

CAT
Critically Appraised Topic

**Toepassing van circulerend cel-vrij DNA in plasma als ‘liquid biopsy’
voor solide tumoren**

Author: Paul-Emile Claus
Supervisor: Dr. Dieter De Smet / Prof. Dr. Geert Martens
Date: 24/01/2016

CLINICAL BOTTOM LINE

In de diagnostiek en opvolging van solide tumoren spelen klassieke serumproteïne bio-merkers en beeldvorming een cruciale rol. De snelle technologische ontwikkelingen in de genomische analyse hebben echter geleid tot een paradigmashift waarbij de analyse van mutaties in specifieke tumoren meer en meer een centrale hoeksteen wordt voor monitoring van patiënten en therapeutische beslissingen. Gedurende lange tijd werden deze mutaties bij voorkeur geanalyseerd in weefselmateriaal uit de primaire tumor of metastasen. De laatste decennia heeft een nieuwe type bio-merker, cel-vrij circulerend tumor DNA (ctDNA), zijn intrede gemaakt, en aangetoond dat het voordelen biedt naar het niet-invasief identificeren van therapeutisch relevante mutaties. Het snel opsporen van deze mutaties is van belang voor de diagnose, maar meer nog voor de monitoring van kankerpatiënten, die voor hun overleving vaak afhankelijk zijn van dure precisie geneesmiddelen. Deze geneesmiddelen werken specifiek in tegen genetische alteraties in het DNA van tumorcellen, dat door verschillende mechanismen vrij voorkomt in het bloed van de patiënt. Onder therapie kunnen nieuwe mutaties ontstaan, die soms een aanpassing van precisie geneesmiddel vereisen. Gezien de enorme omvang van dit domein focussen we ons op 1 type van tumoren, de niet-kleincellige longtumoren. Voor de moleculaire analyse van ctDNA bestaat er een groeiend arsenaal aan technische assays die elk voordelen en beperkingen hebben, maar voor hun diagnostische performantie en concordantie met de analyse van weefselbiopten erg gelijkaardig scoren. De toenemende technische mogelijkheden zijn voor een moleculair labo niet altijd makkelijk bij te houden. De uiteindelijke keuze van platform is een afweging tussen kost, turn-around time, flexibiliteit en (digitale) informatieverwerking en -weergave. Globaal kunnen we stellen dat ctDNA analyse nog onvoldoende gevoelig is om de weefselbiopsie als gouden standaard te vervangen bij de primaire diagnostiek, maar vooral een plaats verdient bij de monitoring van tumor herhal, en bij het verschijnen van resistentie mutaties onder specifieke precisie therapie.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Tumoren ontstaan per definitie door genomische veranderingen die de activiteit of expressie van proto-oncogenen of tumor suppressor genen wijzigen. Dit kan gaan om complexe structurele veranderingen (translocaties, deleties, inserties, copy number aberrations, amplificaties) ofwel puntmutaties, die meestal (in >95% van alle tumoren) verworven of somatisch zijn, maar ook erfelijk of geraden kunnen voorkomen (1). Er zijn mutaties beschreven die voorkomen bij verschillende tumoren of verschillende histologische subtypes van een tumor. Andere mutaties zijn daarentegen kenmerkend voor het ontstaan van één welbepaald type tumor (2). Zo gaan bijvoorbeeld geraden mutaties in het STK11-gen gepaard met een hoger risico op het ontwikkelen van hamartomen in het colon en het ontstaan van tumoren in colon, pancreas en ovaria (het Peutz-Jegher syndroom), terwijl somatische mutaties in STK11 geassocieerd zijn met longtumoren (3).

Het tumor-specifieke profiel van mutaties is niet alleen bepalend voor de agressiviteit van de tumor (celdeling, metastasen...), maar ook voor de therapeutische gevoeligheid of het gebrek daaraan. Door de snelle technologische evolutie van Massive Parallel Sequencing (MPS) technieken en hun dalende kost, is de moleculaire profilering van tumorbiopten op korte tijd geëvolueerd van een fundamentele onderzoekstechniek naar een centrale hoeksteen voor

(i) de diagnose en classificatie van een toenemend aantal tumoren, complementair aan de cytogenetische en morfologische karakterisering.

(ii) de identificatie van specifieke mutaties met prognostische waarde, maar nog belangrijker, voor de selectie van mutaties met een therapeutische impact, de zogenaamde 'actionable mutations'.

Die laatste vormen de basis van het precisie geneeskunde-concept: specifieke DNA mutaties in klassieke proto-oncogen signaal cascades die geassocieerd zijn met gevoeligheid dan wel resistentie aan specifieke precisie geneesmiddelen die heel selectief op de gemuteerde cascades inwerken. Dergelijke gerichte geneesmiddelen (bijv. small-molecule tyrosine kinase inhibitoren (TKI), serine/threonine kinase inhibitoren en monoklonale antilichamen) veroorzaken minder destructie van normale cellen dan de klassieke chemostatika, en worden geacht een hoger therapeutisch effect te bieden. Ze zijn doorgaans erg duur, en logischerwijze niet werkzaam bij patiënten zonder de bijhorende 'actionable mutation'. Vandaar het belang van een perfecte matching tussen specifieke mutatie en precisie geneesmiddel: deze zogenaamde 'companion diagnostics' garanderen niet alleen de beste zorg voor de patiënt, maar vermijdt ook nutteloos gebruik van kostbare middelen in het gezondheidszorgbudget.

Een belangrijke, recente evolutie is de uitbreiding van de moleculaire analyse van tumorbiopten naar cel-vrij, circulerend tumor DNA (ctDNA): door turnover van tumorcellen lekt een variabele fractie van dit DNA in de circulatie. Algemeen wordt aangenomen dat de analyse van ctDNA - ook wel 'liquid biopsy' genoemd - gebruikt kan worden als surrogaat indicator voor het pathologisch proces in de originele tumor of zijn metastasen (4). In een stijgend aantal studies wordt de toegevoegde waarde van ctDNA aangetoond: dit DNA kan op een relatief snelle en minimaal-invasieve manier in plasma of serum geanalyseerd worden, wat niet alleen het comfort voor de patiënt verhoogt maar ook duidelijk minder risico's inhoudt dan de analyse van weefselbiopten (incisie- of totale excisiebiopsies) en puncties (bijv. fine-needle aspiration; FNA). Bovendien vormt de analyse van ctDNA een representatievere indicator van de (residuele) tumorload. De meeste tumoren vertonen immers een grote cellulaire heterogeniteit door een evolutief proces waarbij 1 of meerdere, initiële driver mutaties in de vroegste tumorcel aanleiding geven tot het ontstaan van diverse klonen van dochtercellen die dan weer op hun beurt genetische alteraties vertonen door endogene of exogene stimuli. De progressieve accumulatie van additionele, en vaak onderling verschillende mutatiepatronen, zal ertoe leiden dat de genetische informatie van de tumor in de dochtercellen erg ongelijkmatig verdeeld is (5). Deze tumorheterogeniteit brengt vooral risico's met zich mee naar de representativiteit van fijne naaldbiopten: ongeveer 30% van de mutatielast in een tumor is specifiek voor dergelijke dochterklonen, waardoor er naar schatting 42% kans is om cruciale driver mutaties te missen indien men slechts 1 naaldbiopsie analyseert (6). Om die reden wordt longweefsel bekomen met een fijne naald biopsie ongeschikt geacht voor moleculaire analyse. De mutaties die ontstaan in metastasen onder invloed van chemo- en/of radiotherapie kunnen in specifieke gevallen een resistentie aan precisie geneesmiddelen induceren. Niet-invasieve, frequente opvolging van dergelijke clonale evoluties is dan ook essentieel en gebeurt bij voorkeur door herhaalde analyses van ctDNA.

Een groeiende consensus onder de diverse maatschappelijke stakeholders (oncologen, patiënten, zorgverzekeraars, farmaceutische bedrijven en de overheid) toont aan dat doorgedreven moleculaire analyse van tumoren, en hun herhaalde opvolging via ctDNA een disruptieve technologie is, waarvan verwacht wordt dat ze de overleving van kankerpatiënten zal verbeteren. Toch is er nog onzekerheid over de optimale technologie, de rationele selectie van de tumor-selectieve mutatie panels, de ontwikkeling van klinisch relevante interpretatie-algoritmen, hun impact op kernindicatoren zoals (ziektevrije) overleving en de onzekere balans tussen toegevoegde waarde en de betaalbaarheid. Deze afwegingen werden ook gemaakt in het Laboratorium Moleculaire Diagnostiek, in de dienst

Laboratoriumgeneeskunde van AZ Delta, Roeselare, en vormden de aanzet tot deze CAT. In AZ Delta werkt men momenteel aan de verdere uitbouw van een state-of-the-art moleculair oncologisch platform met uitgebreide aandacht voor de implementatie van ctDNA analyse binnen het domein van de Klinische Biologie.

In deze CAT zullen we ons focussen op de moleculaire analyse van solide tumoren, in het bijzonder van niet-kleincellige longtumoren (non-small cell lung carcinoma; NSCLC). Na een overzicht van de courante sequencing technieken, en een beschrijving van het mutatie landschap van NSCLC met duiding van relevante 'actionable' mutaties, zullen we specifiek ingaan op de plaats van ctDNA analyse in de diagnostiek, therapieselectie en opvolging van longkankerpatiënten. We besluiten met een overzicht en kritische vergelijking van de diverse technologische platformen op basis van een literatuurstudie, met bijzondere aandacht voor kritieke (pre-)analytische variabelen. Op basis daarvan proberen we aanbevelingen te formuleren voor implementatie hiervan in de zorg van longkankerpatiënten.

QUESTION(S)

- 1) *De rol van moleculaire diagnostiek bij de keuze van precisie therapie bij NSCLC: welke zijn de belangrijkste, therapeutisch relevante somatische mutaties ('actionable mutations') waarvoor specifieke testen ('companion diagnostics') noodzakelijk zijn in de huidige praktijkvoering? En wat zijn de beperkingen van de huidige state-of-the-art analyse van longweefselbiopten?*
- 2) *Wat is cel-vrij, circulerend tumor DNA (ctDNA) en hoe kan de analyse hiervan een meerwaarde betekenen voor de diagnostiek en opvolging van NSCLC patiënten? Wat is er gekend over de stabiliteit en kritische (pre-)analytische factoren van ctDNA?*
 - a. *Wat is ctDNA?*
 - b. *Klaring, stabiliteit en (pre-)analytische factoren*
- 3) *Welke moleculaire assays kunnen gebruikt worden voor de detectie van ctDNA en met welke technische aspecten moet men rekening houden?*
 - a. *Targeted (PCR-gebaseerde) versus untargeted (sequencing-gebaseerde) tests*
 - b. *Concordantie/diagnostische performantie van DNA analyse: tumorweefsel versus plasma*
 - c. *Klinische meerwaarde van ctDNA analyse?*

SEARCH TERMS

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH terms: "Carcinoma, Non-Small-Cell Lung", ("Analysis", "Diagnosis", "Drug therapy", "Genetics"); "Advanced" or "Metastatic"; "EGFR" or "ALK" or "BRAF" or "HER2" or "PIK3CA" or "KRAS"; "Multiplex Polymerase Chain Reaction"; "High-Throughput Nucleotide Sequencing"*
- 2) *Other (non-MeSH) search terms: "Liquid Biopsy"; "Cell-free DNA"; "Circulating Tumor DNA"; "Circulating Tumor Cells"; "Next-Generation Sequencing"*
- 3) *PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters*
- 4) *UpToDate Online (2016)*

