

# AKCİĞER KANSERİNDE HEDEFE YÖNELİK TEDAVİLER

## TARGETED TREATMENTS IN LUNG CANCER

### Büge Öz

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

e-mail: ozbuge@gmail.com

DOI: 10.5578/tcb.2017.027

### Özet

Küçük hücreli dışı akciğer karsinom (KHDAK)'larında moleküler testlerle yönlendirilen hedefli tedaviler, standart bir akciğer kanseri tedavisi haline gelmiştir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyonları ve anaplastik lenfoma kinaz (ALK) yeniden düzenlemeleri, EGFR ve ALK tirozinkiaz inhibitörleri (TKİ) için en iyi prediktif biyobelirteçler olarak kullanılmaktadır. Rehberlerde bunlara yeni eklenenler ROS-1 yeniden düzenlemeleri ve BRAF mutasyonudur. Ayrıca transfeksiyon sırasında yeniden düzenlemeleri (RET) ve mezenkimal epitel (MET) değişiklikleri ve HER-2 mutasyonları başta olmak üzere, yakın gelecekte testlerin listesi artmaktadır. Bu durumda patologlar, klinik testler için klinik örnekleri dikkatli bir şekilde yönetmeli ve bu yönlendirici mutasyonlara yönelik tedavilerden yararlanacak hastaları hızlı ve doğru bir şekilde tanımlamak için ellerinden gelenin en iyisini yapmalıdır. Akciğer kanserlerinin moleküler biyobelirteçleri, mutasyonlar, gen yeniden düzenlemeleri ve amplifikasyonlar olmak üzere üç kategoriye ayırmak uygundur. Testlerin sayısı arttıkça daha hassas ve aynı anda çoklu genetik testlerin yapılacağı sistemlerin [yeni generasyon genetik test sistemleri (NGS)] rutine geçirilmesi kaçınılmazdır.

**Anahtar kelimeler:** Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu, moleküler test, EGFR, ALK, ROS-1, BRAF, RET, MET, HER-2

### GİRİŞ

Akciğer kanseri tüm dünyada çok sık rastlanan ve o oranda da kötü prognoza sahip malignitelerin başında gelmektedir. Son yıllarda akciğer kanserlerinin kapsamlı genomik profilinin ortaya konması, bu tümörlerin genetik olarak oldukça heterojen ve karmaşık olduğunu ispatlamıştır. Bu çalışmalar ayrıca özellikle küçük hücreli dışı akciğer karsinom (KHDAK)'larında özellikle akciğer adenokarsinom (AAK)'larında çok sayıda hedeflenebilir, onkogenik sürücü mutasyonun ortaya çıkmasını sağlamıştır (1).

KHDAK'larda adenokarsinom (AK) dışında skuamöz hücreli karsinom (SHK)'lar içinde hedeflenebilir mutasyonlar belirlenmeye çalışılmaktadır (fibroblast büyüme faktörü reseptörü, DDR2 gibi) ancak hiçbiri şu aşamada rutin uygulamaya geçmemiştir (2,3).

### Abstract

Targeted therapies guided by molecular diagnostics have become a standard treatment of non-small cell lung carcinoma (NSCLC). Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations and anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangements are currently used as the best predictive biomarkers for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors, respectively. Besides EGFR and ALK, the list of druggable genetic alterations has been added as ROS-1 rearrangements and BRAF mutations in recent guides. The other druggable genetic alterations such as rearranged during transfection (RET) rearrangements, mesenchymal-epithelial (MET) alterations and HER-2 mutations will be on the list in a short time period. In this situation, pathologists should carefully manage clinical samples for molecular testing and should do their best to quickly and accurately identify patients who will benefit from precision therapeutics. It is appropriate to distinguish three categories of lung cancers: molecular biomarkers, mutations, gene rearrangements, and amplifications. As the number of tests increases, it is inevitable that more precise and simultaneous multigenetic testing systems [new generation genetic testing systems (NGS)] should be routinely run.

**Keywords:** Non small cell carcinoma, molecular test, EGFR, ALK, ROS-1, BRAF, RET, MET, HER-2

Ayrıca KHDAK'larda immünterapi rutin uygulamaya geçmiştir. İmmünterapi seçimi için de KHDAK için programlanmış ölüm reseptörü 1 (PD-L1) araştırmasında rutin patolojik değerlendirmede yerini almış durumdadır (4). Yazının ilerleyen bölümlerinde kısaca ona da değinilecektir.

