

Die Bedeutung umfassender Molekular Diagnostik mittels Hybrid Capture Next Generation Sequencing beim nicht-squamösen NSCLC

(Titel der Dissertation)

Der Fakultät für Medizin und Gesundheitswissenschaften der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg zur Erlangung des Grades und Titels

Doctor rerum medicinalium (Dr.rer.medic.)

angenommene Dissertation

von Frau Stefanie Schatz, M.Sc.

geboren am 15.02.1988 in Linz, Österreich

Erstbetreuer: Prof. Dr. med. Frank Griesinger
Weitere Betreuende: Prof. Dr. med. Katharina Tiemann
Gutachter: Prof. Dr. med. Cornelius Waller und Prof. Dr. med. Alexander Winter

Tag der Disputation: 10. Januar 2025

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich diese Arbeit „*Die Bedeutung umfassender Molekulardiagnostik mittels Hybrid Capture Next Generation Sequencing beim nicht-squamösen NSCLC*“ selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe alle von anderen Autor:innen wörtlich übernommenen Stellen, wie auch die sich an die Gedankengänge anderer Autor:innen eng anlegenden Ausführungen meiner Arbeit, besonders gekennzeichnet und die Quellen zitiert.

Ich versichere außerdem, dass die inhaltliche und formale Übereinstimmung von gedruckter und elektronischer Fassung eingehalten wurde.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Schatz'. The letters are cursive and somewhat stylized.

Stefanie Schatz

Für meine Eltern

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Frank Griesinger, der mich mit seiner Expertise, konstruktiven Kritik und stets offenen Tür während der gesamten Promotionszeit begleitet hat. Seine Unterstützung und fachliche Anleitung haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein großes Dankeschön richte ich an meine Vorgesetzten und Geschäftsführer des Institutes für Hämatopathologie Hamburg (HpH) Prof. Dr. Katharina Tiemann und Prof. h.c. Dr. Markus Tiemann, deren Bereitschaft, die notwendigen Daten und Testungen bereitzustellen, die Grundlage für diese Arbeit bildete. Die persönliche und fachliche Entwicklung, die ich durch das Arbeiten an der HpH erfahre, ist von unschätzbarem Wert.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Kollegen und Freund Markus Falk. Seine fachliche Unterstützung und die Diskussionen mit ihm haben dieser Arbeit wertvolle Impulse verliehen. Sein Zuspruch und unermüdlicher Rat waren und sind mir eine besondere Stütze. Markus, die Zusammenarbeit mit dir macht einfach Spaß!

Mein Dank gilt auch meiner lieben Freundin Frida, die die Korrektur meiner Arbeit übernommen und mit ihrem Blick fürs Detail geholfen hat, die Qualität der Arbeit zu sichern. Ihre Geduld und Unterstützung sind nicht selbstverständlich und verdienen besondere Anerkennung.

Danke an meine lieben Kolleg:innen der HpH, es ist eine Freude mit euch zusammenarbeiten zu dürfen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden und insbesondere meinem Partner danken, die mir in dieser Zeit mit Rückhalt, Verständnis und Zuspruch zur Seite gestanden haben. Ohne eure Unterstützung und euer Vertrauen in mich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank an alle, die mich auf diesem Weg begleitet haben!

Kurzzusammenfassung der kumulativen Promotionsarbeit

Der Fortschritt der molekularpathologischen Charakterisierung von Lungenkarzinomen hat zu einer deutlichen Verbesserung der Behandlungsoptionen geführt. Vor allem Adenokarzinome der Lunge sind häufig durch somatische Treibermutationen gekennzeichnet und können somit gezielt mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) behandelt werden. Auch neue, potentiell prädiktive Biomarker wie die Tumormutationslast (TMB) können durch die technologische Weiterentwicklung analysiert werden und wegweisend für die Behandlung sein. Um eine vollumfängliche Diagnostik und somit ein optimales Therapiemanagement zu gewährleisten, bietet sich das Next Generation Sequencing (NGS), welches sowohl für Gewebe- als auch Flüssigbiopsien (Liquid Biopsy) etabliert ist, an.

Ziel dieser Arbeit ist, die NGS-basierte Mutationsanalytik im Routinealltag zu evaluieren. Dabei werden sowohl praktische Aspekte dieser Technologie, wie die Dauer vom Materialeingang bis zum Befund, als auch der Informationszugewinn auf molekularer Ebene und dessen Auswirkung auf die Therapie erläutert. Das TMB wird mit anderen molekularen Markern korreliert und das Resistenzspektrum von Tumoren in Abhängigkeit der TKI-Therapiesequenz (Osimertinib in der Erst- versus Zweitlinie) untersucht.

Die 417 getesteten NSCLC Proben waren zu 17.5% (73/417) Treiber-gen-mutiert und 85% (62/73) davon wiesen ein niedriges TMB, also unter 10Mut/Mb, auf. TMB war invers korreliert mit Treibermutationen. Die höchsten TMB Werte wurden für Patient:innen mit TP53 und KRAS Mutationen nachgewiesen. In 80% (94/115) der Fälle konnten die von den Leitlinien vorgegebenen zehn Werktage für die Analyse inklusive Befundung eingehalten werden. Von den 56 getesteten Liquid Biopsies fortgeschrittener NSCLC konnte bei neun eine EGFR Mutation nachgewiesen werden, die den Einsatz des EGFR TKI Osimertinib in der Erstlinie erlaubte. Die übrigen 47 Patient:innen wurden in der Zweitlinie anhand einer Liquid Biopsy auf das Vorliegen einer p.T790M Resistenzmutation positiv getestet und konnten somit Osimertinib in der Zweitlinie, also nach Versagen eines EGFR TKI der ersten beziehungsweise zweiten Generation, erhalten. In sieben Plasmaproben, die bei Resistenz unter Osimertinib-Erstlinientherapie analysiert wurden, konnte die initiale Treibermutation bestätigt und in drei Fällen eine Resistenzmutation festgestellt werden. In der Osimertinib-Zweitlinien-Kohorte konnte in 41 von 47 Plasmaproben die zugrundeliegende Treiberalteration sowie die EGFR p.T790M Resistenzmutation in 90% (37/41) bestätigt werden. Als Ausdruck der Resistenz gegen Osimertinib akquirierten 39% (16/41) der Patient:innen eine EGFR p.C797S, die den häufigsten Resistenzmechanismus gegen Osimertinib in der Zweitlinientherapie darstellt.

Abstract

The improvement of molecular genotyping of lung cancer has led to a significant specification of treatment options and is routinely used to guide clinical care of lung adenocarcinoma patients. Lung adenocarcinomas are often characterized by the presence of somatic driver mutations. Based on this, the tumor can be treated individually with targeted therapy such as tyrosine kinase inhibitors (TKI). New, potentially predictive biomarkers such as tumor mutation burden (TMB) can also be analyzed through technological advancements and can guide the treatment strategy. Next generation sequencing (NGS), which is established for both tissue and liquid biopsy, is an ideal tool to ensure fully comprehensive diagnostics and thus optimal therapy management.

The aim of this work is to evaluate NGS-based mutation analysis in routine practice. Practical aspects of this technology, such as the turn-around time from start of HC NGS workflow to reporting, as well as the information gain on the molecular level and its impact on therapy will be explained. TMB will be correlated with other molecular markers and the spectrum of resistance-conferring mutations will be examined in relation to TKI therapy sequence (osimertinib in first versus second line).

Of the 417 NSCLC samples tested, 17.5% (73/417) were driver gene mutated and 85% (62/73) of these had low TMB, i.e., below 10 Mut / Mb. TMB was inversely correlated with driver mutations, the highest TMB levels were detected for patients with TP53 and KRAS mutations. In 80% (94/115) of the cases, the ten working days for analysis including reporting specified by the guidelines could be met. Of the 56 liquid biopsies of advanced NSCLC tested, an EGFR mutation was detected in nine, allowing the use of the EGFR TKI osimertinib in the first line. The remaining 47 patients tested positive for the presence of a p.T790M resistance mutation by liquid biopsy in the second-line setting and were thus able to receive osimertinib in the second-line setting, i.e., after failure of a first- or second-generation EGFR TKI. In seven plasma samples analyzed for resistance on first-line osimertinib therapy, the initial driver mutation was confirmed and a resistance mutation was detected in three cases. In the second-line osimertinib cohort, the underlying driver alteration was confirmed in 41 of 47 plasma samples and the EGFR p.T790M resistance mutation was detected in 90% (37/41). As an expression of resistance to osimertinib, 39% (16/41) of patients acquired an EGFR p.C797S, which is the most common mechanism of resistance to osimertinib in second-line therapy.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	III
Danksagung	V
Kurzzusammenfassung der kumulativen Promotionsarbeit	VI
Abstract	VII
Inhaltsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XII
1 EINLEITUNG Das Lungenkarzinom, ein Paradebeispiel für Präzisions-onkologie	1
1.1 Molekulare Angriffspunkte des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms	4
1.1.1 EGFR Treibermutationen und der Einsatz von TKI beim NSCLC	4
1.1.2 Verschiedene Klassen von BRAF Mutationen	5
1.1.3 Genfusionen und Translokationen: ALK, ROS1, RET und NTRK	5
1.1.4 MET: Amplifikation und der Verlust des Exon 14	6
1.1.5 Sehr häufig und endlich therapierbar beim NSCLC: KRAS p.G12C	7
1.1.6 Perspektive: Zielgerichtete Therapie bei HER2 Mutationen und NRG1 Fusionen	7
1.2 Prädiktoren für die Immuntherapie: etablierte und moderne Biomarker	9
1.2.1 PD-L1 Expression als Prädiktor für das Ansprechen auf ICI	9
1.2.2 Tumormutationslast als Baustein eines komplexen Zusammenspiels aus mehreren Prädiktoren für das Ansprechen auf ICI	9
1.2.3 Perspektive: STK11, KEAP1, ARID1A und POLE als potentielle Prädiktoren für eine ICI Behandlung	11
1.3 Hybrid Capture-basiertes Next Generation Sequencing	11
1.3.1 Liquid Biopsy: Alternative und wichtige Ergänzung zur Gewebetestung	12
2 PUBLIKATION (I) Implementierung eines komplexen Biomarkers in den diagnostischen Routinediagnostik - Tumormutationslast beim metastasierten NSCLC	14
1. Introduction	16
2. Results	17
2.1. TMB assay correlation with clinical trial assay of CheckMate 227	17
2.2. Histology, driver mutations and PD-L1	18
2.3. Turn-around time and HC NGS workflow	20
2.4. Evaluation of tumor mutation analysis in routine lab samples	22
2.4.1 TMB in relation to age	22
2.4.2 TMB in relation to driver mutations	22
2.4.3 TMB and PD-L1	23
2.4.4 Correlation of somatic tumor mutations and TMB	24
2.5. Clinical use of IO related biomarkers in clinical decision making	25

3. Discussion	25
4. Materials and Methods	26
5. Conclusions	27
Supplementary Materials:	27
Appendix A	27
3 PUBLIKATION (II) Zielgerichtete Therapie beim EGFR mutierten NSCLC – die Therapiesequenz und ihr Einfluss auf das Resistenzspektrum	29
1. Introduction	32
2. Materials and Methods	33
2.1. Patient Cohort	33
2.2. Liquid Biopsy	33
3. Results	33
3.1. Patient Characteristics	33
3.2. Resistance Spectrum after First Line Osimertinib Treatment	36
3.3. Resistance Spectrum after Second Line Osimertinib Treatment	36
3.6. Presence of Diverse EGFR and PIK3CA Molecular Subclones of in Patients' Plasma ctDNA after Second Line Osimertinib	37
4. Discussion.	37
5. Conclusions	39
Appendix A	40
4 PUBLIKATION (III) CtDNA Bestimmung einer Patientin mit HER2 mutiertem NSCLC im Therapieverlauf unter Trastuzumab-Deruxtecan	44
1. Introduction	45
2. Case Report	46
3. Discussion	48
4. Conclusions	49
5 DISKUSSION Molekularpathologische Testung: obligater Bestandteil der Diagnostik des Lungenkarzinoms	50
6 Stellungnahme zum Eigenanteil	58
7 Weitere Publikationen und Beiträge als (Co-)Autorin	65
8 Literaturverzeichnis	67

Abkürzungsverzeichnis

ALK*	Anaplastic Lymphoma Kinase
BRAF*	Proto-Oncogene B-Raf (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)
cfDNA	Circulating cell-free DNA, zirkulierende zellfreie DNA
ctDNA	Circulating tumor DNA, zirkulierende Tumor DNA
DGHO	Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie
EGFR*	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	European Medicines Agency; Europäische Arzneimittelagentur
ESMO	European Society of Medical Oncology; Europäische Gesellschaft medizinischer Onkologie
HC	Hybrid Capture (Namensgebender Arbeitsschritt „Hybridisierung“ der Hochdurchsatzsequenzierung)
HER2*	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
ICI	Immunecheckpoint-Inhibitor
Indel	Mutationen durch Insertionen oder Deletionen
KEAP1*	Kelch Like ECH Associated Protein 1
KRAS*	Kirsten Rat Sarcoma
Mb	Megabase
MDPI	Multidisciplinary Digital Publishing Institute
MET*	MET Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase
MRD	Minimal residual disease, messbare (minimale) Resterkrankung
mRNA	Messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
Mut	Mutation
NGS	Next Generation Sequencing (Hochdurchsatzsequenzierung)
NRG1*	Neuregulin 1
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer, Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NTRK*	Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase
OS	Overall Survival, Gesamtüberleben
p.	protein, Protein (Schreibweise bei Mutation z.B.: p.L858R)

PD-1**	Programmed death protein 1
PD-L1**	Programmed death ligand 1
PFS	Progression-free survival, progressionsfreies Überleben
PIK3CA*	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
POLE*	DNA-Polymerase Epsilon
PTEN*	Phosphatase and tensin homolog
py	Pack Years, Packungsjahr
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors; Regelwerk zur Bewertung des Behandlungserfolges solider Tumoren
RET*	Rearranged during transfection
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROS1*	ROS Proto-Oncogene 1
SCLC	Small cell lung cancer, Kleinzelliges Lungenkarzinom
STK11*	Serin / Threonin-Kinase 11
T-DXd	Trastuzumab-Deruxtecan
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TMB	Tumor mutation burden, Tumormutationslast
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WT	Wildtyp

* Gen
 ** Protein

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Entwicklung der Präzisionsonkologie beim metastasierten NSCLC. Chronologische Darstellung der zugelassenen Medikamente für zielgerichtete und Immuntherapie von Patient:innen mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom. Blass-blau dargestellt sind die TKI, welche zunächst die Erstzulassung für die Zweitlinie erhielten beziehungsweise deren Zulassung auf zusätzliche Biomarker erweitert wurde (Crizotinib 2011 für ALK translozierte und 2016 zusätzlich für ROS1 aberrante Lungenkarzinome)..... 3
- Abbildung 2: Mutationsfrequenzen bekannter NSCLC Treibermutationen und Verfügbarkeit zielgerichteter Therapien. Durch die EMA zugelassene beziehungsweise sich in der Prüfung befindliche Therapieoptionen basierend auf molekularen Aberrationen in den Genen EGFR, BRAF, ALK, ROS1, RET, NTRK1, KRAS, MET, HER2, PIK3CA und NRG1. *Abbildung adaptiert von Tsao et al. [44].*..... 8

1 EINLEITUNG **Das Lungenkarzinom, ein Paradebeispiel für Präzisions-onkologie**

Nach histopathologischen Kriterien lassen sich Lungenkarzinome in zwei Gruppen unterteilen, das kleinzellige (SCLC) und das nicht-kleinzellige (NSCLC) Lungenkarzinom. Das NSCLC ist mit circa 80% deutlich häufiger und unterteilt sich in das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom. Ungefähr 15% entfallen auf das SCLC, welches praktisch immer mit Tabakabusus assoziiert ist. Seltener ist das großzellige Karzinom. Das metastasierte Lungenkarzinom war Jahrzehnte lang mit einer schlechten Prognose assoziiert. Speziell bei der Behandlung des lokal fortgeschrittenen und metastasierten NSCLC hat in den vergangenen Jahren ein erheblicher therapeutischer Umbruch stattgefunden (Abbildung 1). Die Therapie beschränkte sich bis 2008 weitgehend auf den Einsatz unterschiedlicher chemotherapeutischer Ansätze und wurde basierend auf histomorphologischer Begutachtung durch Patholog:innen entschieden. In Abhängigkeit der morphologischen Subgruppe¹ wurde die Zusammensetzung der zytotoxischen Therapie variiert. Die daraus resultierenden Gesamtüberlebensraten (OS) von Patient:innen im klinischen Stadium IV² betragen median etwa 13 Monate [1]. Im Jahr 2009 wurden Daten zum fortgeschrittenen NSCLC publiziert, die erstmalig darauf hindeuteten, dass Patient:innen mit aktivierenden Mutationen im EGF-Rezeptor (EGFR) von einer Erstlinientherapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) Gefitinib profitierten. Es konnte gezeigt werden, dass nach 12 Monaten unter Gefitinib noch 24.9% und unter Standard-Chemotherapie 6.7% der Patient:innen progressionsfrei waren [2]. In den darauffolgenden Jahren wurden weitere, zum Teil komplexere, molekulare Angriffspunkte beim fortgeschrittenen NSCLC beschrieben. Diese molekulare Charakterisierung hat dazu beigetragen, das OS von Patient:innen mit Treibermutationen³ durch den Einsatz zielgerichteter Therapie im Vergleich zur Chemotherapie auf 32 Monate zu erhöhen [1].

Genetische Treiberalterationen sind vor allem bei Patient:innen mit Nicht-Plattenepithelkarzinomen detektierbar. Für Erkrankte mit einer Nicht-Plattenepithel-Histologie gibt es bereits zahlreiche genetische Aberrationen, die standardmäßig getestet werden. Die European Society of Medical Oncology (ESMO) wie auch die Leitlinien der

¹ Morphologisch differenziert man Lungenkarzinome in vier Haupttypen: kleinzelliges Karzinom, Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom und großzelliges Karzinom.

² Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms nach UICC8 von Stadium 0 (Tis, Carcinoma in situ) – IV (Fernmetastasierung beziehungsweise Tumorausbreitung über Lunge hinaus).

³ Molekulare Veränderungen (Mutationen, Translokationen, Amplifikationen u.a.) welche für das maligne Wachstum der Tumorzellen verantwortlich sind und dieses bis hin zur Metastasierung „vorantreiben“.

Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO) empfehlen in ihren Richtlinien die Untersuchung auf aktivierende EGFR Mutationen, BRAF Mutationen, KRAS p.G12C Mutationen, MET Aberrationen, HER2 Mutationen und Amplifikationen, NTRK Fusionen wie auch ALK, ROS1 und RET Translokationen. Diese therapie relevanten Alterationen sollten vor Einleitung einer Erstlinientherapie analysiert werden, um so anhand der genetischen Signatur des Tumors Medikamente zielgerichtet einsetzen zu können [3, 4]. Die akribische Aufarbeitung auf molekularer Ebene erweitert die Liste der neuen Biomarker stetig und treibt, neben dem NSCLC, auch in anderen Entitäten die molekular stratifizierte Therapie voran.

Die Therapie von Erkrankten ohne Treibermutationen konnte durch den Einsatz von Immuntherapien signifikant verbessert werden und somit einen weiteren Umbruch in der Therapielandschaft bewirken [5-8]. Diese immuntherapeutischen Ansätze beruhen auf der Erkenntnis, dass die Tumorentstehung eng mit der Funktionsfähigkeit des Immunsystems verbunden ist. Bestimmte Immuncheckpoints, wie beispielsweise der Rezeptor PD-1, welcher mit dem Transmembranprotein PD-L1 interagiert, sind für die Inaktivierung von T-Zellen nach einer erfolgten Immunantwort nötig. Tumorzellen können durch aberrante Expression von PD-L1 das adaptive Immunsystem unterdrücken. Die Immuntherapie basiert auf dem Einsatz therapeutischer Antikörper, sogenannter Checkpoint-Inhibitoren, die diese Kontrollpunkte des Immunsystems hemmen. Zurzeit werden unterschiedliche Biomarker wie Mikrosatteliteninstabilität, Tumormutationslast oder PD-L1 in Bezug auf einen möglichen prädiktiven Wert für diese immunonkologische Behandlungsmöglichkeiten validiert [9].

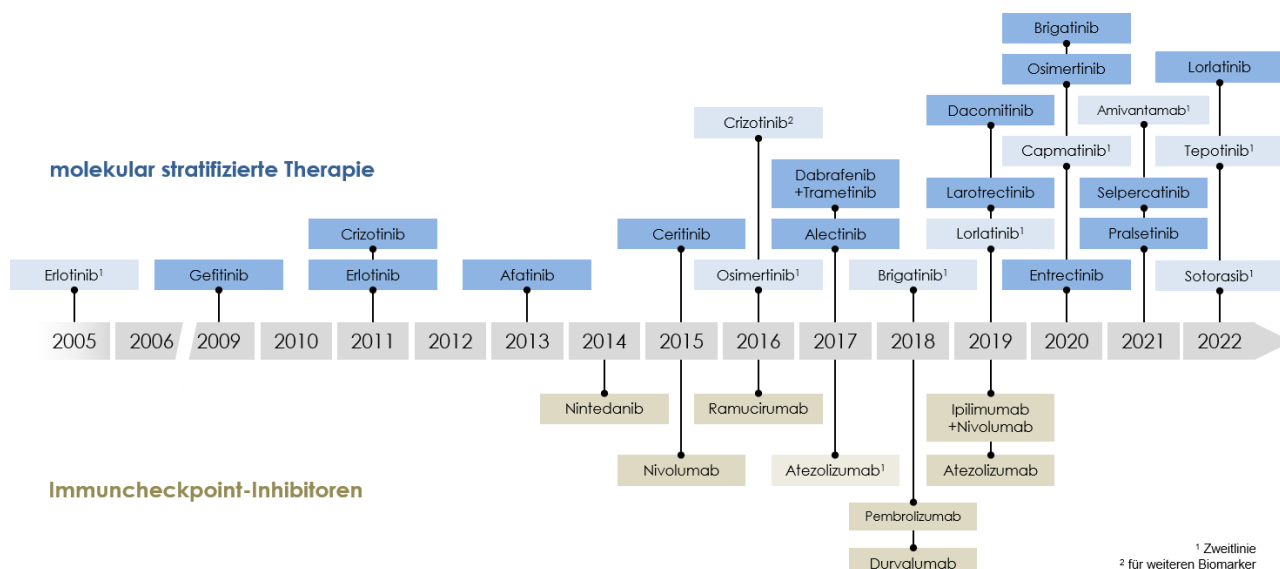


Abbildung 1: Entwicklung der Präzisionsonkologie beim metastasierten NSCLC. Chronologische Darstellung der zugelassenen Medikamente für zielgerichtete und Immuntherapie von Patient:innen mit fortgeschrittenem Lungenkarzinom. Bloss-blau dargestellt sind die TKI, welche zunächst die Erstzulassung für die Zweitlinie erhielten beziehungsweise deren Zulassung auf zusätzliche Biomarker erweitert wurde (Crizotinib 2011 für ALK translozierte und 2016 zusätzlich für ROS1 aberrante Lungenkarzinome).

Lungenkrebs ist mit circa 50.000 Neuerkrankungsfällen pro Jahr eine der häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland und mit einer hohen Sterblichkeit assoziiert. Das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen 68 und 70 Jahren. Hauptrisikofaktor ist das Zigarettenrauchen in aktiver aber auch passiver Form, wobei das Risiko mit der Intensität des Konsums und der Dauer in Jahren⁴ korreliert. Bösartige Neubildungen der Lunge können aber auch durch weitere exogene Risikofaktoren wie Feinstaub, Asbest, Industrie- und Verkehrsgase provoziert werden. Da Symptome der Erkrankung häufig erst bei stärkerem Tumorwachstum und damit spät zu erwarten sind, ist ein Großteil der Neuerkrankungen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lokal fortgeschritten (Stadium III) oder metastasiert (Stadium IV) [3]. Eine Heilung ist in diesen Stadien kaum zu erreichen. Demgegenüber haben frühere, meist symptomfreie Stadien eine deutlich bessere Prognose.

⁴ Packungsjahr (py) ist die Einheit welche die inhalierte Rauch-Dosis eines Rauchers definiert. Sie berechnet sich aus den täglich konsumierte Zigaretten (20 Stück) multipliziert mit der Anzahl der Raucherjahre.

1.1 Molekulare Angriffspunkte des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms

Wie seit einigen Jahren in den S3-Leitlinien manifestiert, sollte vor Beginn einer medikamentösen Erstlinientherapie von Patient:innen mit NSCLC im Stadium IV unbedingt die Ermittlung von therapielevanten Mutationen vorgenommen werden [10]. Dabei sollten neben Aberrationen, für welche bereits Arzneimittelzulassungen bestehen, auch Mutationen bei denen spezifische Therapiekonzepte noch geprüft werden, berücksichtigt werden (Abbildung 2) [3].

1.1.1 EGFR Treibermutationen und der Einsatz von TKI beim NSCLC

Die transmembrane Tyrosinkinase EGFR ist in 10% bis 15% der NSCLC Tumoren mutiert. Durch Aberrationen in EGFR kommt es zu einer konstanten Aktivierung des Rezeptors und korrespondierender, nachgelagerter Signalkaskaden. Durch den Einsatz diverser EGFR TKI kann diese Fehlsteuerung unterbrochen werden [3, 11]. Aufgrund der unterschiedlichen Wirksamkeiten der TKI ist es dennoch wichtig nicht nur zu bestimmen ob, sondern auch welche Mutation des EGF-Rezeptors konkret vorliegt. Deletionen im Exon 19 und die Punktmutation p.L858R im Exon 21 sind mit circa 90% die häufigsten („common“) EGFR Mutationen und können mit allen derzeit verfügbaren TKI behandelt werden. Die übrigen, mit 10% selteneren („uncommon“) Aberrationen, lassen sich in drei Gruppen unterteilen: Gruppe 1 umfasst die Punktmutationen p.G719X, p.S768I und die p.L861Q in den Exons 18, 20 und 21. Die p.T790M Mutation bildet die Gruppe 2 und Gruppe 3 beinhaltet Exon 20 Duplikationen beziehungsweise Insertionen [12]. Bei den seltenen EGFR Mutationen ist das Ansprechen auf die zugelassenen EGFR TKI unterschiedlich oder, im Falle einer Exon 20 Insertion, eine Wirksamkeit der üblichen TKI gar nicht erst zu erwarten. Für Patient:innen mit aktivierender Insertionsmutation im Exon 20 wurde kürzlich ein spezifischer Antikörper durch die EMA zugelassen, welcher für diese Alteration zielgerichtet eingesetzt werden kann [13]. Retrospektive Analysen der LUX-Lung 2, 3 und 6 zeigten, dass Patient:innen mit EGFR Mutationen der Gruppe 1 im Vergleich zu Erkrankten mit Aberrationen der Gruppe 2 und 3, unter dem Einsatz von Afatinib, ein PFS von 10.7 sowie ein OS von 19.4 Monaten erreichen konnten [12, 14]. Durch die Gabe zielgerichteter Substanzen wird ein Selektionsdruck auf die Tumorzellen ausgeübt, was quasi immer in der Bildung von Resistenzmutationen mündet. Der Tumor entwickelt sozusagen eine neue „Überlebensstrategie“ gegen das eingesetzte Medikament [15]. Dem Tumor muss entsprechend seiner „Fluchtmechanismen“ mit einer gezielten Therapiesequenz begegnet

werden. In der vorliegende Arbeit wurden die (Resistenz-) Mutationsspektren von 56 Patient:innen mit fortgeschrittenem NSCLC beschrieben. In einem Fall wurde ein Exon 19 deletiertes NSCLC mit TKI der ersten und zweiten Generation behandelt. Mit einsetzendem Progress konnte zusätzlich zur primären Treibermutationen die p.T790M Punktmutation im Exon 20 nachgewiesen werden. Diese wurde durch den Einsatz von Osimertinib, einen TKI der dritten Generation, überwunden. Nach einiger Zeit verschlechterte sich das Ansprechen auf die Osimertinib Therapie. Neben einer weiteren Mutation im Exon 20, der p.C797S, antwortete der Tumor zusätzlich mit einer EGFR Amplifikation [16]. Dieses Beispiel unterstreicht nicht nur die Notwendigkeit einer umfassenden molekularen Testung vor Erstlinientherapie sondern auch die erneute, umfangreiche Analyse des Tumorgeschehens in der Rezidivsituation. Den molekularen Differenzierungsgrad des Tumors im Krankheitsverlauf festzustellen ist die Voraussetzung für eine optimale Therapiesequenz.

1.1.2 Verschiedene Klassen von BRAF Mutationen

BRAF V600 Mutationen sind bei 1% bis 2% der an NSCLC erkrankten Menschen nachzuweisen und seit April 2017 mit einer Kombinationstherapie aus BRAF- und MEK-Inhibitoren auch zielgerichtet therapierbar [17]. Mit einer ähnlichen Häufigkeit treten BRAF Punktmutationen auch an anderen Positionen im Gen (non-V600) auf und auch BRAF Fusionen sind in der Tumor DNA zu finden [18]. Für non-V600 Mutationen und Fusionen wird derzeit in verschiedenen präklinischen Studien die Verwendung von MEK-Inhibitoren, beziehungsweise Kombinationen aus mehreren Inhibitoren, getestet [19]. Mutationen der Proteinkinase BRAF lassen sich je nach intrinsischer Kinaseaktivität in drei Klassen⁵ einteilen, wobei die erste Klasse ausschließlich die V600 Mutationen und Klasse II und III die non-V600 umfasst [20].

1.1.3 Genfusionen und Translokationen: ALK, ROS1, RET und NTRK

Die Tumor-DNA des Lungenkarzinoms kann auch durch Genumlagerungen gekennzeichnet sein. Dabei heften sich verschiedene Gensegmente neu aneinander, wodurch ein Fusionsgen entsteht. Zielgerichtet behandelbar sind Fusionen beziehungsweise

⁵ Klasse I: BRAF V600 Ras-unabhängige aktive Monomere (hohe Kinaseaktivität); Klasse II: BRAF non-V600 Ras-unabhängige aktive Dimere (mittelmäßige bis hohe Kinaseaktivität); Klasse III: BRAF non-V600 B-Raf/C-Raf Dimere (geringere Kinaseaktivität als Wildtyp BRAF).