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- a) *References*

1. Futreal, P., Coin, L., Marshall, M. et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2004;4(3):177–183
2. Swanton, C., Govindan, R. Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016;374(19):1864–73
3. Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Esteller, M. et al. Inactivation of LKB1 / STK11 Is a Common Event in Adenocarcinomas of the Lung. *Cancer Res* 2002;62(13):3659–62
4. Ziegler, A., Zangemeister-Wittke, U., Stahel, R. Circulating DNA: A new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev* 2002;28(5):255–271
5. Sacher, A., Paweletz, C., Dahlberg, S.E. et al. Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol* 2016;2(8):1014–22
6. De Bruin, E.C., McGranahan, N., Mitter, R. et al. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science* 2014;346(6206):251-6
7. Semenova, E.A., Nagel, R., Berns, A. Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. *Genes Dev* 2015;29:1447–62
8. Varella-Garcia, M. Chromosomal and genomic changes in lung cancer. *Cell Adh Migr* 2010;4(1):100-106
9. Kris, M.G., Johnson, B.E., Berry, L.D. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA* 2014;311(19):1998–2006
10. Barlesi, F., Mazieres, J., Merlio, J.P. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: Results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet* 2016;387(10026):1415–26
11. Kobayashi, S., Boggon, T.J., Dayaram, T. et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005;352:786-92
12. Oxnard, G.R., Paweletz, C.P., Kuang, Y. et al. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res* 2014;20:1698-1705
13. Bordi, P., Del Re, M., Danesi, R., Tiseo, M. et al. Circulating DNA in diagnosis and monitoring EGFR gene mutations in advanced non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2015; 4(5):584–597
14. Sequist, L.V., Waltman, B.A., Dias-santagata, D. et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011;3(75): 75ra26
15. Watanabe, S., Tanaka, J., Ota, T. et al. Clinical responses to EGFR-tyrosine kinase inhibitor retreatment in non-small cell lung cancer patients who benefited from prior effective gefitinib therapy: a retrospective analysis. *BMC Cancer* 2011;11:1
16. Jackman, D.M., Miller V.A., Cioffredi L.A. et al. Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer

patients: results of an online tumor registry of clinical trials. *Clin Cancer Res* 2009;15(16):5267–73

17. Pao, W., Wang, T.Y., Riely, G.J. et al. KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. *PLoS Med* 2005;2(1):e17
18. Stinchcombe, T.E., Johnson, G.L. MEK Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung cancer* 2014;86(2):121-125
19. Engelman, J.A., Chen, L., Tan, X. et al. Effective Use of PI3K and MEK Inhibitors to Treat Mutant K-Ras G12D and PIK3CA H1047R Murine Lung Cancers. *Nat med* 2008;14(12):1351-6
20. Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B. et al. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:809-19
21. Sosman, J.A., Kim, K.B., Schuchter, L. et al. Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *N Engl J Med* 2012;366:707-14
22. Hyman, D.M., Puzanov, I., Subbiah, V. et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med* 2015;373(8):726-736
23. George, R.E., Sanda, T., Hanna, M. et al. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 2008;455(7215):975-8
24. Inamura, K., Takeuchi, K., Togashi, Y. et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Modern Pathol* 2009;22:508–15
25. Inamura, K., Takeuchi, K., Togashi, Y. et al. EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Mod Pathol* 2009;22(4):508-15
26. Shaw, A.T., Yeap, B.Y., Mino-Kenudson, M. et al. Clinical Features and Outcome of Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009;27(26):4247-53
27. Camidge, R., Bang, Y.J., Kwak, E.L. et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol* 2012;13(10):1011–19
28. Friboulet, L., Li, N., Katayama, R. et al. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* 2014;4(6):662–673
29. Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q. et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131(6):1190-203
30. Bergethon, K., Shaw, A.T., Ignatius Ou, S.-H. et al. ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *J Clin Oncol* 2012;30(8):863-870
31. Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T. et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316(5827):1039-43
32. Lee, S.Y., Kim, M.J., Jin, G. et al. Somatic mutations in epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in non-small cell lung cancers. *J Thorac Oncol* 2010;5(11):1734-40

33. Kawano, O., Sasaki, H., Endo, K. et al. *PIK3CA* mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer* 2006;54(2):209-15
34. Jørgensen, J.T.. Targeted HER2 treatment in advanced gastric cancer. *Oncology* 2010;78(1):26-33
35. Buttitta, F., Barassi, F., Fresu, G. et al. Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: mutations are mainly present in adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *Int J Cancer* 2006;119(11):2586-91
36. Gandhi, L., Bahleda, R., Tolaney, S.M. et al. Phase I study of neratinib in combination with temsirolimus in patients with human epidermal growth factor receptor 2-dependent and other solid tumors. *J Clin Oncol* 2014;32(2):68–75
37. Arcila, M.E., Drilon, A., Sylvester, B.E. et al. *MAP2K1* (MEK1) Mutations Define a Distinct Subset of Lung Adenocarcinoma Associated with Smoking. *Clin Cancer Res* 2015;21(8):1935-43
38. Jin, G., Kim, M.J., Jeon, H.S. et al. *PTEN* mutations and relationship to *EGFR*, *ERBB2*, *KRAS*, and *TP53* mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* 2010;69(3):279-83
39. Cree, I.A., Deans, Z., Ligtenberg, M. et al. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *J Clin Pathol* 2014;67:923–931
40. Lindeman, N., Cagle, P.T., Beasley, M.B. et al. Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for *EGFR* and *ALK* Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2013;15:415-453
41. Mandel, P., Métais, P. Les Acides Nucléiques du Plasma Sanguin chez l'Homme. *CR Acad Sci Paris* 1948;142:241–243
42. Stroun, M., Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C., Maurice, P. A. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987;23(6):707–12
43. Goebel, G., Zitt, M., Zitt, M., Müller, H.M. Circulating nucleic acids in plasma or serum (CNAPS) as prognostic and predictive markers in patients with solid neoplasias. *Dis Markers* 2005;21(3):105–20
44. Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J. et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6(224):224ra24
45. Chiu, R.W., Chan, K.C., Gao, Y. et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massive parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:20458-63
46. Beck, J., Bierau, S., Balzer, S. et al. Digital Droplet PCR for Rapid Quantification of Donor DNA in the Circulation of Transplant Recipients as a Potential Universal Biomarker of Graft Injury. *Clin Chem* 2013;59(12):1732-41
47. Anker, P., Mulcahy, H., Chen, X. Q., Stroun, M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18(1):65–73

48. Yu, M., Stott, S., Toner, M., Maheswaran, S., Haber, D. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol* 2011;192(3):373
49. Hupert, M.L., Jackson, J.M., Wang, H. et al. Arrays of high-aspect ratio microchannels for high-throughput isolation of circulating tumor cells (CTCs). *Microsyst Technol* 2014;20(10–11):1815–25
50. Stott, S.L., Hsu, C.-H., Tsukrov, D.I. et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(35):18392–7
51. Snyder, M.W., Kircher, M., Hill, A.J., Daza, R.M., Shendure, J. Cell-free DNA Comprises an *in Vivo* Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell* 2016;164(1–2):57–68
52. Lo, Y.M., Zhang, J., Leung, T.N., Lau, T.K., Chang, A.M., Hjelm, N.M. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64(1):218–24
53. Herriott, R.M., Connolly, J.H., Gupta, S. Blood nucleases and infectious viral nucleic acids. *Nature* 1961;189:817–20
54. Qin, Z., Ljubimov, V.A., Zhou, C., Tong, Y., Liang, J. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chin J Cancer* 2016;35(5):1–9
55. Nadano, D., Yasuda, T., Kishi, K. Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clin Chem* 1993;39:448–52
56. Lee, T.H., Montalvo, L., Chrebtow, V., Busch, M.P. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum *than in plasma*. *Transfusion* 2001;41:276–82
57. El Messaoudi, S., Rolet, F., Mouliere, F., Thierry, A.R. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta* 2013;424:222–230
58. Schiavon, G., Hrebien, S., Garcia-Murillas, I. et al. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Sci Transl Med* 2015;7(313): 313ra182
59. Qiu, M., Wang, J., Xu, Y. et al. Circulating Tumor DNA Is Effective for the Detection of EGFR Mutation in Non–Small Cell Lung Cancer: A Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015;24(1)
60. Hinrichs, J., Van Blokland, M., Moons, M. et al. Comparison of Next-Generation Sequencing and Mutation-Specific Platforms in Clinical Practice. *Am J Clin Pathol* 2015;143:573–578
61. Weber, B., Meldgaard, P., Hager, H. et al. Detection of EGFR mutations in plasma and biopsies from non-small cell lung cancer patients by allele-specific PCR assays. *BMC Cancer* 2014;14:294
62. Jovelet, C., Ileana, E., Le Deley, MC. et al. Circulating Cell-Free Tumor DNA Analysis of 50 Genes by Next-Generation Sequencing in the Prospective MOSCATO Trial. *Clin Cancer Res* 2016;22(12):2960–8
63. Zheng, D., Ye, X., Zhang, M.Z. et al. Plasma EGFR T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. *Sci Rep* 2016;6:20913

64. Wei, Z., Shah, N., Deng, C. et al. *Circulating DNA addresses cancer monitoring in non small cell lung cancer patients for detection and capturing the dynamic changes of the disease.* Springerplus 2016;5:531
65. Douillard, J-Y., Ostoros, G., Cobo, M. et al. *Gefitinib Treatment in EGFR Mutated Caucasian NSCLC: Circulating-Free Tumor DNA as a Surrogate for Determination of EGFR Status.* J Thorac Oncol 2014;9:1345–53
66. Thress, K.S., Brant, R., Carr, T.H. et al. *EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291.* Lung Cancer 2015;90:509-15
67. Chen, K-Z., Lou, F., Yang, F. et al. *Circulating Tumor DNA Detection in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Targeted Sequencing.* Sci Rep 2016;6:31985
68. Couraud, S., Vaca-Paniagua, F., Villar, S. et al. *Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002.* Clin Cancer Res 2014;20:4613-24
69. Uchida, J., Kato, K., Kukita, Y. et al. *Diagnostic Accuracy of Noninvasive Genotyping of EGFR in Lung Cancer Patients by Deep Sequencing of Plasma Cell-Free DNA.* Clin Chem 2015;61(9):1191-6
70. Paweletz, C.P., Sacher, A.G., Raymond, C.K. et al. *Bias-corrected targeted next-generation sequencing for rapid, multiplexed detection of actionable alterations in cell-free DNA from advanced lung cancer patients.* Clin Cancer Res 2015;12
71. Yao, Y., Liu, J., Lei, L. et al. *Detection of circulating tumor DNA in patients with advanced non-small cell lung cancer.* Oncotarget 2016
72. Newman, A.M., Lovejoy, A.F., Klass, D.M. et al. *Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA.* Nat Biotechnol 2016;34:547-55
73. Lebofsky, R., Decraene, C., Bernard, V. et al. *Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types.* Mol Oncol 2015;9:783-90
74. Freidin, M.B., Freydina, D.V., Leung, M. et al. *Circulating tumor DNA outperforms circulating tumor cells for KRAS mutation detection in thoracic malignancies.* Clin Chem 2015;61(10):1299-304
75. Garci-Murillas I., Schiavon, G., Weigelt, B. et al. *Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer.* Sci Transl Med 2015;7(302):302ra133

b) *Guidelines, recommendations and online databases*

1. *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*
2. *My Cancer Genome® - Genetically Informed Cancer Medicin*
3. *European Society of Pathology (ref. 39)*
4. *College of American Pathologists (ref. 40)*
5. *WHO World Cancer Report 2014*
6. *Incidence Fact Sheet Lung Cancer 2013 (Belgian Cancer Registry)*

KERNWOORDEN

Liquid Biopsy – Circulerend Tumor DNA – Non-Small Cell Lung Carcinoma – Advanced – Metastasen –
Precisie Geneeskunde – PCR – Next-Generation Sequencing – Massive Parallel Sequencing

Vraag 1: de rol van moleculaire diagnostiek bij de keuze van precisie therapie bij NSCLC

a) Het genomische landschap van NSCLC

Longkanker is de meest voorkomende kanker in de wereld (nummer 1 bij mannen en 3^e meest voorkomende kanker bij vrouwen). In 2012 werden wereldwijd +/-1,8 miljoen nieuwe diagnoses gesteld, en zijn er +/-1,6 miljoen mensen aan longkanker gestorven. De incidentie voor België bedraagt 36,8 nieuwe diagnoses per 100.000 per jaar (Cijfers van het World Cancer Research Fund International en World Cancer Report 2014 van de WHO).

