakowski, E. Laack, Y.L. Wu, I. Bover, S. Begbie, V. Tzekova, B. Cucevic, J.R. Pereira, S.H. Yang, J. Madhavan, K.P. Sugarman, P. Peterson, W.J. John, K. Krejcy, C.P. Belani, Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomised, double-blind, phase 3 study, *Lancet (London, England)* 374(9699) (2009) 1432-40.

[14] F. Cappuzzo, T. Ciuleanu, L. Stelmakh, S. Cicenias, A. Szczesna, E. Juhasz, E. Esteban, O. Molinier, W. Brugger, I. Melezinek, G. Klingelschmitt, B. Klughammer, G. Giaccone, Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study, *The Lancet. Oncology* 11(6) (2010) 521-9.

[15] F.A. Shepherd, J. Dancey, R. Ramlau, K. Mattson, R. Gralla, M. O'Rourke, N. Levitan, L. Gressot, M. Vincent, R. Burkes, S. Coughlin, Y. Kim, J. Berille, Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18(10) (2000) 2095-103.

[16] F.A. Shepherd, J. Rodrigues Pereira, T. Ciuleanu, E.H. Tan, V. Hirsh, S. Thongprasert, D. Campos, S. Maoleekoonpiroj, M. Smylie, R. Martins, M. van Kooten, M. Dediu, B. Findlay, D. Tu, D. Johnston, A. Bezjak, G. Clark, P. Santabarbara, L. Seymour, Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer, *The New England journal of medicine* 353(2) (2005) 123-32.

[17] N. Hanna, F.A. Shepherd, F.V. Fossella, J.R. Pereira, F. De Marinis, J. von Pawel, U. Gatzemeier, T.C. Tsao, M. Pless, T. Muller, H.L. Lim, C. Desch, K. Szondy, R. Gervais, Shaharyar, C. Manegold, S. Paul, P. Paoletti, L. Einhorn, P.A. Bunn, Jr., Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22(9) (2004) 1589-97.

[18] M. Reck, R. Kaiser, A. Mellempgaard, J.Y. Douillard, S. Orlov, M. Krzakowski, J. von Pawel, M. Gottfried, I. Bondarenko, M. Liao, C.N. Gann, J. Barrueco, B. Gaschler-Markefski, S. Novello, Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial, *The Lancet. Oncology* 15(2) (2014) 143-55.

[19] M. Reck, D. Rodriguez-Abreu, A.G. Robinson, R. Hui, T. Czoszi, A. Fulop, M. Gottfried, N. Peled, A. Tafreshi, S. Cuffe, M. O'Brien, S. Rao, K. Hotta, M.A. Leiby, G.M. Lubiniecki, Y. Shentu, R. Rangwala, J.R. Brahmer, Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer, *The New England journal of medicine* 375(19) (2016) 1823-1833.

[20] R.S. Herbst, P. Baas, D.W. Kim, E. Felip, J.L. Perez-Gracia, J.Y. Han, J. Molina, J.H. Kim, C.D. Arvis, M.J. Ahn, M. Majem, M.J. Fidler, G. de Castro, Jr., M. Garrido, G.M. Lubiniecki, Y. Shentu, E. Im, M. Dolled-Filhart, E.B. Garon, Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial, *Lancet (London, England)* 387(10027) (2016) 1540-50.

[21] H. Borghaei, L. Paz-Ares, L. Horn, D.R. Spigel, M. Steins, N.E. Ready, L.Q. Chow, E.E. Vokes, E. Felip, E. Holgado, F. Barlesi, M. Kohlhaufl, O. Arrieta, M.A. Burgio, J. Fayette, H. Lena, E. Poddubskaya, D.E. Gerber, S.N. Gettinger, C.M. Rudin, N. Rizvi, L. Crino, G.R. Blumenschein, Jr., S.J. Antonia, C. Dorange, C.T. Harbison, F. Graf Finckenstein, J.R. Brahmer, Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer, *The New England journal of medicine* 373(17) (2015) 1627-39.