Translokationen der Gene ALK, ROS1, RET und NTRK. ALK und ROS1 Translokationen treten mit circa 4% beziehungsweise 2% bei Adenokarzinomen auf und betreffen vermehrt junge, oftmals weibliche, Patient:innen und Nicht- beziehungsweise Wenig-Raucher:innen [21]. Mit einem hohen Risiko für Hirnmetastasen sind maligne Tumoren mit einer RET-Fusion assoziiert. Mit einer Häufigkeit 1% bis 2% wird dieser onkogene Treiber bei Patient:innen mit Lungenkarzinom festgestellt. RET-fusionspositive NSCLC können seit Mai 2020 mit dem Multikinasehemmer Selpercatinib behandelt werden. Inzwischen steht zusätzlich zu Selpercatinib auch Pralsetinib in der Erst- und Zweitlinientherapie zur Verfügung [22, 23]. NTRK Genfusionen treten mit wechselnder Prävalenz bei soliden Tumoren unterschiedlichster Lokalisation auf. Mit 91% bis 100% beruhen infantile Fibrosarkome am häufigsten auf einem umgelagerten NTRK Gen. Andere Entitäten wie beispielsweise papilläre Schilddrüsenkarzinome, hochdifferenzierte Gliome sowie Darm- und Kopf-Hals-Tumoren sind hingegen nur zu einem Bruchteil davon betroffen (zwischen 1% und 10%) [24-27]. Die Häufigkeit von NTRK Fusionen beim NSCLC vermutet man bei unter einem Prozent der Fälle (aufgrund der zum Teil sehr niedrigen Prävalenz und untersuchten Fallzahlen pro Tumorentität ist die statistische Aussagekraft eingeschränkt) [28, 29]. Tumorentitätsübergreifend sind seit September 2019 Larotrectinib und seit August 2020 Entrectinib für die Behandlung von NTRK-fusionspositiven Tumoren zugelassen [30, 31].

1.1.4 MET: Amplifikation und der Verlust des Exon 14

Die Aktivierung der MET Rezeptortyrosinkinase spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und beim Überleben von Tumorzellen. Die Aktivierung dieser Tyrosinkinase kann aufgrund verschiedener genetischer Mechanismen stattfinden. Unter anderem wird diese Aktivierung neben MET Amplifikation durch das MET Exon 14 Skipping bedingt. Durch eine Mutation im MET Gen wird ein notwendiger Spleißvorgang der MET RNA blockiert was den Verlust des Exon 14 in der prozessierten mRNA zur Folge hat – das Exon 14 wird nicht translatiert. Dadurch kommt es zum Verlust der Juxtamembrandomäne und der fehlerhaft verkürzte MET Rezeptor reichert sich im Proteasom der Zelle an und führt zu einer onkogenen Überaktivierung des nachgeschalteten Signalweges [32]. MET Aberrationen kommen beim NSCLC mit einer Häufigkeit zwischen 3% bis 4% vor und können seit Mai 2020 mit Capmatinib beziehungsweise seit Februar 2022 mit Tepotinib in der fortgeschrittenen, metastasierten Situation zielgerichtet therapiert werden [33-35].

1.1.5 Sehr häufig und endlich therapierbar beim NSCLC: KRAS p.G12C

Aktivierende Mutationen in KRAS sind mit circa 25% die häufigsten Aberrationen beim Lungenkarzinom und sind vorwiegend bei Raucher:innen und Ex-Raucher:innen zu beobachten. KRAS ist schon seit Dekaden als molekularer Treiber identifiziert, dennoch waren Ansätze der zielgerichteten Therapie lange Zeit erfolglos und KRAS galt als „undruggable“. Im Jahr 2019 deuteten erstmals Daten der CodeBreak 100 Studie darauf hin, dass Patient:innen mit KRAS p.G12C mutierten, fortgeschrittenem NSCLC auf den Inhibitor Sotorasib ansprachen. Diese Beobachtungen bestätigten sich und so kam es im Januar 2022 zum Durchbruch: Der erste KRAS p.G12C Hemmer Sotorasib wurde durch die EMA zugelassen [36-38]. Weitere KRAS Inhibitoren befinden sich derzeit in der klinischen Erprobung.

1.1.6 Perspektive: Zielgerichtete Therapie bei HER2 Mutationen und NRG1

Fusionen

Im Fokus laufender Studien, aber noch kein Behandlungsstandard in der zielgerichteten Therapie des NSCLC, sind unter anderem HER2 Mutationen [39]. Beim NSCLC kommen aktivierende HER2 Mutationen mit einer Häufigkeit von 2% bis 4% vor allem in Adenokarzinomen von Nicht-Raucher:innen vor [40]. Amplifikationen von HER2 kommen de novo, also ohne vorangegangener TKI Therapie, in circa 3% der Fälle oder aber auch als Resistenzmechanismus auf EGFR TKI Gabe mit einer Häufigkeit von 10% vor [41]. Bei HER2 mutierten NSCLC kann als Off-Label-Use⁶ aufgrund der Daten der DESTINY-Lung01 Studie, und einer bereits erfolgten Zulassung in den USA, derzeit eine Therapie ab der Zweitlinie mit dem Antikörper-Zytostatika-Konjugat Trastuzumab Deruxtecan (T-DXd) in Frage kommen [42]. Publikation III der vorliegenden Arbeit beschreibt den Off-Label- Use von T-DXd einer Patientin mit einer seltenen Insertionsvariante p.G776delinsVC des HER2 Gens. Es wird beschrieben, wie sich die Gabe dieser Medikation auf den Krankheitsverlauf und die ctDNA Konzentration im Blut der Nie-Raucherin auswirkt [43, 44]. Die Prävalenz an NRG1 Fusionen beim Lungenkarzinom liegt bei circa 1%. Aktuell befindet sich, neben Lungentumoren auch für andere Tumorentitäten, der bispezifischen Antikörper Zenocutuzumab in Prüfung [45].

⁶ Zulassungsüberschreitende Verwendung eines Medikaments außerhalb der von den nationalen oder europäischen Zulassungsbehörden genehmigten Anwendungsgebietes.

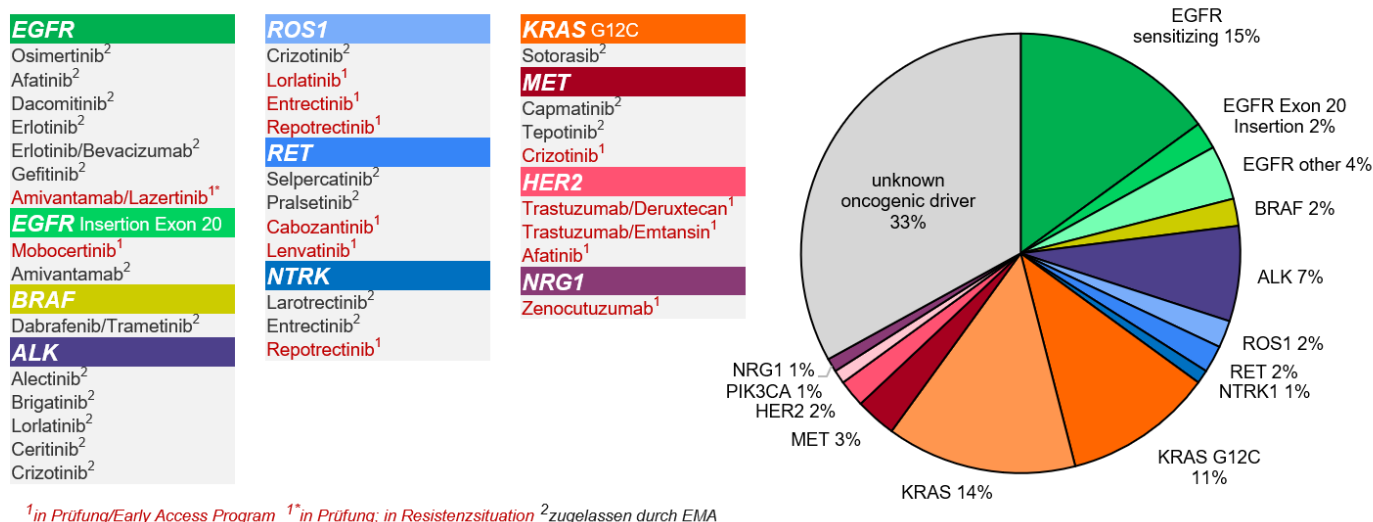


Abbildung 2: Mutationsfrequenzen bekannter NSCLC Treibermutationen und Verfügbarkeit zielgerichteter Therapien. Durch die EMA zugelassene beziehungsweise sich in der Prüfung befindliche Therapieoptionen basierend auf molekularen Aberrationen in den Genen EGFR, BRAF, ALK, ROS1, RET, NTRK1, KRAS, MET, HER2, PIK3CA und NRG1. *Abbildung adaptiert von Tsao et al. [46].*

1.2 Prädiktoren für die Immuntherapie: etablierte und moderne Biomarker

Neben dem zielgerichteten Einsatz molekularer TKI Therapien bei bestimmten Subgruppen von NSCLC Patient:innen hat die Immunonkologie durch das Verwenden von Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) den Krankheitsverlauf Betroffener mit Tumoren ohne Treibermutationen revolutioniert. Eine Reihe von ICI wie Nivolumab, Pembrolizumab und Atezolizumab, hielten seit 2015 Einzug in das Therapieregime des NSCLC (Abbildung 1).

1.2.1 PD-L1 Expression als Prädiktor für das Ansprechen auf ICI

Die PD-L1 Prävalenz wurde durch eine Vielzahl von retrospektiven Studien und Subgruppenanalysen gezeigt. Dies unterstützt die Annahme, dass je stärker PD-L1 exprimiert ist, desto wahrscheinlicher das Ansprechen auf ICI. Dennoch wurden auch Fälle bestätigt, bei denen trotz niedriger bis nicht vorhandener PD-L1 Expression das Therapieansprechen auf ICI gut war, oder aber auch das Nichtansprechen bei hoher PD-L1 Expression im Tumorgewebe. Diese Datenlage ließ also die Annahme zu, dass die PD-L1 Expression als alleiniger Biomarker nicht ausreicht, um die Zielgruppe an Patient:innen zu identifizieren. Trotz dieser Einschränkung bleibt die PD-L1 Expression derzeit der einzige prospektiv validierte Prädiktor für das Ansprechen auf eine Behandlung mit ICI und der einzige zulassungsrelevante Biomarker für den Einsatz einer ICI Therapie [47].

1.2.2 Tumormutationslast als Baustein eines komplexen Zusammenspiels aus mehreren Prädiktoren für das Ansprechen auf ICI

Im Zuge der Erforschung des komplexen Zusammenspiels von Immunsystem und molekularer Tumorbiologie hat sich die Tumormutationslast⁷ (TMB) als weiterer Biomarker-Kandidat hervorgetan. Bereits 2015 konnte gezeigt werden, dass Tumoren mit einer hohen Anzahl von Mutationen im exonischen Territorium, welche zu Veränderungen in der Proteinsequenz führen, besser auf eine Therapie mit ICI ansprechen als Tumoren von Patient:innen mit einer geringeren Mutationslast. Entscheidend ist vermutlich, dass die Aberrationen in den jeweils kodierenden Bereichen der untersuchten Gene liegen und so tatsächlich auch zu einer Proteinveränderung führen. Das Neuauftreten somatischer

⁷ Tumormutationslast: Gesamtzahl an genetischen Veränderungen je kodierender Region eines Tumorzellgenom. Berechnung: Mutation pro Megabase DNA (Mut/Mb).

Mutationen kann mit der Neoantigenbildung und dem Auslösen einer tumorspezifischen Immunantwort assoziiert sein, also einer Entwicklung der Immunogenität [48-50]. Im März 2018 wurden Daten eines Patient:innenkollektives von mehr als 200 NSCLC Erkrankten publiziert, welche unabhängig von der PD-L1 Expression dafür aber in Abhängigkeit eines hohen TMB, vom Einsatz einer anti-PD-L1 beziehungsweise anti-PD-1 Therapie profitierten [51]. Unter anderem konnten auch die Daten der CheckMate-026 Studie den positiv prädiktiven Wert eines hohen TMB unterstützen [52]. Im Mai 2018 wurden erste Ergebnisse der CheckMate-227 vorgestellt. Diese Studie befasste sich sowohl mit TMB als auch der Expression von PD-L1 und der darauf basierenden Selektion von NSCLC Patient:innen für die Erstlinientherapie mittels Nivolumab plus Ipilimumab beziehungsweise Chemotherapie. Es wurden Gewebeproben analysiert und der Cut-off für hohes TMB wurde für diese Studie bei ≥ 10 Mut/Mb gesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen der PD-L1 Expression des Tumors und TMB keine Korrelation vorlag. Darüber hinaus konnten die Daten zwar einen signifikanten Vorteil im PFS des ICI- versus Chemotherapie-Arms der TMB high Patient:innen feststellen, jedoch konnte hinsichtlich des OS kein Benefit bewiesen werden. Das OS wurde also nicht vom TMB beeinflusst, was ein hohes TMB als exklusiven prädiktiven Marker für ICI von da an in Frage stellte [53, 54]. Nachdem umfangreiche Initiativen zur Harmonisierung verschiedener, kommerziell verfügbarer Tests gezeigt haben, dass die meisten Systeme für eine valide TMB Analyse geeignet sind, ist vor allem die Klärung eines einheitlichen Schwellenwertes für hohes TMB essentiell. Ein aussagekräftiger Cut-off muss je Entität und unter Berücksichtigung der Abdeckung des gewählten TMB Panel, dem Tumorzellgehalt und der Menge an eingesetzter DNA definiert werden [55-57]. Der TMB Status darf vermutlich nicht (mehr) als alleiniger prädiktiver Biomarker, sondern als Baustein eines komplexen Zusammenspiels aus mehreren Prädiktoren verstanden werden, welche die Wahl einer geeigneten Behandlungsstrategie und prognostische Abschätzungen immer präziser zulassen. Trotz der heterogenen Datenlage führte die KEYNOTE-158 in den USA zu einer tumoragnostischen Zulassung von Pembrolizumab in der Zweitlinie mit TMB als prädiktiven Biomarker. Dennoch wurde diese Studie vielfach kritisiert, da bei einigen Tumorentitäten der Therapieerfolg begrenzt war [58].

1.2.3 Perspektive: STK11, KEAP1, ARID1A und POLE als potentielle Prädiktoren für eine ICI Behandlung

Neben der Expression von PD-L1 und des TMB reihen sich weitere potentielle Prädiktoren für die Therapie mittels ICI ein. Die Serin-Threonin Kinase STK11 kann in Abhängigkeit der vorhandenen Mutation als Tumorsuppressor oder als Onkogen fungieren. Aktivierende Mutationen finden in den Exons eins oder zwei statt, inaktivierende hingegen im Bereich von Exon drei bis neun, wobei Mutationen der ersten beiden Exons als prognostisch ungünstig beim NSCLC gewertet werden. Mutationen in STK11 sind signifikant mit KRAS und invers mit EGFR Mutationen assoziiert [59]. Treten somatische Mutationen gleichzeitig in STK11 und dem Tumorsuppressor KEAP1 auf, ist die Prognose besonders ungünstig und ein Ansprechen auf ICI schwach [60]. Im Gegensatz dazu gelten Mutationen in ARID1A als positive Prädiktoren im Hinblick auf die Therapie [61]. Mit einem prognostischen Vorteil bringt man Mutationen in der DNA-Polymerase Epsilon POLE in Verbindung. Tumoren, welche eine POLE Mutation beherbergen, können zu einem ultramutierten Phänotyp führen, also zu einem Tumor mit hoher TMB. Die damit einhergehende erhöhte Neoantigenlast und die gesteigerten tumorinfiltrierenden Lymphozyten könnten auf ein besseres Ansprechen auf Immuntherapie hinweisen [47, 62]. Die prädiktive beziehungsweise prognostische Aussagekraft der oben genannten Biomarker ist noch nicht abschließend geklärt und muss in weiteren Studien geprüft werden, um so den Patient:innen immer präzisere Behandlungsstrategie bereitstellen zu können.

1.3 Hybrid Capture-basiertes Next Generation Sequencing

Der rasante Fortschritt von Wissenschaft und Technologie hat das Feld der diagnostischen Anwendungen in den letzten Jahrzehnten massiv vorangebracht und neu definiert. Wurde 1962 der Nobelpreis für die Entdeckung der DNA als Doppelhelix an Watson und Crick verliehen, ist man heute durch moderne Sequenziermethoden dazu im Stande, in nur wenigen Stunden das gesamte menschliche Genom durchzusequenzieren. Unter diesen enormen Entwicklungen der letzten Jahrzehnte zählt die Einführung des NGS zu den Schlüsselpunkten neuer diagnostischer Herangehensweisen in der täglichen Behandlungsroutine von Krebspatient:innen. NGS ist als Sammelbegriff verschiedener Methoden zu verstehen, welche im Vergleich zu konventionellen Verfahren wie der Sanger Sequenzierung, die DNA-Sequenzen und somit auch Veränderungen in tumorassozierten Genen wesentlich schneller entschlüsseln können. Ein weiterer großer Vorteil ist, dass

parallel mehrere Gene, zusammengefasst in Genpanel⁸, gleichzeitig bearbeitet werden können. NGS Methoden unterscheiden sich in der Art der Anreicherung relevanter Genbereiche. Beim Hybrid Capture-basierten NGS (HC NGS) werden Zielsequenzen vor der eigentlichen Sequenzierung durch einen Hybridisierungsschritt mit DNA-Sonden aus dem fragmentierten Gesamtgenom angereichert und anschließend klonal amplifiziert. Diese Methode lässt es zu, große intronische Genbereiche aus dem Patientengenom zu präzipitieren und im Falle einer vorliegenden Gentranslokation sogar unbekannte Fusionspartner zu identifizieren. Durch das HC NGS können Mutationen, die nur einzelne Nukleotide betreffen, wie Missense- und Nonsense-Mutationen aber auch kleinere Indels, detektiert werden. Darüber hinaus ist es aber auch möglich, numerische Chromosomenveränderungen, also Translokationen, Deletionen und Amplifikationen, zu bestimmen [63]. Neben der Vielfalt an Informationen, die aus nur einer Tumorprobe gewonnen werden können, werden auch konventionelle Nachweiskonzepte, wie die Fluoreszenz in situ Hybridisierung, zum Teil durch zielführendere Methoden ersetzt und machen diese Art der Testung noch effizienter.

1.3.1 Liquid Biopsy: Alternative und wichtige Ergänzung zur Gewebetestung

Üblicherweise geschieht die molekulare Tumortypisierung bei Patient:innen mit NSCLC anhand einer Biopsie oder eines Resektats, also einer Gewebeprobe. Leider ist diese Art der Probengewinnung nicht immer erfolgreich. Häufig kann nicht ausreichend Gewebe gewonnen werden oder die extrahierte DNA reicht sowohl qualitativ als auch quantitativ für einen Nachweis der angeforderten Diagnostik nicht aus. Außerdem kann sich die Tumorgewebentnahme für Betroffene als risikoreich darstellen und wird auch teilweise vom Erkrankten selbst abgelehnt. Steht kein Gewebe zur Verfügung, kann die Flüssigbiopsie (Liquid Biopsy) als alternatives Testmaterial genutzt werden. Die Liquid Biopsy beschreibt die molekulargenetische Testung an zellfreier Tumor DNA und basiert auf der Beobachtung, dass Körper (cfDNA) - und Tumorzellen (ctDNA) Nukleinsäuren in die Blutbahn abgeben. Wieviel ctDNA in der Flüssigbiopsie vorhanden ist, hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Größe und Lokalisation des Tumors, seine biologische Variabilität aber auch der klinische und therapeutische Status des/der zu Behandelnden spielen hierbei eine Rolle [64]. Entscheidend ist auch die korrekte Probenabnahme und das Verwenden eigens

⁸ Genpanel / Panel-Diagnostik: mehrere Gene, welche mit einem bestimmten Krankheitsbild beziehungsweise Tumorentität assoziiert sind, werden simultan sequenziert, um so eine rasche und effektive Diagnostik zu gewährleisten.

vorgesehener Blutröhrchen, welche den Abbau der Tumor-DNA durch DNAsen verhindern, und die Blutzellen fixieren. Herausfordernd ist auch, dass die ctDNA nur einen geringen Anteil der gesamten cfDNA ausmacht, denn die Tumor DNA wird durch DNA „normaler“ Körperzellen stark verdünnt. Die ausreichende Spezifität und Sensitivität des eingesetzten Testverfahrens sind also unabdingbar und machen herkömmliche Methoden, wie die Sanger Sequenzierung, für diese Art an Material ungeeignet [65, 66].

Trotz ihrer Wichtigkeit ist die Liquid Biopsy als minimalinvasive Methode sowohl in der Primärdiagnostik als auch in der Resistenzsituation kein Ersatz, sondern vielmehr eine wichtige Ergänzung zum „Goldstandard“ Gewebetestung. Ein molekularpathologischer Befund, welcher ausschließlich auf der Analyse einer Flüssigbiopsie basiert, sollte immer kritisch bewertet werden, da ein falsch negatives Resultat aufgrund zu geringer ctDNA Konzentration nicht auszuschließen ist.

2 PUBLIKATION (I) Implementierung eines komplexen Biomarkers in den diagnostischen Routinealltag - Tumormutationslast beim metastasierten NSCLC

Als Paradebeispiel der Präzisionsmedizin konnte sich für das NSCLC der Behandlungsstandard Betroffener in den letzten Jahren enorm verbessern. Der Einsatz von TKI bei Lungenkarzinomen mit klassischen Treiber Mutationen ist aus dem Therapiemanagement nicht mehr wegzudenken. Bei Nichtvorhandensein von treibenden Mutationen in Genen wie EGFR, ALK, ROS1 und BRAF hat sich die Immuntherapie als Behandlungsstandard etabliert. Die PD-L1 Expression von Tumorzellen ist der bis heute einzige, zugelassene Biomarker für den Einsatz von ICI, obwohl Daten zeigten, dass auch Tumoren mit keiner beziehungsweise niedriger PD-L1 Expression auf Immuntherapie ansprechen können. Dies lässt die Vermutung zu, dass der PD-L1 Status allein nicht ausreicht, um eine prädiktive Aussage über den Behandlungserfolg anzustellen. Das TMB wird in der folgenden Arbeit als komplexer, potentiell prädiktiver Biomarkeranwärter vorgestellt. Dafür wurde an 417 Tumorproben eine Panelanalyse (340 Gene umfassend) durchgeführt und neben der Beschreibung der analysierten Mutationsspektren, verschiedene, für den Routinealltag wichtige Aspekte des HC NGS, diskutiert.

⋮

Die folgende Publikation wurde am 24. Juni 2020 in der frei zugänglichen Fachzeitschrift Cancers (Basel), welche vom Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) herausgegeben wird, publiziert (Peer-Review). Die Publikation war Teil der Special Issue Ausgabe „PD-L1/PD1 Modulation Mechanisms in Lung Cancer: From Basic to Translational Evidences“ [16].

Article

Integration of tumor mutation burden and PD-L1 testing in routine laboratory diagnostics in non-small cell lung cancer

Stefanie Schatz^{1,2§}, Markus Falk^{1,2§}, Balázs Jóri^{3§}, Hayat O. Ramdani^{4,5,2}, Stefanie Schmidt^{1,2}, Eva-Maria Willing³, Roopika Menon³, Harry J. M. Groen⁷, Linda Diehl⁶, Matthias Kröger⁸, Claas Wesseler^{10,2}, Frank Griesinger^{4,5,2}, Petra Hoffknecht^{9,2}, Markus Tiemann^{1,2}, Lukas C. Heukamp^{1,2*}

1 Institut für Hämatopathologie Hamburg, Fangdieckstraße 75A, 22547 Hamburg, Germany

2 Lung Cancer Network NOWEL, <https://www.nowel.org/>

3 NEO New Oncology GmbH, Gottfried-Hagen-Straße 20, 51105 Cologne, Germany

4 Department of Hematology and Oncology, Pius-Hospital Oldenburg, Georgstraße 12, 26121 Oldenburg, Germany

5 Department of Internal Medicine-Oncology, University of Oldenburg, Georgstraße 12, 26121 Oldenburg, Germany

6 Institute of Experimental Immunology and Hepatology, University Medical Center Hamburg Eppendorf, Martinistraße 52, 20246, Hamburg, Germany

7 Department of Pulmonary Diseases, University of Groningen and University Medical Center Groningen, Hanzeplein 1, 9713 GZ Groningen, The Netherlands

8 Onkologische Schwerpunktpraxis, Kröger Ambulante Onkologie, Wiener Straße 1, 27568 Bremerhaven, Germany

9 Department of Thorax Oncology, Niels-Stensen-Kliniken, Franziskus-Hospital Harderberg Alte Rothenfelder Straße 23, 49124 Georgsmarienhütte, Germany

10 Department of Internal Medicine and Pulmonology, Asklepios Klinikum Harburg, Eißendorfer Pferdeweg 52, 21075 Hamburg, Germany

* Correspondence: heukamp@hp-hamburg.de; Tel.: +49-176-200-56495

§ **Authors contributed equally**

Received: 30 April 2020; Accepted: 20 June 2020; Published: 24 June 2020

Abstract: In recent years, NSCLC has evolved into a prime example for precision oncology with multiple FDA approved “precision” drugs. For the majority of NSCLC lacking targetable genetic alterations, immune checkpoint inhibition (ICI) has become standard of care in first line treatment or beyond. PD-L1 tumor expression represents the only approved predictive biomarker for PD-L1/PD-1 checkpoint inhibition by therapeutic antibodies. Since PD-L1 negative or low expressing tumors may also respond to ICI, additional factors are likely to contribute in addition to PD-L1 expression. Tumor mutation burden (TMB) has emerged as a potential candidate, however it is the most complex biomarker so far and might represent a challenge for routine diagnostic. We therefore established a hybrid capture (HC) next generation sequencing (NGS) assay that covers all oncogenic driver alterations as well as TMB and validated TMB values by correlation with the assay (F1CDx) used for the CheckMate 227 study. Results of the first consecutive 417 patients analyzed in a routine clinical setting are presented. Data show that fast reliable comprehensive diagnostics including TMB and targetable alterations are obtained with a short turn-around time. Thus even complex biomarkers can easily be implemented in routine practice to optimize treatment decisions for advanced NSCLC.

Keywords: immuno-oncology; tumor mutational burden; lung cancer; routine diagnostics; driver mutation; PD-L1;

1. Introduction

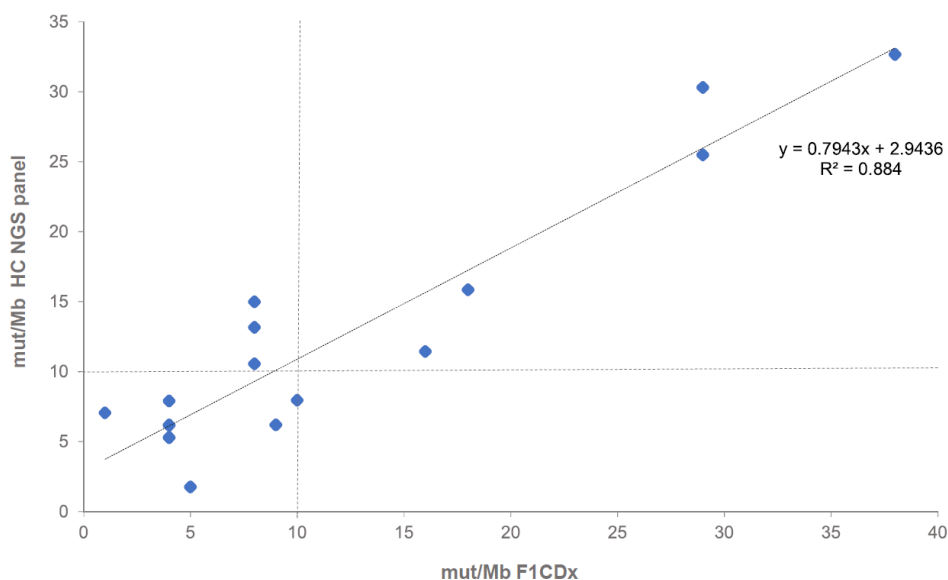
In advanced non-small cell lung cancer immune checkpoint inhibitors (ICI) targeting the PD-1/PD-L1 axis, have sustainably changed the therapeutic approach of driver mutation negative tumors. ICI have become available for first- and second-line treatment and represents a next step in the effort to reduce the group of patients receiving systemic chemotherapy. Despite these advances, still a limited group of about 20% of NSCLC patients benefit from ICI. Biomarkers are needed to predict the response outcome before initiation of therapy. As of now, PD-L1 expression has been established as the only predictive biomarker for treatment with ICI, nevertheless several factors are limiting its predictive value. Firstly, tumor heterogeneity in terms of PD-L1 tumor expression can be significant and can also change in response to therapy. Secondly, PD-L1 negative tumors have been reported to respond to ICI as well, rendering PD-L1 an imperfect biomarker and urging the need for other biomarkers such as microsatellite instability (MSI) and TMB [67-73]. Potentially, TMB may be an independent factor from PD-L1 expression in predicting outcome. TMB is referred to as the total number of somatic mutations that occur in an exome of a tumor genome, although the exact calculation and definition of TMB might differ based on the type of variants, region size or localization [74, 75]. Exonic mutations can lead to the translation of novel peptide epitopes on the tumor surface that may increase the immunogenicity and, therefore, trigger an immune response [75-79]. TMB has been demonstrated to be a strong predictive value for the efficacy of ICI in second and third-line monotherapy, in first-line monotherapy and in the first line combination of immuno-oncological (IO) substances, even if the patients tumors did not show expression of PD-L1 [51, 52, 80, 81]. Furthermore, TMB is evaluated for the selection of patients who benefit from the combination of nivolumab and ipilimumab over platinum-based chemotherapy [53]. A recent study describes TMB as a predictor for survival after immunotherapy across multiple cancer types including head and neck, bladder, breast and renal cancer, underlining the general validity of TMB stratification [82]. Two other recent studies revealed that the efficacy of pembrolizumab plus chemotherapy or placebo plus chemotherapy as first-line treatment was not associated with TMB [83, 84]. The lack of correlation between PD-L1-expression and TMB status has been observed in several different studies, highlighting the independent and potential complementary role for both biomarkers [51, 52, 80, 85]. However, the measurement and calculation of TMB still misses uniform standards. Several factors can influence TMB, including DNA repair capacity and mutation rate. Because current neoantigen-predictive algorithms are imperfect, it is likely that the relationship between TMB and antigenicity is complex. Furthermore, additional factors can affect immunogenicity, including the clonality of neoantigens and the tumor microenvironment [75]. In addition, tumor heterogeneity and clonal architecture, the size of the selected genomic region of interest and setup regarding driver mutational panel bias or even tumor purity can also influence the results from a biological perspective. From the technical point of view, NGS-derived deamination artifacts, considered variant allele frequency, the lack of predefined cut-off values, and the mutation types challenge the introduction of TMB as general biomarker for immunotherapies [86]. The clinical utility of TMB is also affected by pre- and postanalytic parameters, such as storage of FFPE sample, turn-around time (TAT) or analysis failure rate [87, 88]. To evaluate the importance of TMB as a practical biomarker, clinical routine data are needed. Here, we present the first TMB mono-centric dataset from a cohort of 417 lung cancer samples in Germany. We aim to cover the proposed gaps by discussing clinical usability as driver mutations and TMB in the period from 2018 to 2020 using a commercially available assay (NEOplus v2 RUO[†], NEO New Oncology GmbH). The assay was designed to detect targetable driver mutations and genomic alterations (i.e. translocations, copy number changes) of other clinically relevant genes such KRAS, KEAP1, STK11, ARIDA1 (Appendix A) as well as to estimate TMB in an exonic territory of 1.14 Mb. After internal validation the assay was used in our accredited clinical laboratory for routine mutation analysis in NSCLC patients. Samples were exclusively tested upon request by the attending physician and therefore reflect real world data.