Histologisch onderscheidt men 4 groepen van longtumoren: plaveiselcelcarcinoom (35-40 %), adenocarcinoom (25-35 %), grootcellig carcinoom (10-15 %) en kleincellig carcinoom (20-25 %). Samen maken ze 95 % van alle longtumoren uit. De eerste 3 groepeerd men onder de niet-kleincellige longcarcinoom (NSCLC) (7). Deze histologische subtypes verschillen niet alleen in cel van origine, maar ook in het moleculaire profiel van hun mutaties. De ontwikkeling van high-throughput sequencing technieken zoals de Next-Generation Sequencing (NGS) heeft de identificatie van verschillende alteraties, gaande van puntmutaties, inserties, deleties tot translocaties mogelijk gemaakt tot een resolutie van een enkel basenpaar met een vrij hoge precisie en nauwkeurigheid. Sommige mutaties komen voor bij alle types longtumoren, zoals een (volledige of partiële) deletie in de korte arm van chromosoom 3 (3p), en een deletie in cel-cyclus regulatoren in de CDKN2A en p53 locus met verlies van ARF en p16, waardoor ontregeling van de p53 en CDK4/6/pRB assen (8). Andere mutaties zijn eerder lineage-specifiek, en komen typisch voor bij 1 specifiek histologisch subtype. Globaal zorgt de mutagene werking van sigarettenrook voor een ongewoon hoge mutatiegraad waardoor longkankers tot de genetisch meest complexe van alle tumoren behoren. Rokers hebben typisch C>A transversies met 10 mutaties per megabase (= 10⁶ basenparen; bp) tegenover 1 mutatie per megabase bij niet-rokers. Dit zorgt voor de klassieke **somatische puntmutaties in proto-oncogenen** zoals EGFR, KRAS en BRAF die typisch voorkomen in longadenocarcinoom. Dergelijke proto-oncogen mutaties vinden we typisch in de receptor tyrosine kinase signaling pathways die cruciaal zijn voor cellulaire deling, groei en differentiatie, zoals de Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)-pathway en de PI3K/AKT1/MTOR-pathway (zie figuren in attachments 2 en 3). De meeste, therapeutisch relevante alteraties van NSCLC komen voor in proto-oncogenen. Daarnaast zijn ook **somatische mutaties in tumor suppressor genen** frequent, vooral van TP53 (46%), STK11 (17%), KEAP1 (17%), NF1 (11%), RB1 (4%) en CDKN2A (4%). Tenslotte vertoont het longkankergenoom nog tal van andere, meer **complexe, structurele varianten** zoals

(i) chromosomale translocaties die aanleiding geven tot fusie constructen met diverse oncogenen zoals ALK, ROS en RET.

(ii) copy-number veranderingen die aanleiding geven tot gen amplificatie (bijv. HER2 overexpressie door ErbB2 amplificatie en MET overexpressie).

(iii) mutaties in chromatine-modificerende genen (bijv. SETD2, ARID1A en SMARCA4) en in RNA-splicing genen (bijv. RBM10 en U2AF1), die via epi-genetische veranderingen longtumoren veroorzaken.

In deze CAT zullen we ons verder focussen op de puntmutaties en fusieconstructen, waarvoor een therapeutisch correlaat bestaat.

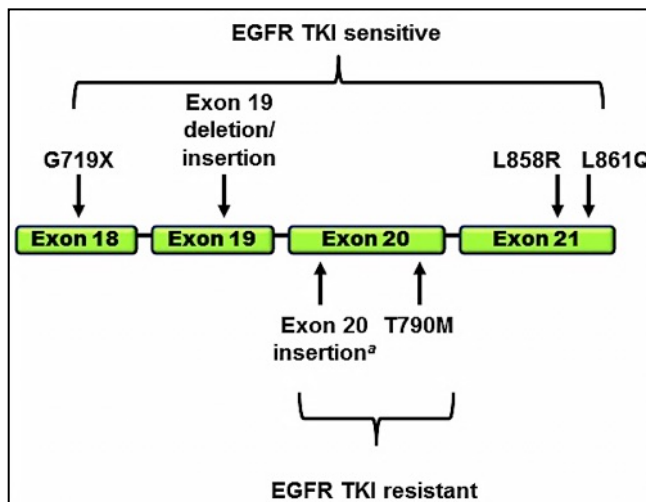
Ondanks de sterke moleculaire heterogeniteit is de initiële behandeling van lokale longtumoren (stadium I of II) in grote lijn éénvormig. Bij gelokaliseerde ziekte (primaire tumor van de long: T1 of T2 zonder lymfeklierinvasie) en indien de gezondheid van de patiënt het toelaat, is heelkundige resectie al dan niet met (neo-)adjuvante chemotherapie de centrale hoeksteen in de behandeling. Voor niet-operabele patiënten kan radiotherapie gecombineerd worden met chemotherapie. Voor patiënten met stadium III – dit omvat longtumoren met lokale invasie in het mediastinum, hart, grote bloedvaten, trachea, N. laryngeus recurrens en/of slokdarm vaak met lymfeklierinvasie - en stadium IV ziekte zijn heelkunde en radiotherapie geen optie meer en is een multidisciplinaire aanpak

aangewezen. Hierbij spelen de precisie geneesmiddelen een belangrijke rol. Dit geldt eveneens voor patiënten die een recidief ontwikkelen na een primaire behandeling met heelkunde, radio- en/of chemotherapie. Ook zij komen in aanmerking voor een secundaire behandeling met deze bio-targets. Het belang van moleculaire profilering is hier dan ook niet te onderschatten. Het Lung Cancer Mutation Consortium heeft aangetoond dat longkankerpatiënten waarbij een moleculaire alteratie werd geïdentificeerd en die behandeld worden met een specifiek gericht bio-target, een betere prognose hebben dan patiënten waarbij geen oorzakelijke mutatie kon gedetecteerd worden (9). Bij deze laatste groep patiënten is het erg moeilijk en vanzelfsprekend ook weinig zinvol om een gerichte bio-target of een combinatie hiervan op te starten, en is men aangewezen op cytotoxische chemotherapie met meer nevenwerkingen, een slechtere progressievrije overleving (7,1 versus 10 maanden) en slechtere totale overleving (11,8 versus 16,5 maanden) als gevolg (10).

Het aantal precisie moleculen die momenteel in ontwikkeling zijn voor kankerbehandeling groeit zienderogen, en dus kunnen we verwachten dat in de toekomst het aantal corresponderende, therapeutisch relevante mutaties ook verder zal toenemen. Het aantal genen/mutaties waarvoor vandaag reeds een sterke evidentie bestaat van therapeutische relevantie is echter beperkt. Onder therapeutische relevantie ('actionable') verstaan we zowel specifieke genetische alteraties die therapeutische respons voorspellen, alsook alteraties waarvan we weten dat een respons zal uitblijven. In beide gevallen levert de mutatie analyse nuttige informatie op over het wel of niet geven van kostbare precisie geneesmiddelen. Zie attachment 1 voor een volledig overzicht.

Volgende genen/mutaties zijn met zekerheid 'actionable' bij NSCLC:

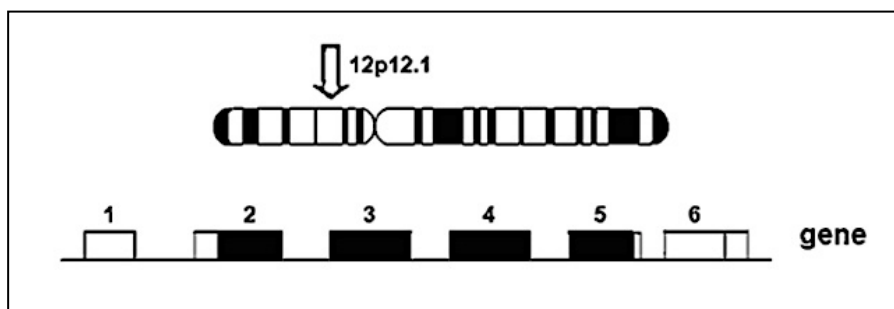
- 1) **EGFR** (gemuteerd bij 10-35% van de NSCLC en 14-16% van de longadenocarcinoma): dit gen codeert voor een 486 aminozuren-lang, trans-membranair receptor tyrosine kinase (RTK). EGFR maakt deel uit van de ErbB familie, een groep van sterk verwante receptor tyrosine kinases, waartoe ErbB1 (of EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) en ErbB4 behoren. Hoewel hun basisstructuur gelijkaardig zijn, hebben ze een verschillende activiteit. Na activatie door binding van specifieke liganden zoals Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor-alpha (TGF- α) en amphireguline aan het extracellulair domein vormt EGFR een dimeer met een ander erbB waarbij het zijn intracellulair gelegen tyrosine kinase domein auto-fosforyleert en verder downstream verschillende cascade-eiwitten activeert, waaronder RAS, RAF, MEK, transcriptiefactoren alsook eiwitten die een rol spelen in translatie (bijv. ribosomen). Deze eiwitten spelen een cruciale rol in de MAPK-pathway waarlangs signalen van buiten de cel de kern bereiken en zo de cel aanzetten tot celgroei, proliferatie en differentiatie. De c.2573T>G of L858R puntmutatie in exon 21 en deleties in exon 19 vertegenwoordigen beiden bijna elk de helft van alle EGFR-gemuteerde NSCLC. Ook andere, minder voorkomende puntmutaties in exon 18, 20 en 21 zijn beschreven (zie figuur 1). De L858R puntmutatie in exon 21 en de exon 19 deletie voorspellen doorgaans therapeutische respons ('sensitizing mutations') op de 1^{ste} generatie TKI zoals erlotinib (Tarceva[®]) of gefitinib (Iressa[®]). Andere mutaties voorspellen TKI therapie resistentie: in 50% van de erlotinib en gefitinib-resistente NSCLC gaat het om de klassieke c.2369C>T of T790M mutatie op exon 20 (11). De T790M mutatie is zelden aanwezig van bij de start, maar treedt frequent op onder therapie met TKI: bij 49 tot 63% van de EGFR gemuteerde NSCLC na een mediane behandelingsperiode van 10-12 maanden (12, 13). Bovendien kunnen T790M-gemuteerde tumorcellen bij eenzelfde patiënt ook weer verdwijnen. In enkele case reports wordt melding gemaakt van patiënten die de T790M mutatie ontwikkelden onder TKI therapie en hierdoor resistentie verwierven, maar deze mutatie ook weer verloren en opnieuw een goede respons op TKI vertoonden (14, 15).



Figuur 1: schematische voorstelling van het EGFR-gen met voornaamste mutaties. Mutaties bovenaan zijn geassocieerd met gevoeligheid aan EGFR TKI. Mutaties onderaan induceren resistentie aan EGFR TKI. (Bron: *My Cancer Genome*®)

2) **KRAS** (Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene) is gemuteerd bij 15-25% van de NSCLC, en 33% van de adenocarcinoma. Dit gen, gelegen op de korte arm van chromosoom 12, codeert voor een intracellulair, membraangebonden GTPase eiwit dat samen met HRAS en NRAS deel uitmaakt van de RAS-familie (zie figuur 2). Het RAS-eiwit werkt als een schakelaar dat aan guanosinetrifosfaat (GTP) bindt en het hydrolyseert tot guanosinedifosfaat (GDP), waardoor het zichzelf 'aanschakelt' en andere eiwitten meer downstream in de MAPK-pathway activeert. Mutaties in KRAS komen typisch voor in exon 1 (waarvan +/-80% in codon 12), 2, 3 of 4 en zijn typisch missense puntmutaties. EGFR en KRAS mutaties zijn beiden driver mutaties van longadenocarcinoma, maar komen zelden samen voor in eenzelfde tumorcel en definiëren fundamenteel andere tumorceltypes. Aangezien KRAS downstream van EGFR staat, zorgen KRAS mutaties voor een activatie van de EGFR pathway die los staat van upstream EGFR stimulatie. Bovendien dragen KRAS-gemuteerde NSCLC typisch een normaal wild-type EGFR waardoor zij therapeutische resistentie vertonen aan EGFR TKI (16, 17). Ze beantwoorden dus in de regel niet aan therapie met 1^e generatie TKI en voorspellen dan ook een globaal slechtere overleving dan EGFR-gemuteerde NSCLC. Dergelijke KRAS mutaties zijn dus klinisch bruikbaar om de afwezigheid van respons op TKI te voorspellen, hetgeen nutteloze behandeling van de patiënt met deze dure medicijnen vermijdt.