- [22] J. Brahmer, K.L. Reckamp, P. Baas, L. Crino, W.E. Eberhardt, E. Poddubskaya, S. Antonia, A. Pluzanski, E.E. Vokes, E. Holgado, D. Waterhouse, N. Ready, J. Gainor, O. Aren Frontera, L. Havel, M. Steins, M.C. Garassino, J.G. Aerts, M. Domine, L. Paz-Ares, M. Reck, C. Baudelet, C.T. Harbison, B. Lestini, D.R. Spigel, Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer, *The New England journal of medicine* 373(2) (2015) 123-35.
- [23] D.S. Salomon, R. Brandt, F. Ciardiello, N. Normanno, Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies, *Critical reviews in oncology/hematology* 19(3) (1995) 183-232.
- [24] Y. Yarden, M.X. Sliwkowski, Untangling the ErbB signalling network, *Nature reviews. Molecular cell biology* 2(2) (2001) 127-37.
- [25] J. Schlessinger, Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell* 103(2) (2000) 211-25.
- [26] X. Zhang, J. Gureasko, K. Shen, P.A. Cole, J. Kuriyan, An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor, *Cell* 125(6) (2006) 1137-49.
- [27] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell* 100(1) (2000) 57-70.
- [28] V. Rusch, J. Mendelsohn, E. Dmitrovsky, The epidermal growth factor receptor and its ligands as therapeutic targets in human tumors, *Cytokine & growth factor reviews* 7(2) (1996) 133-41.
- [29] D.E. Davies, S.G. Chamberlin, Targeting the epidermal growth factor receptor for therapy of carcinomas, *Biochemical pharmacology* 51(9) (1996) 1101-10.
- [30] J. Baselga, J. Mendelsohn, The epidermal growth factor receptor as a target for therapy in breast carcinoma, *Breast cancer research and treatment* 29(1) (1994) 127-38.
- [31] W. Lei, J.E. Mayotte, M.L. Levitt, Enhancement of chemosensitivity and programmed cell death by tyrosine kinase inhibitors correlates with EGFR expression in non-small cell lung cancer cells, *Anticancer research* 19(1a) (1999) 221-8.
- [32] P.A. Bunn, Jr., W. Franklin, Epidermal growth factor receptor expression, signal pathway, and inhibitors in non-small cell lung cancer, *Seminars in oncology* 29(5 Suppl 14) (2002) 38-44.
- [33] F. Cappuzzo, F.R. Hirsch, E. Rossi, S. Bartolini, G.L. Ceresoli, L. Bemis, J. Haney, S. Witta, K. Danenberg, I. Domenichini, V. Ludovini, E. Magrini, V. Gregorc, C. Doglioni, A. Sidoni, M. Tonato, W.A. Franklin, L. Crino, P.A. Bunn, Jr., M. Varella-Garcia, Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer, *Journal of the National Cancer Institute* 97(9) (2005) 643-55.
- [34] J.G. Paez, P.A. Janne, J.C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F.J. Kaye, N. Lindeman, T.J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M.J. Eck, W.R. Sellers, B.E. Johnson, M. Meyerson, EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy, *Science (New York, N.Y.)* 304(5676) (2004) 1497-500.
- [35] W. Pao, V. Miller, M. Zakowski, J. Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, B. Singh, R. Heelan, V. Rusch, L. Fulton, E. Mardis, D. Kupfer, R. Wilson, M. Kris, H. Varmus, EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(36) (2004) 13306-11.
- [36] T.J. Lynch, D.W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R.A. Okimoto, B.W. Brannigan, P.L. Harris, S.M. Haserlat, J.G. Supko, F.G. Haluska, D.N. Louis, D.C. Christiani, J. Settleman, D.A. Haber, Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *The New England journal of medicine* 350(21) (2004) 2129-39.
- [37] H. Shigematsu, L. Lin, T. Takahashi, M. Nomura, M. Suzuki, Wistuba, II, K.M. Fong, H. Lee, S. Toyooka, N. Shimizu, T. Fujisawa, Z. Feng, J.A. Roth, J. Herz, J.D. Minna, A.F.

