

'Liquid biopsy' en therapieresistentie bij *EGFR*-gemuteerd longcarcinoom

Liquid biopsy and therapy resistance in *EGFR* mutated lung carcinoma

drs. J. Minnema-Luiting¹, drs. C.M.J. Steendam², prof. dr. R.H.N. van Schaik³, prof. dr. W.N.M. Dinjens⁴, dr. J.H. von der Thüsen⁵ en prof. dr. J.G.J.V. Aerts¹

SAMENVATTING

Deze 66-jarige patiënte, bekend met stadium IV niet-kleincellig longcarcinoom met een activerende mutatie in exon 19 van de 'epidermal growth factor receptor' (*EGFR*), werd behandeld met een eerste lijns-*EGFR*-tyrosinekinaseremmer (TKI). Na één jaar behandeling was de ziekte progressief en werd in het bloed de resistentiemutatie *T790M* gevonden. De responskans bij behandeling met derdegeneratie-*EGFR*-TKI's is even hoog bij detectie van *T790M* in het bloed als bij vaststelling op weefsel. De bevinding van *T790M* was dan ook reden om de behandeling om te zetten naar osimertinib, met een fraaie partiële respons tot gevolg. Detectie van circulerend tumor-DNA, zoals dat bij een 'liquid biopsy' gebeurt, wordt momenteel nog beperkt klinisch ingezet. Zoals hier beschreven, kunnen resistentiemechanismen worden aangetoond in het bloed met ook vastgestelde respons op behandeling. Dit kan weefseldiagnostiek in specifieke gevallen overbodig maken. Het toepassingsgebied van 'liquid biopsy' zal zich in de toekomst naar alle waarschijnlijkheid verder uitbreiden. Hiervoor is meer onderzoek nodig. (NED TIJDSCHR ONCOL 2018;15:175-9)

SUMMARY

This 66 year-old patient with stage IV non-small cell lung carcinoma with an activating mutation in exon 19 of the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) received treatment with a first line *EGFR* tyrosine kinase inhibitor (TKI). After one year of treatment, there was disease progression and the acquired resistance mutation *T790M* was found in blood. With the detection of *T790M* in blood, the likelihood of response to third generation *EGFR*-TKIs is similar to detection of this mutation in tissue. This patient was treated with osimertinib, leading to a partial response. There are several possible clinical applications for the detection of circulating tumor DNA in blood. As described here, resistance mechanisms can be demonstrated with earlier proof of response to treatment, making tissue biopsy unnecessary in specific cases. In the future, clinical applications of liquid biopsy are expected to expand, for which more research is needed.

¹longarts, afdeling Longziekten, Erasmus MC, ²longarts, afdeling Longziekten, Erasmus MC en Amphia Ziekenhuis, ³klinisch chemicus, afdeling Klinische Chemie, Erasmus MC, ⁴klinisch moleculair bioloog in de pathologie, afdeling Pathologie, Erasmus MC, ⁵patholoog, afdeling Pathologie, Erasmus MC. Correspondentie graag richten aan mw. drs. J. Minnema-Luiting, longarts, afdeling Longziekten, Erasmus MC, 's-Gravendijkwal 230, 3015 CE Rotterdam, tel.: 010 703 48 62, e-mailadres: j.minnema-luiting@erasmusmc.nl

Belangenconflict en financiële ondersteuning: W. Dinjens: sprekersvergoeding en consultancy BMS, Roche, AstraZeneca, Amgen; J. von der Thüsen: sprekersvergoeding en consultancy AbbVie, BMS, Boehringer Ingelheim, MSD, Pfizer, Roche; J. Aerts: sprekersvergoeding en consultancy Eli-Lilly, Boehringer Ingelheim, MSD, BMS, AstraZeneca, Amphera, Roche en aandeelhouder Amphera b.v.