Onderzoek naar specifieke geneesmiddelen tegen KRAS in NSCLC is tot op heden weinig succesvol. Daarom wordt de focus in de laatste jaren gericht op de effectoren van het geactiveerde KRAS meer downstream in de MAPK-pathway zoals het MEK-gen, dat specifiek geïnhibeerd kan worden door selumetinib of trametinib (Lexicomp®). Deze MEK-inhibitoren worden bij voorkeur gecombineerd met chemotherapie, of in zeldzame gevallen met erlotinib. In monotherapie worden ze bijna nooit toegediend (18). De resultaten betreffende tumorreductie en overleving onder deze MEK-inhibitoren worden echter in andere experimentele studies op dierenmodellen tegengesproken (19).



Figuur 2: KRAS-gen op de korte arm van chromosoom 12. (Bron: *My Cancer Genome*®)

- 3) **BRAF** (gemuteerd bij 1-4% van NSCLC, en 10% van de longadenocarcinoma): dit gen codeert voor een signaal mediator downstream van KRAS. Er zijn meer dan 30 oncogene mutaties in het BRAF-gen gekend, maar in meer dan 50% van de gevallen gaat het om een substitutie van Thyminen naar Adenine op nucleotide 1799 in exon 15 waardoor Valine wordt vervangen door Glutamaat op codon 600 (V600E puntmutatie) in het deel dat codeert voor het kinase-domein van het eiwit. Andere puntmutaties in exon 11 (bijv. c.1406G>T of Gly469Val en c.1406G>C of Gly469Ala) en exon 15 zijn ook beschreven maar minder frequent. De ontwikkeling van specifieke BRAF-inhibitoren gebeurt vooral in het oncologisch veld van de melanomen daar in +/- 50% van de melanomen de V600E puntmutatie in het BRAF-gen wordt geïdentificeerd. Small-molecule TKI zoals vemurafenib (Zelboraf®) en dabrafenib toonden een goede respons bij V600E-positieve, gemetastaseerde melanoma patiënten (20, 21), maar ook bij BRAF-gemuteerde NSCLC (22).
- 4) Het **ALK** of Anaplastic Lymphoma Kinase-gen codeert eveneens voor een RTK. Activerende missense mutaties in het ALK-gen zijn beschreven in subtypes van neuroblastomen (23). Belangrijker zijn ALK-fusies die in anaplastische grootcellige lymfomen, colorectale tumoren, ovariumkankers en in NSCLC kunnen worden teruggevonden. Meestal betreft het een translocatie tussen 2 verschillende chromosomen waarbij het volledige ALK-gen fuseert met een ander, hetzij volledig, actief gen, hetzij met een deel van een gen. De meest voorkomende ALK fusie constructen in NSCLC zijn **EML4-ALK** rearrangements. Ze komen voor bij ongeveer 4% van de NSCLC en zijn meer frequent in adenocarcinomen dan in de andere NSCLC subtypes. Ze komen typisch voor bij niet-rokers of vroegere rokers en bij relatief jongere patiënten: gemiddeld 56 jaar tegenover NSCLC-patiënten met een andere of geen detecteerbare mutatie die gemiddeld 64 jaar zijn op moment van diagnose (24). EML4-ALK fusies zijn wederzijds exclusief met EGFR en KRAS mutaties (25). Tot op heden zijn 9 verschillende EML4-ALK varianten gekend. Ook niet-EML4 fusie partners van ALK zijn geïdentificeerd, zoals KIF5B-ALK en TFG-ALK. Volgens Shaw et al zijn EML4-ALK fusies geassocieerd met resistentie aan EGFR TKI (26). Crizotinib (Xalkori®) is een specifieke, FDA-approved ALK-inhibitor, die een verlengde progressievrije overleving geeft (27). Echter, een toenemende verworven resistentie tegen deze ALK TKI wordt beschreven, vermoedelijk door het optreden van puntmutaties in het ALK kinase domein onder therapie. Tweede generatie ALK TKI zoals ceritinib (Zykadia®) en alectinib (Alecensa®) vertonen in deze gevallen een betere werking (28).
- 5) Het **ROS1**-gen, gelegen op chromosoom 6q22, codeert voor een RTK van de insuline receptor familie. ROS1-fusies met een intact tyrosine kinase domein zijn potentiële driver mutaties in NSCLC (29). ROS1-fusies worden geïdentificeerd bij ongeveer 2% van de longtumoren. Net als bij ALK, zijn ROS1-fusies meer frequent in adenocarcinomen, bij niet-rokers of vroegere rokers en bij relatief jongere patiënten. Verschillende ROS1 fusie varianten zijn beschreven in NSCLC, waaronder SLC34A2-ROS1, CD74-ROS1, EZR-ROS1, TPM3-ROS1 en SDC4-ROS1. In een aantal klinische studies wordt aangetoond dat de specifieke TKI crizotinib ook actief is tegen ROS1 wegens de sterke structurele gelijkenissen tussen de tyrosine kinase domeinen van ALK en ROS1 (30).
- 6) Het **MET**-gen, gelegen op chromosoom 7, codeert voor een RTK dat behoort tot de MET/ROn-familie. Door binding van zijn ligand, de Hepatocyte Growth Factor (HGF), worden zowel de MAPK-pathway als de verwante PI3K/AKT/MTOR-pathway geactiveerd. Overexpressie van MET door gen amplificatie maar ook skipping mutaties in exon 14 komen voor bij 2-4% van NSCLC en bij +/-20% van de NSCLC met verworven resistentie tegen EGFR TKI, en leidt tot een verhoogde ErbB3 (Her3)-afhankelijke activatie van PI3K. Standaardtesten voor het analyseren van MET expressie omvatten immunohistochemische (IHC) en FISH testen. MET-amplificaties induceren resistentie tegen 1^{ste} generatie TKI (bijv. erlotinib en gefitinib) (31). In een aantal studies wordt crizotinib ook als een specifieke MET-inhibitor naar voren geschoven. We

vinden echter onvoldoende gegevens terug omtrent de efficaciteit van crizotinib bij NSCLC. Hetzelfde geldt voor foretanib (of XL880) dat bij MET-gemuteerde papillaire niertumoren in klinische trials een lichte verlenging van de progressievrije en totale overleving biedt.

Voor een aantal andere mutaties, waarvoor experimentele geneesmiddelen of specifieke combinatiebehandelingen nog volop in onderzoek zijn, is het nog te vroeg om deze te catalogeren als 'actionable mutations':

- 7) **PIK3CA**: dit gen codeert voor het katalytisch domein van het fosfatidyl3-kinase (PI3K) eiwit, een intracellulair gelegen mediator in de PI3K/AKT1/MTOR-pathway, een cascade verwant aan de MAPK-pathway. Gain-of-function mutaties in PIK3CA worden terug gevonden in 1-3% van de NSCLC, en komen frequenter voor in plaveiselcelcarcinoma en bij rokers (32). Mutaties in PIK3CA zijn typisch puntmutaties die voorkomen in exon 9, dat codeert voor een helicaal domein, en exon 20 dat codeert voor het kinase domein. Ze kunnen samen voorkomen met mutaties in EGFR en kunnen aanleiding geven tot verworven resistentie tegen EGFR antagonist (33). Specifieke small-molecule PI3K inhibitoren zijn vandaag de dag volop in klinische ontwikkeling en geven reeds veelbelovende resultaten naar behandeling toe van squameuze longkankers. Aangezien echter mutaties in PIK3CA vaak overlappen met andere moleculaire alteraties zoals in EGFR, en zij dus eerder als een 'passenger mutatie' dan een driver mutatie optreden, is het moeilijk om de klinische werkzaamheid van deze middelen in monotherapie in te schatten.
- 8) **HER2 of ERBB2** (bij 2-4% van de NSCLC): dit eiwit behoort tot de ErbB familie van transmembranaire RTK. Het gen voor HER2 bevindt zich op chromosoom 17. Specifieke liganden voor het HER2 eiwit zijn niet gekend. Wel weet men dat HER2 preferentieel betrokken is bij de hetero-dimerisatie stap van de andere ErbB's zoals EGFR, waardoor het geactiveerd wordt (gelijkaardig aan EGFR) en zowel de MAPK-pathway als de verwante PI3K/AKT/MTOR-pathway activeert. HER2 mutaties zijn typisch in-frame inserties in exon 20 die aanleiding geven tot amplificatie van het gen. Ook puntmutaties in exon 20 zijn beschreven. Ze zijn verantwoordelijk voor de tumorigenese bij verschillende andere weefsels (34). HER2 mutaties komen voor bij 2-4% van de NSCLC, vooral in adenocarcinoma en bij patiënten die nooit gerookt hebben (35). Trastuzumab (Herceptin®), een monoclonaal anti-HER2-antilichaam dat bewezen heeft grote therapeutische voordelen te bieden bij HER2-positieve borstkankers, heeft in monotherapie weinig succes bij NSCLC. Recente klinische studies beweren echter wel dat trastuzumab in combinatie met chemotherapie, of trastuzumab samen met afatinib (een EGFR/HER2 TKI), en neratinib (een HER2-inhibitor) in combinatie met temsirolimus (een mTOR-inhibitor), een licht uitstel van de ziekteprogressie van 3 tot 5 maanden kunnen bieden (36).
- 9) Het **MEK1** of MAP2K1-gen codeert voor een intracellulair gelegen mediator van de MAPK-pathway. Somatische mutaties in MEK1 komen voor in ongeveer 1% van alle NSCLC en zijn meer frequent in adenocarcinoma en bij rokers dan in plaveiselcelcarcinoma en bij niet-rokers. In een retrospectieve studie van 36 patiënten met MEK1-gemuteerde longadenocarcinoma waren de meest voorkomende mutaties c.171G>T of K57N (64%) en c.167A>C of Q56P (19%), en waren MEK1 mutaties wederzijds exclusief met mutaties in EGFR, KRAS, BRAF en andere mutaties (37). Selumetinib and trametinib zijn twee van de enkele MEK-inhibitoren die volop in ontwikkeling zijn. Volgens de eerste klinische trials zouden zij niet alleen de overleving bij MEK1-gemuteerde NSCLC verlengen maar zouden ze ook een gunstig effect hebben bij NSCLC-patiënten met mutaties in andere eiwitten die deel uitmaken van de MAPK-pathway.
- 10) Het **FGFR1** of Fibroblast Growth Factor Receptor type 1-gen is gelegen op de korte arm van chromosoom 8 en codeert eveneens voor een transmembranair RTK eiwit. Amplificaties van FGFR1 vinden we terug bij 13-25% van de squameuze longtumoren. Small-molecule FGFR1-

inhibitoren zijn volop in klinische ontwikkeling. Eénduidige resultaten zijn er tot op heden nog niet.