- Gazdar, Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers, *Journal of the National Cancer Institute* 97(5) (2005) 339-46.
- [38] S. Fang, Z. Wang, EGFR mutations as a prognostic and predictive marker in non-small-cell lung cancer, *Drug design, development and therapy* 8 (2014) 1595-611.
- [39] C. Mao, L.X. Qiu, R.Y. Liao, F.B. Du, H. Ding, W.C. Yang, J. Li, Q. Chen, KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies, *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 69(3) (2010) 272-8.
- [40] L. Benesova, M. Minarik, D. Jancarikova, B. Belsanova, M. Pesek, Multiplicity of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with tyrosine kinase inhibitors, *Anticancer research* 30(5) (2010) 1667-71.
- [41] T.S. Mok, Y.L. Wu, S. Thongprasert, C.H. Yang, D.T. Chu, N. Saijo, P. Sunpaweravong, B. Han, B. Margono, Y. Ichinose, Y. Nishiwaki, Y. Ohe, J.J. Yang, B. Chewaskulyong, H. Jiang, E.L. Duffield, C.L. Watkins, A.A. Armour, M. Fukuoka, Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma, *The New England journal of medicine* 361(10) (2009) 947-57.
- [42] M. Tiseo, M. Bartolotti, F. Gelsomino, P. Bordi, Emerging role of gefitinib in the treatment of non-small-cell lung cancer (NSCLC), *Drug design, development and therapy* 4 (2010) 81-98.
- [43] J.Y. Douillard, G. Ostoros, M. Cobo, T. Ciuleanu, R. McCormack, A. Webster, T. Milenkova, First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study, *British journal of cancer* 110(1) (2014) 55-62.
- [44] C. Zhou, Y.L. Wu, G. Chen, J. Feng, X.Q. Liu, C. Wang, S. Zhang, J. Wang, S. Zhou, S. Ren, S. Lu, L. Zhang, C. Hu, C. Hu, Y. Luo, L. Chen, M. Ye, J. Huang, X. Zhi, Y. Zhang, Q. Xiu, J. Ma, L. Zhang, C. You, Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study, *The Lancet. Oncology* 12(8) (2011) 735-42.
- [45] R. Rosell, E. Carcereny, R. Gervais, A. Vergnenegre, B. Massuti, E. Felip, R. Palmero, R. Garcia-Gomez, C. Pallares, J.M. Sanchez, R. Porta, M. Cobo, P. Garrido, F. Longo, T. Moran, A. Insa, F. De Marinis, R. Corre, I. Bover, A. Illiano, E. Dansin, J. de Castro, M. Milella, N. Reguart, G. Altavilla, U. Jimenez, M. Provencio, M.A. Moreno, J. Terrasa, J. Munoz-Langa, J. Valdivia, D. Isla, M. Domine, O. Molinier, J. Mazieres, N. Baize, R. Garcia-Campelo, G. Robinet, D. Rodriguez-Abreu, G. Lopez-Vivanco, V. Gebbia, L. Ferrera-Delgado, P. Bombaron, R. Bernabe, A. Bearz, A. Artal, E. Cortesi, C. Rolfo, M. Sanchez-Ronco, A. Drozdowskyj, C. Queralt, I. de Aguirre, J.L. Ramirez, J.J. Sanchez, M.A. Molina, M. Taron, L. Paz-Ares, Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial, *The Lancet. Oncology* 13(3) (2012) 239-46.
- [46] J.C. Yang, Y.L. Wu, M. Schuler, M. Sebastian, S. Popat, N. Yamamoto, C. Zhou, C.P. Hu, K. O'Byrne, J. Feng, S. Lu, Y. Huang, S.L. Geater, K.Y. Lee, C.M. Tsai, V. Gorbunova, V. Hirsh, J. Bennouna, S. Orlov, T. Mok, M. Boyer, W.C. Su, K.H. Lee, T. Kato, D. Massey, M. Shahidi, V. Zazulina, L.V. Sequist, Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials, *The Lancet. Oncology* 16(2) (2015) 141-51.
- [47] K. Park, E.H. Tan, K. O'Byrne, L. Zhang, M. Boyer, T. Mok, V. Hirsh, J.C. Yang, K.H. Lee, S. Lu, Y. Shi, S.W. Kim, J. Laskin, D.W. Kim, C.D. Arvis, K. Kolbeck, S.A. Laurie, C.M. Tsai, M. Shahidi, M. Kim, D. Massey, V. Zazulina, L. Paz-Ares, Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial, *The Lancet. Oncology* 17(5) (2016) 577-89.