### KHDAK'LARDA İLK TANIMLANAN SÜRÜCÜ GENETİK MUTASYONLAR; EGFR ve ALK

EGFR hücrelerde proliferasyon ve apoptozisi düzenleyen sinyallerin iletim yollarını kontrol eden hücre yüzey reseptörüdür ve tirozin kinazların ErbB familyasının bir üyesidir

(5). Bu reseptör hücre dışı bir sinyalle aktive olur ve çekirdeğe proliferasyon ve diğer sinyaller gider. Normal koşullarda dinlenme halindeki hücrede EGFR bloke haldedir dimerize olmaz (5). Ancak EGFR geninde (7. Kromozom üzerinde) özellikle de Egzon 19 (delesyonlar) veya Egzon 21'de (nokta mutasyonu) meydana geldiğinde EGFR sürekli dimerize halde kalır, hücreye sürekli olarak proliferasyon ve apoptozdan kaçabilme sinyalleri verilir (6,7).

EGFR mutasyonları yeterli tümör içeren materyalden (parafin blok, kesitler ve sitolojik materyal) DNA izole edilerek farklı moleküler yöntemlerle test edilebilmektedir (8,9). Akciğer kanseri çoğunlukla küçük doku ya da sitolojik materyalle tanı aldığından moleküler testler de olabilecek en duyarlı yöntemlerle yapılmalıdır (1). Günümüzde bu nedenle EGFR mutasyonu araştırmak için en sık real-time PCR yöntemi kullanılmaktadır (10,11).

KHDAK'larda EGFR mutasyonları ve bu yazıda yer alan, güncel rehberlerde belirtilen (NCCN rehberi) diğer yönlendirici genetik değişiklikler ve sıklıkları Tablo 1'de verilmiştir.

Anaplastik lenfoma kiraz (ALK) ilk olarak 2007 yılında, kromozom 2p üzerindeki bir tirozin kinaz domainindeki bir kırılma ve inversiyonun, sonrasında aynı kromozom üzerinde bulunan EML-4 ile birleşerek EML4-ALK füzyon geninin yaratılmasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir (12). ALK translokasyonu, ALK tirozin kinazın sürekli aktivitesine yol açan onkogenik füzyonlara neden olur ve bu da hücrede proliferasyon, migrasyon yeteneğini arttırarak hayatta kalabilmesini sağlar (12,13). ALK translokasyonu KHDAK'larda özellikle AAK'lar-

da %3-7 oranında görülmektedir. ALK gen translokasyonu 3 yöntemle araştırılabilir; bunlar floresan in situ hibridizasyon (FISH), reverse transkriptaz PCR (RT-PCR) ve immünohistokimyasal olarak tümörde protein ekspresyonunun araştırılması şeklinde araştırılabilir (13). Ancak son rehberlerde FISH ya da valide edilmiş primer antikor klonu kullanılır ise immünohistokimyasal olarak da değerlendirilebilir (1,8,9,13-15).

### KHDAK'larda Diğer Moleküler Genetik Testler

KRAS ise (kirsten rat sarkom 2 viral onkogen homoloğu), epidermal büyüme faktörü (EGFR) ve mezenkimal epitel (MET) dahil olmak üzere birçok tirozin kinazdan büyüme sinyallerini ileten bir GTP'az ailesine aittir. KRAS'da sürekli sinyal üretimine yol açan aktive edici mutasyonlar beyaz ırkta ve sigara içenlerde daha yüksektir ve EGFR veya ALK mutasyonlarıyla birbirini dışlayıcı; bir varsa diğerini aynı hastada olma olasılığı olmayan mutasyonlardır (10). Ayrıca KRAS mutasyonu kötü prognozla ve EGFR tedavisine ya da kemoterapiye dirençle ilişkili bulunmuştur (10).

ROS-1 6. Kromozom (6q22) üzerinde bulunan, insan reseptör tirozin kinaz ailesine ait bir genidir ve ilk olarak 2003 yılında bulunmuştur (16). ALK ile benzer demografik verilere sahip hastalarda ve özellikle AAK'da %1-2 oranında saptanan bir genetik değişikliktir (16-18).