2. Results

2.1. TMB assay correlation with clinical trial assay of CheckMate 227

To determine whether the assay was able to estimate TMB comparable to the assay used in the CheckMate 227 clinical trial, a series of 17 samples were both analyzed in-house as well as by F1CDx (Foundation Medicine Inc., Cambridge Massachusetts)

A high correlation ($R^2=0.884$, 95% CI [0.799, 0.968]) between both assays was observed and the TMB category (high vs. low) showed 80% (12/15) concordance with the F1CDx category with a cut-off of 10



mut/Mb (Figure 1).

1.

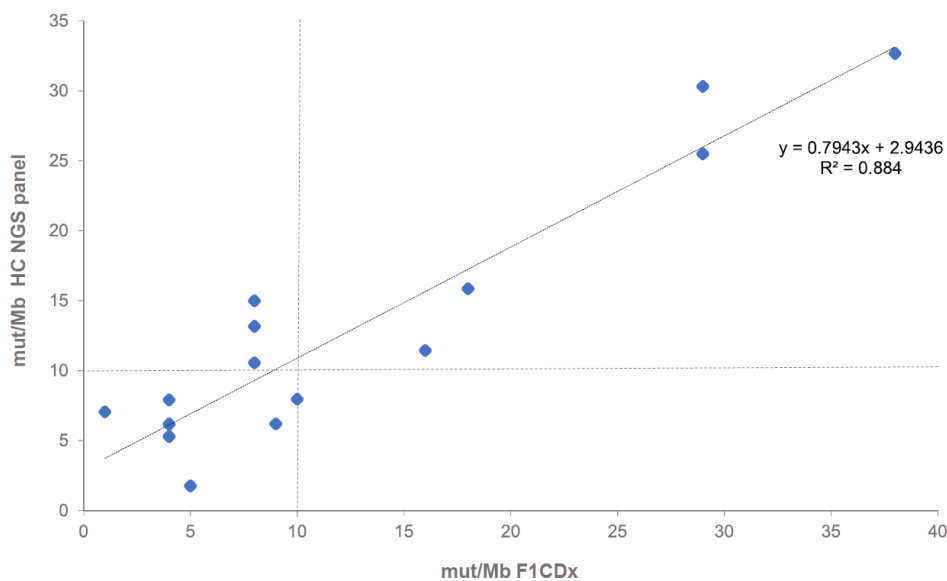


Figure 1. Correlation of TMB estimation of 17 samples measured by NEOplus v2 RUO[‡] and F1CDx assays.

2.2. Histology, driver mutations and PD-L1

In this cohort, 42.4% (177/417) of patients were of female gender and 57.6% (240/417) were male, the mean age being 66 years (Table 1). Histological classification revealed 73.9% (308/417) adeno carcinomas, 0.2% (1/417) adeno-squamous, 7.9% (33/417) squamous cell, 1.0% (4/417) small cell lung cancer 0.5% (2/417) of cases displayed large cell neuroendocrine differentiation, while 16.5% (69/417) were not otherwise specified (NOS). EGFR mutations were detected with a frequency of 14.87% (62/417) however only 66% (41/62) constituted the classical targetable drivers including exon 19 deletions or L858R. The remaining 34% were mostly located outside exons 18-21. Exon 20 insertions, resistant to 1st, 2nd and 3rd generation EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKI), were detectable in 6 cases (6/417, 1.4%) (Table 1).

Table 1. Overview of patients characteristics according to TMB values.

		total N=417	TMB <10 N= 260 (62.35%)	TMB ≥10 N= 157 (37.65%)
Age	<i>Median</i>	66	66	66
	<i>Mean (+/-SD)</i>	65.0 (11.8)	64.7 (12.5)	65.7 (10.5)
	<i>Range</i>	21-92	21-92	93-90
	<65 years	199 (47.72%)	126 (48.46%)	73 (46.50%)
	≥65 years	218 (52.28%)	134 (51.54%)	84 (53.50%)
Sex	Female	177 (42.45%)	140 (53.85%)	100 (63.69%)
	Male	240 (57.55%)	120 (46.15%)	57 (36.31%)
Histology	Adenocarcinoma	308 (73.86%)	201 (77.31%)	107 (68.15%)
	Squamous	33 (7.91%)	14 (5.38%)	19 (12.10%)
	Adeno-squamous	1 (0.24%)	1 (0.38%)	
	Large-cell neuroendocrine	2 (0.48%)		2 (1.27%)
	SCLC	4 (0.96%)	4 (1.54%)	
	NOS	69 (16.55%)	40 (15.38%)	29 (18.47%)
EGFR status	Mutant	62 (14.87%)	47 (18.08%)	15 (9.55%)
	Wild type	355 (85.13%)	213 (81.92%)	142 (90.45%)
	targetable EGFR mutation	41 (66.13%)	33 (12.69%)	8 (5.10%)
	targetable EGFR plus resistance mutation T790M	3 (4.84%)	3 (1.15%)	
	EGFR exon 20 insertion	6 (9.68%)	6 (2.31%)	
	other / variant of unknown significance	12 (19.35%)	5 (1.92%)	7 (4.46%)
BRAF status	Mutant	36 (8.63%)	20 (7.69%)	16 (10.19%)
	Wild type	381 (91.37%)	240 (92.31%)	141 (89.81%)
	V600E / class I*	9 (25.00%)	8 (3.08%)	1 (0.64%)
	non-V600E / class II*	11 (30.56%)	5 (1.92%)	6 (3.82%)
	non-V600E / class III*	5 (13.89%)	3 (1.15%)	2 (1.27%)
	other mutation / variant of unknown significance	11 (30.56%)	4 (1.54%)	7 (4.46%)
Gene fusions	Mutant	41 (9.83%)	32 (12.31%)	9 (5.73%)
	Wild type	368 (88.25%)	223 (85.77%)	145 (92.36%)
	n.d.	8 (1.92%)	5 (1.92%)	3 (1.91%)
	ALK translocation	15 (36.59%)	14 (5.38%)	1 (0.64%)
	ROS1 translocation	2 (4.88%)	1 (0.38%)	1 (0.64%)
	RET translocation	3 (7.32%)	3 (1.15%)	
	other fusions / translocation of unknown significance	21 (51.22%)	14 (5.38%)	7 (4.46%)
PD-L1 TPS	<1%	123 (29.50%)	79 (30.38%)	44 (28.03%)
	≥1% and <5%	50 (11.99%)	26 (10.00%)	24 (15.29%)
	≥5% and <50%	79 (18.94%)	55 (21.15%)	24 (15.29%)
	≥50%	99 (23.74%)	53 (20.38%)	46 (29.30%)
	n.d.	66 (15.83%)	47 (18.08%)	19 (12.10%)

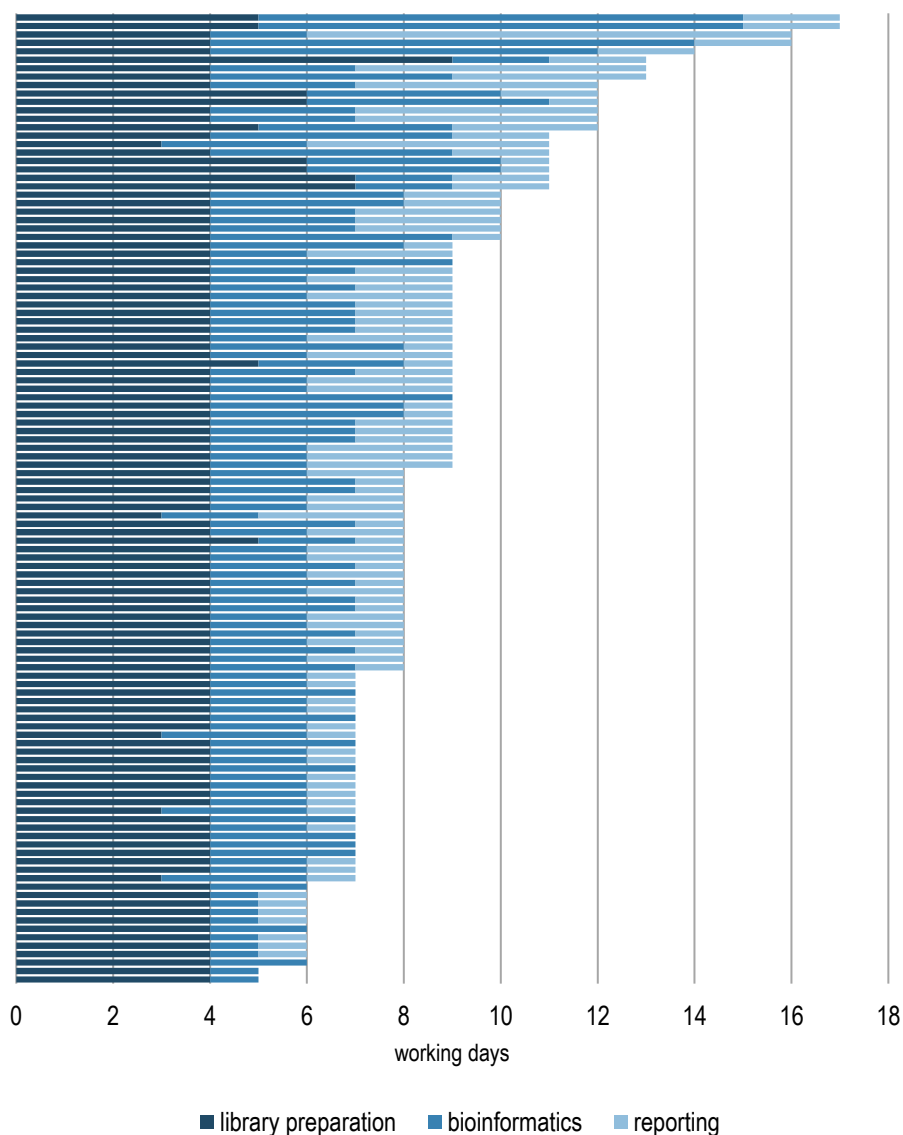
*BRAF mutations were classified based on Yao et al. [20]

Several point mutations were detected within the BRAF gene (36/417, 8.63%), among these, 9 were BRAF V600E. Deemed targetable gene fusions were found with a frequency of 9.83% (41/417), including 15 (3.66%) EML4-ALK, two CD74-ROS1 (0.48%) and three RET translocations (0.73%, 2x KIF5B-RET, RET-CCDC6). Several other fusions were detected including inter- and intragenic fusions of TP53, RB1, STK11 and CDKN2A/B. Within the group of adenocarcinomas, 79.9% of cases were devoid of a targetable driver alteration and 1.6% showed wildtype in all 39 therapeutically relevant genes. None of the squamous cell carcinomas showed a targetable driver alteration. In parallel to mutational analysis, PD-L1 immunohistochemistry (IHC) was performed and tumor proportion score (TPS) was determined for each sample. 123/417 (29.5%) of tumors did not express PD-L1 (<1% of PD-L1), while 11.99% showed PD-L1 expression between $\geq 1\%$ and <5% PD-L1, 18.94% between $\geq 5\%$ and <50% PD-L1 and 23.74% of cases had strong PD-L1 expression ($\geq 50\%$ PD-L1). In 15.8% of cases no PD-L1 analysis was performed either because it was not requested by the physician or due to limited tissue availability.

2.3. Turn-around time and HC NGS workflow

According to European guidelines turn-around times for molecular testing in advanced lung cancer should take no longer than 10 working days [10, 89]. We initially wanted to determine whether comprehensive testing including TMB estimation was feasible within this timeframe. To that end we analyzed the first 115 cases for turn-around time and found that from 81.7% (94/115) of cases a result was sent to the treating physician within 10 working days (Figure 2). To further improve on the turn-around time we looked at the steps responsible for possible delays more closely. HC NGS workflow was subdivided into library preparation, sequencing, bioinformatics (data processing) and generation of a pathological report. Underlying causes for extended turn-around times in these 21 cases were delays in reporting (33%) mainly due to complex genomic alterations, library preparation (38%) such as insufficient DNA at intermediate steps of library preparation requiring some step to be repeated, other technical issues (19%) such as operator or handling mistakes or delays in IT and bioinformatics due to server drop out (10%) (Figure 2). Pre-analytics including FFPE embedding, histological evaluation for tumor content and DNA extraction, required between 2 to 5 days in 80% of cases. More than 5 days were needed in 20% of samples due to delays in workflow (Figure 2). As only one HC NGS run was performed initially per week also the sample entry date influenced overall TAT.

(A) Turn-around time TMB workflow in working days



(B) Duration pre-analytics (n=115) (C) Reasons for prolonged TAT (n=21) (D) Dropout rate TMB workflow (n=132)

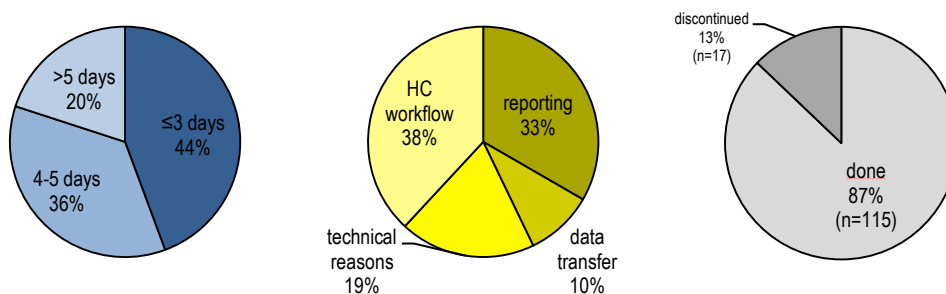


Figure 2. Turn-around time for TMB evaluation. (A) TAT in working days per case from start of HC NGS workflow to reporting; (B) Duration of pre-analytics including tissue embedding and DNA extraction; (C) Reasons for prolonged TAT (>10 working days); (D) Percentage cases not meeting quality criteria.

2.

2.4. Evaluation of tumor mutation analysis in routine lab samples

2.4.1 TMB in relation to age

Based on these findings we considered the assay set up sufficiently fast to continue using the assay for further routine diagnostics including targetable mutations. After a total of 417 were analyzed we correlated patient specific parameters with the observed TMB values. There appeared no significant age ($p=0.476$) or gender ($p=0.110$) specific association with TMB (Figure 3).

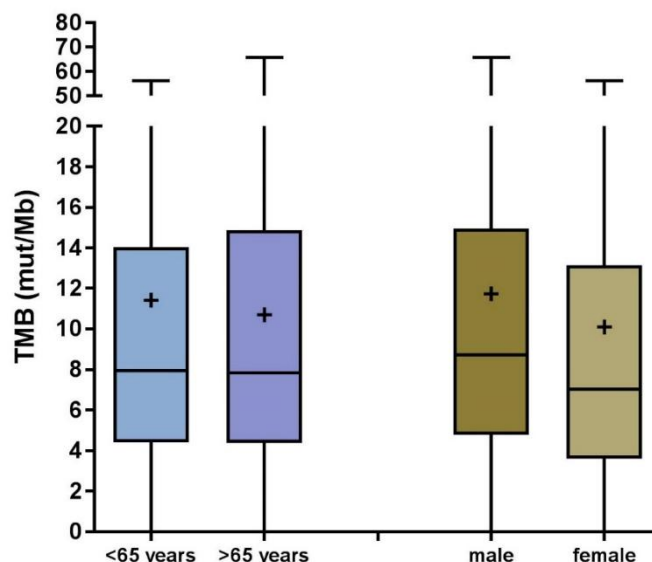


Figure 3. TMB status (mut/Mb) is not significantly correlated to age or gender. Boxplots are shown with the 95% confidence interval indicated by the box. Lines indicate the mean and + the median. Statistical analysis by Student t test did neither reveal significant differences in TMB between patients under or over 65 years of age ($p=0.476$), nor between male and female patients ($p=0.110$).

2.4.2 TMB in relation to driver mutations

Recent reports suggest that the presence of typical driver alterations inversely correlates with the number of somatic tumor mutations [90, 91]. In our cohort, targetable driver alterations (EGFR, ALK, ROS, BRAF V600E, RET) occurred at a combined frequency of 17.5% (73/417). The majority of this group of patients 62/73 (84.9%) showed a lower TMB, below a cut off of 10 mut/Mb, while only 11/73 (15.1%) patients were in the TMB high group (≥ 10 mut/Mb).

The most prevalent somatic mutations found were TP53 (237/417, 56.8%), followed by KRAS (135/417, 32.4%), KEAP1 (54/417, 15.8%), STK11 (64/417, 15.3%), EGFR (62/417, 14.9%), ATM (46/417, 11.03%) and others. Gene amplifications were discovered in 45/417 (10.8%) and gene fusions in 9.83% (41/417) of cases (Figure 4).

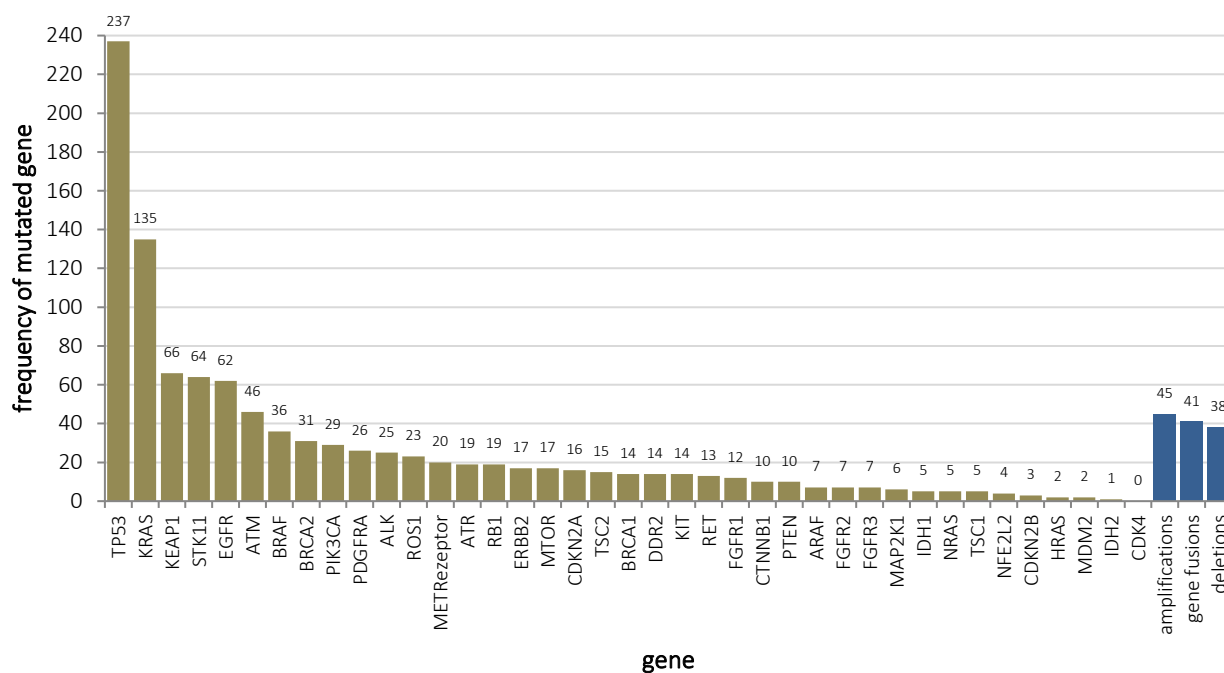


Figure 4. Number of tumors carrying non-synonymous gene mutations in descending order of frequency (grey), including gene amplifications, fusions and deletions (blue).

2.4.3 TMB and PD-L1

Data from literature indicate that PD-L1 expression on tumor cells does not correlate with TMB and that TMB should therefore be considered as an independent predictive biomarker [92]. In line with this observation we found no significant association between TMB value and PD-L1 TPS (Figure 5). Further, we categorized the tumors on basis of PD-L1 tumor proportions score and observed no statistically significant association (as assessed by analysis of variance, ANOVA) of PD-L1 tumor expression and TPS scores ($p = 0.798$).

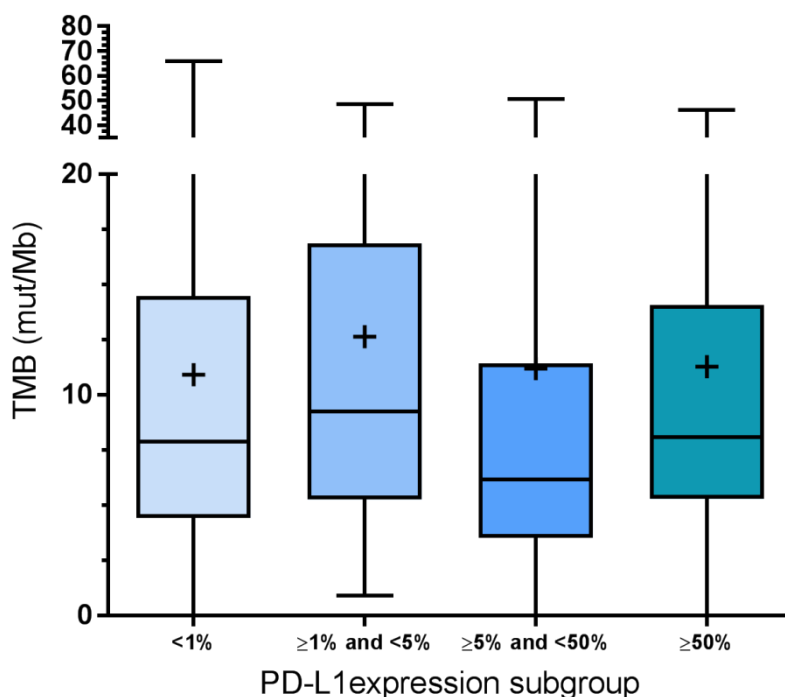


Figure 5. TMB is not different in the four groups of PD-L1 tumor proportion score. Data are presented as box plots with a 95% confident interval. The line indicates the mean, the + indicates the median. Statistical analysis by ANOVA did not reveal significant ($p < 0.05$) differences in TMB between TPS groups.

2.4.4 Correlation of somatic tumor mutations and TMB

It has been shown, that the presence of targetable driving mutations such as activating EGFR mutations is associated only with limited responses to immune checkpoint inhibitors [93]. It has been postulated that this is due to low TMB. Particularly EGFR and ALK mutations are more frequent in light or never smokers, further supporting this hypothesis [94]. Tumors characterized by a targetable driver alteration show significantly lower TMB compared to those lacking any driver alteration ($p < 0.001$). TMB in EGFR mutated tumors was significantly lower compared to TMB in KEAP1 ($p < 0.01$), ARID1A ($p < 0.05$), STK11 ($p < 0.05$) and POLE ($p < 0.05$) mutated tumors. Along those lines, TMB in ALK mutated tumors was significantly lower compared to KEAP1, ARID1A, POLE and STK11 mutated tumors (each $p < 0.05$).

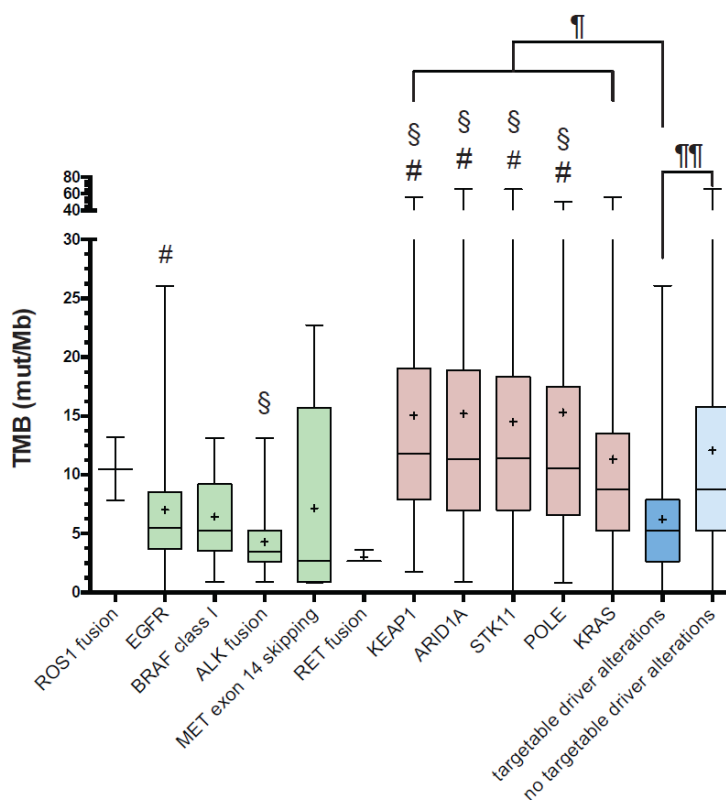


Figure 6. TMB and clinically relevant genetic alterations. For targetable driver alterations (green and blue) TKI-sensitive mutations were counted. Regarding KEAP1, ARID1A, STK11 and POLE all non-synonymous aberrations (red) were considered. Data are presented as box plots with a 95% confident interval. The line indicates the mean, the + indicates the median. Statistical analysis by ANOVA revealed significant differences in TMB between EGFR and KEAP1, ARID1A, POLE and STK11 (#) mutated groups, between ALK fusion and KEAP1, ARID1A, POLE and STK11 mutated groups (§) and between targetable driver mutations and all red groups (¶) and lastly between targetable and non-targetable driver mutations groups (¶¶).

2.5. Clinical use of IO related biomarkers in clinical decision making

Recent publications suggest that STK11 and KEAP1 mutations might be associated with an inferior response to IO [95, 96]. Contrarily, ARID1A mutations seem to confer positive prediction [97]. Based on these findings, we observe that clinicians are interested in additional biomarkers with predictive value for IO.

Inactivating mutations in STK11 were detected with a frequency of 11.3% (47/417) and for KEAP1 with 7.7% (32/417). Functional mutations in ARID1A were found in 5.3% (22/417) of patients. Interestingly, all these variants were associated with higher TMB values indicating that particularly STK11 and KEAP1 are biomarkers independent from TMB.

3. Discussion

When TMB emerged as a potential predictive biomarker, it was considered to possibly be the most challenging and complex genomic biomarker to date. NGS based sequencing of a minimum of one Megabase exonic territory in combination with advanced bioinformatics analyses is needed. The NEOplus v2 RUO[†] panel has a total territory of 2.50 Mb, of which 1.14 Mb are dedicated to TMB evaluation. The territory dedicated to TMB evaluation excludes typical cancer genes that are known to have a mutation bias. The need for a TMB territory size of greater than 1 Mb is based on the data of Chalmers et al. and generally considered to be sufficient. This is supported by the comparisons of several TMB assays in the recently published German comparative TMB study [98]. There was considerable doubt whether speedy local TMB testing could be implemented and whether testing large number of patients was feasible. The initiatives of Quality in Pathology and Friends of Cancer Research jointly addressed the need for

harmonization of TMB testing. In this study on a cohort of 417 lung cancer patients we asked whether TMB can be assessed alongside with other predictive genomic biomarkers needed for treatment stratification. We implemented a HC NGS assay into routine diagnostics, allowing for simultaneous detection of TMB and relevant aberrations including targetable driver mutations. TMB values correlated well with the F1Dx panel. These data are compatible with previously published data from a German harmonization trial [87, 98].

The TAT proved to be in line with guidelines as 81.7% of cases met required turn-around time of 10 working days. Comparing the NEOplus v2 RUO[†] HC assay to the F1Dx assay (used in CheckMate 227) revealed a high degree of association.

Samples analyzed in this study mainly consisted of adenocarcinomas, however a significant proportion of biopsies were histologically classified in external pathologies and the histological subtype was not reported to us. Therefore, a relatively large proportion appeared as NOS, unfortunately in most cases tissue was not sufficient for reevaluation. TMB was not associated to age in our cohort, although previously an age effect was published regarding other cancer entities [99]. TMB and PD-L1 expression were not associated supporting the concept of two independent and therefore potentially additive biomarkers for immune oncological treatment. Male gender appears to be associated with higher TMB compared to females potentially reflecting different smoking habits, however this difference was not statistically significant. The frequency of targetable driver alterations (EGFR, ALK, ROS1, MET exon 14 skipping, RET or BRAF V600E) was in line with the literature and their presence was significantly associated with a lower TMB value. In contrast, tumors that carried mutations in KRAS or genes assumed to cause primary resistance to IO (STK11, KEAP1 and POLE) showed higher TMB. In 2019 the complex CheckMate 227 trial using TMB as a co-primary endpoint in some subgroups could not convincingly show a role for TMB as a useful predictive biomarker. Since then retrospective analyses explored the use of pembrolizumab versus chemotherapy in all therapeutic lines, showing improvement in OS, PFS and ORR for TMB high patients [7, 100].

Based on the KEYNOTE-158 trial the FDA recently approved pembrolizumab monotherapy for patients with solid tumors and TMB ≥ 10 mut/Mb. The study included adults and pediatric patients with unresectable or metastatic disease with progression upon prior treatment or no alternative treatment options. This underlines the concept of TMB as a predictive biomarker [101].

4. Materials and Methods

Selection of patients

Patients were retrospectively selected from our internal pathological documentation system based on request for comprehensive molecular testing from 2018 to 2019. All samples represent tumor biopsies tested in a single institution (Institut für Hämatopathologie Hamburg, Germany). Use of anonymized patient data was reviewed by the local ethics committee (Ref number: WF-055/18 and WF-017/19).

PD-L1

PD-L1 was stained immunohistochemically using the antibody clone 22C3 pharm Dx (Dako Omnis, 1:30 dilution) on the automated BenchMark Ultra platform (Roche Diagnostics) with positive controls spleen, tonsil and placenta as part of a multi tissue control. Scoring was conducted by board certified and trained pathologists [102].