Trefwoorden: celvrij DNA (cfDNA), circulerend tumor-DNA (ctDNA), *EGFR*, 'liquid biopsy', mutatie, 'next generation sequencing' (NGS), niet-kleincellig longcarcinoom (NSCLC), 'polymerase chain reaction' (PCR), resistentiemechanismen, *T790M*, tyrosinekinaseremmers (TKI)

Keywords: cell free DNA (cfDNA), circulating tumor DNA (ctDNA), *EGFR*, liquid biopsy, mutation, next generation sequencing (NGS), non-small cell lung carcinoma (NSCLC), polymerase chain reaction (PCR), resistance mechanism, *T790M*, tyrosine kinase inhibitors (TKI)

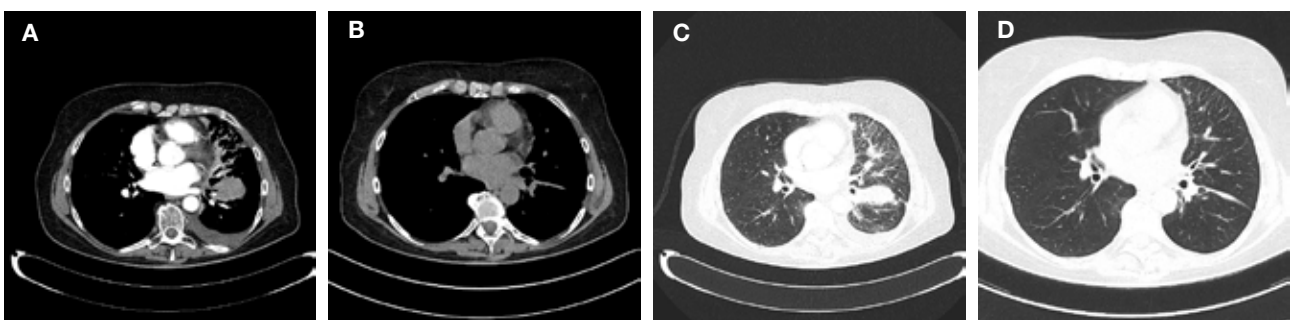
INLEIDING

Bij stadium IV niet-kleincellig longcarcinoom (NSCLC), type adenocarcinoom, dient moleculaire diagnostiek te worden ingezet naar genetische aberraties in onder andere de 'epidermal growth factor receptor' (*EGFR*), aangezien deze bij 10-15% van de NSCLC in de Kaukasische bevolking voorkomen.¹ Patiënten bij wie een activerende *EGFR*-mutatie wordt gevonden, zijn gebaat bij behandeling met een eerstelijns-*EGFR*-tyrosinekinaseremmer (TKI); de eerstegeneratiemiddelen erlotinib of gefinitib, of het tweede-generatiemiddel afatinib.^{2,3} Resistentie voor *EGFR*-TKI's ontstaat na een mediane behandelduur van één jaar en wordt in de helft van de gevallen veroorzaakt door het ontstaan van de resistentie-*EGFR*-*T790M*-mutatie.⁴ Met de komst van osimertinib, een derde generatie irreversibele remmer van *EGFR* met sensibiliserende mutaties én de TKI-resistentie-mutatie *T790M*, worden objectieve responspercentages (ORR) van 62-71% behaald.^{5,6} Ook tijdens behandeling met osimertinib worden verscheidene resistentiemechanismen beschreven, waarbij tot in 40% van de gevallen een *EGFR*-*C797S*-mutatie ontstaat.^{7,8} Bij tumorprogressie onder eerstelijns-*EGFR*-TKI's is diagnostiek door een biopsie van de groeiende laesie de eerste vervolgstap om vast te stellen of er een *T790M*-mutatie is ontstaan. Dit is soms echter niet mogelijk, omdat de laesies niet bereikbaar zijn of omdat de patiënt dit onderzoek weigert. Wij laten zien dat een 'liquid biopsy' bij *EGFR*-gemuteerde longkanker soms voldoende informatie kan geven voor de klinische praktijk.