ROS-1 translokasyonunda bu genin tirozin kinaz domaininde meydana gelen kırılma sonrası en sık CD74 olmakla birlikte 7'den fazla partnerle füzyon oluşturan bir gen değişikliğiyle meydana gelir (16,18). ROS-1 translokasyonu da ALK translokasyonu gibi 3 yöntemle araştırılabilir: immün-

**Tablo 1.** KHDAK'larda (öz adenokarsinom) tedaviyi yönlendiren/yönlendirebileceği düşünülen moleküler/genetik değişiklikler

Gen	Gendeki aktive edici patoloji/varyantlar	Sıklık
Mutasyonlar		
EGFR	Egzon 19 delesyonları, Egzon 21 L858R, Egzon 20 T790M*	% 50-6** % 10-20**
KRAS	G12X, G13X, G61X	%5-10* %20-30**
BRAF	V600E	%1-2
HER-2	Egzon 20'de p.A775 G776 insersiyon	%1-2
MET	Egzon 14 ve çevresinde skip mutasyon	%4-5
Gen füzyonları		
ALK	EML4-ALK, TGF-ALK, KIF5B-ALK	%2-7
ROS-1	CD74-ROS-1, EZR-ROS-1, SLC34A2-ROS-1, SDC4-ROS-1	%1-2
RET	KIF5B-RET, CCDC6-RET	%1
Gen sayı değişiklikleri		
MET	Gen amplifikasyonları	%2-4
HER-2	Gen amplifikasyonları	%1-2
FGFR	Gen amplifikasyonları	%13-22 ##
EGFR	Gen amplifikasyonları	%8-9 ##
*Asya kökenli adenokarsinomlu hastalarda **Batılı adenokarsinom hastalarında #EGFR için tedavi direnci ilişkili mutasyon (sekonder mutasyon) ##Skuamöz hücreli karsinomda		

histokimya, FISH ve RT-PCR. Güncel rehberler öncelikle FISH ile araştırılmasını önermektedir (14). ALK gibi henüz valide edilmiş bir immünohistokimyasal primer antikoru ticari olarak yoktur immünohistokimya ön tarayıcı olarak kullanılabilir (14,16,18).

2017-2018 KHDAK test rehberlerinde EGFR, ALK, ROS-1'den sonra negatif bulunur ise BRAF mutasyonunun araştırılması önerisi gelmiştir (14). BRAF mutasyonu KHDAK'larda %2-4 oranında görülmektedir (19,20). Rat sarkom (RAS) gen ailesinden biri olan BRAF KHDAK'larda en sık (yaklaşık %50) V600E nokta mutasyonu şeklinde görülür (19,21). BRAF mutasyonunda en sık real-time PCR yöntemiyle test edilmektedir.

### **KHDAK'ları Moleküler Testlerinde Yakın Gelecek**

Buraya kadar güncel rehberlerde yazılan ileri evre KHDAK hastalarında tanıdan sonra, tedaviye geçmeden yapılması gereken ve önerilen testler özetlenmiştir. Ancak geri kalan yönlendirici mutasyonlar için de hedefli tedavi için birçok sayıda araştırma sürdürülmektedir. Bir hastada Tablo 1'de belirtilen diğer moleküler-genetik değişikliklerin hepsi hakkında bilgi sahibi olmak, tedavinin daha en başında hastaya en uygun şekilde planlanmasını sağlayacaktır.

%70'i ileri evrede yakalanan akciğer karsinomu hastalarında doku ya da sitolojik materyal hem tanı hem de testler için kullanılacaktır. Bu nedenle daha en başından bolca tümör içeren materyal alınması, biyopsi için önceden hastanın klinik bilgilerinin patolojla paylaşılması, biyopsinin cuma günleri yapılmamasına özen gösterilmesi önerilmektedir (22).

Biyopsi ya da sitolojik materyalin en ekonomik şekilde kullanılması için patoloğun yapacakları ve hemen arkasından yapılacak testleri için güncel durumu özeti Resim 1'de verilmiştir (4,10,22).

Resim 2'de güncel ve yakın gelecekte rutine girecek testlerin çeşitliliği gösterilmiştir (4). Çoğunlukla sınırlı materyalden değerlendirilen, aynı doku örneklerinin hem tanı hem de testler için kullanılması zorunluluğu KHDAK'larda çoklu gen panelleri ya da tüm egzomların çalışılabileceği yeni generasyon sekanslama (NGS) yöntemlerine geçişi zorunlu kılmıştır. Amerikan Patoloji ve Moleküler Patoloji derneklerinin dünyadaki rutin uygulamalara ışık tutan son protokol-rehber yayınlarında BRAF sonrasında testlerin NGS ile devam edilmesini önermektedir 17.08.2018 11:19:00.