Mutation testing

For molecular analysis 3-10 5-10 μ m micrometer formalin fixed paraffin embedded (FFPE) sections were prepared and tumor tissue was micro-dissected in case tumor content was below 10%. DNA was extracted semi-automated (Maxwell[®] 16, Promega) and 400ng input DNA was sonographically sheared (Covaris[®]) into approximately 200bp double stranded fragments. Hereafter, adapters were ligated and genomic regions of interest were enriched using complementary bait sequences. During this hybrid capture, the selected baits ensure optimal coverage of all relevant genomic regions including 340 genes in a 1.14 Mb complete genomic territory size. Following the enrichment, the targeted fragments were clonally amplified and sequenced with next-generation sequencing (NextSeq 500/550, Illumina). Point mutations, small insertions and deletions, copy number alterations and rearrangement/gene fusions were called with

NEO New Oncology's proprietary computational biology analysis pipeline and analyzed using the NEO diagnosis software.

TMB

For TMB, the number of somatic mutations detected within 1.14 Mb of the genome, were quantified and that value extrapolated to the whole exome using a validated algorithm (NEO New Oncology). Alterations known to be included in genomic databases such as Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) or Exome Aggregation Consortium (ExAc) were excluded.

TMB was calculated from genomic alterations called by the bioinformatics pipeline. Single nucleotide changes with predicted missense, nonsense, silent, nonstop consequences and small insertions/deletions with in-frame or frameshift insertion/deletion consequences were considered for TMB calculation. Variants with an allelic frequency of at least 5% (for LOD 0.05 value) or 10% (for LOD 0.1 value) were included and frequent germ line variants present in ExAc and dbSNP were not considered. The TMB value was provided as mutations per Megabase (mut/Mb).

Statistical analysis

Descriptive statistics were used. Differences between groups were tested with parametric or non-parametric methods depending on the distribution. Box plots were generated using GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) and statistical significance assessed by Student *t* and ANOVA (Alpha level 0.05). For Figure 1, Pearson correlation was performed using Microsoft Excel.

5. Conclusions

We show that routine diagnostics of highly complex biomarkers such as TMB is feasible today and that a central industrial testing facility is not required. This is a highly important finding given that clinical trial results using TMB as a predictive biomarker are promising and FDA approval is currently pending. However, at this point in time data is still not fully mature and further validation is required.

Supplementary Materials:

Author Contributions: Conceptualization, L.D., F.G., M.T. and L.C.H.; Data curation, M.F., B.J., S.S. (Stefanie Schmidt), R.M., H.J.M.G. and F.G.; Formal analysis, B.J. and R.M.; Investigation, M.T.; Methodology, S.S. (Stefanie Schatz), S.S. (Stefanie Schmidt) and E.-M.W.; Resources, M.K., C.W., F.G., P.H. and M.T.; Software, E.-M.W.; Supervision, F.G., M.T. and L.C.H.; Visualization, S.S. (Stefanie Schatz), M.F. and B.J.; Writing—original draft, S.S. (Stefanie Schatz), M.F. and B.J.; Writing—review & editing, H.O.R., H.J.M.G., L.D., M.K., C.W., F.G., P.H. and L.C.H.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We thank Birgit Brussé for data documentation and Sabine Bleicher for extraordinary technical support.

Conflicts of Interest: Petra Hoffknecht, Honorarium: Boehringer Ingelheim, Pfizer, Takeda, Roche Pharma, Lilly, BMS, MSD, AstraZeneca, Abbvie; Frank Griesinger, Honorarium: Astra Zeneca, Boehringer Ingelheim, BMS, Celgene, Lilly, MSD, Novartis, Pfizer, Roche, Takeda, Ariad, Abbvie, Siemens; Markus Tiemann, Honorarium: AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Novartis, Roche, Pfizer, Takeda, BMS, MSD; Markus Falk, Honorarium: Boehringer Ingelheim, AstraZeneca, BMS, Novartis, Roche; Lukas C. Heukamp, Honorarium: Boehringer Ingelheim, Pfizer, BMS, MSD, AstraZeneca. All other authors do not declare any conflict of interest.

Appendix A

List of genes included in NEOplus v2 RUO[‡]. NEOplus v2 RUO[‡] detects point mutations in 330 genes and small insertions and deletions in 325 genes, as well as copy number changes in 230 genes. In addition, gene fusions are detected in 16 genes.

[‡]For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Point Mutations, small Insertions and Deletions

ABL1, ABL2, ACVR1B, AKT1, AKT2, AKT3, ALK, ALMS1, AMER1, APC, APLNR, AR, ARAF, ARHGEF12, ARID1A, ARID1B, ARID2, ASXL1, ATAD5*, ATM, ATR, ATRX, AURKA, AURKB, AXIN2, AXL, B2M, BAP1, BARD1, BCL2, BCL2L1, BCL6, BLM, BMPR1A, BMS1, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD2, BRD3, BRD4, BRIP1, BTK, BUB1B, CARD11, CASP8, CBF, CBL, CCND1, CCND2, CCNE1, CD274, CD58, CD79A, CD79B, CDC73, CDH1, CDK12, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C, CEBPA, CHD4, CHEK1, CHEK2, CIC, CLSPN, CREBBP, CRKL, CSF1R, CTCF, CTNNA1, CTNNB1, CUL3, DAXX, DCUN1D4, DDB2, DDR2, DICER1, DOT1L, EGFR, EMSY, EP300, EPHA3, EPHA5, EPHA7, EPHB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERFF1, ESR1, EZH2, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, FAS, FAT1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLCN, FLT1, FLT3, FOXO3, FOXP1, FRS2, GATA1, GEN1, GLI1, GNA11, GNA13, GNAI2, GNAQ, GNAS, GNAT2, GSK3B, H3F3A, H3F3B, HDAC2, HGF, HLT, HRAS, HSP90AA1, IDH1, IDH2, IFNGR1, IFNGR2, IGF1R, IGF2, IGF2R, IKBKB, IKBKE, IL21R, INHBA, INPP4B, IRF1, IRF2, IRF4, JAK1, JAK2, JAK3, JUN, KAT6A*, KDR, KEAP1, KIT, KMT2A, KMT2B, KMT2C, KMT2D, KRAS, KSR1, LRP1B, LYN, MAD2L1, MAGI2, MAP2K1, MAP2K3, MAP2K4, MAP3K1, MCL1, MDM2, MDM4, MED12, MEN1, MET, MITF, MLANA, MLH1, MLH3, MPL, MRE11, MSH2, MSH3, MSH5, MSH6, MST1R, MTOR, MUTYH, MYC, MYCL, MYCN, NBN, NCOA3, NCOA4, NF1, NF2, NFE2L2, NFKBIA, NOTCH2, NOTCH4, NPM1, NRAS, NSD1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PALB2, PBRM1, PDCD1LG2, PDGFRA, PDGFRB, PDK1, PIK3C2B, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1, PIK3R2, PLCG2, PMS2, POLD1, POLE, POLG, POLH, POT1, PPM1D, PPP2R1A, PRDM1, PREX2, PRKCI, PRKDC, PRKN, PSMB5, PTCH1, PTEN, PTPN11, PTPRC, PTPRK, PTPRT, QKI, RAC1, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L, RAD54L2, RAF1, RANBP2, RARA, RB1, RECQL4, RET, REV3L, RICTOR, RIT1, RNF43, RNPS1, ROS1, RPL10A, RPL23, RPTOR, SDHA*, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SERPINB3, SERPINB4, SETD1A*, SETD1B, SETD2, SF3B1, SLIT2, SLX4, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMO, SOX2, SPEN, SPOP, SRP54, STAG2, STAT3, STK11, SUFU, SYK, TAF3, TAP1, TAP2, TAPBP, TCF7L2, TGFBR2, TNFAIP3, TNFRSF14, TOP1, TOP2A, TP53, TP53BP1, TRRAP, TSC1, TSC2, TSHR, U2AF1, U2AF1L5, VEGFA, VHL, WISP3, WRN, WT1, XPA, XPC, XRCC1, ZFH3*, ZNF217

* Detection of small insertions and deletions in ATAD5, KAT6A, SDHA, SETD1A, ZFH3 not possible.

Copy Number Changes

ABL1, AKT1, AKT2, AKT3, ALK, ALMS1, AMER1, APC, APLNR, AR, ARAF, ARID1A, ARID1B, ARID2, ASXL1, ATAD5, ATM, ATR, ATRX, AURKA, AXIN2, AXL, BARD1, BCL6, BLM, BMPR1A, BMS1, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD2, BRD3, BRD4, BRIP1, BTK, BUB1B, CARD11, CASP8, CCND1, CCNE1, CD274, CDC73, CDH1, CDK12, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN2A, CDKN2B, CHD4, CIC, CLSPN, CREBBP, CSF1R, CTNNA1, CTNNB1, CUL3, DAXX, DDB2, DDR2, DICER1, DOT1L, EGFR, EMSY, EP300, EPHA3, EPHB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERFF1, ESR1, EZH2, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCI, FANCL, FANCM, FAS, FAT1, FGF19\$, FGF23#, FGF3\$, FGF4\$, FGF6#, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT1, FLT3, FOXO3, FOXP1, FRS2, GATA1, GLI1, GSK3B, HDAC2, IDH1, IDH2, IFNGR1, IKBKB, IKBKE, IL21R, INHBA, INPP4B, IRF1, IRF2, IRF4, JAK1, JAK2, JAK3, KAT6A, KDR, KEAP1, KIT, KRAS, LRP1B, LYN, MAGI2, MAP2K1, MDM2, MDM4, MED12, MEN1, MET, MITF, MLH1, MPL, MRE11, MSH2, MSH3, MSH5, MSH6, MST1R, MUTYH, MYC, MYCL, MYCN, NBN, NCOA3, NCOA4, NF1, NF2, NFE2L2, NPM1, NSD1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PALB2, PBRM1, PDGFRA, PDGFRB, PDK1, PIK3C2B, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3R1, PIK3R2, PMS2, POLD1, POLE, POLG, POLH, PPM1D, PRDM1, PTCH1, PTEN, PTPN11, PTPRK, QKI, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L, RAD54L2, RAF1, RANBP2, RARA, RB1, REV3L, RICTOR, RIT1, RNF43, ROS1, RPTOR, SETD1A, SETD1B, SETD2, SF3B1, SLIT2, SLX4, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMARCA4, SMO, SPOP, STAG2, STAT3, STK11, SYK, TAP1, TAP2, TAPBP, TGFBR2, TNFAIP3, TOP1, TOP2A, TP53, TP53BP1, TRRAP, TSC1, TSC2, VEGFA, WRN, XPC, XRCC1

\$ genes considered as one cluster

genes considered as one cluster

Gene Fusions

ALK, BRAF, CD74, EML4, ETV6 (NTRK3 Fusion), FGFR1, FGFR2, FGFR3, KIF5B, MET, NRG1, NTRK1, PDGFRA, RET, ROS1



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3 PUBLIKATION (II) Zielgerichtete Therapie beim EGFR mutierten NSCLC – die Therapiesequenz und ihr Einfluss auf das Resistenzspektrum

Seit im Jahr 2009 Gefitinib als TKI für die Behandlung von Patient:innen mit lokal fortgeschrittenem oder metastasierten NSCLC mit aktivierender EGFR Mutation zugelassen wurde, sind inzwischen neben EGFR TKI der ersten auch TKI der zweiten und dritten Generation verfügbar. Obwohl sich durch den Einsatz dieser Kinasehemmer das Überleben der Patient:innen bei weniger Nebenwirkungen gegenüber der klassischen Systemtherapie weitaus verbessert hat, kommt es im Verlauf der Therapie unweigerlich zur Ausbildung von Resistenzmutationen. Das Spektrum an Mutationen, welche mit Resistenzen gegen die aktuelle Therapie einhergehen, hängt vom eingesetzten TKI, aber auch von der Therapielinie ab. Beim Drittgenerations-TKI Osimertinib, der seit Mai 2018 auch für Erstlinientherapie zugelassen ist, scheint die Bandbreite an Resistenzmutationen in der Erstlinientherapie deutlich größer zu sein, verglichen mit TKI der ersten beziehungsweise zweiten Generation. Die häufigste Resistenzmutation in der Zweitlinientherapie gegen Osimertinib, also bei Vorliegen einer aktivierenden EGFR Mutation und einer p.T790M Gatekeeper-Resistenzmutation, ist in etwa 50% der Fälle die bekannte EGFR p.C797S Mutation. Hingegen spielen bei akquirierter Resistenz gegen Osimertinib in der Erstlinientherapie (bei Fehlen einer p.T790M) Amplifikationen und Alterationen einer Vielzahl von anderen Genen sowie Gentranslokationen in RET, ALK oder BRAF eine Rolle. Einige dieser akquirierten Resistenzmutationen können durch den Einsatz weiterer zielgerichteter Medikamente adressiert und das Fortschreiten der Erkrankung wieder eingedämmt werden. Daher sollte die Bestimmung des molekularen Profils bei Progress oder Rezidiv unter TKI unbedingt erfolgen. Der Vorteil der Liquid Biopsy in diesem Zusammenhang ist zudem, dass ein repräsentatives Spektrum aller genetischer Alterationen und damit aller resistenten Klone etabliert werden kann, welches über die Untersuchung einer einzigen progredienten Manifestation beziehungsweise eines resistenten Klons, hinausgeht. In der nachfolgenden Publikation wird anhand von 56 Patient:innen mit fortgeschrittenem NSCLC, welche eine Osimertinib Therapie in der Erst- oder Nachfolgelinie erhalten haben, das Spektrum an Resistenzmutationen diskutiert. Die Analyse wurde anhand eines HC NGS Multigenpanel an der Liquid Biopsy durchgeführt. Diese Methode ist nicht invasiv und erspart Patient:innen Komplikationen von invasiven Eingriffen und dem Gesundheitssystem relevante Kosten durch die Behandlung von Nebenwirkungen und gegebenenfalls Langzeitmorbidität durch invasive Gewebeprobenentnahme. Die Untersuchungsergebnisse unterstreichen, wie wichtig das

Bestimmen von molekularen Alterationen nicht nur vor, sondern auch bei akquirierter Resistenzsituation ist.

⋮

Die folgende Publikation wurde am 8. Juni 2021 in der frei zugänglichen Fachzeitschrift Cancers (Basel), welche vom Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) herausgegeben wird, publiziert (Peer-Review). Die Publikation war Teil der Special Issue Ausgabe „Biomarkers in Lung Cancer“ [103].

Article

Comparison of Resistance Spectra After First and Second Line Osimertinib Treatment Detected by Liquid Biopsy

Balázs Jóri ^{1,2,†}, Stefanie Schatz ^{1,2,†}, Len Kaller ^{2,3}, Bettina Kah ^{1,2}, Julia Roeper ^{2,4,5}, Hayat O. Ramdani ^{2,4,5}, Linda Diehl ⁶, Petra Hoffknecht ^{2,7}, Christian Grohé ^{2,8}, Frank Griesinger ^{2,4,5}, Markus Tiemann ^{1,2}, Lukas C. Heukamp ^{1,2,‡} and Markus Falk ^{1,2,‡,*}

- ¹ Institut für Hämatopathologie Hamburg, Fangdieckstraße 75A, 22547 Hamburg, Germany; jori@hp-hamburg.de (B.J.); schatz@hp-hamburg.de (S.S.); kah@hp-hamburg.de (B.K.); mtiemann@hp-hamburg.de (M.T.); heukamp@hp-hamburg.de (L.C.H.); falk@hp-hamburg.de (M.F.)
- ² Lung Cancer Network NOWEL, 26129 Oldenburg, Germany, <https://www.nowel.org/>; len.kaller@semmelweis-hamburg.de (L.K.); julia.roeper@uni-oldenburg.de (J.R.); hayat.oum.el.kheir.ramdani@uni-oldenburg.de (H.O.R.); Petra.Hoffknecht@niels-stensen-kliniken.de (P.H.); Christian.Grohe@jsd.de (C.G.); Frank.Griesinger@Pius-Hospital.de (F.G.)
- ³ Asklepios Campus Hamburg, Semmelweis University, Lohmühlenstraße 5, 20099 Hamburg, Germany
- ⁴ Department of Hematology and Oncology, Pius-Hospital Oldenburg, Georgstraße 12, 26121 Oldenburg, Germany
- ⁵ Department of Internal Medicine-Oncology, University of Oldenburg, Georgstraße 12, 26121 Oldenburg, Germany
- ⁶ Institute of Experimental Immunology and Hepatology, University Medical Center Hamburg Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany, li.diehl@uke.de (L.D.)

⁷Department of Thorax Oncology, Niels-Stensen-Kliniken, Franziskus-Hospital Harderberg Alte Rothenfelder Straße 23, 49124 Georgsmarienhütte, Germany

⁸Department of Pneumology, Evangelische Lungenklinik Berlin, Lindenberger Weg 27, 13125 Berlin, Germany

* Correspondence: falk@hp-hamburg.de

† Authors contributed equally

‡ Authors contributed equally

Citation: Jóri, B.; Schatz, S.; Kaller, L.; Kah, B.; Roeper, J.; Ramdani, H.O.; Diehl, L.; Hoffknecht, P.; Grohé, C.; Griesinger, F.; et al. Comparison of Resistance Spectra After First and Second Line Osimertinib Treatment Detected by Liquid Biopsy. *Cancers* **2021**, *13*, 2861.

<https://doi.org/10.3390/cancers13122861>

Academic Editor: Frederico Cappuzzo

Received: 23 April 2021

Accepted: 25 May 2021

Published: 8 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Since the recent approval of osimertinib, a third generation tyrosine kinase inhibitor (TKI) targeting *EGFR* in non-small cell lung cancer (NSCLC), tracing the resistance mechanisms that yield to failure of osimertinib has become of interest. As the spectrum of osimertinib-resistance related genomic alterations appears significantly more diverse compared to first and second generation TKI, comprehensive, and preferably non-invasive molecular diagnostic methods are required for the detection of resistance mechanisms. In this study, we present molecular results of 56 NSCLC patients during disease progression on first and second line osimertinib treatment using a hybrid capture (HC) next generation sequencing (NGS) based liquid biopsy approach. We show examples of polyclonal resistance development which leads to the presence of multiple resistance mechanisms in the same patient, and highlight the clinical utility of HC NGS over single gene testing.

Abstract: Since 2009, several first, second, and third generation EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKI) have been approved for targeted treatment of EGFR mutated metastatic non-small lung cancer (NSCLC). A vast majority of patients is improving quickly on treatment; however, resistance is inevitable and typically occurs after one year for TKI of the first and second generation. Osimertinib, a third generation TKI, has recently been approved for first line treatment in the palliative setting and is expected to become approved for the adjuvant setting as well. Progression-free survival (PFS) under osimertinib is superior to its predecessors but its spectrum of resistance alterations appears significantly more diverse compared to first and second generation EGFR TKI. As resistance mechanisms to osimertinib are therapeutically targetable in some cases, it is important to comprehensively test for molecular alterations in the relapse scenario. Liquid biopsy may be advantageous over tissue analysis as it has the potential to represent tumor heterogeneity and clonal diversification. We have previously shown high concordance of hybrid capture (HC) based next generation sequencing (NGS) in liquid biopsy versus solid tumor biopsies. In this study, we now present real-world data from 56 patients with metastatic NSCLC that were tested by liquid biopsy at the time of disease progression on mostly second line treated osimertinib treatment. We present examples of single and multiple TKI resistance mechanisms, including mutations in multiple pathways, copy number changes and rare fusions of RET, ALK, FGFR3 and BRAF. In addition, we present the added value of HC based NGS to reveal polyclonal resistance development at the DNA level encoding multiple EGFR C797S and PIK3CA mutations.

Keywords: liquid biopsy; lung cancer; routine diagnostics; osimertinib resistance

1. Introduction

EGFR mutations predominantly occur in non-squamous NSCLC with a frequency of about 10–15% in the western world. These patients benefit from EGFR TKI, however, remission is typically followed by relapse after a median of 9–18 months [11, 104]. Resistance in response to first- and second-generation EGFR TKI (i.e., gefitinib, erlotinib, and afatinib) is most commonly conferred by the gatekeeper mutation T790M [105]. Other alterations like MET gene amplification have been reported in up to 15% of patients and provided a rationale for the addition of MET inhibitors such as crizotinib or tepotinib to overcome resistance [106, 107].

The third-generation TKI osimertinib was originally approved for second line treatment since it showed activity for both the classical EGFR mutations and T790M, leading to the concept of sequential TKI therapy, including a switch to osimertinib upon progress and T790M positivity. After the recent approval of osimertinib for first line treatment, the concept of sequential TKI therapy has been challenged and is still a matter of debate [108]. The “best first” strategy of oncology favors osimertinib as first line option for EGFR mutated NSCLC based on the overall survival (OS) benefit compared to first-generation EGFR TKI and the prevention of the most frequent resistance mechanism, T790M. Resistance mechanisms to osimertinib are therefore important to capture by comprehensive testing in order to identify those patients with targetable resistance mechanisms.

The most common resistance mutation after second line osimertinib affects the C797X residue in EGFR, the binding site for this substance [109–112]. In case C797X is occurring in cis configuration with T790M as (T790M; C797S), it renders the tumor insensitive to any currently approved EGFR TKI. The setting of EGFR C797X in trans to T790M, as (T790M); (C797S), is rare compared to cis. However, data indicate sensitivity of in trans configuration of (T790M); (C797S) to a combination first- or second-generation EGFR TKI together with a third-generation EGFR TKI [113, 114]. The overall spectrum of resistance alterations in response to osimertinib is remarkably more complex than to its class members of the prior generations [108]. Fusions of NTRK and ALK have been reported as well as amplification of ERBB2, EGFR and MET, or point mutations leading to activation of RAS/MAPK or PI3K/AKT/mTOR pathways [112, 115–117].

The accurate identification of such genetic alterations is crucial not just for patient management but also for advancing our understanding of treatment-induced tumor evolution. As the feasibility of repeated tissue biopsies during tumor progression is clinically problematic, non-invasive methods, such as liquid biopsy, emerged as complement to routine tissue-based diagnostics and became recommended in the new College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology guidelines for molecular testing of patients with metastatic NSCLC [118, 119].

Hotspot testing methods, such as droplet digital PCR or enhanced-ice-COLD-PCR might allow high sensitivity in blood-based resistance testing of metastatic cancers [120, 121]. However, these assays are limited

to covering only narrow genomic territories and are unsuitable to reveal complex and heterogeneous resistance mechanisms that are commonly occurring during osimertinib treatment [108]. In this regard, HC NGS that provides comprehensive analysis of point mutations, small InDels, copy number alterations, and gene fusions, including exonic and intronic regions of onco- and suppressor genes, from liquid biopsy samples might deliver the demanded clinical utility [63].

In this work, we highlight patients that were sequentially tested via liquid biopsy and focus on resistance to osimertinib mainly in the second line setting. We provide examples for the clinical applicability and added value of HC NGS based liquid biopsy in resistance testing in terms of known and novel genomic alterations, multiple resistance mechanisms and evidence for development of polyclonal resistance.

2. Materials and Methods

2.1. Patient Cohort

Among a cohort of over 700 patients tested via liquid biopsy in the central laboratory of North-East-West Lung Network (NOWEL), a German lung cancer network, we identified a total of 56 patients who developed progressive disease on osimertinib treatment. As part of NOWEL, plasma ctDNA was analyzed as an alternative to tissue biopsy because 1) patients refused a solid tumor biopsy, 2) tissue biopsy was not possible, or 3) tissue derived DNA was not sufficient for coverage of all targetable driver alterations. The EGFR mutation status at primary diagnosis had either been assessed in our institution (Institut für Hämatopathologie Hamburg, Germany) at an earlier time point or was documented as part of the NOWEL clinical documentation. Collating the resistance pattern to osimertinib, we excluded plasma samples that met the assay's quality criteria, but tested wildtype for the initial EGFR driver mutation, presumably indicating limited tumor DNA shedding.

2.2. Liquid Biopsy

Whole blood (18 mL) was collected in two Streck Cell-Free DNA BCT® (Streck, Omaha/NE, USA) and cfDNA was extracted using Qiagen's QIAamp Circulating Nucleic Acid kit (Qiagen, Hilden, Germany). Liquid Biopsies were taken at the time of progression under osimertinib. CfDNA was subjected to HC based NGS to detect point mutations, small InDels, copy number alterations and genomic translocations (NEOliquid v1, NEO New Oncology GmbH, Germany). Details of the panel setup are included in Appendix A. In brief, after DNA extraction, adapters were ligated, and DNA was processed as described previously [122]. After enrichment, targeted fragments were clonally amplified and sequenced in parallel at an ultrahigh sequencing depth averaging 37150× (unfiltered reads). Computational analysis was performed with NEO New Oncology's proprietary computational biology analysis pipeline to remove sequencing artefacts and detect relevant genomic alterations in a quantitative manner (minor allele frequency $\geq 0.1\%$). Of note, due to assay limitation, in copy number variation (CNV) calling enabled only the detection of amplifications in EGFR, ERBB2, and MET. The detection of CNV deletions, such as in RB1 or TP53 was not possible.

3. Results

3.1. Patient Characteristics

The mean age of the 56 patients that received osimertinib as either first or second line EGFR TKI was 60 years with a female/male ratio of 64% versus 36%. Smoking status could not be assessed in 6/56 (11%) of patients, while 31/56 (55%) were reported to be never smokers, 2/56 (4%) current smokers, and 17/56 patients (30 %) former smokers. Pack years were documented for 14/17 former smokers with a median of 17py. Histomorphological classification revealed a majority of adenocarcinomas in 54/56 of the cases (96%), besides one case (2%) adeno-squamous and large-cell carcinoma, respectively. Clinical stage of disease was UICC stage IV exclusively (98%) while in 2% documentation was incomplete (Table 1). In nine of 56 patients osimertinib was administered first line, and in 47 of 56 patients as second line TKI. Of the latter, 37 of 47 patients received one first or second generation TKI prior to osimertinib and eight of 47 patients received two different TKI prior to osimertinib. In two patients therapy included rociletinib, a third generation EGFR TKI that did not gain

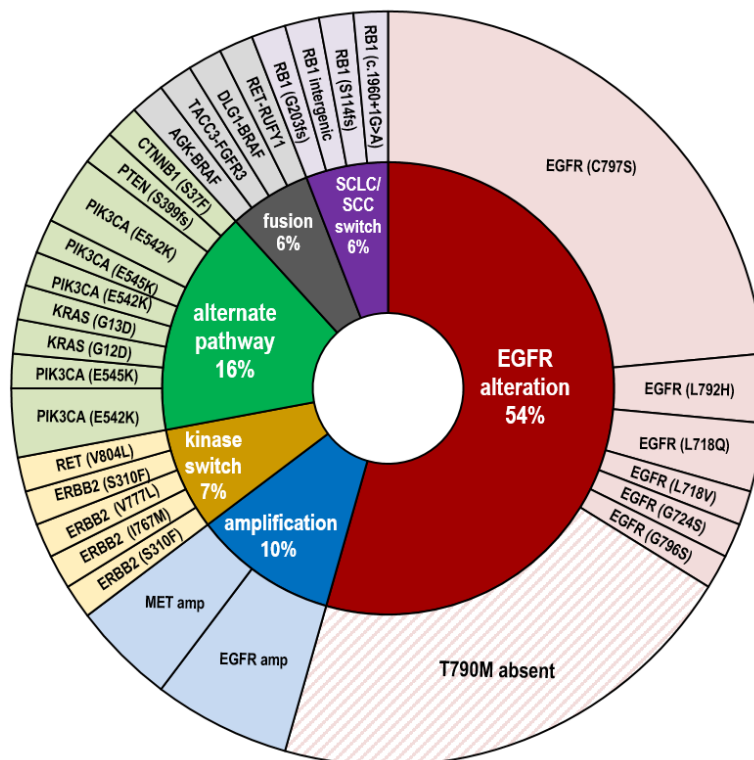
approval. Two of 47 patients received a sequence of gefitinib, erlotinib and afatinib in varying order during the course of the disease before osimertinib was administered.

Table 1. Overview of patient characteristics.

Characteristics		Categories	Number (N) and Value (%)		
N = 56	Age at diagnosis (years)	Median	63		
		Mean (\pm SD)	60 (\pm 12)		
		Interquartile range	49.5–71.5		
	Sex	<65 years	30	(54%)	
		\geq 65 years	26	(46%)	
	Smoking status	Female	36	(64%)	
		Male	20	(36%)	
	Histology	Current smoker	2	(4%)	
		Never smoker	31	(55%)	
		Ex-smoker	17	(30%)	
	UICC stage	n.d.	6	(11%)	
		Adenocarcinoma	54	(96%)	
		Adeno-squamous	1	(2%)	
	Primary <i>EGFR</i> mutation type*	Large-cell carcinoma	1	(2%)	
		IV	55	(98%)	
	TKI sequence	n.d.	1	(2%)	
		Exon 19 deletions	40	(71%)	
		L858R	13	(23%)	
		L861Q	1	(2%)	
E709G, G719S		1	(2%)		
TKI sequence	E709V, G719C	1	(2%)		
	sequential therapy	47	(84%)		
TKI sequence	osimertinib first line	9	(16%)		
	N = 41	<i>EGFR</i> dependent resistance to first and second generation TKI	T790M	36	(88%)
yes			48	(86%)	
N = 56	Primary <i>EGFR</i> mutation confirmed by liquid biopsy	no (after sequential therapy)	6	(11%)	
		no (previously treated with osimertinib first line)	2	(4%)	
		resistance alteration acquired	33	(80%)	
N = 41	Patients resistance under sequential therapy	no resistance alteration	8	(20%)	
		absolute number of detected resistance mechanisms	68		
		resistance alteration acquired	3	(43%)	
N = 7	Patients resistance under first line osimertinib	no resistance alteration	4	(57%)	
		absolute number of detected resistance mechanisms	5		

The most predominant *EGFR* activating mutations were the common exon 19 deletions (40/56, 71%), followed by L858R (13/56, 23%). In 3/56 (5%) patients, uncommon mutations were identified as the original driver, in two of which, concomitant *EGFR* mutations were present ((E709G; G719S), (E709V; G719C), L861Q). de novo T790M mutations in TKI naïve patients were not detected at primary diagnosis. The detected resistance spectrum to osimertinib is shown in Figure 1. A comprehensive patient specific list is provided in the supplements (Supplementary Table S1).