- [48] L.V. Sequist, B.A. Waltman, D. Dias-Santagata, S. Digumarthy, A.B. Turke, P. Fidias, K. Bergethon, A.T. Shaw, S. Gettinger, A.K. Cosper, S. Akhavanfard, R.S. Heist, J. Temel, J.G. Christensen, J.C. Wain, T.J. Lynch, K. Vernovsky, E.J. Mark, M. Lanuti, A.J. Iafrate, M. Mino-Kenudson, J.A. Engelman, Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors, *Science translational medicine* 3(75) (2011) 75ra26.
- [49] J. Chmielecki, J. Foo, G.R. Oxnard, K. Hutchinson, K. Ohashi, R. Somwar, L. Wang, K.R. Amato, M. Arcila, M.L. Sos, N.D. Socci, A. Viale, E. de Stanchina, M.S. Ginsberg, R.K. Thomas, M.G. Kris, A. Inoue, M. Ladanyi, V.A. Miller, F. Michor, W. Pao, Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling, *Science translational medicine* 3(90) (2011) 90ra59.
- [50] H.A. Yu, M.E. Arcila, N. Rekhtman, C.S. Sima, M.F. Zakowski, W. Pao, M.G. Kris, V.A. Miller, M. Ladanyi, G.J. Riely, Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19(8) (2013) 2240-7.
- [51] G.R. Oxnard, M.E. Arcila, C.S. Sima, G.J. Riely, J. Chmielecki, M.G. Kris, W. Pao, M. Ladanyi, V.A. Miller, Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(6) (2011) 1616-22.
- [52] S. Maheswaran, L.V. Sequist, S. Nagrath, L. Ulkus, B. Brannigan, C.V. Collura, E. Inserra, S. Diederichs, A.J. Iafrate, D.W. Bell, S. Digumarthy, A. Muzikansky, D. Irimia, J. Settleman, R.G. Tompkins, T.J. Lynch, M. Toner, D.A. Haber, Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells, *The New England journal of medicine* 359(4) (2008) 366-77.
- [53] Z. Wang, R. Chen, S. Wang, J. Zhong, M. Wu, J. Zhao, J. Duan, M. Zhuo, T. An, Y. Wang, H. Bai, J. Wang, Quantification and dynamic monitoring of EGFR T790M in plasma cell-free DNA by digital PCR for prognosis of EGFR-TKI treatment in advanced NSCLC, *PloS one* 9(11) (2014) e110780.
- [54] K.Y. Su, H.Y. Chen, K.C. Li, M.L. Kuo, J.C. Yang, W.K. Chan, B.C. Ho, G.C. Chang, J.Y. Shih, S.L. Yu, P.C. Yang, Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30(4) (2012) 433-40.
- [55] A.G. Sacher, P.A. Janne, G.R. Oxnard, Management of acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer, *Cancer* 120(15) (2014) 2289-98.
- [56] A. Jukna, G. Montanari, M.C. Mengoli, A. Cavazza, M. Covi, F. Barbieri, F. Bertolini, G. Rossi, Squamous Cell Carcinoma "Transformation" Concurrent with Secondary T790M Mutation in Resistant EGFR-Mutated Adenocarcinomas, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11(4) (2016) e49-51.
- [57] K. Suda, I. Murakami, K. Sakai, H. Mizuuchi, S. Shimizu, K. Sato, K. Tomizawa, S. Tomida, Y. Yatabe, K. Nishio, T. Mitsudomi, Small cell lung cancer transformation and T790M mutation: complimentary roles in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer, *Scientific reports* 5 (2015) 14447.
- [58] J.K. Lee, J. Lee, S. Kim, S. Kim, J. Youk, S. Park, Y. An, B. Keam, D.W. Kim, D.S. Heo, Y.T. Kim, J.S. Kim, S.H. Kim, J.S. Lee, S.H. Lee, K. Park, J.L. Ku, Y.K. Jeon, D.H. Chung, P.J. Park, J. Kim, T.M. Kim, Y.S. Ju, Clonal History and Genetic Predictors of Transformation Into Small-Cell Carcinomas From Lung Adenocarcinomas, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35(26) (2017) 3065-3074.
- [59] R. Kanda, A. Kawahara, K. Watari, Y. Murakami, K. Sonoda, M. Maeda, H. Fujita, M. Kage, H. Uramoto, C. Costa, M. Kuwano, M. Ono, Erlotinib resistance in lung cancer cells