- 11) Het **PTEN**-gen is in feite een tumor suppressor gen dat codeert voor een fosfatase-eiwit dat een inhiberende werking uitoefent op de PI3K/AKT1/MTOR-pathway door het defosforyleren van het fosfatidylinositol(3,4,5)-trifosfaat (PIP3) ter hoogte van de celmembraan. Zowel somatische mutaties als deleties in het PTEN-gen zijn beschreven bij glioblastomen, endometrium- en prostaatkankers. Somatische mutaties in PTEN kunnen geïdentificeerd worden bij 4-8% van alle NSCLC en kunnen in verschillende exons (1 tot en met 9) voorkomen (38). Meest gekend is een inactiverende mutatie in exon 7 waarbij een stop codon wordt geïntroduceerd in het PTEN-gen. Immunochemische testen worden toegepast om veranderingen in PTEN expressie te detecteren: lage expressie leidt tot een toegenomen activiteit van de PI3K/AKT1/MTOR-pathway. De small-molecule PI3K-inhibitoren - die nog in volle ontwikkeling zijn - zouden ook bij PTEN-gemuteerde NSCLC werkzaam zijn gezien deze eiwitten deel uitmaken van dezelfde pathway, maar hiervoor bestaat nog onvoldoende evidentie in de internationale literatuur.

b) Moleculaire analyse van tumorbipten: plaats in routine zorg en beperkingen

Moleculaire analyse van tumorbipten is een belangrijke tool geworden in klinische laboratoria. Het sterk uitbreidend arsenaal aan technische mogelijkheden (PCR-gebaseerde methodes versus panel-based sequencing assays) is voor een klinisch labo niet altijd makkelijk bij te houden. Voor terugbetaling van moleculaire diagnostische tests in België is accreditatie conform de ISO15189 norm vereist. Net zoals voor andere labo analyses, stelt deze ISO norm dat ook moleculaire tests aan een grondige validatie worden onderworpen (dit geldt voor alle CE-IVD gemarkeerde tests).

Verschillende consortia en werkgroepen zoals de European Society of Pathology (ESP), UK-NEQAS, European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) en de College of American Pathologists (CAP) bieden External Quality Assessment (EQA) programma's en richtlijnen aan. Hieronder behoren ook aanbevelingen voor de samenstelling van relevante gen panels voor specifieke tumoren (bijv. EGFR, KRAS en ALK testing bij NSCLC), maar ook kwaliteitsindicatoren voor elke stap in het ganse verwerkingsproces: van het bekomen en fixeren van het biopt tot een geïntegreerde rapportering naar de clinicus (39, 40). Organisaties zoals UK-NEQAS en EMQN bieden heel recent ook nieuwe EQA schema's aan voor isolatie en analyse van ctDNA.

Ondanks doorgedreven kwaliteitsbewaking heeft de moleculaire analyse van Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) longbipten drie belangrijke beperkingen:

1) FFPE-geïnduceerde DNA artefacten: de formaline-fixatie zelf introduceert random puntmutaties in het DNA, gelijkaardig aan de mutaties geïnduceerd door bijv. roken. De klassieke T790M mutatie is daar een voorbeeld van. Aangezien dit proces willekeurig plaatsvindt, zal het niet in alle cellen van eenzelfde tumor kloon aanwezig zijn. Indien een weefselbiopsie is afgenomen met een grote hoeveelheid aan tumorcellen vormt dit geen probleem. Bij biopsiemateriaal met een lage neoplastische cellulariteit kan hierdoor echter interpretatieve onzekerheid ontstaan. Doorgaans worden mutaties die in minder dan 5% van de DNA reads worden aangetroffen daarom niet gerapporteerd, maar deze drempel verschilt van lab tot lab.

2) Niet-representativiteit van het biopt: door de tumorale heterogeniteit kan bij een naaldbiopsie accidenteel de driver mutatie of een cellulaire kloon met een actionable mutatie gemist worden. Het biopt is m.a.w. niet altijd representatief voor de gehele tumor. Door de snelle clonale evolutie van longtumoren verschilt het genomisch landschap van metastasen niet alleen van dat van de primaire tumor, maar zien we ook divergerende evolutie van individuele metastasen.

3) Biopsie niet bruikbaar voor longitudinale monitoring: een weefselbiopsie is een invasieve procedure, met risico's voor de patiënt. Het is vaak moeilijk tot onmogelijk om biopsiemateriaal te verkrijgen van diep gelegen tumoren, en zeker van uitzaaiingen in het mediastinum, bot of hersenen. Bovendien heeft men hier vaak te maken met een groep van patiënten die algemeen verzwakt zijn. Voor frequente monitoring hebben we dus nood aan een sensitieve en specifieke, circulerende biomarker, die men relatief goedkoop, gemakkelijk en niet-invasief kan bemachtigen.

Vraag 2: de toegevoegde waarde van ctDNA

a) Wat is ctDNA?

De aanwezigheid van cel-vrij DNA in de bloedcirculatie werd ontdekt in 1948 door Mandel en Métais (41). Zij stelden vast dat in het bloed van gezonde mensen korte, dubbelstrengse DNA-fragmenten van meestal <200 bp lang circuleren, afkomstig van apoptose van normale, hematopoïetische cellen. Het is pas 30 tot 40 jaar later dat men ontdekte dat de totale hoeveelheid cel-vrij DNA significant verhoogd is bij sommige kankerpatiënten, en dat het dezelfde moleculaire eigenschappen draagt als de cellen in de primaire tumor (42). De cellulaire mechanismen van ctDNA-vrijstelling zijn slechts deels begrepen. Vermoedelijk gaat het om vrijstelling van DNA fragmenten bij secundaire necrose van tumorcellen die apoptose ondergaan, als deel van hun normale cellulaire turnover. Zowel primaire tumor als metastasen contribueren tot de circulerende vrije DNA pool. Een andere hypothese stelt dat ctDNA ook actief kan worden vrijgesteld door de primaire tumor of ter hoogte van metastasen (43).

Ook de mate waarin solide tumoren ctDNA vrijstellen – vermoedelijk een waardemeter voor tumorcel turnover – verschilt in functie van het tumortype: Bettegowda et al hebben aangetoond dat ctDNA circuleert met een gemiddelde halfwaardetijd van 1,5 uur, maar aan een plasmaconcentratie die sterk tumortype-afhankelijk is: een studie van 17 verschillende tumortypes in 187 patiënten toonde verschillende ctDNA detectielimieten bij verschillende tumortypes (44). ctDNA werd frequenter gedetecteerd bij patiënten met ovarium, lever, colorectale en blaastumoren, en het minst (<10% van de patiënten) bij hersengliomen. Het aantal patiënten met detecteerbare ctDNA levels in hun bloed nam bovendien toe met hoger stadium van de tumor: terwijl slechts 47% van de patiënten met een stadium I tumor detecteerbaar ctDNA had, bedroeg dit percentage bij patiënten met stadium II, III en IV respectievelijk 55, 69 en 82%.

De mogelijkheid om ctDNA te gebruiken als een gevoelige en specifieke (kwalitatieve en kwantitatieve) indicator van tumor load, zorgt voor een totaal nieuwe klasse van oncologische bio-markers, die verder de ontwikkeling van diverse ultra-gevoelige moleculaire technieken stimuleert: het concept van liquid biopsy is daarmee geboren. Ook in andere situaties, waarbij een vorm van DNA mosaïcisme in het plasma voorkomt, kent analyse van DNA een exponentieel stijgend aantal applicaties, bijvoorbeeld in de prenatale screening en in de transplantogeneeskunde (45, 46).

Naast ctDNA is er nog een andere belangrijke bron van tumor DNA in de circulatie, namelijk circulerende tumorcellen (CTC) Bij gemetastaseerde ziekte komen intacte cellen afkomstig van de primaire tumor of van metastasen in zeer lage aantallen in het plasma voor (gemiddeld ≤ 1 CTC/mL). Verschillende studies tonen aan dat de concentratie CTC steeds lager is dan de concentratie aan ctDNA bij eenzelfde patiënt voor eenzelfde tumor (47). De mate waarin bepaalde tumoren cellen detacheren en deze intact laten circuleren, is vermoedelijk variabel, en varieert in functie van de sterkte van intercellulaire verbindingen. CTC kunnen enkelvoudig of in clusters circuleren. De analyse van CTC is arbeidsintensief en vereist gespecialiseerde technieken voor isolatie en fenotypering, gebaseerd op antibody-coated immunomagnetische of microfiltratie technieken (48-50). Deze technieken zijn moeilijker te standaardiseren dan de PCR- of NGS-analyse van ctDNA. Hoewel interessant, lijkt klinische translatie van het CTC concept moeilijk, en kozen we ervoor dit niet verder te behandelen in deze CAT.

b) Klaring, stabiliteit en (pre-)analytische factoren

Bij gezonde individuen bestaat er een evenwicht tussen de continue vrijstelling van DNA uit apoptotische cellen enerzijds en een degradatie en klaring via de nieren, milt en lever anderzijds (51). Om het klaringproces van circulerend DNA te kunnen verduidelijken, hebben Dennis Lo et al de lijn doorgetrokken naar foetaal DNA dat circuleert in het bloed van de moeder. Zij hebben aangetoond dat dit foetaal DNA snel uit de maternale circulatie wordt geklaard na de bevalling. Reeds 1 dag na de bevalling konden zij geen foetaal DNA meer detecteren in het maternale plasma. Deze klaring gebeurde in twee fasen met verschillende kinetiek: een initiële, snelle fase (met een gemiddelde halfwaardetijd van +/- 1 uur) gevolgd door een tragere fase (met een gemiddelde halfwaardetijd van +/- 13 uur), hetgeen suggereert dat meerdere mechanismen in de klaring van circulerend foetaal DNA betrokken zijn (52). Eén van deze mechanismen is de degradatie van DNA door nucleasen aanwezig in het bloed, met het DNase I als voornaamste (53). Deze nucleasen hydrolyseren de fosfodiesterbindingen in enkelstrengig of dubbelstrengig plasma DNA. Tot op vandaag zijn er zo goed als geen grote studies die meer in detail deze of andere mechanismen van degradatie of klaring van DNA uit het plasma beschrijven. Verder is niet bekend of ook andere factoren zoals circadiaanse ritmes, ontsteking of bepaalde therapieën hierop invloed hebben (54).

De geringe stabiliteit van circulerend DNA – en dus ook ctDNA - brengt belangrijke pre-analytische implicaties en beschouwingen naar vooral staalbewaring met zich mee. Zo werd door Nadano et al aangetoond dat het anticoagulans EDTA als een indirecte DNase I inhibitor werkzaam is (55). ctDNA zal dus minder snel afgebroken worden in bloedstalen die EDTA bevatten. Andere onderzoekers hebben vastgesteld dat in serum meer cel-vrij DNA aanwezig is vanuit de hematopoïetische cellijn door in vitro lysis van witte bloedcellen tijdens het stollingsproces (56), hetgeen een artefactuele dilutie kan veroorzaken van ctDNA in de totale pool van wild-type DNA. EDTA-plasma tubes worden daarom bij voorkeur gebruikt voor analyse van ctDNA.