A Acquired resistance mechanism after second line osimertinib



B Acquired resistance mechanism after first line osimertinib

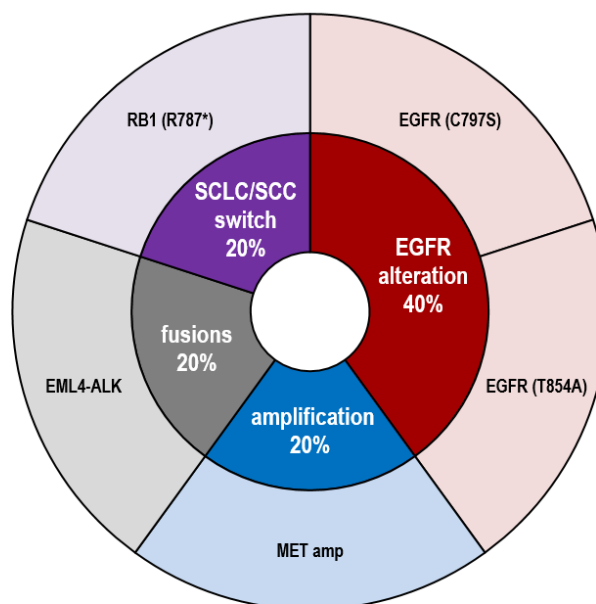


Figure 1. Spectrum of resistance alterations after osimertinib treatment. **(A)** Patients treated sequentially with first or/and second generation TKI followed by osimertinib. CtDNA analysis was performed at time of progression to second line osimertinib. Overall 68 resistance mutations were allocated to 41 patients' samples. Acquired EGFR alterations (N = 37, 54%) are colored in red, acquired amplifications (N = 7, 10%) in blue, alterations associated with kinase switch in yellow (N = 5, 7%), resistance mutations indicative for alternate pathway in green (N = 11, 16%), acquired gene fusions in grey (N = 4, 6%) and transformation into squamous-cell carcinoma / small cell lung

cancer (SCC/SCLC) in purple (N = 4, 6%). (B) Resistance alterations after first line osimertinib of seven NSCLC patients. Two (40%) *EGFR* resistance alterations (red), one (20%) *MET* amplification (blue), one *EML4-ALK* fusion (grey), one *RB1* mutation indicative for SCC/SCLC switch (purple) respectively. Patients were excluded from analysis in case the initial *EGFR* driver mutation was not detectable in plasma cfDNA.

3.2. Resistance Spectrum after First Line Osimertinib Treatment

Nine patients (9/56, 16%) in our cohort received osimertinib first line. Seven plasma samples confirmed the initial driver mutation. Five of them carried common *EGFR* mutations (exon 19 deletion/L858R) as the original driver, while two showed uncommon mutations L861Q and (E709G, G719S). These driver mutations are currently being discussed as being less sensitive to *EGFR* TKI [123-125].

In three of seven patients treated with osimertinib first line resistance mechanisms were detected. One patient (1/7, 14%) showed a C797S resistance mutation, in another, alterations in TP53 and RB1 indicated potential tumor transformation to SCLC [11,25,26] although no solid tumor biopsy was available for histological confirmation. In a third patient, multiple resistance mechanisms were observed in a single plasma sample, including *MET* amplification, *EML4-ALK* fusion (v3) and *EGFR* T854A mutation. The T854A mutation was found in combination with the driver L858R mutation with similar allelic frequencies, suggesting a concomitant (L858R; T854A) mutation. In vitro, T854A in combination with L858R was described as refractory to first/second generation TKI but sensitive to third generation *EGFR* TKI [126]. In four of seven (57%) patients no on or off target resistance alteration was detectable, although one of these cases displayed a BRCA2 mutation. Six patients (6/7, 86%) carried a TP53 mutation. Of note, no patient receiving osimertinib first line developed a T790M mutation, nor was it present prior to treatment.

3.3. Resistance Spectrum after Second Line Osimertinib Treatment

A number of 47 patients received osimertinib second line, of those, six plasma samples did not reveal the initial driver alteration, indicative of limited ctDNA shedding and therefore were excluded from further analysis. Of the remaining 41 patients, 37 (90%) had developed a T790M in response to a previously administered first or second generation TKI. Four patients were switched from first/second generation TKI to osimertinib despite the absence of T790M. In 20% (8/41) of plasma samples no obvious resistance alteration to osimertinib was detectable, although the primary driver mutation was readily visible and the liquid biopsy was sent to us at the time of progression to osimertinib. Nevertheless, in these cases clinically relevant passenger mutations were detectable at the time of progression, including inactivating mutations in ATM (2/41, 5%) and TP53 (6/41, 15%). Altogether, 33/41 (80%) of samples harbored at least one alteration defined as an acquired driver alteration, and therefore presumably causing resistance to osimertinib. In descending order of frequency, we detected *EGFR* C797S in 16/41 (39%) cases, followed by 12% (5/41) samples with non-C797S *EGFR* mutations including V843I, L718Q, C724S, and L792H, and one patient with (L718V, L718Q, L792H, G796S). The V843I mutation has been described as a lung cancer predisposing variant so we cannot exclude its germline origin (Variant Allelic Frequency, VAF = 82.3%) [127, 128]. In 7% (3/41) of cases ctDNA showed concomitant RB1 and TP53 inactivating mutations, indirectly indicative of transformation to SCLC. Due to a lack of FFPE material from these patients, this however could not be confirmed histomorphologically. *EGFR* amplification occurred in 10% (4/41) of cases and *MET* amplification in 3/41 (7%) cases, respectively. CTNNB1 point mutations occurred in three (7%), KRAS mutations as well as PIK3CA activating mutations in two (5%), and one of each ERBB2, PTEN, mTOR, and RET mutation in one (2%) of the 41 patient samples. Furthermore, we identified gene fusions of AGK-BRAF, RET-RUFY1, TACC-FGFR3, and DLG1-BRAF (each 1/41, 2%). Reports in the literature have defined “loss of T790M” as another mechanism of resistance to third generation *EGFR* TKI [129]. In our cohort, 14/41 (34%) plasma samples were devoid of T790M after osimertinib treatment, although it was detectable at an earlier time point.

Of note, the above listed resistance alterations did not necessarily occur mutually exclusive but in combinations of up to four in a single liquid biopsy sample.

It is still a matter of debate whether resistance mutations do preexist prior to TKI therapy in form of low frequency subclones or are secondarily acquired during the course of TKI therapy. For two patients with C797S positive plasma, FFPE tissue from primary diagnosis was available. We reevaluated the tissue derived DNA for a potential a priori presence of C797S by applying HC NGS with an limit of detection of 0.1% similar to

that used for ctDNA analysis. While the initial exon 19 deletions were confirmed in these patients, the C797S mutation was not detected in the TKI naïve setting (data not shown). However, the presence of preexisting subclones below detection levels cannot be completely ruled out.

3.6. Presence of Diverse EGFR and PIK3CA Molecular Subclones of in Patients' Plasma ctDNA after Second Line Osimertinib

Altogether, we detected the C797S variant in 16(39%) of 41 patients that received osimertinib as second line TKI, all of which displayed synchronous T790M in the liquid biopsy. In four of the 16 patients with detectable plasma C797S ctDNA, we detected two distinct nucleotide variations, specifically c.2389T > A and c.2390 G > C, both separately encoding for C797S. Consequently ctDNA of one patient displayed three distinct alleles (1) T790M (2) T790M + C797S (c.2389T > A) (3) T790M + (C797S c.2390 G > C) (Figure 2A). Another patient even displayed five different alleles originating from at least three different tumor subclones (1) T790M (2) C797S (c.2389T > A) (3) C797S (c.2390 G > C) (4) T790M + C797S (c.2389T > A) (5) T790M + C797S (c.2390 G > C) (Figure 2B).

We evaluated other single-nucleotide variants in that regard, assuming that our finding may represent subclonal divergence of resistance patterns beyond the protein level. Indeed we detected two activating PIK3CA mutations in one plasma sample, E545K (c.1633G > A, VAF = 3.81%) and E542K (c.1624G > A, VAF = 0.20%) giving rise to four subclones altogether in this specific patient (1) T790M (2) T790M + PIK3CA (L792H) (3) T790M + PIK3CA (G796S) (4) T790M + C797S (c.2389T > A) (Figure 2C).

Resistance in response to third generation TKI appears more heterogeneous than to earlier generation TKI as reflected by subclonal ramification at protein and DNA levels [108]. For example, one patient's ctDNA in our cohort was defined by multiple resistance alterations at the time of progression on second line osimertinib, including C797S, TACC-FGFR3 fusion along with the T790M from previous TKI treatment.

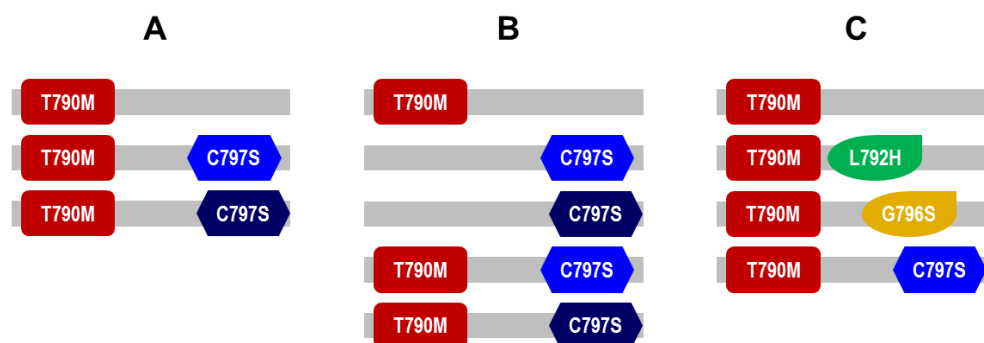


Figure 2. Schematic representation of EGFR and PIK3CA allelic variants in plasma samples of select patients after osimertinib second line treatment. (A) Three distinct alleles: T790M, T790M + C797S (c.2389T > A), T790M + (C797S c.2390 G > C) (B) Five distinct alleles: T790M, C797S (c.2389T > A), C797S (c.2390 G > C), T790M + C797S (c.2389T > A), T790M + C797S (c.2390 G > C) (C) Four distinct alleles: T790M, T790M + PIK3CA (L792H), T790M + PIK3CA (G796S), T790M + C797S (c.2389T > A).

4. Discussion.

With the intent to decipher resistance mechanisms in response to osimertinib, we retrospectively collected HC NGS data of liquid biopsies from 56 patients that progressed under osimertinib treatment.

Of the seven patients treated with osimertinib first line and cfDNA testing proved successful, one patient (14%) developed a C797S resistance mutation. C797X is a common resistance mechanism against osimertinib that has been previously described especially after second line osimertinib. In our cohort, 39% of patients treated with osimertinib in second line developed C797S mutations, which is significantly higher than the 15% C797X mutation rate observed in the AURA3 trial [130]. In AURA3, however, patients were tested for resistance alterations that either progressed or treatment was discontinued for other reasons. Thus, the patients in our cohort may be more clearly defined by clinical progression at the time of liquid biopsy taking.

This possibility is strengthened by the observation that in AURA3, 60% of patients had no known resistance alteration versus merely 20% in our cohort [130]. It could further be speculated that different sensitivity levels of liquid biopsy might be one of the reasons for the difference. The assay we used was validated with a lower limit of detection of 0.1% for single nucleotide variants, while the performance specifications of the assay used in AURA3 indicates a range of 0.05–0.25% for single nucleotide variants [130].

In one patient, concomitant TP53 and RB1 mutations suggested SCLC transformation. Despite the limitation that we could not confirm this finding histomorphologically, it will be interesting to see whether combination of osimertinib with chemotherapy (FLAURA2 trial) will prevent such resistance. Furthermore, studies are underway, combining EGFR TKI with VEGF inhibitors and it will be instructive to observe its potential impact on resistance pattern [131].

Regarding the second line osimertinib subgroup, all except one C797S mutated patients showed additional resistance mechanisms. Multiple resistance mechanisms highlight the importance of complex and well-designed molecular diagnostic assays and might be one explanation for primary resistance to osimertinib in second line.

Among the additional alterations, we detected gene translocations including EML4-ALK (v3), TACC3-FGFR3, RET-RUFY1, and two different BRAF fusions. As detection of fusions by RNA-based assays from liquid biopsy is challenging, DNA-based HC NGS provides a valid alternative. Further, we detected activating mutations in KRAS, ERBB2, RET, and CTNNB1, presumably conferring a new oncogenic driver in the respective tumor. The PIK3CA/PTEN/mTOR axis was mutated in four patients, including the hotspot mutation E545K. In one patient, two simultaneous PIK3CA mutations were detectable, suggesting polyclonal resistance development. CtDNA of four patients displayed concomitant RB1 and TP53 mutations indicative of SCLC transformation, however no solid tumor biopsy was available for histological confirmation. Amplifications of MET were detected in 7% of patients treated with second line. In the FLAURA trial 15% of patients treated with first line osimertinib developed MET amplification, comparing well to our data, although patient number in our cohort was limited [132]. In our second line osimertinib group, 7% of patients displayed MET amplification, roughly half the frequency of AURA3 with 19% MET amplification [130].

Irrespective of the line of treatment, testing only for the C797X hotspot would have detected merely half of the actual resistance alterations compared to HC NGS. Considering the potential off-label use of targeted therapeutic options and available clinical trials, we identified another 19 % of patients with druggable alterations such as BRAF- and FGFR3-fusions and clinically relevant mutations in RET, ERBB2, PIK3CA, and MTOR. These findings underline the necessity of biomarker-directed studies such as the ORCHARD trial, allowing for individual molecular stratification based on the type resistance alteration post osimertinib progression [133].

“Loss of T790M” is an often cited concept of osimertinib resistance and a recent meta-analysis indicates prolonged PFS in cases where T790M persists [129]. In our cohort, T790M did not occur in patients treated with osimertinib first line. In contrast, about 90% of patients in our cohort did develop T790M upon treatment with EGFR TKI of the first or second generation. After these patients were switched to osimertinib, 34% had “lost” T790M, since it ceased to appear in the liquid biopsy. The T790M point mutation increases ATP affinity of the EGFR ATP binding pocket and confers the most common type of resistance in response to ATP equivalent TKI of the first and second generation [134]. In contrast, osimertinib overcomes T790M through increased hydrophobic interactions with Met790 versus Thr790 and an improved rate of covalent bond formation via more effective positioning of the acrylamide residue [135]. Suppression of T790M positive tumor cell clones along with synchronous appearance of resistance alterations in response to osimertinib therefore appears to be a compelling mechanism of tumor evasion to selective TKI pressure. The term “loss of T790M” is however suggestive of genetic clearance of T790M on a previously mutated allele. In that sense the term may be misleading because mechanistically, suppression of the T790M containing tumor subclone may be the underlying reason. Our ctDNA analyses at the time of osimertinib progression revealed undetectable levels of T790M in a significant portion of cases, presumably reflecting lack of DNA shedding of T790M positive subclones.

Our data supports an emerging picture that osimertinib may promote molecular diversification to a level beyond that of TKI of the first and second generation.

Intriguingly, in four patients we detected development of both EGFR C797S versions (c. [2389T > A]; [2390G > C]), indicative of a subclonal ramification even beyond the protein level that may mirror the effect of

a more selective TKI pressure. We want to point out, however, that one of these patients received rociletinib, another third generation TKI prior to osimertinib, so at least in this specific case the resistance alteration cannot clearly be attributed to either TKI. Plasma ctDNA analyses are by nature snapshots of a dynamic and heterogeneous tumor development. In the absence of longitudinal tissue biopsies including metastases, it is not possible to trace back the respective time points where clonal branching had occurred.

A fundamental debate is still ongoing whether resistance emerges by selection of preexisting low level subclones or by de novo acquisition of mutated alleles [136]. We therefore retrospectively sequenced solid tumor biopsies of two patients whose ctDNA revealed presence of nucleotide changes that lead to C797S. The comparison of FFPE with liquid samples somewhat favored the concept of de novo acquisition by not containing C797S mutations or the FGFR3 fusion, however, the coverages in the FFPE samples did not allow us to draw distinct conclusions in this regard (data not shown).

First and second generation EGFR TKI act as non-covalently binding competitive ATP equivalents and, therefore, target EGFR irrespectively of wildtype or mutated configuration. T790M sterically hinders binding of these TKI to the ATP-binding site of EGFR [137]. Osimertinib covalently binds to EGFR residue C797X and therefore specifically targets activating EGFR mutations including T790M, but to a lesser extent wildtype EGFR. In vitro, osimertinib acts more effective, as represented by lower IC₅₀ values than most first and second generation TKI with minimal off-target effects translating into less adverse events in patients [138]. This has led to the concept of sequential therapy, starting with a TKI of first or second generation and upon relapse and confirmation of T790M adjusting second line treatment to osimertinib to achieve prolonged overall TKI effectivity. Based on FLAURA trial, osimertinib has been approved for first line treatment with a better outcome (PFS and OS) compared to erlotinib or gefitinib [104]. Especially the improved OS in the FLAURA trial has somewhat settled the discussion of sequence therapy versus “best first”. As it is still unclear which patients might develop T790M and which therefore might benefit from a sequence strategy, the standard of care has moved to osimertinib in first line. However, concepts of early detection of T790M and early treatment with osimertinib are currently investigated in clinical trials and it will be important to see, whether these concepts will lead to an improved OS for the overall population in comparison to osimertinib first line.

As osimertinib is about to receive expanded approval for the adjuvant setting, increasing numbers of NSCLC patients of all stages with an inherently better prognosis and longer therapeutic interval will be treated with osimertinib in the future. Other TKI are currently not approved in the adjuvant setting, hence, the use of osimertinib will be without alternative for early stage tumors when it comes to TKI treatment. Studies are urgently needed to assess the potential risk of osimertinib to promote fast subclonal tumor evolution inducing diversification of resistance.

5. Conclusions

Resistance to osimertinib imposes a significant challenge as post-osimertinib options are limited as of now. Our study confirms the complexity and wide spectrum of resistance mechanisms, such as rare gene fusions, copy number alterations, cellular transformation, and activation of alternate pathways after osimertinib treatment. The applied HC NGS liquid biopsy proved clinical utility by identifying actionable alterations. These data highlight the importance of longitudinal and comprehensive molecular testing and might be crucial to decipher third generation TKI resistance mechanisms to guide subsequent therapies.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1. Patient treatment and alterations detected with liquid biopsy in the 56 patient’s cohort of late stage NSCLC during disease progression under TKI treatment.

Author Contributions: Conceptualization, B.J., S.S., M.T., L.C.H., and M.F.; Data curation, S.S., L.K., J.R., and H.O.R.; Formal analysis, B.J., S.S., L.K., and J.R.; Funding acquisition, F.G., M.T., and L.H.; Investigation, B.J., S.S., L.K., J.R., P.H., F.G., L.C.H., and M.F.; Methodology, B.J., B.K., and L.C.H.; Project administration, B.K., F.G., M.T., and L.C.H.; Resources, P.H., C.G., F.G., M.T., and L.C.H.; Supervision, F.G., M.T., and L.C.H.; Visualization, B.J. and S.S.; Writing—original draft, B.J., S.S., and M.F.; Writing—review and editing, B.J., S.S., J.R., H.O.R., L.D., P.H., C.G., F.G., M.T., and M.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of University of Oldenburg (FP-Project 2014-I)

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: We thank Yannick Reufer for data adjustments and NGS Team HpH for extraordinary technical support, Judith Müller-Eisert and Frauke Leenders for language support.

Conflicts of Interest: All other authors do not declare any conflict of interest.

Appendix A

List of genes included in NEOliquid v1. NEOliquid v1 comprises of 39 genes and is designed to detect point mutations, small insertions and deletions in *ALK* (NM_004304), *ARAF* (NM_001256196), *ATM* (NM_000051), *ATR* (NM_001184), *BRAF* (NM_004333), *BRCA1* (NM_007300), *BRCA2* (NM_000059), *CDK4* (NM_000075), *CDKN2A* (NM_001195132), *CDKN2B* (NM_004936), *CTNNB1* (NM_001904), *DDR2* (NM_001014796), *EGFR* (NM_005228), *ERBB2* (NM_004448), *FGFR1* (NM_001174067), *FGFR2* (NM_000141), *FGFR3* (NM_001163213), *HRAS* (NM_001130442), *IDH1* (NM_001282387), *IDH2* (NM_002168), *KEAP1* (NM_203500), *KIT* (NM_000222), *KRAS* (NM_004985), *MAP2K1* (NM_002755), *MDM2* (NM_002392), *MET* (NM_001127500), *MTOR* (NM_004958), *NFE2L2* (NM_006164), *NRAS* (NM_002524), *PDGFRA* (NM_001347829), *PIK3CA* (NM_006218), *PTEN* (NM_000314), *RB1* (NM_000321), *RET* (NM_020975), *ROS1* (NM_002944), *STK11* (NM_000455), *TP53* (NM_000546), *TSC1* (NM_000368), *TSC2* (NM_000548). Detection of InDels is possible in intron 13 of *MET*. The test supports the detection of copy number amplifications of *EGFR*, *ERBB2* and *MET*. Gene fusions are evaluated in 7 genes in the following regions: *ALK* (NM_004304): introns 18-21, *BRAF* (NM_004333): introns 6-10, *FGFR1* (NM_001174067): introns 5-6, 15-18, *FGFR2* (NM_000141): introns 1, 8-10, 15-17, *FGFR3* (NM_001163213): introns 3, 5-6, 11-17, *RET* (NM_020975): introns 6-11, *ROS1* (NM_002944): introns 31-35.

Supplementary Table 1. Patient treatment and alterations detected with liquid biopsy in the 56 patient's cohort of late stage NSCLC during disease progression under TKI treatment. (X) mutation present from a single nucleotide change; (XX) mutation present from two nucleotide changes leading to C797S: (c.2389T>A and c.2390G>C); *TP53* in bold letter because of *RBI* mutations suggesting a small-cell transformation SCLC. Abbreviations: erlotinib (ERL), gefitinib (GEF), rociletinib (ROC), afatinib (AFA), osimertinib (OSI). Variant of unknown significance (VUS)

patient	<i>EGFR</i> driver confirmed by liquid biopsy	TKI received	<i>EGFR</i> dependent resistance			<i>EGFR</i> independent putative resistance					passenger mutation		
			T790M	C797S	other	amplification	SCLC/SCC switch	kinase switch	fusion	alternate pathway	(in)activating	VUS	
P15	E746_A750del	OSI		X								<i>TP53</i> (R110L)	<i>PIK3CA</i> (K111del)
P55	L858R	OSI			T854A	<i>MET</i>				<i>ALK-EML4</i> (v3)		<i>TP53</i> (R248Q)	<i>MET</i> (A179T)
P29	L858R	OSI										<i>STK11</i> (L105*); <i>TP53</i> (G244V)	
P27	L858R	OSI										<i>TP53</i> (E336fs*10)	<i>KEAPI</i> (E134K)
P43	L858R	OSI										<i>BRCA2</i> (E2981fs); <i>TP53</i> (Y234C)	<i>ALK</i> (R1084H); <i>PDGFRA</i> (R829*)
P46	L861Q	OSI											<i>BRCA1</i> (I562V)
P49	E709G, G719S	OSI										<i>TP53</i> (R156P, E298*)	<i>TSC2</i> (I723V); <i>ATM</i> (E586_G587delinsDC, A425V); <i>FGFR3</i> (E330Q); <i>CTNNB1</i> (K435N)
P20	non	OSI											
P30	non	OSI											
P44	E746_S752delinsV	ERL, OSI	loss of		G724S								<i>ATM</i> (K3004E)
P16	E746_S752delinsV	AFA, OSI, CRI	loss of			<i>EGFR</i>	<i>RBI</i> fusion (intergenic)					<i>TP53</i> (Q167*); <i>STK11-STK11</i>	<i>RBI</i> (T502I); <i>CTNNB1</i> (I231M); <i>TSC2</i> (D1406N)
P51	E746_A750del	AFA, OSI	loss of			<i>MET</i>						<i>TP53</i> (R175H)	<i>ROS1</i> (R448H)
P14	L858R	ERL, OSI	loss of			<i>MET</i>							<i>FGFR1</i> (R749H)
P32	E746_A750del	AFA, OSI	loss of					<i>ERBB2</i> (V777L, 1767M, S310Y)		<i>KRAS</i> (G13D)		<i>BRCA2</i> (T3030fs, N2134fs); <i>TP53</i> (R249S)	
P37	E746_A750del	ERL, OSI	loss of							<i>RET-RUFY1</i>	<i>PIK3CA</i> (E545K, E542K)	<i>TP53</i> (Q136P)	<i>EGFR</i> (R932C); <i>PIK3CA</i> (R87T)

P06	E746_A750del	AFA, OSI	loss of					<i>KRAS</i> (G12D)	<i>ATR</i> (R2148*); <i>TP53</i> (W91*)	<i>ATR</i> (H1520R); <i>MTOR</i> (D2512Y, R2505*); <i>RET</i> (A641T)
P42	E746_A750del	AFA, OSI	loss of					<i>PIK3CA</i> (E545K)	<i>CDKN2A</i> fusion (intergenic)	<i>ERBB2</i> (T216M)
P41	E746_A750del	AFA, OSI	loss of						<i>TP53</i> (Q192*)	
P19	L747_S752del	ERL, AFA, OSI	loss of							<i>MTOR</i> (M2366V)
P04	K745_A750delinsK	ERL, OSI	loss of						<i>TP53</i> (R158P)	
P17	L747_T751delinsP	GEF, AFA, OSI	loss of							<i>PDGFRA</i> (E336G)
P11	E746_A750del	GEF, OSI	loss of							
P38	E746_A750del	GEF, OSI	loss of							<i>ALK</i> (P230Q), <i>TSC2</i> (R905Q)
P35	L858R	AFA, OSI	X	X	L718V, L718Q, L792H, G796S	<i>EGFR</i>			<i>TP53</i> (c.376-2A>T)	<i>FGFR3</i> (D760N); <i>TSC2</i> (R1451S); <i>BRCA1</i> (K556N)
P31	L747_P753delinsS	GEF, ERL, AFA, OSI	X	X		<i>EGFR</i>				
P08	L858R	ERL, OSI	X	X			<i>RBI</i> (G203fs)		<i>TP53</i> (E198*)	
P12	L858R	ERL, OSI	X	X				<i>ERBB2</i> (S310F)		<i>ALK</i> (G35fs)
P23	L858R	AFA, OSI	X	X				<i>AGK-BRAF</i>	<i>CTNNB1</i> (S37Y)	
P56	L747_P753delinsS	AFA, OSI	X	X				<i>DLG1-BRAF</i>	<i>IDH2</i> (R140Q); <i>TP53</i> (Q104*, S241F)	<i>EGFR</i> (M1002T)
P13	E746_T751delinsA	AFA, OSI	X	X					<i>CTNNB1</i> (S37Y)	<i>TP53</i> (G199V)
P33	E746_A750del	AFA, OSI	X	X					<i>MTOR</i> (Y1974H)	<i>ATM</i> (H1352Q)
P24	L747_T751delinsP	AFA, OSI	X	X					<i>TP53</i> (R248Q)	
P02	K745_A750delinsK	AFA, ROC, OSI	X	X						<i>TSC1</i> (A659V)
P18	E746_A750del	ERL, OSI	X	X					<i>TP53</i> (V157F)	<i>EGFR</i> (G459A)
P39	E746_A750del	GEF, OSI	X	X					<i>CTNNB1</i> (S37Y)	<i>ATM</i> (N1719D)
P03	K745_A750delinsK	ERL, OSI	X	XX	V843I	<i>EGFR</i>		<i>KRAS</i> (A146V)		<i>DDR2</i> (S215F), <i>ROS1</i> (I595del)
P05	E746_A750del	ERL, ROC, OSI	X	XX				<i>TACC-FGFR3</i>		<i>TSC1</i> (R992T)
P48	E746_A750del	AFA, OSI	X	XX					<i>TP53</i> (R158L)	
P28	E746_A750del	AFA, OSI	X	XX						<i>ARAF</i> (G499E), <i>MET</i> (M1247T), <i>TP53</i> (I162N)

P36	L858R	ERL, OSI	X	L718Q	<i>MET</i>	<i>RBI</i> (S114fs, c.1960+1G>A)	<i>TP53</i> (V73fs)
P54	L858R	AFA, OSI	X	L792H		<i>RET</i> (V804L)	<i>TP53</i> (I254N)
P07	L858R	AFA, OSI	X				
P22	E746_A750del	AFA, OSI	X				<i>ATM</i> (c.2921+1G>T) <i>ATR</i> (S2264L), <i>NFE2L2</i> (L266F), <i>EGFR</i> (R962C)
P34	E746_A750del	AFA, OSI	X				<i>TP53</i> (R248Q)
P01	L747_P753delinsQ	ERL, OSI	X				<i>ATM</i> (R3008H)
P21	L858R	GEF, OSI, AFA	X				<i>TP53</i> (V216L) <i>ERBB2</i> (D1252N)
P10	E746_A750del	AFA, GEF, ERL, OSI				<i>PTEN</i> (S399fs)	<i>TP53</i> (H179Y) <i>MTOR</i> (R731H)
P52	E746_A750del	AFA, GEF, OSI					<i>TP53</i> (R249G)
P26	E746_A750del	AFA, OSI					
P45	E709V, G719C	ERL, OSI					<i>TP53</i> (I195N,W53*)
P53	<i>non</i>	AFA, GEF, OSI					
P09	<i>non</i>	AFA, OSI					
P47	<i>non</i>	AFA, OSI					
P50	<i>non</i>	AFA, OSI					
P40	<i>non</i>	ERL, OSI					
P25	<i>non</i>	GEF, OSI					

4 PUBLIKATION (III) CtDNA Bestimmung einer Patientin mit HER2 mutiertem NSCLC im Therapieverlauf unter Trastuzumab-Deruxtecan

Die Behandlung von HER2 mutierten NSCLC ist Gegenstand aktueller Studien, jedoch ist derzeit keine zielgerichtete Therapie als Behandlungsstandard für Lungentumoren zugelassen. Der nachfolgende Fallbericht beschreibt den Therapie- und Krankheitsverlauf einer 61-jährigen Patientin, Nie-Raucherin, mit HER2 mutiertem Adenokarzinom der Lunge. Seit der Erstdiagnose im April 2020 erhielt die Patientin zuerst Chemotherapie, gefolgt von dem Antikörperkonjugat Trastuzumab-Deruxtecan (Off-Lable-Use) und schließlich, bei Krankheitsprogress, eine Kombination aus Ramucirumab und Docetaxel. Im Zeitraum von Mai 2021 bis Februar 2022 wurde anhand von 12 Liquid Biopsies der Krankheitsverlauf und die Allelfrequenz der bekannten HER2 p.G776delinsVC Insertionsmutation vergleichend beobachtet. Neben der bereits diagnostizierten HER2 Exon 20 Insertion, konnte in sechs der 12 Plasmaproben zusätzlich eine potentielle Resistenzmutation im Gen MET detektiert werden.