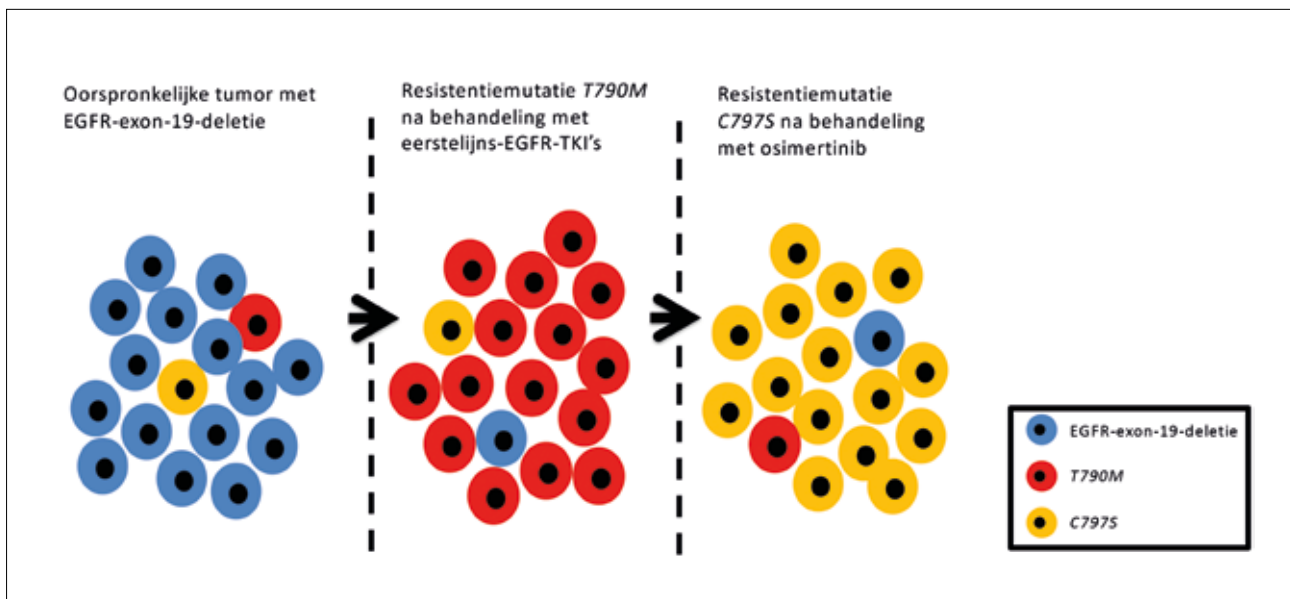
ZIEKTEGESCHIEDENIS

Deze 66-jarige patiënte, nimmer gerookt, is sinds mei 2015 bekend met een stadium IV niet-kleincellig longcarcinoom (NSCLC) op basis van pleuritis carcinomatosa. Vanwege een *EGFR*-exon 19-deletiemutatie (p.E746_A750del) werd elders in de eerste lijn gestart met afatinib, een tweede-generatie-*EGFR*-TKI. Vanwege bijwerkingen van pijnlijke huidkloven werd de behandeling omgezet naar erlotinib en later gefinitib, beide eerstegeneratie-*EGFR*-TKI's.^{2,3} Na ruim een

jaar behandeling was de ziekte progressief met groei van de parahilaire massa in de linkeronderkwab, toenemende lymfangitis en pleuritis carcinomatosa links, waarbij patiënte ook last had van hoesten en dyspneu. Op dit moment werd zij verwezen naar ons centrum. Diagnostiek naar *T790M* werd ingezet op bloed ('liquid biopsy'), waarbij een 'polymerase chain reaction' (PCR) werd uitgevoerd gericht op bekende *EGFR*-mutaties.⁹ Ook werd 'next generation sequencing' (NGS) ingezet op tumorcellen uit pleuravocht. Beide onderzoeken toonden de aanwezigheid van de 'gatekeeper' puntmutatie *T790M* aan, evenals de originele *EGFR*-exon 19-deletiemutatie. De behandeling met gefinitib werd gestaakt en zij startte met osimertinib in oktober 2016. Na zes weken behandeling was er een duidelijke klinische respons met afname van haar pulmonale klachten. Dit werd radiologisch bevestigd met een fraaie partiële respons op CT, waarop afname van de tumormassa links en vermindering van lymfangitis en pleuritis carcinomatosa werd gezien (zie Figuur 1). Osimertinib heeft een gunstig toxiciteitsprofiel en het middel werd goed verdragen.⁵ Ten tijde van de behandeling konden zowel de *T790M*- als de *EGFR*-exon 19-deletiemutatie niet meer worden gedetecteerd in de 'liquid biopsy'. Na 12 maanden osimertinib ontstond echter een atelectase van de lingula. Bij bronchoscopie werd cytologisch materiaal afgenomen uit de middenkwab; pathologisch onderzoek van dit materiaal bewijst de aanwezigheid van tumorcellen aldaar. Moleculaire diagnostiek met behulp van NGS toonde amplificatie aan van de oorspronkelijke *EGFR*-exon 19-deletiemutatie (allelfrequentie 86%), de eerder gedetecteerde exon 20-*T790M*-mutatie (allelfrequentie 25%), maar nu ook een nieuwe mutatie in exon 20, namelijk *C797S* (allelfrequentie 25%). De *T790M*- en de *C797S*-mutaties bleken in cis voor te komen (aanwezig te zijn in hetzelfde DNA-molecuul). Dit is een bekend resistentiemechanisme op osimertinib. Op basis hiervan werd patiënte overgezet naar behandeling met chemotherapie.^{7,8} Een schematisch overzicht van het beloop van de mutaties in de tijd is ingevoegd (zie Figuur 2).