- mediated by integrin beta1/Src/Akt-driven bypass signaling, *Cancer research* 73(20) (2013) 6243-53.
- [60] E.A. Eisenhauer, P. Therasse, J. Bogaerts, L.H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe, J. Verweij, New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1), *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 45(2) (2009) 228-47.
- [61] A.J. Weickhardt, B. Scheier, J.M. Burke, G. Gan, X. Lu, P.A. Bunn, Jr., D.L. Aisner, L.E. Gaspar, B.D. Kavanagh, R.C. Doebele, D.R. Camidge, Local ablative therapy of oligoprogressive disease prolongs disease control by tyrosine kinase inhibitors in oncogene-addicted non-small-cell lung cancer, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 7(12) (2012) 1807-14.
- [62] J.F. Gainor, A.T. Shaw, Emerging paradigms in the development of resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31(31) (2013) 3987-96.
- [63] H.A. Yu, C.S. Sima, J. Huang, S.B. Solomon, A. Rimner, P. Paik, M.C. Pietanza, C.G. Azzoli, N.A. Rizvi, L.M. Krug, V.A. Miller, M.G. Kris, G.J. Riely, Local therapy with continued EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy as a treatment strategy in EGFR-mutant advanced lung cancers that have developed acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 8(3) (2013) 346-51.
- [64] J.E. Chaft, G.R. Oxnard, C.S. Sima, M.G. Kris, V.A. Miller, G.J. Riely, Disease flare after tyrosine kinase inhibitor discontinuation in patients with EGFR-mutant lung cancer and acquired resistance to erlotinib or gefitinib: implications for clinical trial design, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(19) (2011) 6298-303.
- [65] J.C. Soria, Y.L. Wu, K. Nakagawa, S.W. Kim, J.J. Yang, M.J. Ahn, J. Wang, J.C. Yang, Y. Lu, S. Atagi, S. Ponce, D.H. Lee, Y. Liu, K. Yoh, J.Y. Zhou, X. Shi, A. Webster, H. Jiang, T.S. Mok, Gefitinib plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer after progression on first-line gefitinib (IMPRESS): a phase 3 randomised trial, *The Lancet. Oncology* 16(8) (2015) 990-8.
- [66] H. West, G.R. Oxnard, R.C. Doebele, Acquired resistance to targeted therapies in advanced non-small cell lung cancer: new strategies and new agents, *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Meeting* (2013).
- [67] T.S. Mok, Y.L. Wu, M.J. Ahn, M.C. Garassino, H.R. Kim, S.S. Ramalingam, F.A. Shepherd, Y. He, H. Akamatsu, W.S. Theelen, C.K. Lee, M. Sebastian, A. Templeton, H. Mann, M. Marotti, S. Ghiorghiu, V.A. Papadimitrakopoulou, Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer, *The New England journal of medicine* 376(7) (2017) 629-640.
- [68] S. Popat, A. Wotherspoon, C.M. Nutting, D. Gonzalez, A.G. Nicholson, M. O'Brien, Transformation to "high grade" neuroendocrine carcinoma as an acquired drug resistance mechanism in EGFR-mutant lung adenocarcinoma, *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 80(1) (2013) 1-4.
- [69] C. Bosc, G.R. Ferretti, J. Cadranel, C. Audigier-Valette, B. Besse, F. Barlesi, C. Decroisette, S. Lantuejoul, F. Arbib, D. Moro-Sibilot, Rebiopsy during disease progression in patients treated by TKI for oncogene-addicted NSCLC, *Targeted oncology* 10(2) (2015) 247-53.
- [70] M.J. Overman, J. Modak, S. Kopetz, R. Murthy, J.C. Yao, M.E. Hicks, J.L. Abbruzzese, A.L. Tam, Use of research biopsies in clinical trials: are risks and benefits adequately

discussed?, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31(1) (2013) 17-22.

[71] P.A. Vanderlaan, N. Yamaguchi, E. Folch, D.H. Boucher, M.S. Kent, S.P. Gangadharan, A. Majid, M.A. Goldstein, M.S. Huberman, O.N. Kocher, D.B. Costa, Success and failure rates of tumor genotyping techniques in routine pathological samples with non-small-cell lung cancer, *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 84(1) (2014) 39-44.

[72] V.M. Singh, R.C. Salunga, V.J. Huang, Y. Tran, M. Erlander, P. Plumlee, M.R. Peterson, Analysis of the effect of various decalcification agents on the quantity and quality of nucleic acid (DNA and RNA) recovered from bone biopsies, *Annals of diagnostic pathology* 17(4) (2013) 322-6.

[73] L.A. Diaz, Jr., A. Bardelli, Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32(6) (2014) 579-86.

[74] P. Mandel, P. Metais, [Not Available], *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales* 142(3-4) (1948) 241-3.