Dieser Fallbericht zeigt, dass die molekulargenetische Testung an zellfreier Tumor DNA im Therapieverlauf möglich ist und Aufschluss über die Dynamik der Erkrankung geben kann. Die minimalinvasive Testung durch Liquid Biopsy kann dazu beitragen Resistenzmutationen frühzeitig zu erkennen und die damit einhergehenden Konsequenzen auf Therapieebene zu lenken.

⋮

Die folgende Publikation (Fallbericht) wurde am 30. Januar 2023 in der frei zugänglichen Fachzeitschrift Current Oncology, welche vom Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) herausgegeben wird, publiziert (Peer-Review). Die Publikation war Teil des Current Oncology (Section Thoracic Oncology), Volume 30 Issue 2 [44].

Case Report

Response of an HER2-Mutated NSCLC Patient to Trastuzumab Deruxtecan and Monitoring of Plasma ctDNA Levels by Liquid Biopsy

Markus Falk ¹, Eva Willing ¹, Stefanie Schmidt ¹, Stefanie Schatz ¹, Marco Galster ², Markus Tiemann ¹, Joachim H. Ficker ³ and Wolfgang M. Brueckl ^{3,*}

¹ Institute for Histopathology Hamburg, Fangdieckstraße 75A, 22547 Hamburg, Germany;

² Department of Radiology, Paracelsus Medical University, General Hospital Nurnberg, Ernst-Nathan-Str.1, 90419 Nuremberg, Germany

³ Department of Respiratory Medicine, Allergology and Sleep Medicine, Paracelsus Medical University, General Hospital Nurnberg, Ernst-Nathan-Str.1, 90419 Nuremberg, Germany

* Correspondence: wolfgang.brueckl@klinikum-nuernberg.de

Citation: Falk, M.; Willing, E.; Schmidt, S.; Schatz, S.; Galster, M.; Tiemann, M.; Ficker, J.H.; Brueckl, W.M. Response of an HER2-Mutated NSCLC Patient to Trastuzumab Deruxtecan and Monitoring of Plasma ctDNA Levels by Liquid Biopsy. *Curr. Oncol.* **2023**, *30*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Received: 15 December 2022

Accepted: 11 January 2023

Published: 30 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: HER2-targeted therapy is currently the subject of several studies in lung cancer and other solid tumors using either tyrosine kinase inhibitors (TKI) or targeted-antibody–drug conjugates. We describe a 61-year-old female patient with HER2 mutated adenocarcinoma of the lungs who received chemo-immunotherapy, followed by trastuzumab deruxtecan (T-DXd) and third-line Ramucirumab/Docetaxel at disease progression. Plasma ctDNA monitoring was obtained at 12 timepoints during therapy and revealed HER2 mutation allele frequencies that corresponded to the clinical course of disease. HER2-targeted T-DXd therapy resulted in a profound clinical response and may be an option for NSCLC patients carrying an activated HER2 mutation. Longitudinal liquid biopsy quantification of the underlying driver alteration can serve as a powerful diagnostic tool to monitor course of therapy.

Keywords: HER2 mutation; trastuzumab deruxtecan; liquid biopsy; disease monitoring

1. Introduction

Human epithelial growth factor receptor 2 (HER2, also known as ERBB2) is a member of the ErBB receptor tyrosine kinase family, which have been identified as oncogenic driver genes in 2–4% of non-small-cell lung cancers (NSCLC) [43]. HER2 targeting has influenced the treatment of breast and gastric cancers. Recently, a HER2-directed antibody–drug conjugate, trastuzumab deruxtecan, has been granted by the FDA for metastatic NSCLC patients who have received prior systemic therapy. Classically, patients with HER2 mutant NSCLC have been treated with standard chemo- or immunotherapy, which are known to have limited activity in second- or third-line treatment [139, 140]. HER2 is a complex therapeutic target, as point mutations, protein overexpression and gene copy number variations can occur and may respond differently to HER2 inhibition. Three-dimensional modeling has demonstrated that HER2 exon 20 insertion mutations induce a constitutively active kinase conformation and are therefore regarded as activating oncogenic mutations [141]. In breast cancer, usually HER2 protein expression and HER2 gene amplification are correlated to one another, while in lung cancer this correlation appears to be weaker [142, 143]. HER2 is overexpressed in 2.4–38% of lung cancer cells. HER2 overexpression

and HER point mutations are not clearly associated and although both alterations can occur mutually within the same tumor, this is only rarely the case [144]. Preclinical data have demonstrated that the HER2 receptor together with the attached HER2-antibody–drug conjugate is internalized more efficiently in cells that carry an activating HER2 point mutation. This may indicate that HER2 point mutation, rather than HER overexpression, is driving the therapeutic effect of T-DXd.

Accordingly, several strategies are currently being evaluated to target HER2, including TKI, bispecific antibodies, or antibody–drug conjugates [144]. Despite the lack of large prospective studies, it is widely accepted that the response to checkpoint inhibition in tumors with driver mutations is generally poor [145, 146]. T-DXd is an antibody–drug conjugate directed against HER2 that showed superior efficacy to trastuzumab emtansine in breast cancers that had progressed on trastuzumab and taxane [147]. Very recently, excellent outcome data of the DESTINY-Breast04 study on HER2 low breast cancer patients have been published [148].

Analysis of HER2 mutations is usually performed using tissue samples, but analysis based on liquid biopsies is also feasible and plasma-derived ctDNA (circulating tumor DNA) can serve as an analyte to detect low-level molecular alterations in patients with solid tumors [149]. We used a hybrid capture (HC) next-generation sequencing (NGS)-based approach to track an HER2-activating mutation that was primarily diagnosed by a different pathology on an FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) tissue sample using amplicon-based NGS technology.

2. Case Report

In April 2020, a 61-year-old female patient presented with cough and increasing dyspnea that had developed within six weeks. Because antibiotics were not effective, the general practitioner arranged a CT scan of the thoracic region. The patient is a never smoker, retired school teacher and married, her father had died of lung cancer. Apart from cataract surgery, the patient had no relevant medical history. Clinical and pathological diagnosis including PET-CT and pathological evaluation was performed, which revealed a TTF1-positive adenocarcinoma in the left upper lobe with a solitary pulmonary metastasis (cT3 cN2 M1a (pul), UICC IVA). Primary tumor biopsy (FFPE) showed no PD-L1 expression (TPS 0%), but an ERBB2/HER2 deletion–insertion variant in exon 20. The p.G776delinsVC (c.2326_2327insTTT) mutation was found with an allelic frequency of 43% as determined by semi-conductor-based NGS (Ion GeneStudio™ S5 Plus System, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and no further alteration in a set of 50 selected genes was detected at primary diagnosis. The p.G776delinsVC is a relatively rare variant that has been described in 0.14% of NSCLC [150]. Similar to other typical exon 20 insertion variants, the p.G776delinsVC is located within the ATP-binding region of the HER2 kinase domain.

From May to July 2020, the patient received four cycles of a palliative first-line chemo-immuno combination, including pembrolizumab/pemetrexed/carboplatin according to the approved KN 189 regimen. CT scans of the thorax and abdomen revealed a mixed response in August 2020, so two more chemo-immuno therapies were planned after consolidating radiation of the right lung tumor. While the fifth course was administered on time, the sixth cycle was postponed until October due to leucopenia (CTC grade 3). Regularly performed CT scans confirmed stable disease. In May 2021, after the tumor had progressed again, targeted therapy with T-DXd was started as second-line therapy (as off-label use as the drug is not approved for this indication by the EMA) and partial remission was observed for seven months followed by clinical progression in January (Figure 1). There were no toxicities CTC grade 3 or 4 during the time of treatment with T-DXd. In addition, there was no delay or dose reduction. In January 2022, after progressive disease had occurred with new pulmonary metastases, treatment was switched to third-line ramucirumab, a VEGFR antibody in combination with docetaxel. In April 2022, after three months of ramucirumab plus docetaxel, the patient presented with a partial remission, regression of right pulmonary metastases, absence of new metastases, and near complete remission of pleural spread. However, due to significant side effects, including mucositis, nausea, epistaxis, watery eyes and hand-foot syndrome, the patient requested a three-month treatment break and is still living without treatment (June 2022).

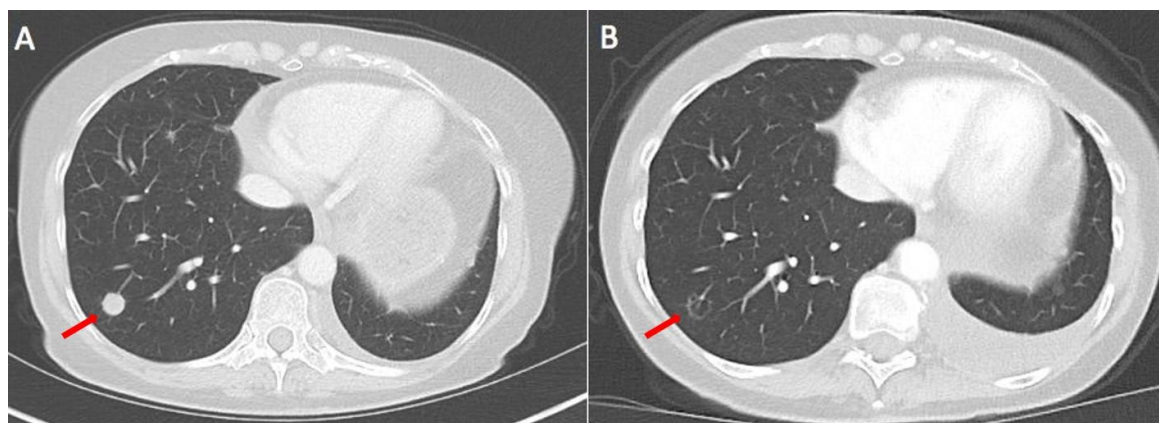


Figure 1. CT scans before start of T-DXd and after 5 months of treatment. One pulmonary nodule in the right lower lobe (arrow) almost diminishes. In addition, there is a small increase in pleural effusion in the left thorax (no malignant pleural effusion). (A) CT scan before start of T-DXd; (B) CT scan after 4 cycles of T-DXd; arrows indicate a lung metastasis which had diminished on Figure B.

Starting with the initiation of T-DXd in May 2021, until the end of February 2022, a total of 12 consecutive plasma samples were collected, cfDNA was extracted and analyzed via HC NGS technology using the SureSelect XT HS2 DNA Library Preparation and Target Enrichment Kit from Agilent according to the manufacturer’s protocol. ctDNA was analyzed for the presence of point mutations and gene fusions in a set of 50 lung-cancer-associated genes [148]. The SureSelect XT HS2 DNA Library Preparation and Target Enrichment Kit is provided with molecular barcodes to remove false-positive events and to detect mutations with low allele frequency, necessary for liquid biopsy. For successful processing, 120 mrp (million read pairs) were required to achieve the necessary mean coverage 2500× over the territory of genes of interest. ctDNA analysis was performed using the Illumina platform, NextSeq 2000 System was used with the flow cell P3 (200 cycles (2× 100 bp) and output 240 Gb).

The HER2 p.G776delinsVC mutation was present with an allele frequency (AF) of 6.05 shortly after the start of T-DXd at the beginning of May 2021 and fell below the assay-validated lower limit of detection of 0.15% AF about four weeks later in June 2021, thus indicating a lack of tumor DNA shedding at this time. From June 2021 to February, HER2 p.G776delinsVC ctDNA levels increased steadily while under T-DXd, reaching a maximum of AF 6.15% in early February, which correlated to clinical progress. In six of the twelve samples, the potential MET resistance alteration MET p.H112Y was detectable, emerging about two months into T-DXd therapy (Figure 2D). The allele frequency ranged from 0.04 to 0.24% and, thus, was close to the validated LOD of 0.15% of the assay.

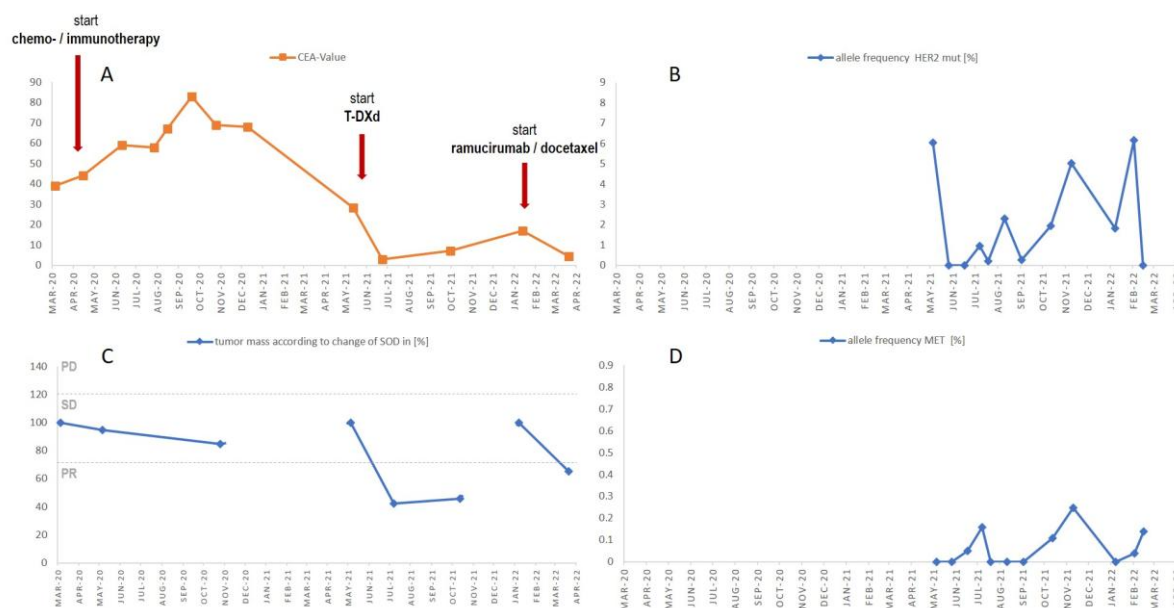


Figure 2. CEA levels and change in SOD according to RECIST during 1st-, 2nd- and 3rd-line therapy. In addition, allele frequencies of HER2 and MET mutations are shown during treatment with T-DXd. (A) CEA values, (B) HER2 p.G776delinsVC allele frequency, (C) RECIST 1.1 criteria, change of sum of diameters as % of tumor mass. PD progressive disease, SD stable disease and PR partial response. (D) MET p.H1112Y allele frequency. Red arrows indicate change in therapy.

Except for the MET p.H1112Y, no further potential resistance mechanism was detected in any of the plasma samples. In addition to ctDNA, carcino-embryonic antigen (CEA) protein levels were determined in blood from the start of chemo-immuno combination therapy in March 2020 throughout three lines of therapy until March 2022. With the start of T-DXd, data were available for both CEA and ctDNA, and the two parameters displayed a high degree of concordance, especially during the first phase after the onset of T-DXd from May through June 2021 (Figure 2A, B).

3. Discussion

We describe the therapeutic course of a 61-year-old, female HER2 mutation-positive NSCLC patient who responded profoundly but transiently to the antibody–drug conjugate T-DXd administered after relapse to first-line pembrolizumab/pemetrexed/carboplatin. Liquid-biopsy-derived ctDNA levels were used to track the driver HER2 exon 20 insertion and to detect potential resistance alterations. At the time of T-DXd initiation, HER2 p.G776delinsVC was present at relatively high allelic frequency 6.05%, but this decreased after one month of therapy. Over the following six months, the proportion of mutated alleles gradually increased again, and finally reached levels similar to those pre-T-DXd. These kinetics corresponded exactly to the clinical course of disease, however not all liquid biopsy assessments proved successful, for instance the sample taken in September 2021 did not show HER2-mutated ctDNA. Upon reevaluation, this sample showed decreased quality parameter which may be partly responsible for the low allele frequency, however preanalytical issues cannot be ruled out.

The HER2 p.G776delinsVC is a relatively rare mutation in lung cancer but has been previously identified as an oncogenic driver [4]. Most members of the receptor tyrosine kinase ErbB family are activated upon ligand binding. In the case of HER2, in contrast, homo- and heterodimerization with other members of ErbB is the main path to induce downstream signaling, providing a clinical rationale for the use of an HER2-targeted antibody [151]. T-DXd is an antibody–drug conjugate directed against HER2 and is currently being investigated for the treatment of solid tumors in several trials. However, in the unconjugated form, trastuzumab in combination with chemotherapy has yielded disappointing results in NSCLC, reflected by a lack of response independent of the HER2 status [152-154]. During the preparation of this manuscript, the phase II DESTINY-Lung01 trial was published, which enrolled 91 NSCLC patients with HER2 mutations who had been refractory to standard therapy. This showed an objective response rate of 55% for T-DXd and a median duration of response of 9.3 months. Third- or higher-degree drug-related adverse events occurred in 46% of patients, especially neutropenia (19%), anemia (10%) and nausea (9%) [141]. However, to the best of our knowledge, no data have yet been published on the monitoring of ctDNA during treatment with T-DXd.

Although CEA is not an established biomarker in NSCLC, some reports have supported its role as a sensitive and specific indicator of objective response to chemotherapy and as a predictive marker of outcome during EGFR-TKI therapy [155, 156]. CEA levels were monitored throughout the different lines of therapy and their course was concordant with the pattern of ctDNA plasma levels (Figure 2A, B).

Since a limited number of patients have been treated with T-DXd for metastatic NSCLC as of today, little is known about the nature and frequency of potential resistance mutations. Based on experience with trastuzumab maytansine, the first in class agent in breast cancer, a heterogeneous spectrum of on-target and off-target resistance can be expected, including loss of HER2 expression, a kinase switch to HER3 or EGFR, dysregulation of PI3K signaling, or even dysfunctional intracellular trafficking and metabolism [157]. Only a few of the above alterations can be reliably detected by a ctDNA-based hybrid capture NGS. We did detect an MET p.H1112Y point mutation emerging after about two months of T-DXd therapy. The low molecular allele frequencies (0.004–0.25%) make it rather unlikely that this specific MET alteration is the sole contributor to tumor relapse. On the other hand, p.H1112Y is located within the kinase domain of MET and has been defined as activating mutation. In addition, MET alterations have been described as a paradigm mechanism of

resistance to targeted therapies; therefore, despite the low AF, we cannot rule out the possibility of a clinically relevant mechanism of resistance and a potential therapeutic target [108, 142, 158].

4. Conclusions

In summary, we demonstrated that ctDNA monitoring during T-DXd therapy for metastatic NSCLC is feasible and has a good association with tumor response. Disease monitoring of solid tumors is primarily performed by CT imaging and is therefore labor- and cost-intensive. Patients treated with targeted therapy develop characteristic resistance mechanisms on the molecular level. These can be complex and may show subclonal diversity and can be restricted to certain parts of the tumor/metastases. Liquid biopsy testing has the advantage of detecting resistance alterations at the molecular level, ideally before progress is detectable on the imaging level. Although liquid biopsy testing by NGS is currently not reimbursed in Germany, it might represent a future perspective in monitoring disease control of solid tumors. It is important to understand the underlying resistance alterations in detail to adjust next-line targeted therapy. Resistance alterations are heterogeneous and include on-target point mutations or gene amplifications and a wide spectrum of off-target alterations, including translocations, gene amplifications and others [108, 159].

Author Contributions: Conceptualization, M.F., W.M.B.; methodology, M.F., E.W., S.S. (Stefanie Schmidt), M.T.; software, M.F., E.W., S.S. (Stefanie Schatz); validation, M.F., E.W., S.S. (Stefanie Schmidt), S.S. (Stefanie Schatz), M.T.; formal analysis, M.F., S.S. (Stefanie Schmidt), S.S. (Stefanie Schatz); investigation, all authors; resources, J.H.F., M.G., W.M.B.; writing—original draft preparation, M.F., S.S. (Stefanie Schatz), W.M.B.; writing—review and editing, all authors; visualization, M.F., S.S. (Stefanie Schatz), M.G., W.M.B.; supervision, M.T., J.H.F.; project administration, W.M.B.; funding acquisition, W.M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by an unrestricted grant to WMB from the “Förderverein des Tumorzentrums Erlangen”, FAU Erlangen and the W. Lutz Stiftung, Nuremberg, Germany.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany (protocol number 294 20B from 18 January 2021).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from the patient involved in this off-label use of T-DXd. In addition, written informed consent has been obtained from the patient to publish this paper.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors thank Ute Herbst and Ramona Paulus for documenting the blood samples obtained.

Conflicts of Interest: Wolfgang M. Brueckl has received honoraria for consulting from AstraZeneca, BMS, Boehringer Ingelheim, Celgene, Chugai, Lilly, MSD, Pfizer, Roche Pharmaceuticals and Takeda. Joachim H. Ficker has received honoraria for consulting and/or lectures from AstraZeneca, Bayer, Boehringer Ingelheim, Chugai, GSK, MSD, Novartis, Pfizer, Roche, and Sanofi-Aventis. Markus Tiemann has received honoraria for consulting and/or lectures from AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, BMS, MSD, Novartis, Lilly Oncology, Roche, Takeda. Markus Falk has received honoraria for consulting and/or lectures from AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Roche, Novartis. All other authors declare no conflict of interest.

5 DISKUSSION Molekularpathologische Testung: obligater Bestandteil der Diagnostik des Lungenkarzinoms

Zielgerichtete Therapieansätze haben zu einer signifikanten Verlängerung des OS bei Patient:innen mit metastasierten Lungenkarzinom geführt. Voraussetzung ist das Vorhandensein einer somatischen Treibermutation im Tumor. Im Jahr 2009 gab es mit Gefitinib lediglich einen zugelassenen TKI für Patient:innen mit EGFR mutierten NSCLC, 13 Jahre später haben sich die für unterschiedlichste Treiberalterationen einsetzbaren Substanzen circa verzwanzigfacht. Für die Gruppe der Patient:innen ohne Treiberalteration bildet die Immunmonotherapie beziehungsweise Immunchemo-Kombinationstherapie die etablierte Standardtherapie. Die reine Chemotherapie in der Erstlinie wurde weitgehend aus den Behandlungsschemata verdrängt und wird lediglich bei Patient:innen eingesetzt, die aufgrund von Multimorbidität, wie beispielsweise einer zusätzlichen chronisch entzündlichen Nebenerkrankung, eine Immuntherapie nicht vertragen.

Der Mutationsstatus bestimmter (Onko-) Gene muss vor Einleitung der Erstlinientherapie molekularpathologisch bestimmt werden. Dies dient dem Nachweis positiv und negativ prognostischer beziehungsweise prädiktiver Biomarker und beschränkt sich mittlerweile nicht mehr auf das fernmetastasierte Stadium IV, sondern zunehmend auch auf frühere Tumorstadien. So wurde die Zulassung eines EGFR TKI der dritten Generation, Osimertinib, für die adjuvante Behandlung des NSCLC der Stadien Ib bis IV erweitert [160]. Basierend auf der IMpower010 Studie ist auch die Immuntherapie eine Option für die adjuvante Behandlungssituation in frühen Stadien des PD-L1 exprimierenden, ALK und EGFR negativen NSCLC. Die Gene EGFR und ALK sind also im TKI-Therapie-Kontext positiv und im Zusammenhang mit Immuntherapie negativ prädiktiv zu bewerten. Demnach müssen sie zukünftig, eine entsprechende Zulassung vorausgesetzt, bei NSCLC Patient:innen praktisch aller Stadien in Vorbereitung einer molekularen Therapiestratifizierung getestet werden. Es ist anzunehmen, dass sich dieser Trend fortsetzt und weitere Biomarker hinzukommen. Für die molekulare Diagnostik haben sich aus dieser Entwicklung heraus weitreichende Konsequenzen ergeben, denn Einzelgentestungen mit konventionellen Methoden sind zunehmend nicht mehr zielführend. Durch Anwendung der NGS-basierten Paneldiagnostik kann das sehr heterogene Spektrum der Treibermutationen samt potentiell relevanter prognostischer Begleitmutationen, inklusive zu erwartender Resistenzmutationen in der Rezidivsituation, im realistischen Zeit- und Kostenrahmen abgebildet werden.

Die Durchführung einer umfangreichen Mutationsanalyse beim Lungenkarzinom steht somit außer Frage, denn sie bildet die Basis für eine individuelle Therapie der Betroffenen.

Die Bandbreite an Biomarkern, die unbedingt vor Therapiebeginn berücksichtigt werden müssen, ist sehr groß und wächst immer weiter, genauso wie die Herausforderung, immer komplexer werdende Biomarker verstehen und interpretieren zu können. Durch die Entwicklung neuester Technologien wie dem HC NGS konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Paneldiagnostik die von der Leitlinie vorgegebenen zehn Werkzeuge in 80% der Fälle eingehalten werden konnten. Anhand einer Tumorseite ist es möglich, simultan 330 Gene auf Non- und Missense-Mutationen, Indels in 325 Genen aber auch Translokationen in 16 und Amplifikationen in 230 Genen zu analysieren. Zeitgleich zu der Testung auf somatische Mutationen ist auch die Bestimmung der Mutationslast des Tumors innerhalb des vorgegebenen Zeitrahmens umsetzbar [10]. Darüber hinaus konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit diagnostische und klinische Aspekte der TMB Bestimmung erörtert werden. Die Testung von 417 Lungentumorseiten konnte, wie in der Literatur beschrieben, altersabhängige Effekte nicht bestätigen [99]. Männer zeigten sich in der untersuchten Kohorte als Geschlecht mit höherem TMB, allerdings konnte dies mit einem p-Wert von 0.110 statistisch nicht untermauert werden. Es konnte auch das aus anderen Datenerhebungen bereits gezeigte Konzept von TMB und PD-L1 Expression als unabhängige Biomarker bestätigt werden. Die PD-L1 Expressionsstärke und die Last an Mutationen im Tumorgenom sind unabhängig voneinander und sollten hinsichtlich ihrer Auswirkung auf immunonkologische Therapien nebeneinander, aber nicht in Summe bewertet werden. Bis dato ist TMB, wenn man von der homologen Rekombinationsdefizienz und Rekombinationsreparatur absieht, der komplexeste molekulare Biomarker. Im Jahr 2015 wurde in einer einschlägigen Publikation ein potentiell prädiktiver Wert für das TMB abgeleitet [48]. Patient:innen, die eine Immuntherapie erhalten haben und 178 Mutationen innerhalb des gesamten Exoms⁹ aufwiesen, sprachen besser auf eine Immuntherapie an als Patient:innen mit weniger als 178 Mutationen im Gesamtexom. Trotz NGS ist die Sequenzierung des gesamten Exoms teuer und zeitaufwendig und daher als routinediagnostische Untersuchung problematisch. Ein entscheidender Aspekt der Arbeit von Rizvi et al. bestand darin, dass eine klinisch zielführende Abschätzung des TMB bereits an deutlich weniger Genterritorium möglich ist, und zwar an etwa einer Megabase [51]. Diese Erkenntnis hat die Machbarkeitsschwelle der TMB Bestimmung im Routinealltag

⁹ Das Exom umfasst alle proteinkodierenden Regionen (Exons) eines Organismus und umfasst beim Menschen circa 38 Mb.

deutlich herabgesetzt und mehrere kommerzielle Anbieter haben entsprechende NGS-basierte Assays angeboten. Allerdings variierten diese zum Teil stark in der Anzahl und Art der abgedeckten Gene (zwischen 250 bis >500 Gene). Es war lange Zeit unklar, welche Testsysteme die besten waren, um einen prädiktiven Wert abzuleiten. Auch eine groß angelegte, nationale deutsche Harmonisierungsstudie konnte keine eindeutige Überbeziehungsweise Unterlegenheit aufzeigen. Zwar konnten die sechs TMB Assays verschiedener Anbieter jeweils mit dem als Goldstandard geltenden FoundationOne CDx vergleichbare Ergebnisse produzieren, allerdings war die Harmonisierung nicht prospektiv ausgelegt, sondern bestand in einem relativen Vergleich der Tests untereinander [98]. Etwa seit 2015 zeigten Daten zum Teil einen Überlebensvorteil von Patient:innen mit höheren TMB Werten. Zum Beispiel konnte in einer Subgruppenanalyse der CheckMate 026 gezeigt werden, dass NSCLC Patient:innen mit einem hohen TMB, deren Tumorzellen zusätzlich zu über 50% PD-L1 exprimierten, besonders gut auf eine Immuntherapie mit Nivolumab ansprachen. Allerdings waren dies retrospektive Analysen mit einer entsprechend eingeschränkten Aussagekraft [161]. Klarheit verschaffte im Jahr 2019 die Phase III-Studie CheckMate 227, welche erstmals TMB in einer prospektiven Kohorte als prädiktiven Biomarker untersuchte. Es konnte kein signifikant besseres Überleben in der Kohorte mit TMB höher als 10Mb unter einer Therapie mit Nivolumab-Ipilimumab-Kombination gegenüber dem Kontrollarm Chemotherapie gezeigt werden [162]. Seitdem hat sich die Gewichtung der TMB Testung zwar reduziert, behält bei vielen Therapeut:innen aber noch immer einen Stellenwert zur Therapiestratifizierung, vor allem in Zusammenschau mit weiteren diagnostischen Parametern wie PD-L1 oder dem Treibermutationsstatus.