FIGUUR 1. A. CT-thorax 27-9-2016: massa linkeronderkwab. B. CT-thorax 29-11-2016: afname van de massa linkeronderkwab. C. CT-thorax 27-9-2016: lymfangitis carcinomatosa. D. CT-thorax 29-11-2016: afname van lymfangitis carcinomatosa.



FIGUUR 2. Overzicht van het beloop van de resistentiemutaties.

‘LIQUID BIOPSY’: ACHTERGROND EN TECHNIEK

In 1948 werd voor het eerst de aanwezigheid van celvrij DNA (cfDNA) in plasma beschreven.¹⁰ Dit cfDNA is afkomstig uit gezond weefsel, ontstoken weefsel of maligne cellen die apoptose of necrose ondergaan. Het cfDNA uit tumorcellen wordt circulerend tumor-DNA (ctDNA) genoemd.⁹ Een van de mogelijke voordelen is dat mutaties in het ctDNA in theorie al de aanwezige mutaties in de primaire tumor en metastasen reflecteren, een ‘liquid biopsy’ toont dus een overzicht van de verschillende genomafwijkingen van alle aanwezige tumor in het lichaam. Dit is belangrijk, omdat het genomisch profiel van tumor en metastasen een grote intra- en intertumorvariabiliteit kent.^{9,11} Bij het afnemen van een weefselbiopt krijg je slechts een ‘snapshot’ van de tumor te zien, met het risico op een ‘single-biopsy bias’. Een mogelijke beperking van ‘liquid biopsy’ is de lagere sensitiviteit bij intrathoracale ziekte ten opzichte van extrathoracale gemetastaseerde ziekte, waarbij minder ctDNA in de circulatie aanwezig is.^{12,13}

In 2010 werd de term ‘liquid biopsy’ voor het eerst geïntroduceerd door Pantel en Alix-Panabières om een bloedtest aan te geven die dezelfde informatie verschaft als een weefselbiopt.¹⁴ Tegenwoordig gebruiken we deze term om een brede categorie aan te geven van minimaal invasieve testen die kunnen worden ingezet op een bloedafname, waarbij wordt gezocht naar opgeloste factoren, zoals proteïnen of tumormarkers, circulerende tumorcellen of ctDNA.¹⁵

Voor de analyse van cfDNA is plasma of serum nodig, afkomstig van EDTA-bloed. Er zijn meerdere commerciële kits

beschikbaar om het cfDNA vervolgens uit plasma of serum te extraheren. Voor de detectie van ctDNA zijn zeer sensitieve analyses benodigd, omdat de kwantiteit en kwaliteit van het ctDNA erg kan variëren. De fractie van cfDNA die afkomstig is van de tumor (ctDNA) ligt bijvoorbeeld tussen 0,01% en 93%. Vervolgens wordt PCR of NGS verricht op het cfDNA.⁹ Bij deze patiënte werd een ‘digital droplet PCR’ (ddPCR) verricht, gericht op bekende veelvoorkomende mutaties in het *EGFR*-gen, waaronder de *T790M*-mutatie. Deze techniek laat in minuscule druppeltjes aparte amplificaties plaatsvinden op DNA-fragmenten, die vervolgens stuk voor stuk worden getypeerd als wildtype of mutant. De gevoeligheid is hierdoor vele malen groter dan van conventionele PCR en uitermate geschikt om mutaties te detecteren bij kleine hoeveelheden tumor-DNA in de circulatie.¹⁶

MOGELIJKE TOEPASSINGEN VAN ‘LIQUID BIOPSY’