Over de vereiste snelheid van staalbehandeling, centrifugatie en DNA isolatie bestaat nog onzekerheid: zo dient volgens El Messaoudi et al ctDNA geanalyseerd te worden in EDTA-plasma binnen de 4 uur na afname, is één- tot tweemaal centrifugeren aan hoge snelheid aangewezen om te verzekeren dat geen andere cellen aanwezig zijn in het plasma, en mogen aliquots op -80° C niet langer dan 9 maanden bewaard worden voor analyse. ctDNA extracten mogen aan maximum 3 vries-dooi cycli onderworpen worden en kunnen op -20°C tot 3 maanden bewaard worden (57). Bij andere applicaties van cel-vrij, circulerend DNA, in het bijzonder bij de Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT) analyse voor detectie van foetaal DNA (voor uitsluiten van trisomie 21, 13, 18) is de stabiliteit cruciaal voor een correct testresultaat: hier bestaat wel een consensus dat het gebruik van gespecialiseerde afnametubes (bijv. STRECK® tubes) noodzakelijk is. Bij dergelijke tubes zou de integriteit van het cel-vrije DNA tot 48 uur bij kamertemperatuur gegarandeerd zijn, voorafgaand aan DNA isolatie. Schiavon et al vergeleken EDTA tubes verwerkt binnen de 2 uur met STRECK® tubes verwerkt binnen de 72 uur aan kamertemperatuur, en vonden een perfecte preservatie van het ctDNA in de gespecialiseerde STRECK® tubes, gemeten aan de hand van tumor-specifieke ESR1-mutaties bij borstkankerpatiënten (58). Uit veiligheidsoverwegingen implementeren de meeste centra dan ook dergelijke tubes bij staalcollectie voor klinische ctDNA analyse. Analooq vonden Sacher et al een vergelijkbare stabiliteit van ctDNA bij NSCLC patiënten, enerzijds afgenomen in EDTA plasma, gecentrifugeerd binnen de 4 uur na afname, en anderzijds in STRECK® tubes getransporteerd aan kamertemperatuur overnacht.

Vraag 3: welke moleculaire assays kunnen gebruikt worden voor de detectie van ctDNA en met welke technische aspecten moet men rekening houden?

a) Targeted (PCR-gebaseerde) versus untargeted (sequencing-gebaseerde) tests

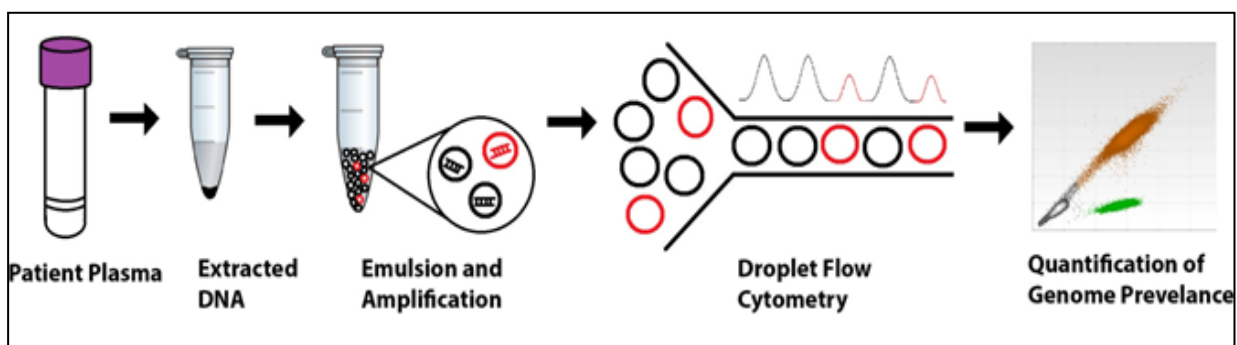
Globaal kan men twee fundamenteel verschillende technologieën gebruiken voor de detectie van ctDNA: Polymerase Chain Reaction (PCR)-gebaseerde tests gericht op gekende puntmutaties (of kleine deleties/inserties) versus DNA sequencing-gebaseerde methodes waarbij het volledige, circulerende DNA kan gelezen worden (= whole genome sequencing), of meer specifiek gefocust wordt op een vooraf bepaald panel van target genen (= targeted- of panel-based sequencing). Op dit moment bestaat er nog geen consensus over de optimale technologie, en beiden hebben voor- en nadelen die in overweging dienen genomen te worden.

PCR-gebaseerde tests gebruiken vooraf ontwikkelde primers en probes, die heel specifiek ontwikkeld zijn om gekende somatische puntmutaties te detecteren. Detectie van complexere genafwijkingen zoals kleine inserties, deleties, copy number aberrations en translocaties is mogelijk, maar vereist complexere primer/probe designs.

Globaal bieden PCR-gebaseerde tests een aantal voordelen, die hen positioneren als goede keuze voor klinische implementatie voor ctDNA analyse in veel labo's:

- 1) kortere turn-around time (TAT) dan de sequencing-gebaseerde tests door een relatief hoge staal throughput.
- 2) lagere kost per staal in vergelijking met sequencing-gebaseerde methodes: dit komt deels door de lagere kost voor reagentia (afhankelijk van de toegepaste techniek), maar vooral door de minder arbeidsintensieve workflow.
- 3) PCR-gebaseerde methodes worden doorgaans als de meest gevoelige beschouwd, hoewel de evidentie daarvoor zwak is en sterk afhankelijk is van het gebruikte platform. De diversiteit is enorm en gaat van conventionele technieken zoals real-time PCR en mutant enriched-PCR tot de digitale PCR waaronder droplet digital PCR (bijv. van Bio-Rad® en RainDance Technologies) en emulsie PCR (bijv. Sysmex BEAMing). In een recente meta-analyse van 27 studies op ctDNA analyse bij NSCLC patiënten werden geen significante, techniek/platform-gerelateerde verschillen gevonden wat betreft de gevoeligheid of specificiteit (59).

Het grote nadeel van de PCR-gebaseerde tests is de beperkte flexibiliteit: de onderzochte mutaties moeten op voorhand gekend en in de assay-design verwerkt zijn. De snel evoluerende kennis van klinisch relevante mutaties vereist dus dat de PCR-target panels continu worden bijgestuurd met nieuwe primer/probe combinaties.



Figuur 3: bij de ddPCR wordt het geëxtraheerd DNA door een emulsieproces in duizenden druppels verdeeld, die in een eerste PCR stap worden geamplificeerd. In een tweede stap wordt het target DNA met een fluorochroom gelabeld. De druppels worden dan één voor één door een flowcytometer gejaagd. Elke druppel zal een signaal afgeven dat overeenkomt met de fluorescentie intensiteit afhankelijk van de aanwezigheid van het target DNA. Door het digitaal optellen van deze signalen kan de concentratie van het gen berekend worden. (Bron: Oxnard et al. Clin Cancer Res 2014).

Sequencing-gebaseerde tests zijn de voorbije jaren geëvolueerd van een exclusief onderzoeksinstrument naar een geavanceerde, diagnostische applicatie in klinische labo's. De 1^e

generatie Sanger sequencing had nog een beperkte throughput, maar de technologische doorbraak van de 2^{de} generatie sequencers (de zogenaamde Massive Parallel Sequencing; MPS, of Next-Generation Sequencing; NGS, met Illumina® en Thermo Fisher Scientific als onbetwiste huidige marktleiders) heeft de sequencing capaciteit drastisch verhoogd aan een kost die beheersbaar is voor een klinisch labo. Men kan opteren om al het DNA aanwezig in een biologisch monster te lezen, maar in een klinische setting verkiest men doorgaans slechts een beperkt panel aan genen met meer diepgang te sequencen voor de detectie van puntmutaties. Bij dergelijke NGS analyses worden eerst panels van korte stukjes DNA (typisch 200 bp lang) behorend tot kritische gebieden van oncogenen geamplificeerd en vervolgens gesequenced aan een prijs van ongeveer 300 euro. Inmiddels is ook al de zogenaamde 3^{de} generatie sequencing beschikbaar: dit omvat Single Molecule Real-Time (SMRT) sequencing (bijv. Pacific Biosciences) en nanopore sequencing (bijv. Oxford Nanopore Technologies), waarbij ook langere stukken genoom kunnen gesequenced worden voor detectie van complexere genoom alteraties (methyleringen, translocaties, deleties, enzovoort).

Het grote voordeel van NGS analyse in vergelijking met PCR-gebaseerde methodes, is dat NGS in staat is om 'unbiased' puntmutaties in een groot aantal oncogenen te detecteren waardoor de methode een veel hogere flexibiliteit heeft dan PCR, die zich noodgedwongen moet richten op de meest frequente, gekende mutaties. Om die reden is NGS dan ook superieur voor het detecteren van mogelijke nieuwe therapieresistentie-geassocieerde mutaties in een tumor. Sequencing-gebaseerde tests leveren dus meer informatie op. Wanneer we de kost van een test uitdrukken per detecteerbare mutatie, is NGS doorgaans veel goedkoper dan PCR methodes (60).

NGS analyse heeft echter ook nadelen:

- 1) De enorme hoeveelheid aan data die bekomen wordt, biedt belangrijke uitdagingen voor informatietechnologie (IT) en digitale bio-informatica: complexe computerprogramma's met grote databases zijn nodig, wat meteen zijn impact heeft op kost en TAT.
- 2) Door het screenen van uitgebreide DNA sequenties is er meer kans dat ook genetische varianten worden gedetecteerd waarvan de klinische impact ongekend is. Deze zogeheten 'variants of unknown significance' kunnen pathologisch zijn of eerder banaal, en de interpretatie van andere, therapeutisch relevante gen mutaties bemoeilijken.

De uiteindelijke keuze tussen PCR-gebaseerde en sequencing-gebaseerde methodes is dus altijd een afweging tussen de hoeveelheid genetische informatie, snelheid/TAT/gebruiksgemak, capaciteit en kost. Met de identificatie van een toenemend aantal, therapeutisch relevante mutaties, en de nood aan laboratorium consolidatie, valt te verwachten dat NGS-gebaseerde technologieën de oplossing voor de toekomst zullen zijn.

b) Concordantie/diagnostische performantie van DNA analyse: tumorweefsel versus plasma

Onvermijdelijk komen we bij de vraag of de analyse van plasma ctDNA de moleculaire analyse van tumorbiopten volledig kan vervangen voor de primaire diagnose en monitoring van NSCLC. In verschillende studies waarbij de detectie van specifieke mutaties in tumorweefsel (FFPE materiaal) wordt vergeleken met de detectie van dezelfde mutatie in simultaan afgenomen plasma, wordt aangetoond dat in plasma doorgaans slechts 50-80% van de mutaties aanwezig in de tumor worden gedetecteerd (tabel 1). Omgekeerd worden in plasma soms bijkomende mutaties gevonden, die niet aanwezig zijn in de primaire tumor.

- (i) Bij NSCLC patiënten behaalden Sacher et al met een plasma ddPCR techniek voor de gerichte detectie van EGFR (exon 19 deletie, L858R mutatie en T790M mutatie) en KRAS (G12X mutatie) een sensitiviteit van respectievelijk 74-82% en 64%, en een specificiteit van 100%. Andere onderzoeksgroepen bekomen gelijkaardige resultaten voor de diagnostische performantie van PCR- en NGS-gebaseerde technieken voor de detectie van EGFR mutaties in plasma.

- (ii) De firma Roche heeft een semi-kwantitatieve, gerichte real-time PCR assay ontwikkeld (cobas® EGFR Mutation Test v2-RUO) voor het detecteren van 42 mogelijke EGFR alteraties in plasma. Na extractie van het DNA uit het plasma door middel van de cobas® cfDNA Sample Preparation Kit wordt analyse op het cobas® z 480 systeem door de firma aanbevolen. In een studie van Weber et al uit 2014 werd deze assay geëvalueerd door de EGFR mutaties geïdentificeerd in plasma te correleren met mutaties in tumorweefsel van 199 patiënten met NSCLC (61). De PCR-assay had een sensitiviteit van 61% en een specificiteit van 96%.
- (i) In de uitgebreide MOSCATO-trial rapporteerden Jovelet et al een gevoeligheid van 55% (voor longkanker en andere solide tumoren samen) voor een amplicon-gebaseerde NGS methode voor de detectie van verschillende, actionable mutaties in ctDNA (62).

De concordantie stijgt naarmate meer ctDNA in de circulatie aanwezig is. Dit blijkt ten dele af te hangen van het histologisch type tumor, maar ook van zijn uitgebreidheid en aantal metastasen (meer ctDNA, dus een hogere concordantie bij gemetastaseerde tumoren). De mate van concordantie/performance lijkt niet of slechts minimaal gerelateerd aan de gebruikte techniek. Een bias in heel wat studies echter is de afname van plasma ctDNA na opstart van chemotherapie, waardoor een significante daling van de mutatie frequentie in het plasma te verwachten is.