Die getesteten Tumoren waren in der vorliegenden Arbeit zu 17.5% Treiber-gen-mutiert, wobei 85% davon ein TMB unter 10mut/Mb aufwiesen. Dies entspricht der Annahme, dass sich die Mutationslast indirekt proportional zum Auftreten von spezifischen Treiber-mutationen, die das Tumorstadium vorantreiben, verhält. TP53 und KRAS waren, wie zu erwarten, die am häufigsten mutierten Gene der untersuchten NSCLC. Die Last an Mutationen war demnach in EGFR und ALK aberranten Tumormaterial signifikant niedriger als bei Patient:innen, deren Lungenkarzinom eine Mutation in den nicht zielgerichtet therapierbaren Genen STK11, ARID1A, POLE und KEAP1 trugen. Die Rationale hinter dem TMB als prädiktiver Biomarker für das Ansprechen auf eine Immuntherapie erscheint naheliegend. Tabakabusus oder andere Umweltfaktoren führen demnach zu einer Anreicherung von Mutationen, was die Entstehung von Krebs begünstigt. Die Gensignatur von Lungenkarzinomen von Raucher:innen ist durch einen eher hohen TMB

gekennzeichnet und seltener mit dem Vorhandensein von Treiberalterationen assoziiert. Die durch den Tabakrauch verursachten Mutationen entstehen an zufälliger Stelle im Genom und können demnach auch intronische, nicht-kodierende Bereiche betreffen, die vermutlich nicht direkt mit der Neoantigenbildung in Zusammenhang stehen. Zur Zählung der für das TMB relevanten Mutationen werden die Introns demnach meist exkludiert. Treibermutationen sind beim Lungenkarzinom, unabhängig vom Raucherstatus, angereichert und werden deswegen für die TMB Abschätzungen teilweise nicht mitgezählt [163]. Weitgehend ungeklärt ist die Frage welche Gene gezählt werden sollten. Bislang konzentriert sich die Zählung auf krebsassoziierte Gene, die aber in Krebserkrankungen potentiell auch statistisch angereichert sind. Außerdem stellt sich die Frage nach einer adäquaten Gewichtung bestimmter Alterationen. Eine Insertion aus fünf Basenpaaren kann als ein oder als fünf Events gezählt werden. So gibt es weitere Unklarheit in Bezug auf komplexere Alterationen wie Translokationen oder den Verlust größerer chromosomaler Regionen. Es sind weitere prospektive Studien nötig, um die bestgeeigneten Algorithmen zur TMB Bestimmung zu evaluieren. Zudem kann der prädiktive Wert des TMB vermutlich nicht isoliert betrachtet werden, sondern nur in Zusammenschau mit anderen Genalterationen, die einen potentiell positiv oder negativ prädiktiven Wert tragen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Mutationen in STK11, KEAP1, ARID1A und POLE signifikant häufiger mit einem TMB von über 10mut/Mb assoziiert sind. STK11 und KEAP1 werden mit einem schlechtem Ansprechen auf Immuntherapie und ARID1A mit positiver Prädiktion assoziiert. In publizierter Kohorte waren 11.3% STK11, 7.7% KEAP1 und 5.3% ARID1A mutiert. Alle wiesen ein hohes TMB auf, was vor allem für STK11 und KEAP1 als TMB unabhängige Biomarker spricht. Zusätzlich zu KEAP1, STK11 und ARID1A mutierten zeigten auch NSCLC Proben mit KRAS Mutation ein hohes TMB. STK11, KEAP1, ARID1A und POLE wurden aufgrund der Datenlage zunächst als prädiktiv für die Immuntherapie erachtet, ein Bild, dass sich nach Publikation weiterer Studien mit den entsprechenden Chemotherapie Vergleichsarmen etwas relativiert hat. Möglicherweise handelt es sich um Prognosemarker. Unabhängig von der endgültigen Klärung dieser Frage müssen diese Genmutationen in Kombination mit dem TMB betrachtet werden, um eine gezieltere prädiktive beziehungsweise prognostische Therapiestratifizierung zu erlauben. Die PD-1/PD-L1 gerichtete Immuntherapie wird in der adjuvanten und neoadjuvanten Behandlungssituation prospektiv untersucht. Im Juni 2022 wurde mit Atezolizumab der erste adjuvante ICI für das frühe NSCLC zugelassen [164]. Voraussetzung für die Therapie ist ein EGFR und ALK Wildtypstatus des Tumors, womit sich negativ prädiktiven molekulargenetischen Daten für die Immunonkologie erweitern. Generell bleibt das

Verständnis prädiktiver Biomarker zur Immuntherapie begrenzt, dies gilt auch für die Resistenzsituation; hier fehlen klar definierte molekulare Mechanismen, die unter der Therapie zur Ausbildung von Resistenzen führen können.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass TMB sich bislang nicht als zuverlässiger Biomarker in den bestehenden Therapieschemata etabliert hat, zumindest nicht in der bestehenden Form. In Zukunft werden durch Kostenreduktion und technologischen Fortschritt noch umfassendere (gesamtdenomische) Untersuchungen möglich sein und potentiell bessere prädiktive Werte erzielen. Möglich wäre auch eine Erweiterung um zusätzliche Parameter, wie genomische Instabilität beziehungsweise homologe Rekombinationsdefizienz, um bessere Vorhersagen treffen zu können.

Neben den ICI bildet die Therapie mit zielgerichteten Inhibitoren eine weitere „Therapiesäule“ für NSCLC Patient:innen. Die zielgerichtete beziehungsweise molekular stratifizierte Therapie ist per Definition nur bei Patient:innen mit einer zugrundeliegenden somatischen Treibermutation wirksam. Herausfordernd dabei ist, dass es bei fast allen EGFR positiven Tumoren nach circa einem Jahr zur Resistenzbildung gegenüber dem EGFR TKI und somit zu einem Rezidiv kommt. Eine erneute Tumorbiopsie oder Liquid Biopsy kann darüber Aufschluss geben, welche Resistenzmutation vorliegt. In Abhängigkeit des verabreichten TKI und der vorliegenden Resistenzmutationen kann dann entweder zur nächsten TKI-Sequenz oder einer anderen Behandlungsstrategie gewechselt werden. Bei etwa 50% der NSCLC Patient:innen liegen therapierbare somatische Treiberalteration vor, von denen nach KRAS die häufigsten im EGF-Rezeptor lokalisiert sind. Im Gegensatz zur Chemo- und Immuntherapie sind die Resistenzmechanismen unter TKI konkreter definierbar und äußern sich in on-¹⁰ beziehungsweise off-target¹¹ Resistenzen. Der diagnostische Nachweis der Resistenzmutationen ist wegweisend für die Folgetherapie. Vor dem Hintergrund der Zulassung von Osimertinib in der adjuvanten Behandlungssituation und der laufenden Studie NeoADAURA in der neoadjuvanten Therapie wird die Frage, welche Auswirkung die tumorentwicklungsabhängige frühe Gabe zielgerichteter Substanzen auf die Resistenzmutationsentwicklung hat, zunehmend relevant.

Anhand der vorliegenden retrospektiven Datenkollektion von 56 Flüssigbiopsien, welche mittels HC NGS analysiert wurden, konnten verschiedene Resistenzmutationen nach der Gabe des Drittgenerations-TKI Osimertinib nachgewiesen werden. Neun der 56

¹⁰ On-target Resistenz: sterische Veränderung des inhibierten Proteins durch Mutation im bisherigen Treiber gen.

¹¹ Off-target Resistenz: neuer Treiber etabliert sich und führt zur Aktivierung anderer Signalwege.

fortgeschrittenen Lungenkarzinome wurden in der Erstlinie mit Osimertinib behandelt, die übrigen 47 Patient:innen erhielten Osimertinib als Zweitlinientherapie, also nach Versagen eines EGFR TKI der ersten beziehungsweise zweiten Generation. In sieben Plasmaproben der Osimertinib-Erstlinientherapierten konnte die initiale Treibermutation verifiziert werden, wobei bei drei Fällen zusätzlich eine Resistenzmutation festgestellt werden konnte: ein(e) Patient:in entwickelte im Laufe der Behandlung eine EGFR p.C797S Resistenzmutation, eine der gängigsten Resistenzen des EGFR mutierten Tumors unter Osimertinib [108]. Außerdem wurden bei einem der drei Fälle Mutationen in den Genen TP53 und RB1 detektiert, was indirekt auf eine Transformation vom EGFR mutierten NSCLC zum SCLC hindeuten kann, also einer histomorphologischen Änderung des Tumors. In der dritten Probe konnten mehrere Zusatzmutationen festgestellt werden, wobei drei davon bereits als Resistenzmutationen in der Literatur beschrieben worden sind: Eine MET Genamplifikation, eine EML4-ALK Translokation und eine EGFR p.T854A Punktmutation. Bemerkenswert erscheint zum einen die klonale Aufspaltung des Tumors unter EGFR TKI und zum anderen die Tatsache, dass zwei der drei gefundenen Resistenzen wiederum zielgerichtete Therapieoptionen aufzeigen. So konnten Daten der INSIGHT 2 Studie zeigen, dass rezidivierende Tumoren mit MET Genamplifikation von der zusätzlichen Gabe von Tepotinib profitieren können [165]. Für zusätzliche ALK Translokation kann eine Kombination mit einem ALK TKI wie Crizotinib zielführend sein.

In der Osimertinib-Zweitlinien-Kohorte konnte in 41 Plasmaproben die bereits bekannte Treiberalteration in der Flüssigbiopsie bestätigt werden. Zusätzlich konnte bei 90% der 41 Betroffenen als Resistenzmechanismus eine EGFR p.T790M Mutation nachgewiesen werden. Vier der 41 Patient:innen bekamen Osimertinib in der zweiten Therapielinie, ohne dass zuvor eine p.T790M Mutation nachgewiesen werden konnte. Als mögliche Gründe dafür können ein Medikamentenwechsel aufgrund von Langzeittoxizität oder ein Progress unter Erst- und Zweitgenerations-TKI diskutiert werden. Von den 90% p.T790M positiven Patient:innen hatten wiederum 39% der Patient:innen zusätzlich zur detektierten p.T790M eine p.C797S, welche zum Voranschreiten der Erkrankung beiträgt, indem die kovalente Bindestelle Cystein 797 von Osimertinib mutiert und zu einer reduzierten Affinität führt [166]. Abgesehen von einem Fall, konnten bei allen übrigen p.C797S mutierten Tumoren zusätzliche Resistenzmechanismen durch die Liquid Biopsy nachgewiesen werden, darunter MET Genamplifikationen, eine RET-RUFY1 Fusion und Punktmutationen in den Genen ERBB2, PIK3CA und PTEN. Diese Daten spiegeln die Komplexität und Heterogenität der genetischen Veränderungen unter TKI Therapie wider und scheinen sich

weder auf EGFR TKI noch auf die Entität NSCLC zu beschränken. So konnten unter KRAS p.G12C spezifischer Inhibition mit Adagrasib beim Kolorektalen- beziehungsweise Lungenkarzinom ähnlich heterogene Resistenzen nachgewiesen werden, ebenso wie nach ALK Inhibition [159, 167]. Treibermutationspositive Tumoren sprechen in der Regel nicht gut auf PD-L1/PD-1 gerichtete ICI an, dies gilt insbesondere für EGFR und ALK mutierte Tumoren, weshalb häufig nur konventionelle Therapieformen für die Rezidivsituation in Frage kommen. Dies unterstreicht gleichzeitig die Wichtigkeit der erneuten molekulargenetischen Testung bei Krankheitsprogress unter zielgerichteter Therapie. Bei Betrachtung des breiten Spektrums zu erwartender on- und off-target Alterationen eignet sich hierfür insbesondere das HC NGS. Dabei kann als Ausgangsmaterial sowohl eine solide Rebiopsie als auch eine Liquid Biopsy in Frage kommen. Eine Liquid Biopsy bietet sich vor allem dann an, wenn kein solides Material verfügbar ist oder der Patient eine erneute Biopsie ablehnt. Für den Mutationsnachweis anhand der Plasma ctDNA gelten allerdings bestimmte Einschränkungen, denn einige Tumoren entlassen keine nachweisbaren Mengen an ctDNA ins periphere Blut. Bei Patient:innen mit hoher Tumorlast beziehungsweise schnellem Tumorwachstum ist die Wahrscheinlichkeit höher, signifikante ctDNA Konzentrationen im Plasma zu finden [168]. Im Hinblick auf erweiterte Zulassungen der zielgerichteten Therapie in Richtung früherer Tumorstadien könnte sich das Anwendungsspektrum der ctDNA Testung weiter wandeln. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass der postoperative Nachweis von ctDNA beim Kolorektalen Karzinom mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [169]. Der Einsatz der Liquid Biopsy könnte somit perioperativ oder im Sinne der messbaren minimalen Resterkrankung, kurz MRD, zielführend sein.

Der potentielle Einsatzbereich der Liquid Biopsy im Therapiemonitoring wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand einer Kasuistik untersucht. Eine 64-jährige Nie-Raucherin mit NSCLC und einer HER2 Insertionsmutation wurde, mit dem in Europa bislang nicht zugelassenen Antikörperkonjugat T-DXd, behandelt. Während des Therapieverlaufs wurden zu insgesamt 12 unterschiedlichen Zeitpunkten Liquid Biopsies entnommen und mittels NGS auf das Vorhandensein der ursprünglichen HER2 Treibermutation, sowie potentiell entstehender Resistenzmutationen, untersucht. Es zeigte sich ein deutliches klinisches Therapieansprechen, welches auf molekularer Ebene mit einer Reduktion der HER2 p.G776delinsVC ctDNA korrelierte und entsprechend auch mit einem Krankheitsprogress nach Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST). Zudem konnte eine

aktivierende Mutation innerhalb der MET Kinasedomäne nachgewiesen werden, die trotz der geringen Allelfrequenz als mögliche Resistenzmutation diskutiert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden, durch den Einsatz der Liquid Biopsy als mögliche Monitoring-Methode, Resistenzmechanismen nach Therapie mit TKI in Patient:innen mit NSCLC beschrieben. Die Mutationen zeigen ein breites Spektrum an on- und off-target Alterationen die zum Krankheitsprogress, unter zunächst erfolgreicher zielgerichteter Therapie, führen. Daraus folgt die Notwendigkeit einer Therapieumstellung unter Berücksichtigung des veränderten Tumorgenotyps. Durch Kombination verschiedener TKI potenzieren sich aber in vielen Fällen auch die Nebenwirkungen. Auch die Wirksamkeit wird weiterhin zeitlich begrenzt und durch Selektion neuer Resistenzmutationen limitiert sein.

Die Analyse von ctDNA als (Monitoring-) Methode kann über die Erkrankungsdynamik und das Resistenzmutationsspektrum Aufschluss geben. Praktisch alle zielgerichtet behandelten Patient:innen entwickeln im Verlauf der Therapie Resistenzen, deren Ursache molekulargenetisch bestimmt werden müssen. Die minimalinvasive Liquid Biopsy kann hier eine hilfreiche Alternative zur aufwendigeren Gewebsanalyse darstellen. Im Krankheitsverlauf verändert sich der Genotyp des Tumors unter dem Selektionsdruck der zielgerichteten Substanz. Kombinationstherapien, die sowohl der primären Treibermutation als auch der im Rezidiv nachweisbaren Resistenzmutation Rechnung tragen, können eine zielführende Behandlungsstrategie darstellen.

6 Stellungnahme zum Eigenanteil

Publikation (I) / Erstautorin

S. Schatz*, M. Falk*, B. Jóri, H*. O. Ramdani, S. Schmidt, E. M. Willing, R. Menon, H. J. M. Groen, L. Diehl, M. Kröger, C. Wesseler, F. Griesinger, P. Hoffknecht, M. Tiemann, and L. C. Heukamp. **"Integration of Tumor Mutation Burden and PD-L1 Testing in Routine Laboratory Diagnostics in Non-Small Cell Lung Cancer."** *Cancers (Basel)* 12, no. 6 (Jun 24 2020). <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12061685>.

Beschreibung des Eigenanteils von Stefanie Schatz in Abgrenzung der geteilten Erstautorenschaften von Markus Falk und Balazs Jóri:

Stefanie Schatz

- ab Februar 2019 (Start Forschungsprojektes) bis zur Einreichung des Manuskriptes im April 2020: Datenerhebung, Datenauswertung (deskriptive und explorative Datenanalyse) und die Datenvisualisierung (GraphPad Prism, Microsoft Excel)
- Erstellung einer Mutationsdatenbank von n=1690 Tumorproben (verschiedene Entitäten, retrospektiv) welche mittels HC NGS analysiert wurden; Selektion der n=417 Lungenkarzinome welche anhand eines Multigenpanel (NEOplus v2 RUO, 330 Gene umfassend) analysiert wurden
- aus internen Befundungssystem der Hämatopathologie Hamburg wurden für die n=417 Lungenkarzinome (a) Patientencharakteristika (Geschlecht, Alter, Histologische Diagnose), (b) Mutationsklasse (aktivierend, inaktivierend, VUS) und (c) PD-L1 Status durch IHC, ergänzt und ausgewertet [siehe Results 2.2. Histology, Driver Mutations and PD-L1; Table 1]
- für n=132 der n=417 Analysen wurden Daten zur TAT evaluiert: pro Analyse / Fall die Dauer für Präanalytik (von Eingang Material bis Sequenzierung), Bioinformatik und Befundung dokumentiert; für n=21 und n=17 (Drop-outs) im Einzelfall geprüft warum TAT von 10 Werktagen nicht eingehalten bzw. der Workflow nicht positiv abgeschlossen wurde [siehe Results 2.3. Turn-around time and HC NGS workflow; Figure 2]
- anhand der erstellten Mutationsdatenbank Auswertung und Visualisierung folgender Kapitel / Abbildungen:
 - 2.4.1 TMB in relation to age; Figure 3
 - 2.4.2 TMB in relation to driver mutations; Figure 4
 - 2.4.3 TMB and PD-L1, Figure 5

○ 2.4.4 Correlation of somatic tumor mutations and TMB; Figure 6

- korrespondierend zu oben genannter Datenauswertung wurden die Kapitel des Ergebnis-, Material & Methoden-Teils des Manuskriptes selbstständig verfasst; Einleitung, Diskussion und Konklusion in Zusammenarbeit mit Markus Falk und Balazs Jóri erstellt
- Koordination des Forschungsvorhaben und aller beteiligten (Co-)Autoren über den gesamten Prozess hinweg. Am 30. April 2020 Einreichung des Manuskriptes (Journal Cancers, Verlag MDPI) und Betreuung der Revision (Korrespondenz mit den Editoren und Reviewer, Nachbearbeitung und Korrekturen in Zusammenarbeit mit den (Co-) Autoren)

Markus Falk

- konzeptionelle Vorarbeiten wie Sichtung der Rohdaten (nach Sequenzierung) und Bestimmung der Patientencharakteristika / Definition der Patientenkohorte; Wichtung der Ergebnisse; Abschätzung weiterer zielführender Untersuchungen
- schriftliche Vorbereitung der Diskussion und Konklusion des Manuskriptes in Zusammenarbeit mit den Erstautor:innen

Balazs Jóri

- Validierung der NEOplus v2 RUO Assays; Erstellung und Validierung der bioinformatischen Pipeline zur Datenanalyse, Mutationsannotation, CNV Calling
- Analyse, Auswertung und Bewertung von n=17 Tumorproben siehe 2.1. *TMB Assay Correlation with Clinical Trail Assay of CheckMate 227*; korrespondierender Teil des Ergebnisteils wurde verfasst
- schriftliche Vorbereitung der Einleitung des Manuskriptes und Diskussion in Zusammenarbeit mit den Erstautor:innen

Beiträge und Mithilfe der Co-Autoren:

Projektkonzept: L. Diehl, M. Tiemann, F. Griesinger, L. C. Heukamp
Datenkuration: S. Schmidt, R. Menon, H. J. M. Groen, F. Griesinger
Formale Analyse: R. Menon
Investigation: M. Tiemann
Methodik: S. Schmidt, E.-M. Willing
Datenressource: M. Kröger, C. Wesseler, F. Griesinger, P. Hoffknecht, M. Tiemann

Software: E.-M. Willing
Supervision: F. Griesinger, M. Tiemann, L. C. Heukamp
Review & Editing: H. O. Ramdani., H. J. M. Groen, L. Diehl, M. Kröger, C. Wesseler, F. Griesinger, P. Hoffknecht, L. C. Heukamp

Anmerkung: beim Hochladen des Manuskriptes ist bei der Vergabe der „Author Contributions“ ein Fehler unterlaufen. Stefanie Schatz wurde fälschlicherweise nicht unter „Data Curation“ gelistet. Dieser Fehler wurde dem Verlag gemeldet, die öffentliche Richtigstellung kann unter <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/6/1685#> eingesehen werden.

Hiermit bestätige wir, *Stefanie Schatz*, *Markus Falk* und *Balazs Jóri*, die oben beschriebenen Leistungen erbracht zu haben.



Stefanie Schatz

Markus Falk

Balazs Jóri

Publikation (II) / Erstautorin

Jóri, Balázs*, Stefanie Schatz*, Len Kaller, Bettina Kah, Julia Roeper, Hayat O Ramdani, Linda Diehl, Petra Hoffknecht, Christian Grohé, and Frank Griesinger. **"Comparison of Resistance Spectra after First and Second Line Osimertinib Treatment Detected by Liquid Biopsy."** *Cancers* (Basel) 13, no. 12 (2021): 2861. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34201252/>

Beschreibung des Eigenanteils von Stefanie Schatz in Abgrenzung der geteilten Erstautorenschaft mit Balazs Jóri:

Stefanie Schatz

- Konzeptionierung und Erarbeiten der Fragestellung gemeinsam mit Balazs Jóri
- Start: Oktober 2020 von über 700 Patient:innen (mind. einmal Liquid Biopsy getestet; Lunge Netzwerk NOWEL) wurden molekularpathologischen Daten um klinische Daten ergänzt (vor Oktober 2020: Erstellung und Auswertung eines Fragebogens; mit Unterstützung von Co-Autor Len Kaller)
- Erstellung einer Datenbank n=741 Analysen zur Evaluierung von n=56 Lungenkarzinom-Patient:innen mit Progress unter EGFR TKI-Gabe
- Datenauswertung (deskriptive) „3.1. Patient Characteristics“: Alter bei Erstdiagnose; Geschlecht; Raucherstatus; Histologie; Tumorstadium; primäre EGFR Mutation; TKI Sequenz; EGFR Resistenzen; Bewertung Liquid Biopsy [siehe Table 1 und Table S1]
- Datenvisualisierung (Microsoft Excel; Microsoft PowerPoint) der n=56 Lungenkarzinome im Hinblick auf erworbene Resistenzspektren [Figure 1A und 1B]
- schriftliche Ausarbeitung der Ergebnisse [2.1. Patient Cohort; 3.1. Patient Characteristics; 3.2. Resistance Spectrum after First Line Osimertinib Treatment; 3.3. Resistance Spectrum after Second Line Osimertinib Treatment] und Diskussion
- schriftliche Ausarbeitung der Einleitung in Zusammenarbeit mit Balazs Jóri
- Koordination des Forschungsvorhaben und aller beteiligten Co-Autoren über den gesamten Prozess hinweg. Am 23. April 2021 reichte ich das Manuskript (Journal Cancers, Verlag MDPI) ein und betreute den Prozess (Peer-Review) der Revision (Korrespondenz mit den Editoren und Reviewer, Nachbearbeitung und Einarbeitung von Korrekturen).

Balazs Jóri

- Validierung des NEOliquid v1 Assays
- detaillierte Sichtung und Evaluation der NGS-Rohdaten zur Einschätzung der cis/trans Konstellation von T790M, C797S, G796S und L792 [3.4. Presence of Diverse EGFR and PIK3CA Molecular Subclones of in Patients' Plasma ctDNA after Second Line Osimertinib] und Diskussion
- schematischer Darstellung der Allel-Varianten mit Unterstützung von Stefanie Schatz [Figure 2]
- schriftliche Ausarbeitung der Einleitung in Zusammenarbeit mit Stefanie Schatz

Beiträge und Mithilfe der Co-Autoren:

Projektkonzept: M. Tiemann, L. C. Heukamp, M. Falk
Datenkuration: L. Kaller, H. O. Ramdani, J. Roeper
Formale Analyse: L. Kaller, J. Roeper
Funding: F. Griesinger, M. Tiemann, L. C. Heukamp
Investigation: L. Kaller, J. Roeper, P. Hoffknecht, F. Griesinger, L. C. Heukamp, M. Falk
Methodik: B. Kah, L. C. Heukamp
Administration: B. Kah, F. Griesinger, M. Tiemann, L. C. Heukamp
Datenressource: C. Grohé, F. Griesinger, P. Hoffknecht, M. Tiemann, L. C. Heukamp
Supervision: F. Griesinger, M. Tiemann, L. C. Heukamp
Manuskript: M. Falk
Review & Editing: H. O. Ramdani., L. Diehl, F. Griesinger, P. Hoffknecht, L. C. Heukamp, C. Grohé, M. Falk

Hiermit bestätige wir, *Stefanie Schatz* und *Balazs Jóri*, die oben beschriebenen Leistungen erbracht zu haben.



Addendum Ethikvotum Publikation II

Am 01.07.2024 wurde durch die Medizinische Ethikkommission der Fakultät VI – Medizin und Gesundheitswissenschaft der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg unter dem Zeichen 2024-079 die fortwährende Gültigkeit des Votums Drs.41/2014 und Nutzung erhobener Daten durch die Versorgung im Lungennetzwerk NOWEL bestätigt.

Es handelt sich um das Votum Drs.41/2014 der Kommission für Forschungsfolgenabschätzung und Ethik der Universität Oldenburg / EMS Oldenburg-Groningen vom 30.06.2014, welches die Basis für Forschungsprojekte (inkl. Publikationen) im Zusammenhang mit Versorgung durch das Lungennetzwerk NOWEL bildet.

Zusätzlich zum Votum Drs.41/2014 wurde und wird jede(r) Patient:in im Rahmen des integrierten Versorgungsprojektes (NOWEL) aufgeklärt und eine personenbezogene Einwilligungserklärung, die eine Zustimmung zur Veröffentlichung anonymisierter Daten beinhaltet, eingeholt.

Publikation (III) / Co-Autorin

Falk, Markus, Eva Willing, Stefanie Schmidt, Stefanie Schatz, Marco Galster, Markus Tiemann, Joachim H. Ficker, and Wolfgang M. Brueckl. 2023. "**Response of an HER2-Mutated NSCLC Patient to Trastuzumab Deruxtecan and Monitoring of Plasma ctDNA Levels by Liquid Biopsy**" *Current Oncology* 30, no. 2: 1692-1698. <https://doi.org/10.3390/curroncol30020130>

Beiträge der Autorinnen/Autoren:

Konzept:	Markus Falk, Wolfgang M. Brueckl
Methodik:	Markus Falk, Eva Willing, Stefanie Schmidt, Markus Tiemann
Software:	Markus Falk, Eva Willing, Stefanie Schatz
Validierung:	Markus Falk, Eva Willing, Stefanie Schmidt, Stefanie Schatz , Markus Tiemann
Formal Analyse:	Markus Falk, Stefanie Schmidt, Stefanie Schatz
Investigation:	alle Autoren
Ressourcen:	Joachim H. Ficker, Marco Galster, Wolfgang M. Brueckl
Manuskript:	Markus Falk, Stefanie Schatz , Wolfgang M. Brueckl
Review & Editing:	alle Autoren
Visualisierung:	Markus Falk, Stefanie Schatz , Marco Galster, Wolfgang M. Brueckl
Supervision:	Markus Tiemann, Joachim H. Ficker
Projekt Administration:	Wolfgang M. Brueckl

7 Weitere Publikationen und Beiträge als (Co-)Autorin

- Willing E-M, Vollbrecht C, Vössing C, Weist P, Schallenberg S, Herbst JM, **Schatz S**, Jóri B, Bataillon G, Harter P, et al. Development of the NOGGO GIS v1 Assay, a Comprehensive Hybrid-Capture-Based NGS Assay for Therapeutic Stratification of Homologous Repair Deficiency Driven Tumors and Clinical Validation. *Cancers*. 2023; **15**(13):3445. <https://doi.org/10.3390/cancers15133445>
- Clausen S, Falk M, Oesterling F, Fehr A, Stang A, Boecker W, Gesk S, **Schatz S**, Stenman G, Tiemann K, Loening T, Friedrich RE. Outcome of Ordinary Polymorphous Adenocarcinomas of the Salivary Glands in Comparison With Papillary and Cribriform Subtypes. *Anticancer Res*. 2022 Mar;**42**(3):1455-1463. doi: 10.21873/anticancer.15616. PMID: 35220239.
- Janning M, Kobus F, Babayan A, Wikman H, Velthaus JL, Bergmann S, **Schatz S**, Falk M, Berger LA, Böttcher LM, Päsler S, Gorges TM, O'Flaherty L, Hille C, Joosse SA, Simon R, Tiemann M, Bokemeyer C, Reck M, Riethdorf S, Pantel K, Loges S. Determination of PD-L1 Expression in Circulating Tumor Cells of NSCLC Patients and Correlation with Response to PD-1/PD-L1 Inhibitors. *Cancers (Basel)*. 2019 Jun 17;**11**(6):835. doi: 10.3390/cancers11060835. PMID: 31212989; PMCID: PMC6627043.
- Falk, M., **S. Schatz**, and L. Heukamp, *Molekularpathologie des Lungenkarzinoms: aktuelle Standards und weitere Entwicklungen Molecular pathology of lung cancer: current standards and further developments*. *Der Pneumologe*, 2019. **16**.
- Ramdani H., Falk M., **Schatz S.**, Heukamp L., Tiemann M., Wesseler C., Schuurung E., Groen H., Griesinger F., *Evaluation of combined biomarkers for tumor response to immunotherapy (I/O) in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2019. **37**: p. e14269-e14269.
- Roeper J., Lueers A.C., Falk M., **Schatz S.**, Tiemann M., Wesseler C., Wiest G.H., Sackmann S., Ukena D., Heukamp L., Griesinger F., *Risk of not receiving second-line therapy is high in EGFR mt+ patients: real-world data of certified lung cancer centers on treatment sequence in EGFR mt+ patients*. *Annals of Oncology*, 2019. **30**: p. ii48.
- Roeper J., Falk M., **Schatz S.**, Tiemann M., Wesseler C., Wiest G.H., Sackmann S., Ukena D., Griesinger F., *Treatment patterns of EGFR mt+ NSCLC IV pts: Real-world data of the NOWEL network*. *Annals of Oncology*, 2019. **30**: p. v630.

- Zink, P., Falk M., **Schatz S.**, Tiemann M., *Analysis of the tumour microenvironment and tumour genotype through different stages of lung adenocarcinoma.* Annals of Oncology, 2019. **30**: p. v650.
- Berger LA, Janning M, Velthaus JL, Ben-Batalla I, **Schatz S**, Falk M, Iglauer P, Simon R, Cao R, Forcato C, Manaresi N, Bramlett K, Buson G, Hanssen A, Tiemann M, Sauter G, Bokemeyer C, Riethdorf S, Reck M, Pantel K, Wikman H, Loges S. Identification of a High-Level MET Amplification in CTCs and cfTNA of an ALK-Positive NSCLC Patient Developing Evasive Resistance to Crizotinib. J Thorac Oncol. 2018 Dec;**13**(12):e243-e246. doi: 10.1016/j.jtho.2018.08.2025. Epub 2018 Sep 8. PMID: 30205165.
- **Schatz S**, Falk M, Menon R, Heukamp LC, Roeper J, Griesinger F, Tiemann M. Hybrid capture NGS reliably detects a spectrum of clinically significant genetic aberrations in both, primary diagnostics and the relapse scenario. Annals of Oncology 2018, **29**, viii517.
- Eisenberg T, Schroeder S, Andryushkova A, Pendl T, Küttner V, Bhukel A, Mariño G, Pietrocola F, Harger A, Zimmermann A, Moustafa T, Sprenger A, Jany E, Büttner S, Carmona-Gutierrez D, Ruckenstuhl C, Ring J, Reichelt W, Schimmel K, Leeb T, Moser C, **Schatz S**, Kamolz LP, Magnes C, Sinner F, Sedej S, Fröhlich KU, Juhasz G, Pieber TR, Dengjel J, Sigrist SJ, Kroemer G, Madeo F. Nucleocytosolic depletion of the energy metabolite acetyl-coenzyme a stimulates autophagy and prolongs lifespan. Cell Metab. 2014 Mar 4;**19**(3):431-44. doi: 10.1016/j.cmet.2014.02.010. PMID: 24606900; PMCID: PMC3988959.