[75] S. Jahr, H. Hentze, S. Englisch, D. Hardt, F.O. Fackelmayer, R.D. Hesch, R. Knippers, DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells, *Cancer research* 61(4) (2001) 1659-65.

[76] H. Kimura, K. Kasahara, M. Kawaishi, H. Kunitoh, T. Tamura, B. Holloway, K. Nishio, Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12(13) (2006) 3915-21.

[77] H. Kimura, M. Suminoe, K. Kasahara, T. Sone, T. Araya, S. Tamori, F. Koizumi, K. Nishio, K. Miyamoto, M. Fujimura, S. Nakao, Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA), *British journal of cancer* 97(6) (2007) 778-84.

[78] T.K. Yung, K.C. Chan, T.S. Mok, J. Tong, K.F. To, Y.M. Lo, Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15(6) (2009) 2076-84.

[79] B. Weber, P. Meldgaard, H. Hager, L. Wu, W. Wei, J. Tsai, A. Khalil, E. Nexo, B.S. Sorensen, Detection of EGFR mutations in plasma and biopsies from non-small cell lung cancer patients by allele-specific PCR assays, *BMC cancer* 14 (2014) 294.

[80] J.Y. Douillard, G. Ostoros, M. Cobo, T. Ciuleanu, R. Cole, G. McWalter, J. Walker, S. Dearden, A. Webster, T. Milenkova, R. McCormack, Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9(9) (2014) 1345-53.

[81] J. Luo, L. Shen, D. Zheng, Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis, *Scientific reports* 4 (2014) 6269.

[82] M. Qiu, J. Wang, Y. Xu, X. Ding, M. Li, F. Jiang, L. Xu, R. Yin, Circulating tumor DNA is effective for the detection of EGFR mutation in non-small cell lung cancer: a meta-analysis, *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 24(1) (2015) 206-12.

[83] M. Reck, K. Hagiwara, B. Han, S. Tjulandin, C. Grohe, T. Yokoi, A. Morabito, S. Novello, E. Arriola, O. Molinier, R. McCormack, M. Ratcliffe, N. Normanno, ctDNA Determination of EGFR Mutation Status in European and Japanese Patients with Advanced NSCLC: The

- ASSESS Study, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11(10) (2016) 1682-9.
- [84] B. Han, M. Ratcliffe, V. Haddad, H. Brown, S. Tjulandin, K. Hagiwara, M. Reck, N. Normanno, 59PD Association of EGFR mutation subtypes with clinical and demographic characteristics of patients (pts) with aNSCLC: IGNITE and ASSESS pooled analysis, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11(4 Suppl) (2016) S79-80.
- [85] S. Couraud, F. Vaca-Paniagua, S. Villar, J. Oliver, T. Schuster, H. Blanche, N. Girard, J. Tredaniel, L. Guilleminault, R. Gervais, N. Prim, M. Vincent, J. Margery, S. Larive, P. Foucher, B. Duvert, M. Vallee, F. Le Calvez-Kelm, J. McKay, P. Missy, F. Morin, G. Zalcman, M. Olivier, P.J. Souquet, Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20(17) (2014) 4613-24.
- [86] J.S. Tseng, T.Y. Yang, C.R. Tsai, K.C. Chen, K.H. Hsu, M.H. Tsai, S.L. Yu, K.Y. Su, J.J. Chen, G.C. Chang, Dynamic plasma EGFR mutation status as a predictor of EGFR-TKI efficacy in patients with EGFR-mutant lung adenocarcinoma, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 10(4) (2015) 603-10.
- [87] Y.L. Wu, L.V. Sequist, C.P. Hu, J. Feng, S. Lu, Y. Huang, W. Li, M. Hou, M. Schuler, T. Mok, N. Yamamoto, K. O'Byrne, V. Hirsh, N. Gibson, D. Massey, M. Kim, J.C. Yang, EGFR mutation detection in circulating cell-free DNA of lung adenocarcinoma patients: analysis of LUX-Lung 3 and 6, *British journal of cancer* 116(2) (2017) 175-185.
- [88] Y.J. Zhu, H.B. Zhang, Y.H. Liu, F.L. Zhang, Y.Z. Zhu, Y. Li, J.P. Bai, L.R. Liu, Y.C. Qu, X. Qu, X. Chen, Y. Li, G.J. Zheng, Quantitative cell-free circulating EGFR mutation concentration is correlated with tumor burden in advanced NSCLC patients, *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 109 (2017) 124-127.
- [89] Q. Zhou, X.C. Zhang, Z.H. Chen, X.L. Yin, J.J. Yang, C.R. Xu, H.H. Yan, H.J. Chen, J. Su, W.Z. Zhong, X.N. Yang, S.J. An, B.C. Wang, Y.S. Huang, Z. Wang, Y.L. Wu, Relative abundance of EGFR mutations predicts benefit from gefitinib treatment for advanced non-small-cell lung cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29(24) (2011) 3316-21.
- [90] C. Mao, J.Q. Yuan, Z.Y. Yang, X.H. Fu, X.Y. Wu, J.L. Tang, Blood as a Substitute for Tumor Tissue in Detecting EGFR Mutations for Guiding EGFR TKIs Treatment of Nonsmall Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Medicine* 94(21) (2015) e775.
- [91] G. Fan, K. Zhang, J. Ding, J. Li, Prognostic value of EGFR and KRAS in circulating tumor DNA in patients with advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis, *Oncotarget* 8(20) (2017) 33922-33932.
- [92] M. Marcq, A. Vallee, A. Bizieux, M.G. Denis, Detection of EGFR mutations in the plasma of patients with lung adenocarcinoma for real-time monitoring of therapeutic response to tyrosine kinase inhibitors?, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9(7) (2014) e49-50.
- [93] B.S. Sorensen, L. Wu, W. Wei, J. Tsai, B. Weber, E. Nexø, P. Meldgaard, Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib, *Cancer* 120(24) (2014) 3896-901.
- [94] G.R. Oxnard, C.P. Paweletz, Y. Kuang, S.L. Mach, A. O'Connell, M.M. Messineo, J.J. Luke, M. Butaney, P. Kirschmeier, D.M. Jackman, P.A. Janne, Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation

- genotyping of cell-free plasma DNA, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20(6) (2014) 1698-1705.
- [95] G.R. Oxnard, K.S. Thress, R.S. Alden, R. Lawrance, C.P. Paweletz, M. Cantarini, J.C. Yang, J.C. Barrett, P.A. Janne, Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34(28) (2016) 3375-82.
- [96] J.J. Chabon, A.D. Simmons, A.F. Lovejoy, M.S. Esfahani, A.M. Newman, H.J. Haringsma, D.M. Kurtz, H. Stehr, F. Scherer, C.A. Karlovich, T.C. Harding, K.A. Durkin, G.A. Otterson, W.T. Purcell, D.R. Camidge, J.W. Goldman, L.V. Sequist, Z. Piotrowska, H.A. Wakelee, J.W. Neal, A.A. Alizadeh, M. Diehn, Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients, *Nature communications* 7 (2016) 11815.
- [97] J. Remon, C. Caramella, C. Jovelet, L. Lacroix, A. Lawson, S. Smalley, K. Howarth, D. Gale, E. Green, V. Plagnol, N. Rosenfeld, D. Planchard, M.V. Bluthgen, A. Gazzah, C. Pannet, C. Nicotra, E. Auclin, J.C. Soria, B. Besse, Osimertinib benefit in EGFR-mutant NSCLC patients with T790M-mutation detected by circulating tumour DNA, *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 28(4) (2017) 784-790.
- [98] J. Tanizaki, E. Banno, Y. Togashi, H. Hayashi, K. Sakai, M. Takeda, H. Kaneda, K. Nishio, K. Nakagawa, Case report: Durable response to afatinib in a patient with lung cancer harboring two uncommon mutations of EGFR and a KRAS mutation, *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 101 (2016) 11-15.
- [99] Y. Liu, L. Sun, Z.C. Xiong, X. Sun, S.L. Zhang, J.T. Ma, C.B. Han, Meta-analysis of the impact of de novo and acquired EGFR T790M mutations on the prognosis of patients with non-small cell lung cancer receiving EGFR-TKIs, *OncoTargets and therapy* 10 (2017) 2267-2279.
- [100] M.J. Niederst, H. Hu, H.E. Mulvey, E.L. Lockerman, A.R. Garcia, Z. Piotrowska, L.V. Sequist, J.A. Engelman, The Allelic Context of the C797S Mutation Acquired upon Treatment with Third-Generation EGFR Inhibitors Impacts Sensitivity to Subsequent Treatment Strategies, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21(17) (2015) 3924-33.
- [101] D. Ayeni, K. Politi, S.B. Goldberg, Emerging Agents and New Mutations in EGFR-Mutant Lung Cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21(17) (2015) 3818-20.
- [102] J.Y. Wu, C.J. Yu, Y.C. Chang, C.H. Yang, J.Y. Shih, P.C. Yang, Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on "uncommon" epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(11) (2011) 3812-21.
- [103] N. Karachaliou, C. Mayo-de las Casas, C. Queralt, I. de Aguirre, B. Melloni, F. Cardenal, R. Garcia-Gomez, B. Massuti, J.M. Sanchez, R. Porta, S. Ponce-Aix, T. Moran, E. Carcereny, E. Felip, I. Bover, A. Insa, N. Reguart, D. Isla, A. Vergnenegre, F. de Marinis, R. Gervais, R. Corre, L. Paz-Ares, D. Morales-Espinosa, S. Viteri, A. Drozdowskyj, N. Jordana-Ariza, J.L. Ramirez-Serrano, M.A. Molina-Vila, R. Rosell, Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial, *JAMA oncology* 1(2) (2015) 149-57.
- [104] T. Mok, Y.L. Wu, J.S. Lee, C.J. Yu, V. Sriuranpong, J. Sandoval-Tan, G. Ladrera, S. Thongprasert, V. Srimuninnimit, M. Liao, Y. Zhu, C. Zhou, F. Fuerte, B. Margono, W. Wen, J. Tsai, M. Truman, B. Klughammer, D.S. Shames, L. Wu, 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, *Clinical cancer*