VOORSPELLEN VAN RESPONS OP BEHANDELING

Bij NSCLC stadium IV heeft het vaststellen van specifieke genetische aberraties zoals translocaties, mutaties of amplificaties in bijvoorbeeld *EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *HER2*, *ROS1*, *RET*, *MET* of *NTRK1* directe consequenties voor de behandeling.^{17,18} Regelmatig zijn echter onvoldoende tumorcellen beschikbaar om mutatie-analyse uit te voeren en is er geen mogelijkheid om een nieuw biopt af te nemen, of wordt dit door de patiënt geweigerd. Indien bij een ‘liquid biopsy’ dan bepaalde activerende mutaties of een verhoogd aantal genkopieën in het bloed worden gedetecteerd, zou dit beleidsconsequenties tot gevolg kunnen hebben.^{9,19}

AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1** Resistentie van NSCLC tegen eerstelijns-EGFR-TKI's ontstaat na een mediane behandelduur van één jaar. In 50% van de gevallen gaat het om de *EGFR*-resistentiemutatie *T790M*.
- 2** Osimertinib is een irreversibele derdegeneratie-EGFR-TKI met krachtige werking bij *T790M*-gemuteerd NSCLC, met een zeer gunstig toxiciteitsprofiel.
- 3** Een bekend resistentiemechanisme bij behandeling met osimertinib is het ontstaan van een *EGFR*-*C797S*-mutatie.
- 4** Bij tumorprogressie onder behandeling met EGFR-TKI's is hernieuwde mutatieanalyse essentieel. Een 'liquid biopsy' waarbij *T790M* in het cfDNA in plasma wordt aangetoond, maakt het afnemen van een weefselbiopt in sommige gevallen overbodig.
- 5** Andere mogelijkheden van 'liquid biopsy' zijn onder andere het monitoren van tumorrespons en vroege detectie van tumorprogressie; dit wordt voornamelijk alleen als onderdeel van wetenschappelijke studies gedaan bij NSCLC.

VASTSTELLEN VAN RESISTENTIEMECHANISMEN

Met de komst van de gerichte behandeling met TKI's zijn ook de secundaire (verworven) resistentiemutaties aan het licht gekomen. Patiënten die met een eerstelijns-EGFR-TKI worden behandeld, krijgen gemiddeld na één jaar te maken met ziekteprogressie. Bij de helft is dan de verworven 'gatekeeper'-mutatie *T790M* aanwezig in de tumor. Detectie van deze mutatie heeft gevolgen voor de therapiekeuze, sinds de komst van de derdegeneratie-EGFR-TKI osimertinib. Oxnard et al. toonden aan dat een 'liquid biopsy' in staat was de *T790M*-mutatie vast te stellen met een sensitiviteit van 70%. In dit onderzoek hadden de patiënten met *T790M* in het bloed een vergelijkbare uitkomst op osimertinib als de patiënten bij wie de mutatie in een weefselbiopt werd vastgesteld. Als een 'liquid biopsy' *T790M* aantoonde bij progressie onder eerstegeneratie-EGFR-TKI's, is een weefselbiopt overbodig en kan worden gestart met osimertinib. Bij een negatieve 'liquid biopsy' dient, gezien de kans op een fout-negatieve uitslag van 30%, alsnog een weefselbiopt te worden verricht.¹⁹ De *C797S*-puntmutatie die kan optreden bij resistentie op osimertinib, kan ook met 'liquid biopsy' worden aangetoond.⁸

VROEGDIAGNOSTIEK, DETECTIE VAN RECIDIËF EN RESPONS OP TKI-BEHANDELING

Vroegdiagnostiek van maligniteiten is één van de bekende voordelen van ctDNA-analyse. In lijn hiermee ligt de vroege detectie van recidieven of het vaststellen van tumorresidu na in opzet curatieve chirurgie. Gebruikelijk is de follow-up na chirurgie te verrichten met radiologische beeldvorming. Deze methoden zijn kostbaar en stellen de patiënt bloot aan straling en contrastmedia. Tevens hebben ze een beperkte sensitiviteit voor het detecteren van micrometastasen.