8 Literaturverzeichnis

1. Gutierrez, M.E., et al., *Genomic Profiling of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer in Community Settings: Gaps and Opportunities*. Clin Lung Cancer, 2017. **18**(6): p. 651-659.
2. Mok, T.S., et al., *Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma*. N Engl J Med, 2009. **361**(10): p. 947-57.
3. *Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC)*. [DGHO Guidelines] 2018 November 2018; Leitlinien von DGHO, OeGHO, SGMO und SGH+SSH]. Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/@@guideline/html/index.html>.
4. Planchard, D., et al., *Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2018. **29**(Suppl 4): p. iv192-iv237.
5. Brahmer, J., et al., *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer*. N Engl J Med, 2015. **373**(2): p. 123-35.
6. Borghaei, H., et al., *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer*. New England Journal of Medicine, 2015. **373**(17): p. 1627-1639.
7. Herbst, R.S., et al., *Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial*. Lancet, 2016. **387**(10027): p. 1540-1550.
8. Rittmeyer, A., et al., *Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial*. Lancet, 2017. **389**(10066): p. 255-265.
9. Bai, R., et al., *Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors*. Biomarker Research, 2020. **8**(1): p. 34.
10. *Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 1.0*. Leitlinienprogramm Onkologie 2018; Available from: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html>.
11. Sharma, S.V., et al., *Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(3): p. 169-81.
12. Yang, J.C., et al., *Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6*. Lancet Oncol, 2015. **16**(7): p. 830-8.
13. Park, K., et al., *Amivantamab in EGFR Exon 20 Insertion-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer Progressing on Platinum Chemotherapy: Initial Results From the CHRYSALIS Phase I Study*. J Clin Oncol, 2021. **39**(30): p. 3391-3402.
14. Kobayashi, Y. and T. Mitsudomi, *Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy*. Cancer Sci, 2016. **107**(9): p. 1179-86.
15. Yuan, M., et al., *The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2019. **4**: p. 61.
16. Schatz, S., et al., *Integration of Tumor Mutation Burden and PD-L1 Testing in Routine Laboratory Diagnostics in Non-Small Cell Lung Cancer*. Cancers (Basel), 2020. **12**(6).
17. Odogwu, L., et al., *FDA Approval Summary: Dabrafenib and Trametinib for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancers Harboring BRAF V600E Mutations*. Oncologist, 2018. **23**(6): p. 740-745.
18. Johnson, D.B., C.A. Nebhan, and M.S. Noel, *MEK inhibitors in non-V600 BRAF mutations and fusions*. Oncotarget, 2020. **11**(44): p. 3900-3903.

19. Johnson, D.B., et al., *Trametinib Activity in Patients with Solid Tumors and Lymphomas Harboring BRAF Non-V600 Mutations or Fusions: Results from NCI-MATCH (EAY131)*. Clin Cancer Res, 2020. **26**(8): p. 1812-1819.
20. Yao, Z., et al., *Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS*. Nature, 2017. **548**(7666): p. 234-238.
21. Rosell, R., et al., *ALK and ROS1 non-small-cell lung cancer: two molecular subgroups sensitive to targeted therapy*. Lancet Respir Med, 2014. **2**(12): p. 966-8.
22. Drilon, A., et al., *Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion–Positive Non–Small–Cell Lung Cancer*. New England Journal of Medicine, 2020. **383**(9): p. 813-824.
23. Gainor, J.F., et al., *Pralsetinib for *RET* fusion-positive non-small-cell lung cancer (ARROW): a multi-cohort, open-label, phase 1/2 study*. The Lancet Oncology, 2021. **22**(7): p. 959-969.
24. Bourgeois, J.M., et al., *Molecular detection of the ETV6-NTRK3 gene fusion differentiates congenital fibrosarcoma from other childhood spindle cell tumors*. Am J Surg Pathol, 2000. **24**(7): p. 937-46.
25. Brzezińska, E., et al., *Molecular analysis of the RET and NTRK1 gene rearrangements in papillary thyroid carcinoma in the Polish population*. Mutat Res, 2006. **599**(1-2): p. 26-35.
26. Wu, G., et al., *The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma*. Nat Genet, 2014. **46**(5): p. 444-450.
27. Stransky, N., et al., *The landscape of kinase fusions in cancer*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4846.
28. Okamura, R., et al., *Analysis of NTRK Alterations in Pan-Cancer Adult and Pediatric Malignancies: Implications for NTRK-Targeted Therapeutics*. JCO Precis Oncol, 2018. **2018**.
29. Haratake, N. and T. Seto, *NTRK Fusion-positive Non-small-cell Lung Cancer: The Diagnosis and Targeted Therapy*. Clin Lung Cancer, 2021. **22**(1): p. 1-5.
30. Laetsch, T.W., et al., *Larotrectinib for paediatric solid tumours harbouring NTRK gene fusions: phase 1 results from a multicentre, open-label, phase 1/2 study*. Lancet Oncol, 2018. **19**(5): p. 705-714.
31. Paz-Ares, L., et al., *Patient-reported outcomes from STARTRK-2: a global phase II basket study of entrectinib for ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer and NTRK fusion-positive solid tumours*. ESMO Open, 2021. **6**(3): p. 100113.
32. Salgia, R., et al., *The promise of selective MET inhibitors in non-small cell lung cancer with MET exon 14 skipping*. Cancer Treat Rev, 2020. **87**: p. 102022.
33. Wolf, J., et al., *Capmatinib in MET Exon 14–Mutated or MET–Amplified Non–Small–Cell Lung Cancer*. New England Journal of Medicine, 2020. **383**(10): p. 944-957.
34. Van Der Steen, N., et al., *cMET Exon 14 Skipping: From the Structure to the Clinic*. J Thorac Oncol, 2016. **11**(9): p. 1423-32.
35. Le, X., et al., *Tepotinib Efficacy and Safety in Patients with MET Exon 14 Skipping NSCLC: Outcomes in Patient Subgroups from the VISION Study with Relevance for Clinical Practice*. Clin Cancer Res, 2022. **28**(6): p. 1117-1126.
36. Canon, J., et al., *The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity*. Nature, 2019. **575**(7781): p. 217-223.
37. Nakajima, E.C., et al., *FDA Approval Summary: Sotorasib for KRAS G12C-Mutated Metastatic NSCLC*. Clin Cancer Res, 2022. **28**(8): p. 1482-1486.
38. Hong, D.S., et al., *KRAS(G12C) Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors*. N Engl J Med, 2020. **383**(13): p. 1207-1217.
39. Wang, Y., et al., *HER2 exon 20 insertions in non-small-cell lung cancer are sensitive to the irreversible pan-HER receptor tyrosine kinase inhibitor pyrotinib*. Ann Oncol, 2019. **30**(3): p. 447-455.

40. Pillai, R.N., et al., *HER2 mutations in lung adenocarcinomas: A report from the Lung Cancer Mutation Consortium*. *Cancer*, 2017. **123**(21): p. 4099-4105.
41. Li, B.T., et al., *HER2 Amplification and HER2 Mutation Are Distinct Molecular Targets in Lung Cancers*. *J Thorac Oncol*, 2016. **11**(3): p. 414-9.
42. Li, B.T., et al., *Trastuzumab Deruxtecan in HER2-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2022. **386**(3): p. 241-251.
43. Yang, G., et al., *Specific HER2 Exon 20 Gly776 Deletion-Insertions in Non-Small Cell Lung Cancer: Structural Analysis and Sensitivity to HER2-Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors*. *Front Pharmacol*, 2022. **13**: p. 806737.
44. Falk, M., et al., *Response of an HER2-Mutated NSCLC Patient to Trastuzumab Deruxtecan and Monitoring of Plasma ctDNA Levels by Liquid Biopsy*. *Current Oncology*, 2023. **30**(2): p. 1692-1698.
45. Schram, A.M., et al., *Efficacy and safety of zenocutuzumab, a HER2 x HER3 bispecific antibody, across advanced NRG1 fusion (NRG1+) cancers*. 2022, American Society of Clinical Oncology.
46. Tsao, A.S., et al., *Scientific Advances in Lung Cancer 2015*. *Journal of Thoracic Oncology*, 2016. **11**(5): p. 613-638.
47. Rossi, G., et al., *Präzisionsmedizin bei NSCLC im Zeitalter der Immuntherapie: Neue Biomarker zur Selektion der am besten geeigneten Therapie oder des am besten geeigneten Patienten*. *Kompass Pneumologie*, 2020. **8**(6): p. 300-317.
48. Rizvi, N.A., et al., *Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer*. *Science*, 2015. **348**(6230): p. 124-8.
49. Alexandrov, L.B., et al., *Signatures of mutational processes in human cancer*. *Nature*, 2013. **500**(7463): p. 415-21.
50. McGranahan, N., et al., *Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade*. *Science*, 2016. **351**(6280): p. 1463-9.
51. Rizvi, H., et al., *Molecular Determinants of Response to Anti-Programmed Cell Death (PD)-1 and Anti-Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Profiled With Targeted Next-Generation Sequencing*. *J Clin Oncol*, 2018. **36**(7): p. 633-641.
52. Carbone, D.P., et al., *First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2017. **376**(25): p. 2415-2426.
53. Hellmann, M.D., et al., *Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(22): p. 2093-2104.
54. Hellmann, M.D., et al., *Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2019. **381**(21): p. 2020-2031.
55. Wild, P.J., *Stellenwert der Testung der Tumormutationslast*. *Der Pathologe*, 2019. **40**(3): p. 366-368.
56. Szustakowski, J.D., et al., *Evaluation of tumor mutation burden as a biomarker for immune checkpoint inhibitor efficacy: a calibration study of whole exome sequencing with FoundationOne®*. 2018, AACR.
57. Peters, S., et al., *Abstract CT074: Tumor mutational burden (TMB) as a biomarker of survival in metastatic non-small cell lung cancer (mNSCLC): Blood and tissue TMB analysis from MYSTIC, a Phase III study of first-line durvalumab±tremelimumab vs chemotherapy*. 2019, AACR.
58. Marabelle, A., et al., *Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study*. *Lancet Oncol*, 2020. **21**(10): p. 1353-1365.
59. Pécuchet, N., et al., *Different prognostic impact of STK11 mutations in non-squamous non-small-cell lung cancer*. *Oncotarget*, 2017. **8**(14): p. 23831-23840.

60. Papillon-Cavanagh, S., et al., *STK11 and KEAP1 mutations as prognostic biomarkers in an observational real-world lung adenocarcinoma cohort*. *ESMO Open*, 2020. **5**(2).
61. Gullapalli, S., et al., *Update on Targeted Therapies for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Durvalumab in Context*. *Onco Targets Ther*, 2020. **13**: p. 6885-6896.
62. Wang, F., et al., *Evaluation of POLE and POLD1 Mutations as Biomarkers for Immunotherapy Outcomes Across Multiple Cancer Types*. *JAMA Oncol*, 2019. **5**(10): p. 1504-1506.
63. Heuckmann, J.M. and R.K. Thomas, *A new generation of cancer genome diagnostics for routine clinical use: overcoming the roadblocks to personalized cancer medicine*. *Ann Oncol*, 2015. **26**(9): p. 1830-1837.
64. Heitzer, E., et al., *The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer*. *NPJ Precis Oncol*, 2017. **1**(1): p. 36.
65. Siravegna, G., et al., *Integrating liquid biopsies into the management of cancer*. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2017. **14**(9): p. 531-548.
66. Wan, J.C.M., et al., *Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA*. *Nature Reviews Cancer*, 2017. **17**(4): p. 223-238.
67. Kerr, K.M., *The PD-L1 Immunohistochemistry Biomarker: Two Steps Forward, One Step Back?* *J Thorac Oncol*, 2018. **13**(3): p. 291-294.
68. Hirsch, F.R., et al., *PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project*. *J Thorac Oncol*, 2017. **12**(2): p. 208-222.
69. Rimm, D.L., et al., *A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer*. *JAMA Oncol*, 2017. **3**(8): p. 1051-1058.
70. Ratcliffe, M.J., et al., *Agreement between Programmed Cell Death Ligand-1 Diagnostic Assays across Multiple Protein Expression Cutoffs in Non-Small Cell Lung Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2017. **23**(14): p. 3585-3591.
71. Tsao, M.S., et al., *PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project*. *J Thorac Oncol*, 2018. **13**(9): p. 1302-1311.
72. Hellmann, M.D., et al., *Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 012): results of an open-label, phase 1, multicohort study*. *Lancet Oncol*, 2017. **18**(1): p. 31-41.
73. Cristescu, R., et al., *Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy*. *Science*, 2018. **362**(6411).
74. Chalmers, Z.R., et al., *Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden*. *Genome Med*, 2017. **9**(1): p. 34.
75. Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, *Neoantigens in cancer immunotherapy*. *Science*, 2015. **348**(6230): p. 69-74.
76. Gubin, M.M., et al., *Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(9): p. 3413-21.
77. Grizzi, G., et al., *Putative predictors of efficacy for immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer: facing the complexity of the immune system*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017. **17**(12): p. 1055-1069.
78. Chabanon, R.M., et al., *Mutational Landscape and Sensitivity to Immune Checkpoint Blockers*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(17): p. 4309-21.
79. Luksza, M., et al., *A neoantigen fitness model predicts tumour response to checkpoint blockade immunotherapy*. *Nature*, 2017. **551**(7681): p. 517-520.
80. Hellmann, M.D., et al., *Genomic Features of Response to Combination Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer*. *Cancer Cell*, 2018. **33**(5): p. 843-852.e4.

81. Boucher, Y., *Tumor mutational burden (TMB) as a biomarker of response to immunotherapy in small cell lung cancer*. J Thorac Dis, 2018. **10**(8): p. 4689-4693.
82. Samstein, R.M., et al., *Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types*. Nat Genet, 2019. **51**(2): p. 202-206.
83. Gandhi, L., et al., *Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer*. N Engl J Med, 2018. **378**(22): p. 2078-2092.
84. Borghaei, H., et al., *24-Month Overall Survival from KEYNOTE-021 Cohort G: Pemetrexed and Carboplatin with or without Pembrolizumab as First-Line Therapy for Advanced Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer*. J Thorac Oncol, 2019. **14**(1): p. 124-129.
85. Kowanetz, M., et al., *MA 05.09 Pre-existing immunity measured by teff gene expression in tumor tissue is associated with atezolizumad efficacy in NSCLC*. Journal of Thoracic Oncology, 2017. **12**(11): p. S1817-S1818.
86. Nahar, R., et al., *Elucidating the genomic architecture of Asian EGFR-mutant lung adenocarcinoma through multi-region exome sequencing*. Nature communications, 2018. **9**(1): p. 216.
87. Stenzinger, A., et al., *Tumor mutational burden standardization initiatives: Recommendations for consistent tumor mutational burden assessment in clinical samples to guide immunotherapy treatment decisions*. Genes Chromosomes Cancer, 2019. **58**(8): p. 578-588.
88. Addeo, A., G.L. Banna, and G.J. Weiss, *Tumor Mutation Burden-From Hopes to Doubts*. JAMA Oncol, 2019. **5**(7): p. 934-935.
89. *Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Clinical Practice Guidelines [Guidelines] 2018 26 January 2019; Available from: <https://www.esmo.org/Guidelines/Lung-and-Chest-Tumours/Metastatic-Non-Small-Cell-Lung-Cancer>.
90. Offin, M., et al., *Tumor Mutation Burden and Efficacy of EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(3): p. 1063-1069.
91. Spigel, D.R., et al., *Total mutation burden (TMB) in lung cancer (LC) and relationship with response to PD-1/PD-L1 targeted therapies*. Journal of Clinical Oncology, 2016. **34**(15_suppl): p. 9017-9017.
92. Yarchoan, M., et al., *PD-L1 expression and tumor mutational burden are independent biomarkers in most cancers*. JCI Insight, 2019. **4**(6).
93. Reck, M., et al., *Nivolumab plus ipilimumab versus chemotherapy as first-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer with high tumour mutational burden: patient-reported outcomes results from the randomised, open-label, phase III CheckMate 227 trial*. Eur J Cancer, 2019. **116**: p. 137-147.
94. Chapman, A.M., et al., *Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis and comparison of never and ever smokers*. Lung Cancer, 2016. **102**: p. 122-134.
95. Skoulidis, F., et al., *STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma*. Cancer Discov, 2018. **8**(7): p. 822-835.
96. Lagos, G.G., B. Izar, and N.A. Rizvi, *Beyond Tumor PD-L1: Emerging Genomic Biomarkers for Checkpoint Inhibitor Immunotherapy*. American Society of Clinical Oncology Educational Book, 2020(40): p. 1-11.
97. Rizvi, N., et al., *OA04.07 Mutations Associated with Sensitivity or Resistance to Immunotherapy in mNSCLC: Analysis from the MYSTIC Trial*. Journal of Thoracic Oncology, 2019. **14**(10): p. S217.
98. Stenzinger, A., et al., *Harmonization and Standardization of Panel-Based Tumor Mutational Burden Measurement: Real-World Results and Recommendations of the Quality in Pathology Study*. J Thorac Oncol, 2020.

99. Klebanov, N., et al., *Burden of unique and low prevalence somatic mutations correlates with cancer survival*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 4848.
100. Mok, T.S.K., et al., *Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial*. *Lancet*, 2019. **393**(10183): p. 1819-1830.
101. Piha-Paul, S.A., et al., *Efficacy and safety of pembrolizumab for the treatment of advanced biliary cancer: Results from the KEYNOTE-158 and KEYNOTE-028 studies*. *Int J Cancer*, 2020.
102. Scheel, A.H., et al., *Predictive PD-L1 immunohistochemistry for non-small cell lung cancer : Current state of the art and experiences of the first German harmonization study*. *Pathologe*, 2016. **37**(6): p. 557-567.
103. Jóri, B., et al., *Comparison of Resistance Spectra after First and Second Line Osimertinib Treatment Detected by Liquid Biopsy*. *Cancers*, 2021. **13**(12): p. 2861.
104. Ramalingam, S.S., et al., *Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC*. *N Engl J Med*, 2020. **382**(1): p. 41-50.
105. Sequist, L.V., et al., *Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors*. *Sci Transl Med*, 2011. **3**(75): p. 75ra26.
106. Turke, A.B., et al., *Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(1): p. 77-88.
107. Wang, W., et al., *Crizotinib with or without an EGFR-TKI in treating EGFR-mutant NSCLC patients with acquired MET amplification after failure of EGFR-TKI therapy: a multicenter retrospective study*. *Journal of Translational Medicine*, 2019. **17**(1): p. 52.
108. Leonetti, A., et al., *Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer*. *Br J Cancer*, 2019. **121**(9): p. 725-737.
109. Wang, S., et al., *EGFR C797S mutation mediates resistance to third-generation inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer*. *J Hematol Oncol*, 2016. **9**(1): p. 59.
110. Ercan, D., et al., *EGFR Mutations and Resistance to Irreversible Pyrimidine-Based EGFR Inhibitors*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(17): p. 3913-23.
111. Thress, K.S., et al., *Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M*. *Nat Med*, 2015. **21**(6): p. 560-2.
112. Menon, R., et al., *A Novel EGFR(C797) Variant Detected in a Pleural Biopsy Specimen from an Osimertinib-Treated Patient Using a Comprehensive Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Assay*. *J Thorac Oncol*, 2016. **11**(9): p. e105-7.
113. Niederst, M.J., 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): p. 3924-33.
114. Wang, Z., et al., *Lung Adenocarcinoma Harboring EGFR T790M and In Trans C797S Responds to Combination Therapy of First- and Third-Generation EGFR TKIs and Shifts Allelic Configuration at Resistance*. *J Thorac Oncol*, 2017. **12**(11): p. 1723-1727.
115. Lee, J., et al., *Rare Mechanism of Acquired Resistance to Osimertinib in Korean Patients with EGFR-mutated Non-small Cell Lung Cancer*. *Cancer Res Treat*, 2019. **51**(1): p. 408-412.
116. Schrock, A.B., et al., *Receptor Tyrosine Kinase Fusions and BRAF Kinase Fusions are Rare but Actionable Resistance Mechanisms to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors*. *J Thorac Oncol*, 2018. **13**(9): p. 1312-1323.
117. Le, X., et al., *Landscape of EGFR-Dependent and -Independent Resistance Mechanisms to Osimertinib and Continuation Therapy Beyond Progression in EGFR-Mutant NSCLC*. *Clin Cancer Res*, 2018. **24**(24): p. 6195-6203.
118. Rolfo, C., et al., *Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC*. *J Thorac Oncol*, 2018. **13**(9): p. 1248-1268.

119. Lindeman, N.I., et al., *Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology*. J Thorac Oncol, 2018. **13**(3): p. 323-358.
120. Mellert, H., et al., *Development and Clinical Utility of a Blood-Based Test Service for the Rapid Identification of Actionable Mutations in Non-Small Cell Lung Carcinoma*. J Mol Diagn, 2017. **19**(3): p. 404-416.
121. How Kit, A., et al., *Sensitive detection of KRAS mutations using enhanced-ice-COLD-PCR mutation enrichment and direct sequence identification*. Hum Mutat, 2013. **34**(11): p. 1568-80.
122. Müller, J.N., et al., *Concordance between Comprehensive Cancer Genome Profiling in Plasma and Tumor Specimens*. J Thorac Oncol, 2017. **12**(10): p. 1503-1511.
123. Cho, J.H., et al., *Osimertinib for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Uncommon EGFR Mutations: A Multicenter, Open-Label, Phase II Trial (KCSG-LU15-09)*. J Clin Oncol, 2020. **38**(5): p. 488-495.
124. Chiu, C.H., et al., *Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment Response in Advanced Lung Adenocarcinomas with G719X/L861Q/S768I Mutations*. J Thorac Oncol, 2015. **10**(5): p. 793-799.
125. Sato, H., et al., *Allele-Specific Role of ERBB2 in the Oncogenic Function of EGFR L861Q in EGFR-Mutant Lung Cancers*. J Thorac Oncol, 2020.
126. Chiba, M., et al., *Efficacy of irreversible EGFR-TKIs for the uncommon secondary resistant EGFR mutations L747S, D761Y, and T854A*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 281.
127. Demierre, N., et al., *A dramatic lung cancer course in a patient with a rare EGFR germline mutation exon 21 V843I: Is EGFR TKI resistance predictable?* Lung Cancer, 2013. **80**(1): p. 81-4.
128. Matsushima, S., et al., *V843I, a lung cancer predisposing EGFR mutation, is responsible for resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors*. J Thorac Oncol, 2014. **9**(9): p. 1377-84.
129. Zhao, S., et al., *Loss of T790M mutation is associated with early progression to osimertinib in Chinese patients with advanced NSCLC who are harboring EGFR T790M*. Lung Cancer, 2019. **128**: p. 33-39.
130. Papadimitrakopoulou, V.A., et al., *Analysis of resistance mechanisms to osimertinib in patients with EGFR T790M advanced NSCLC from the AURA3 study*. Annals of Oncology, 2018. **29**: p. viii741.
131. Nakagawa, K., et al., *Ramucirumab plus erlotinib in patients with untreated, EGFR-mutated, advanced non-small-cell lung cancer (RELAY): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2019. **20**(12): p. 1655-1669.
132. Lazzari, C., et al., *Mechanisms of resistance to osimertinib*. J Thorac Dis, 2020. **12**(5): p. 2851-2858.
133. Ribeiro, M., et al., *Impressive response to dabrafenib, trametinib, and osimertinib in a metastatic EGFR-mutant/BRAF V600E lung adenocarcinoma patient*. NPJ Precis Oncol, 2021. **5**(1): p. 5.
134. Nagano, T., M. Tachihara, and Y. Nishimura, *Mechanism of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors and a Potential Treatment Strategy*. Cells, 2018. **7**(11).
135. Zhai, X., et al., *Insight into the Therapeutic Selectivity of the Irreversible EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Osimertinib through Enzyme Kinetic Studies*. Biochemistry, 2020. **59**(14): p. 1428-1441.
136. Lim, Z.-F. and P.C. Ma, *Emerging insights of tumor heterogeneity and drug resistance mechanisms in lung cancer targeted therapy*. Journal of hematology & oncology, 2019. **12**(1): p. 1-18.
137. Lim, S.M., et al., *Acquired resistance to EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer: Mechanisms and therapeutic strategies*. Cancer Treat Rev, 2018. **65**: p. 1-10.

138. Cross, D.A., et al., *AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(9): p. 1046-61.
139. Kim, S.Y. and B. Halmos, *Choosing the best first-line therapy: NSCLC with no actionable oncogenic driver*. *Lung Cancer Manag*, 2020. **9**(3): p. Lmt36.
140. Mazieres, J., et al., *Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: results from the IMMUNOTARGET registry*. *Ann Oncol*, 2019. **30**(8): p. 1321-1328.
141. Robichaux, J.P., et al., *Mechanisms and clinical activity of an EGFR and HER2 exon 20–selective kinase inhibitor in non–small cell lung cancer*. *Nature medicine*, 2018. **24**(5): p. 638-646.
142. Ko, B., et al., *MET/HGF pathway activation as a paradigm of resistance to targeted therapies*. *Ann Transl Med*, 2017. **5**(1): p. 4.
143. Hirsch, F., M. Varella-Garcia, and W. Franklin, *Evaluation of HER2/neu in non-small cell lung cancer by immunohistochemistry and fluorescence in-situ hybridization (FISH) techniques*. *Br J Cancer*, 2002. **86**(1449): p. 2002-1456.
144. Zhao, J. and Y. Xia, *Targeting HER2 Alterations in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Comprehensive Review*. *JCO Precis Oncol*, 2020. **4**: p. 411-425.
145. Guisier, F., et al., *Efficacy and Safety of Anti-PD-1 Immunotherapy in Patients With Advanced NSCLC With BRAF, HER2, or MET Mutations or RET Translocation: GFPC 01-2018*. *J Thorac Oncol*, 2020. **15**(4): p. 628-636.
146. Addeo, A., et al., *Immunotherapy in non-small cell lung cancer harbouring driver mutations*. *Cancer Treat Rev*, 2021. **96**: p. 102179.
147. Cortés, J., et al., *Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2022. **386**(12): p. 1143-1154.
148. Modi, S., et al., *Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2022.
149. Lone, S.N., et al., *Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments*. *Molecular Cancer*, 2022. **21**(1): p. 1-22.
150. Consortium, A.P.G., et al., *AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium*. *Cancer discovery*, 2017. **7**(8): p. 818-831.
151. Moasser, M.M., *The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis*. *Oncogene*, 2007. **26**(45): p. 6469-6487.
152. Zinner, R.G., et al., *Trastuzumab in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with Her2-overexpressing, untreated, advanced non-small cell lung cancer: report of a phase II trial and findings regarding optimal identification of patients with Her2-overexpressing disease*. *Lung Cancer*, 2004. **44**(1): p. 99-110.
153. Gatzemeier, U., et al., *Randomized phase II trial of gemcitabine–cisplatin with or without trastuzumab in HER2-positive non-small-cell lung cancer*. *Annals of oncology*, 2004. **15**(1): p. 19-27.
154. Krug, L.M., et al., *Randomized phase II study of weekly docetaxel plus trastuzumab versus weekly paclitaxel plus trastuzumab in patients with previously untreated advanced nonsmall cell lung carcinoma*. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 2005. **104**(10): p. 2149-2155.
155. Arrieta, O., et al., *Usefulness of serum carcinoembryonic antigen (CEA) in evaluating response to chemotherapy in patients with advanced non small-cell lung cancer: a prospective cohort study*. *BMC Cancer*, 2013. **13**: p. 254.
156. Facchinetti, F., et al., *CEA serum level as early predictive marker of outcome during EGFR-TKI therapy in advanced NSCLC patients*. *Tumour Biol*, 2015. **36**(8): p. 5943-51.

157. Hunter, F.W., et al., *Mechanisms of resistance to trastuzumab emtansine (T-DM1) in HER2-positive breast cancer*. *British Journal of Cancer*, 2020. **122**(5): p. 603-612.
158. Zhao, H., et al., *Cabozantinib inhibits tumor growth and metastasis of a patient-derived xenograft model of papillary renal cell carcinoma with MET mutation*. *Cancer Biol Ther*, 2017. **18**(11): p. 863-871.
159. Jänne, P.A., et al., *Adagrasib in Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring a KRAS(G12C) Mutation*. *N Engl J Med*, 2022. **387**(2): p. 120-131.
160. Wu, Y.L., et al., *Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2020. **383**(18): p. 1711-1723.
161. Carbone, D.P., et al., *First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2017. **376**(25): p. 2415-2426.
162. Paz-Ares, L.G., et al., *First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced NSCLC: 4-Year Outcomes From the Randomized, Open-Label, Phase 3 CheckMate 227 Part 1 Trial*. *J Thorac Oncol*, 2022. **17**(2): p. 289-308.
163. Xu, Z., et al., *Assessment of tumor mutation burden calculation from gene panel sequencing data*. *Onco Targets Ther*, 2019. **12**: p. 3401-3409.
164. Felip, E., et al., *Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial*. *Lancet*, 2021. **398**(10308): p. 1344-1357.
165. E, F.S., et al., *INSIGHT 2: a phase II study of tepotinib plus osimertinib in MET-amplified NSCLC and first-line osimertinib resistance*. *Future Oncol*, 2022. **18**(9): p. 1039-1054.
166. Arulananda, S., et al., *Combination Osimertinib and Gefitinib in C797S and T790M EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer*. *Journal of Thoracic Oncology*, 2017. **12**(11): p. 1728-1732.
167. Wu, W., F. Haderk, and T.G. Bivona, *Non-Canonical Thinking for Targeting ALK-Fusion Onco-Proteins in Lung Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2017. **9**(12).
168. Abbosh, C., et al., *Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution*. *Nature*, 2017. **545**(7655): p. 446-451.
169. Lee, C.S., et al., *Postoperative Circulating Tumor DNA Can Predict High Risk Patients with Colorectal Cancer Based on Next-Generation Sequencing*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(16).