Globaal kunnen we toch stellen dat de gevoeligheid van ctDNA analyse momenteel nog onvoldoende is om moleculaire analyse van een weefselbiopsie te vervangen als primair diagnostisch middel. De specificiteit is echter systematisch hoog (in de meeste studies >90%) wat maakt dat ctDNA wel een heel geschikt middel is om gekende mutaties te monitoren, en om zo tumor recidief of groei te evalueren.

Technologie	Platform	Tumor type	Patients included	Concordantie	Sensitiviteit	Specificiteit	Referentie
A) Detectie van EGFR mutaties in ctDNA bij NSCLC patiënten							
ddPCR	BioRad	NSCLC, metastatic	180		74-82	100	Sacher A. et al. JAMA Oncol 2016
ddPCR	BioRad	NSCLC, stage III-IV	25		81	100	Zheng D. et al. Sci Rep 2016 (63)
ddPCR	BioRad	NSCLC, stage IV	50	82	76	88	Wei Z. et al. Springerplus 2016 (64)
RT-PCR	Cobas	NSCLC, stage II-IV	199		61	96	Weber B. et al. BMC Cancer 2014
ARMS RT-PCR	Qiagen	NSCLC	652	94	66	100	Douillard J. et al. J Thorac Oncol 2014 (65)
RT-PCR; ARMS RT-PCR; ddPCR; BEAMING	Various	NSCLC, stage IV	38		78-100	93-100	Thress K. et al. Lung Cancer 2015 (66)
NGS	Ion Torrent PGM	NSCLC, stage I-IIA	58	50	54	47	Chen K. et al. Sci Rep 2016 (67)
NGS	Ion Torrent PGM	NSCLC, I-IV	107	68	58	87	Couraud S. et al. Clin Cancer Res 2014 (68)
NGS	Ion Torrent PGM	NSCLC, stage I-IV	288		54	94-98	Uchida J. et al. Clin Chem 2015 (69)
NGS	Resolution Bioscience	NSCLC, advanced	48		79	100	Paweletz et al. Clin Cancer Res 2015 (70)
NGS	Illumina	NSCLC, stage IIIa-IV	39	84	71	100	Yao Y. et al. Oncotarget 2016 (71)
IDES-enhanced CAPP-Seq	?	NSCLC, stage III-IV	142		92	100	Newman A. et al. Nat Biotechnol 2016 (72)
Meta-analysis 27 studies	Mostly PCR	NSCLC			62	96	Qiu et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2015
NGS	Ion Torrent PGM	Various cancers	283		55		Jovelet et al. Clinical Cancer Res 2016**
NGS	Ion Torrent PGM	Various cancers	34		97		Lebofsky R. et al. Mol Oncol 2015** (73)
NGS; BEAMING; ddPCR	Various	Various cancers		40-85			Bettgadowa C. et al. Sci Transl Med 2014**
B) Detectie van KRAS mutaties in ctDNA bij NSCLC patiënten							
ddPCR	BioRad	NSCLC, metastatic	180		64	100	Sacher A. et al. JAMA Oncol 2016
COLD-PCR/HRM; RT-PCR	Various	NSCLC	82	95	96	95	Freidin M. et al. Clin Chem 2015 (74)
NGS	Illumina	NSCLC, stage IIIa-IV	39	97	75	100	Yao Y. et al. Oncotarget 2016

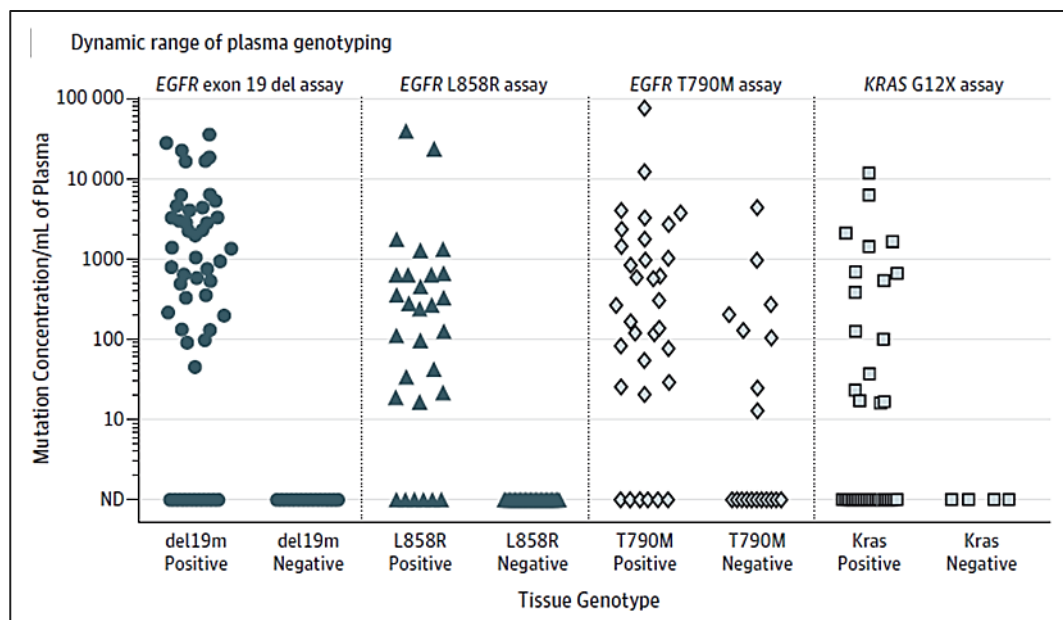
Tabel 1: overzicht diagnostische performantie van ctDNA analyse (EGFR en KRAS mutaties) middels PCR- en NGS-gebaseerde methodes. (**Studies niet specifiek voor NSCLC)

c) Klinische meerwaarde van ctDNA?

Prospectieve studies of systematische reviews die de meerwaarde van ctDNA analyse op objectieve indicatoren zoals 5-jaars overleving en progressievrije overleving aantonen, ontbreken alsnog. De snelle implementatie van dit concept in de oncologische zorg is dan ook grotendeels gebaseerd op anticipatie van mogelijke meerwaarde op meerdere fronten:

1) De analyse van ctDNA laat de klinici toe om het ziekteverloop (tumorgroei, herval, residuele ziekte) te meten op een minimaal invasieve wijze. Bij borstkankerpatiënten werd reeds aangetoond dat ctDNA analyse een herval met metastatische ziekte 7-11 maanden vroeger kan voorspellen dan beeldvorming, en beter correleert met de tumor load dan de klassieke CA15-3 bio-merker (75). Gezien het agressievere ziekteverloop is dergelijke diagnostische winst nog niet aangetoond voor NSCLC.

2) Sacher et al toonden aan dat analyse van T790M mutaties in EGFR vermoedelijk performanter is in plasma dan in weefselbiopsies bij 174 patiënten met verworven resistentie tegen 1^e en 2^e generatie EGFR TKI. Een verklaring die zij hiervoor naar voren schuiven, is dat weefselbiopsies gehinderd worden door tumorale heterogeniteit, of dat de resistentie-inducerende mutatie (EGFR T790M) ontstond in een metastase, en dus bij het nemen van een biopsie in de primaire tumor wordt gemist (figuur 4).



Figuur 4: plasma versus weefsel genotypering. Bij een klein aantal patiënten wordt EGFR T790M in plasma gedetecteerd, en niet in weefsel - vermoedelijk secundair aan tumor heterogeniteit bij resistente ziekte. Deze 'vals-positieven' (weefsel genotypering werd als referentie voor de vergelijking beschouwd) reduceren de specificiteit voor EGFR T790M analyse tot 63% (12/19 patiënten), met een gelijkaardige sensitiviteit van (77%) aan de andere EGFR en KRAS analyses. (Bron: Sacher et al JAMA Oncol 2016).

3) Routine implementatie van ctDNA analyse kan een positieve impact hebben op socio-economisch vlak omdat door het detecteren van resistentie mutaties dure precisie geneesmiddelen bij deze patiënten kunnen worden vermeden. Bovendien kan het de overleving van de patiënt verlengen omdat het een snelle, geïndividualiseerde bijsturing van therapie mogelijk maakt. Wij vonden echter op heden nog geen studies die dergelijke winsten cijfermatig objectiveren.

Besluit

De moleculaire analyse van tumorweefsel, met het oog op de identificatie van therapeutisch relevante mutaties en de geïndividualiseerde selectie van precisie geneesmiddelen, is op korte tijd geëvolueerd naar een hoeksteen van de state-of-the-art behandeling van diverse tumoren. De analyse van ctDNA is een relatief recente, maar disruptieve trend die in een groeiend aantal centra wordt geïmplementeerd. Globaal kunnen we stellen dat ctDNA analyse nog onvoldoende gevoelig is om weefselbiopsie als gouden standaard te vervangen bij de primaire diagnostiek, maar vooral een plaats verdient bij de monitoring van tumor herval, en het verschijnen van resistentie mutaties onder specifieke precisie therapie. Er is nog geen consensus wat betreft de preferentiële technologie: zowel PCR- als NGS-gebaseerde methodes werden beschreven, en de uiteindelijke keuze is een afweging tussen kost, TAT, flexibiliteit en informatie-capaciteit. NGS-gebaseerde technieken bieden grote voordelen wat betreft flexibiliteit en de compleetheid van de mutatie analyse, waardoor we kunnen verwachten dat, gezien het snel toenemend aantal therapeutisch of prognostisch relevante mutaties, dit de technologie van de toekomst zal worden.

COMMENTS

ATTACHMENTS

Attachment I

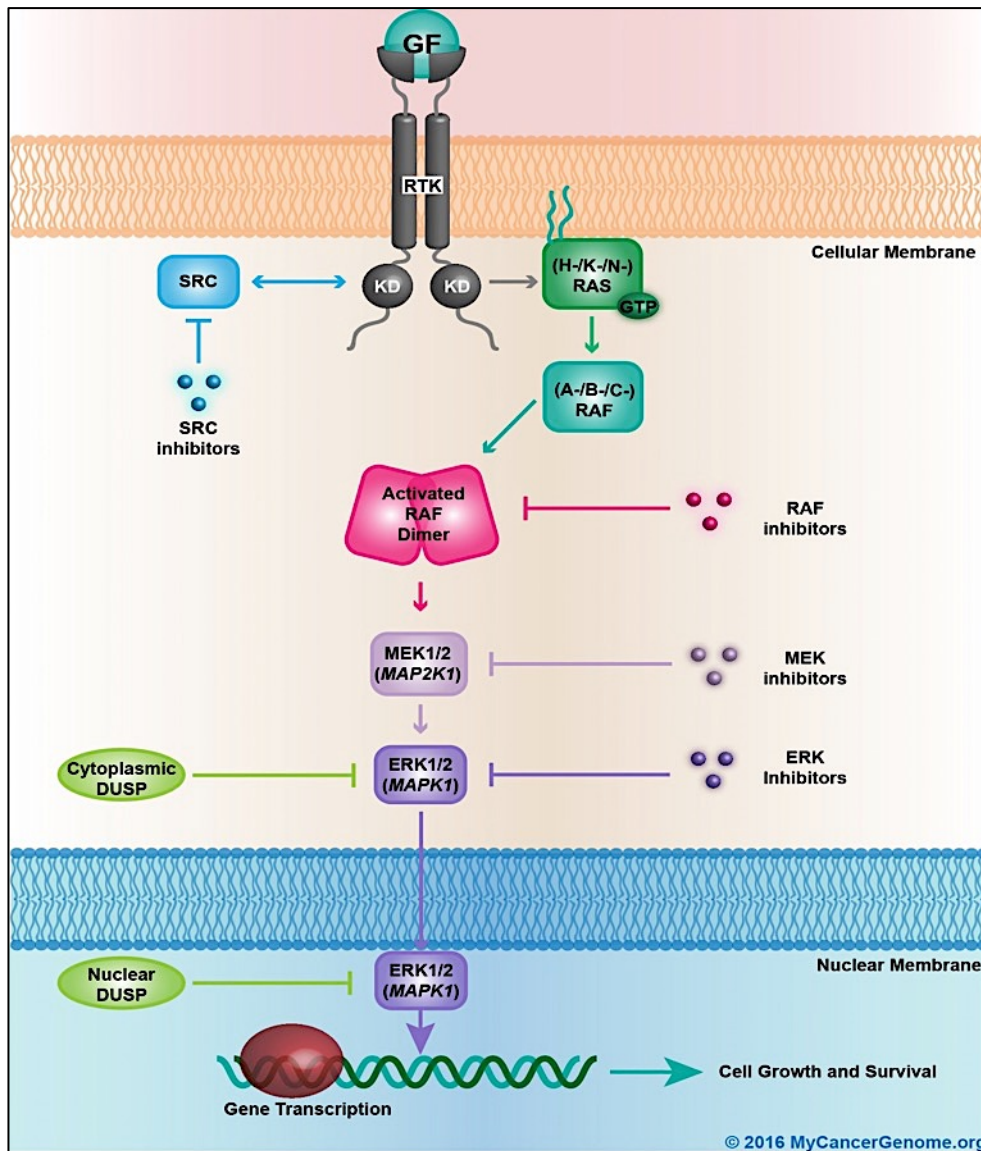
Overzichtstabel van de voornaamste, therapeutische relevante 'actionable mutations' (en andere alteraties) in NSCLC.