- research : an official journal of the American Association for Cancer Research 21(14) (2015) 3196-203.
- [105] Y.J. Lee, K.A. Yoon, J.Y. Han, H.T. Kim, T. Yun, G.K. Lee, H.Y. Kim, J.S. Lee, Circulating cell-free DNA in plasma of never smokers with advanced lung adenocarcinoma receiving gefitinib or standard chemotherapy as first-line therapy, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(15) (2011) 5179-87.
- [106] J. Wang, H. Bai, C. Hong, J. Wang, T.H. Mei, Analyzing epidermal growth factor receptor mutation status changes in advanced non-small-cell lung cancer at different sampling time-points of blood within one day, *Thoracic cancer* 8(4) (2017) 312-319.
- [107] Z. Piotrowska, M.J. Niederst, C.A. Karlovich, H.A. Wakelee, J.W. Neal, M. Minonkenudson, L. Fulton, A.N. Hata, E.L. Lockerman, A. Kalsy, S. Digumarthy, A. Muzikansky, M. Raponi, A.R. Garcia, H.E. Mulvey, M.K. Parks, R.H. DiCecca, D. Dias-Santagata, A.J. Iafrate, A.T. Shaw, A.R. Allen, J.A. Engelman, L.V. Sequist, Heterogeneity Underlies the Emergence of EGFR T790M Wild-Type Clones Following Treatment of T790M-Positive Cancers with a Third-Generation EGFR Inhibitor, *Cancer discovery* 5(7) (2015) 713-22.
- [108] Y.J. Zhu, H.B. Zhang, Y.H. Liu, Y.Z. Zhu, J. Chen, Y. Li, J.P. Bai, L.R. Liu, Y.C. Qu, X. Qu, X. Chen, G.J. Zheng, Association of mutant EGFR L858R and exon 19 concentration in circulating cell-free DNA using droplet digital PCR with response to EGFR-TKIs in NSCLC, *Oncology letters* 14(2) (2017) 2573-2579.
- [109] E. Iwama, K. Sakai, K. Azuma, T. Harada, D. Harada, K. Nosaki, K. Hotta, F. Ohyanagi, T. Kurata, T. Fukuhara, H. Akamatsu, K. Goto, T. Shimose, J. Kishimoto, Y. Nakanishi, K. Nishio, I. Okamoto, Monitoring of somatic mutations in circulating cell-free DNA by digital PCR and next-generation sequencing during afatinib treatment in patients with lung adenocarcinoma positive for EGFR activating mutations, *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 28(1) (2017) 136-141.
- [110] J. He, W. Tan, X. Tang, J. Ma, Variations in EGFR ctDNA Correlates to the Clinical Efficacy of Afatinib in Non Small Cell Lung Cancer with Acquired Resistance, *Pathology oncology research : POR* 23(2) (2017) 307-315.
- [111] K.S. Thress, Complete clearance of plasma EGFR mutations as a predictor of outcome on osimertinib in the AURA trial., *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35(suppl.15) (2017).