### **EGFR ve ALK Pozitif Hastalarda İkincil Direnç Geliştiğindeki Uygulama**

Aktive edici EGFR mutasyonu ve ALK translokasyonu olan hastalarda tedavi sürecindeyken ya da tamamlandığında bir süre sonra (6 ay-2 yıl) ne yazık ki uygun olan TKI tedavisi altında ilaca karşı direnç gelişmektedir. Özellikle ikincil EGFR direnciyle ilgili yapılan araştırmalar, EGFR-TKI'lara karşı direnç kazanmış hastaların yaklaşık %60'ında ikincil EGFR T790M mutasyonunun neden olduğunu ortaya koymuştur (23,24). Kasım 2015'te osimertinib, EGFR-TKI tedavisi de-

vam eden veya tamamlanmış EGFR T790M mutasyonlu metastatik KHDAK hastalarının tedavisi için FDA onayı almıştır. Diğer bazı ilaç firmalarının da EGFR dirençlerinde kullanılmak üzere yeni ilaç geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bu hastalarda T790M mutasyonunun tespiti ancak tümör nüksünün saptandığı dokulardan biyopsiyle veya kandan alınan örneklerde (likit biyopsi) bu mutasyonun gösterilmesi ile mümkündür (25). EGFR likit biyopsi testi günümüzde dolanan kandaki tümör DNA'sında (ctDNA) T790M mutasyonunun hassas-valide edilmiş yöntemlerle araştırılmalıdır, aksi halde çok yüksek oranda yanlış negatif sonuçlar elde edilecektir (14,26-28). Likit biyopsi test edilecek hastadan alınan kan örnekleri laboratuvarlara standart tüplerle gönderilecekse 2-3 saat içerisinde ve soğuk ortamda gönderilmelidir, eğer uzaktan gelecekse pahalı olan özel tüplerle gönderilmelidir (26).

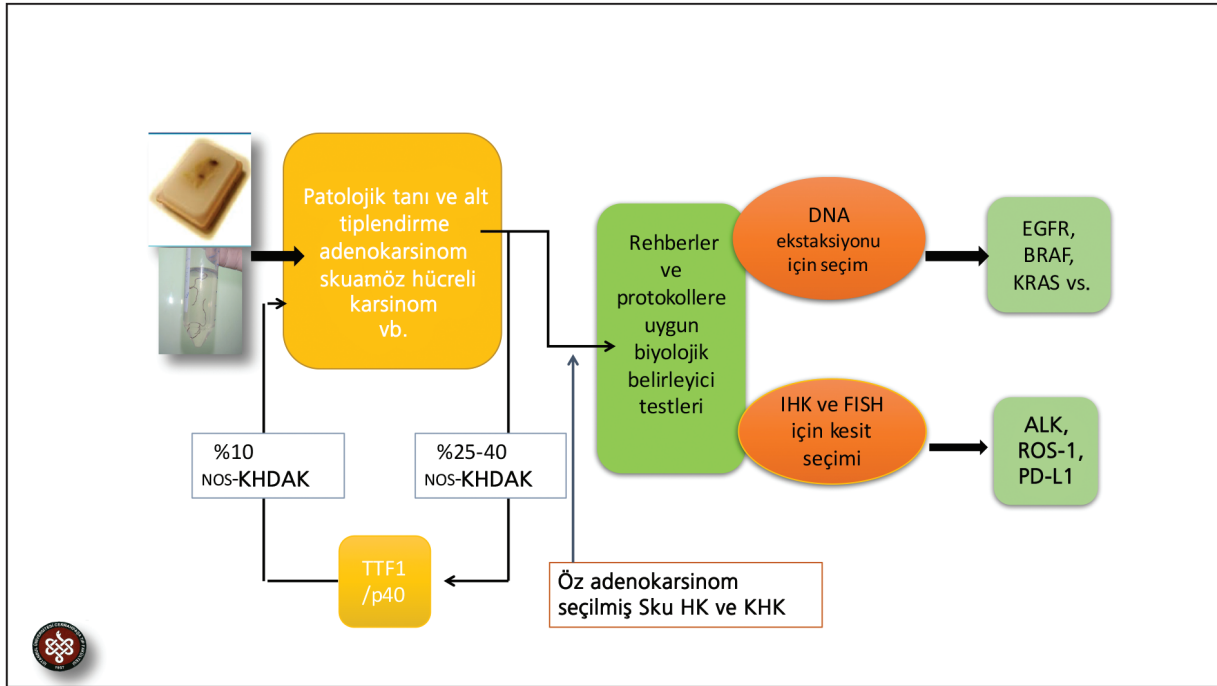
Oldukça hassas NGS platformlarıyla T790M dışındaki ikincil dirence neden olan mutasyonlar da ortaya konabilmektedir ancak bu platformların şimdilik hasta başı maliyeti çok yüksektir fakat teknolojiye gelişmelerle giderek düşeceği öngörülmektedir (27,29).