Gen	Locatie (codon/exon)	Alteratie	Frequentie in NSCLC (met mutatie in desbetreffend gen)	Gerichte therapie
EGFR	Exon 18	c.2156G>C (G719A)	0,6%	EGFR TKI
	Exon 19	Deletie	48%	<ul style="list-style-type: none"> - 1^e generatie EGFR TKI (erlotinib, gefitinib) - 2^e generatie EGFR TKI (afatinib, dacomitinib, neratinib) - 3^e generatie (mutatie-specifieke) EGFR TKI
	Exon 20	Insertie	4-9,2%	<ul style="list-style-type: none"> - Verminderde gevoeligheid voor EGFR TKI - HSP-90-inhibitoren
	Exon 20	c.2369C>T (T790M)	<ul style="list-style-type: none"> - <5% van alle NSCLC - 50% van EGFR-gemuteerde NSCLC met verworven resistentie tegen erlotinib, gefitinib 	<ul style="list-style-type: none"> - Verminderde gevoeligheid voor 1^e en 2^e generatie EGFR TKI - 3^e generatie EGFR TKI (osimertinib)
	Exon 21	c.2573T>G (L858R)	43%	EGFR TKI
	Exon 21	c.2582T>A (L861Q)	2%	EGFR TKI
KRAS	Codon 12	c.34G>T (G12C)	42%	<ul style="list-style-type: none"> - Verminderde gevoeligheid voor EGFR TKI - Selumetinib of trametinib?
	Codon 12	c.35G>A (G12D)	17%	Verminderde gevoeligheid voor EGFR TKI
	Codon 12	c.35G>T (G12V)	20%	Verminderde gevoeligheid voor EGFR TKI
BRAF	Exon 11	c.1406G>C (G469A)	11%	Verminderde gevoeligheid voor 1 ^e generatie EGFR TKI
	Exon 15	c.1799T>A (V600E)	55%	<ul style="list-style-type: none"> - BRAF TKI (vemurafenib, dabrafenib) - Verminderde gevoeligheid voor 1^e generatie EGFR TKI
PIK3CA	Exon 9	c.1633G>A (E545K)	26,7%	<ul style="list-style-type: none"> - PI3K-inhibitoren (o.a. BYL719, buparlisib (BKM120), taselisib (GDC0032), GSK2636771) in ontwikkeling - EGFR TKI?
	Exon 20	c.3140A>G (H1047R)	12,9%	<ul style="list-style-type: none"> - PI3K-inhibitoren (o.a. BYL719, buparlisib (BKM120), taselisib (GDC0032), GSK2636771) in ontwikkeling - EGFR TKI?

HER2	Exon 20	Insertie	83-100%	<ul style="list-style-type: none"> - Trastuzumab - Neratinib (HER2-inhibitor) in combinatie met temsirolimus (mTOR-inhibitor) - Afatinib (EGFR/HER2-inhibitor)
MEK1	Exon 2	c.171G>T of K57N	64%	<ul style="list-style-type: none"> - MEK1-inhibitoren? - Verminderde gevoeligheid voor EGFR TKI
	Exon 2	c.167A>C of Q56P	19%	<ul style="list-style-type: none"> - MEK1-inhibitoren? - Verminderde gevoeligheid voor EGFR TKI
MET		Amplificatie	<ul style="list-style-type: none"> - 2-4% van alle NSCLC - 5-20% van EGFR-gemuteerde NSCLC met verworven resistentie tegen EGFR TKI'n 	<ul style="list-style-type: none"> - ALK/ROS1/MET-inhibitor (o.a. crizotinib) - Verminderde gevoeligheid voor EGFR TKI
	Exon 14	Skipping mutaties	3-4%	ALK/ROS1/MET-inhibitor (crizotinib)?
FGFR1	Chromosoom 8p12	Amplificatie	13-25% van plaveiselcelcarcinoma	FGFR1-inhibitoren (in ontwikkeling)
ALK	Chromosoom 2p23	Rearrangement	3-7% van NSCLC	<ul style="list-style-type: none"> - ALK/ROS1/MET-inhibitor (o.a. crizotinib) - Verminderde gevoeligheid voor EGFR TKI
ROS1	Chromosoom 6q22	Rearrangement	2% van de NSCLC	<ul style="list-style-type: none"> - ALK/ROS1/MET-inhibitor (o.a. crizotinib) - Verminderde gevoeligheid voor EGFR TKI
PTEN	Exon 7	c.697C>T (R233*)	5,5%	<ul style="list-style-type: none"> - PI3K-inhibitoren - Verminderde gevoeligheid voor EGFR TKI

Attachment 2

Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) cell signaling pathway:



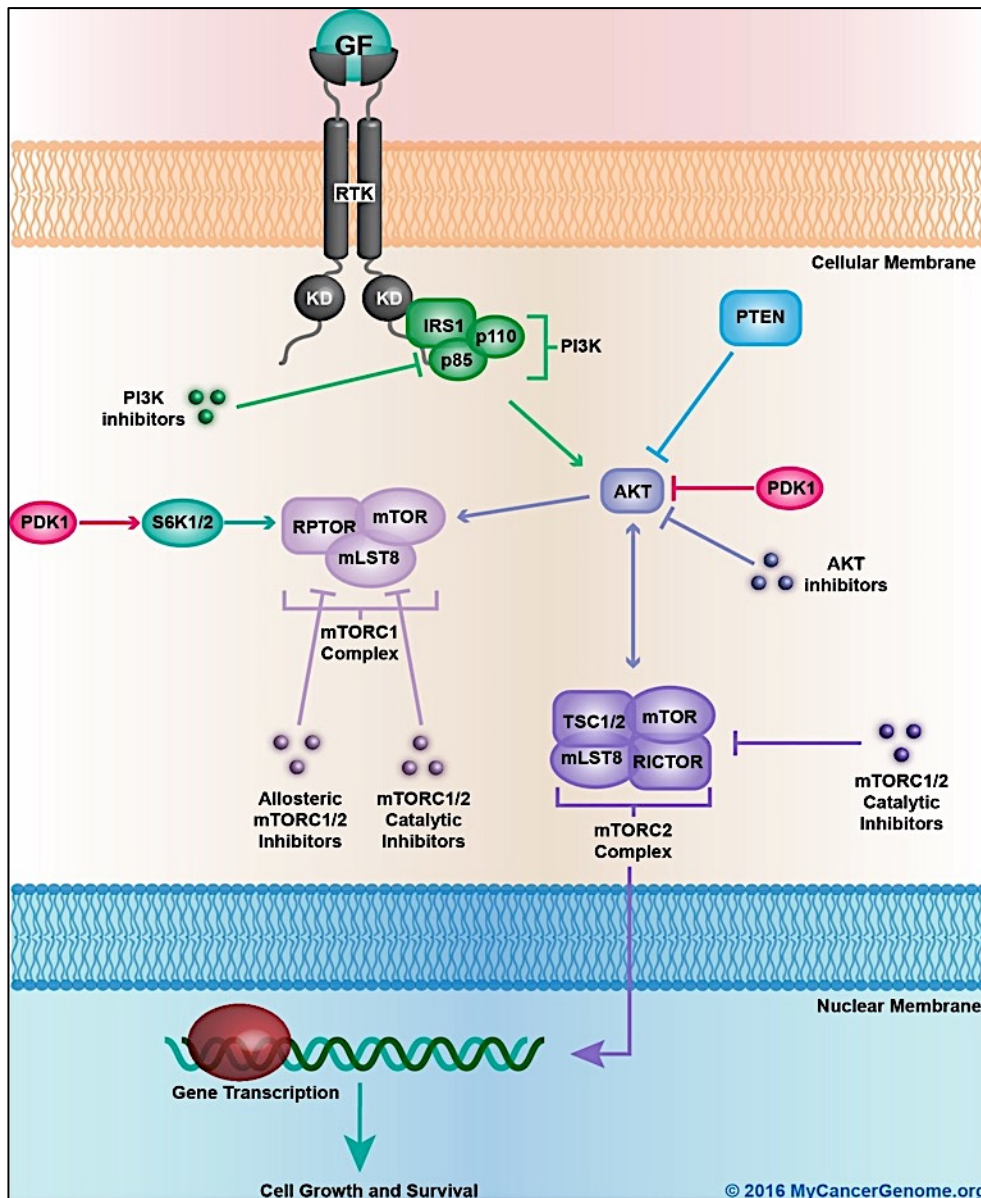
The mitogen-activated protein (MAP) kinase cell signaling pathway promotes cell growth, proliferation, and survival. The MAP kinase pathway may be activated via several different routes, including upstream growth factor receptor tyrosine kinases and downstream mutations in pathway gene components.

Binding of a growth factor (e.g., EGF, HGF) to the receptor tyrosine kinase (RTK) activates the receptor's activity. SRC binds to the receptor at its SH2 domain. Activation of the receptor tyrosine kinase triggers downstream phosphorylation and activation of (H-/K-/N-) RAS, (A-/B-/C-) RAF, MEK1/2 (MAP2K1), ERK1/2 (MAPK1). Ultimately, ERK (MAPK1) activation activates gene transcription that regulates cell growth and survival.

(Source: mycancergenome.org)

Attachment 3

PI3K/AKT1/MTOR cell signaling pathway:



The phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT/mechanistic target of rapamycin (MTOR) cell signaling pathway functions in cell growth and proliferation, protein translation and synthesis, and the regulation of apoptosis. The PI3K pathway may be activated by the binding of extracellular growth factors (e.g., insulin-like growth factor 1, IGF1) to their corresponding receptor tyrosine kinases or by activating mutations in PIK3CA, AKT1, TSC1, or other genes. The pathway is inhibited by phosphatase and tensin homolog (PTEN), which dephosphorylates phosphoinositide phosphates.

Binding of a growth factor (e.g., EGF, HGF) to a receptor tyrosine kinase (RTK) activates the receptor. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) or an analogous adapter protein binds to the receptor tyrosine kinase. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) is composed of two subunits: p85 and p110. PI3K binds to IRS-1 and activates the enzymatic activity of the p110 subunit. Active PI3K binds to phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂) in the cell membrane. PI3K initiates transphosphorylation from PIP₂ to create PIP₃. Phosphorylated PIP₃ or PDK1 activate AKT1. The activation of AKT1 triggers downstream activation of protein complexes mTORC1 and mTORC2 complexes that activate gene transcription and promote cell growth and survival.

(Source: mycancergenome.org)