'Liquid biopsies' lijken met een hoge sensitiviteit en specificiteit een ziekterecidief te kunnen vaststellen, door detectie van tumorspecifieke afwijkingen (bijvoorbeeld *APC* bij colorectaal carcinoom, *TP53* en *KRAS* bij pancreascarcinoom) in bloed, aansluitend aan een periode postoperatief waarin deze afwijkingen niet meer detecteerbaar waren. Ook tumorresidu na chirurgie kan met 'liquid biopsy' worden aangetoond, door de detectie van persisterende tumorgeassocieerde genetische afwijkingen in het bloed.^{9,20} In de casus zien we radiologisch een fraaie partiële respons tijdens de behandeling met osimertinib, tegelijkertijd verdwijnen de *T790M*- en de *EGFR*-exon 19-deletiemutaties in het bloed. Dit impliceert dat 'liquid biopsy' ook kan worden ingezet om respons op TKI's te monitoren.

TERUGKOPPELING NAAR DE CASUS

Bij deze patiënte is enkele keren een 'liquid biopsy' verricht. Op het moment dat zij progressief is onder de eerstelijns-EGFR-TKI's wordt de resistentiemutatie *T790M* gedetecteerd in het bloed. Aangezien dit correleert met verminderde respons op eerstelijns-EGFR-TKI's, maar met een goede respons op de derdegeneratie-EGFR-TKI osimertinib, is dit voldoende voor de switch naar osimertinib. Na drie maanden behandeling en een partiële respons op beeldvormend onderzoek zijn er geen detecteerbare mutaties aanwezig in het bloed. Dit is een therapie-effect, waarbij de respons op behandeling is af te lezen aan de hoeveelheid ctDNA in het bloed.

CONCLUSIE

Het detecteren van ctDNA en tumorspecifieke mutaties in bloed, zoals dat bij een 'liquid biopsy' mogelijk is, brengt een scala aan mogelijkheden met zich mee.⁹ De hier be-

schreven casus laat zien dat het gebruik van deze techniek in sommige gevallen een weefselbiopt overbodig kan maken. De diagnostiek naar resistentiemechanismen bij *EGFR*-gemuteerd NSCLC kan zo patiëntvriendelijker worden. Deze toepassing wordt al gebruikt in de klinische praktijk. Momenteel worden tal van andere mogelijkheden van 'liquid biopsy' onderzocht. De verwachting is dat we in de toekomst wellicht meer gebruik zullen maken van deze techniek in de dagelijkse klinische praktijk.

REFERENTIES

- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350(21):2129-39.
- Linardou H, Dahabreh IJ, Bafaloukos D, et al. Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6(6):352-66.
- Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13(3):239-46.
- Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res* 2013;19(8):2240-7.
- Mok TS, Wu Y-L, Ahn M-J, et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2017;376(7):629-40.
- Yang JC-H, Ahn M-J, Kim D-W, et al. Osimertinib in pretreated T790M-positive advanced non-small-cell lung cancer: AURA study phase II extension component. *J Clin Oncol* 2017;35(12):1288-96.
- Niederst MJ, Hu H, Mulvey HE, et al. The allelic context of the C797S mutation acquired upon treatment with third-generation EGFR inhibitors impacts sensitivity to subsequent treatment strategies. *Clin Cancer Res* 2015;21(17):3924-33.
- Thress KS, Paweletz CP, Felip E, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med* 2015;21(6):560-2.
- Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10(8):472-84.
- Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948;142(3-4):241-3.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366(10):883-92.
- Passiglia F, Listi A, Castiglia M, et al. EGFR inhibition in NSCLC: new findings... and opened questions? *Crit Rev Oncol Hematol* 2017;112:126-35.
- Karlovich C, Goldman JW, Sun J-M, et al. Assessment of EGFR mutation status in matched plasma and tumor tissue of NSCLC patients from a phase I study of rociletinib (CO-1686). *Clin Cancer Res* 2016;22(10):2386-95.
- Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med* 2010;16(9):398-406.
- Merker JD, Oxnard GR, Compton C, et al. Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol* 2018;36(16):1631-41.
- Pekin D, Skhiri Y, Baret J-C, et al. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip* 2011;11(13):2156-66.
- Reungwetwattana T, Liang Y, Zhu V, et al. The race to target MET exon 14 skipping alterations in non-small cell lung cancer: the why, the how, the who, the unknown, and the inevitable. *Lung Cancer Amst Neth* 2017;103:27-37.
- Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. *J Clin Oncol* 2013;31(8):1105-11.
- Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, et al. Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (AZD9291) in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2016;34(28):3375-82.
- Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker - a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta* 2010;411(21-22):1611-24.

ONTVANGEN 29 MAART 2018, GEACCEPTEERD 16 MEI 2018.