EGFR direncinin nedenleri arasında %3-10 arasında küçük hücreli karsinom fenotipine transformasyon bildirilmektedir (30). Bunu saptamanın tek yolu nüks eden tümörden yeniden doku biyopsisi ya da sitolojik materyal alınmasıdır. Bu durumda tedavi tamamen değişecektir.

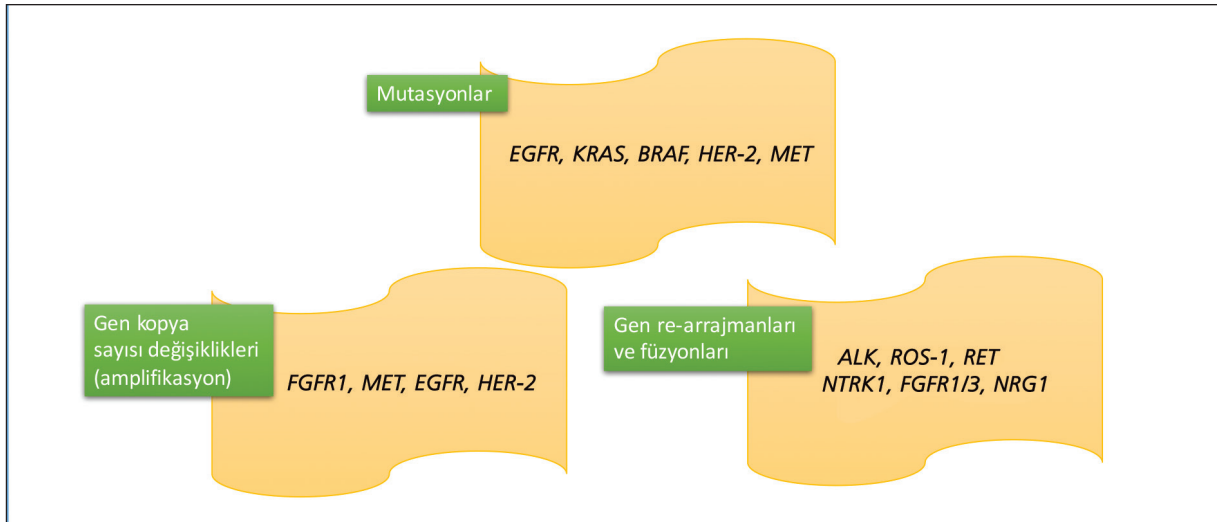
ALK inhibitörleri kullanan hastalarda da ikincil direnç görülebilmektedir. Direncin nedenleri olarak en sık ALK genindeki nokta mutasyonları ortaya konmuştur 17.08.2018 11:19:00. ALK ikincil direncinde nedenin saptanması için biyopsi yapılmasında Avrupa rehberi ile Amerika arasında fark vardır. Avrupa'da doku biyopsisi önerisi yüksek olmasına karşın Amerika'da yeni doku biyopsisi önerilmemektedir (1,14). Yüksek teknoloji NGS ile değerlendirilecek likit biyopsiler yakın gelecekte rutin pratikte yerini aldığı ALK ikincil direncin en sık nedeni olan nokta mutasyonları da test edilebilecektir (31-33).

### **KHDAK'larda İmmüterapi; Patolojiye Düşen Görev**

Programlanmış ölüm-1 (PD-1) bağışıklık sistemindeki T hücrelerinde bir kontrol noktası reseptörüdür. PD-1 reseptörünün upregülasyonu bağışıklık sisteminin kanserli hücreleri yok etme kabiliyetini engelleyen T hücresi tükenmesi sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. PD-1 reseptörü için birçok hücre yüzeyinde programlanmış ölüm ligandı-1 (PD-L1) bulunduğu gösterilmiştir. PD-1 reseptörü PD-L1'e bağlandığında kanser hücresi sitotoksik T hücresinin sitotoksik etkisinden kaçır. PD-L1'in ekspresyonu melanom, akciğer kanseri (hem skuamöz hem de skuamöz olmayan küçük hücreli dış akciğer kanseri), meme, over, pankreas ve özofagus adenokarsinomu, böbrek tümörleri ve mesane kanseri gibi birçok kanser tipinde gözlemlenmiştir.



**Resim 1.** Küçük hücreli dışı akciğer karsinomunda tanı ve testler.



**Resim 2.** Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu için moleküler testler; bugün ve gelecek.

KHDAK'larda anti PD-1 ya da anti PD-L1 olan birkaç ilaç rutin kullanılmaya başlanmıştır.

Bunlardan birisi (pembrolizumab) KHDAK'larda iki endikasyon için onaylanmıştır: metastatik KHDAK'larda tümör hücrelerinin en az %50'sinde PD-L1 ekspresyonu var ise birinci basamak tedavi olarak ve ilerlemiş metastatik KHDAK hastaları için tümör hücrelerinin en az %1'inde PD-L1 ekspresyonu varsa platin bazlı kemoterapiden sonra ve sonra ikinci basamak tedavi olarak.

Bu nedenle tüm KHDAK'lı hastalar için tedavi planlanmadan önce tümörde PD-L1 statüsünü belirlemek gerekmektedir (14).

Tümörde PD-L1 statüsü immünohistokimyasal olarak, valide edilmiş bir primer antikor klonuyla bakılmalıdır. Ayrıca valide edilmiş antikorun hangi immünohistokimya cihazında boyandığı da çok önemlidir. Bunlar için IASLC (International Association For the Study of Lung Cancer) grubu kitapçık yayınlamıştır (34).

### Sonuç

Akciğer karsinomlu hastaların yaklaşık %70'i ileri evrede yakalanmaktadır. Bu hastalar cerrahi tedavi dönemini yitirmiş hastalar olduğundan kısıtlı tümör örnekleriyle değerlendirilmektedir. Bu örnekler hem tanı hem de testler için kullanılacaktır. Tümör içeren formalin fikse parafin blok kesitleri veya sitoloji örneklerinde yukarıda anlatılan biyobelirteçlerin

moleküler analizleri, akciğer kanserlerinin klinik yönetimi için standart laboratuvar testleri haline gelmiştir. Bu bağlamda, işlemlerin standardizasyonu için güncellenmiş ve daha kapsamlı Ulusal Rehberlere ve merkezlerin dış kalite kontrol sağlayacak, sertifikasyon verecek sistemlerin kurulmasına ivedilikle gereksinim vardır.

Günümüzde EGFR-KRAS, BRAF mutasyonlarının araştırmak için en sık real-time PCR yöntemi kullanılmaktadır. Ancak gelecekte tekli testler daha duyarlı ve aynı anda birden fazla genetik mutasyonları saptayabilen NGS yöntemlerine yerini bırakacaktır.

## KAYNAKLAR

- Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* 2014;25:1681-90.
- Kim HR, Kim DJ, Kang DR, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification is associated with poor survival and cigarette smoking dosage in patients with resected squamous cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:731-7.
- Hammeman Ps, Sos ML, Ramos AH, et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discovery* 2011;1:78-89.
- ShimmH S, Chol YL, Kim L, et al. Molecular testing of lung cancers. *Journal of Pathology and Translational Medicine* 2017; 51:242-54.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England Journal of Medicine* 2004;350:2129-39.
- Lopes GL, Vattimo EF, Castro Junior Gd. Identifying activating mutations in the EGFR gene: prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *J Bras Pneumol* 2015;41:365-75.
- Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-1500.
- Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 2010;16:1561-71.
- Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Archiv* 2012;461:245-57.
- Korpanty GJ, Graham DM, Vincent MD, et al. Biomarkers that currently affect clinical practice in lung cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1, and KRAS. *The Treatment of Metastatic Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) in New Era of Personalised Medicine* 2015;64.
- Pirker R, Herth JF, Kerr KM, et al. Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: results from a European workshop. *J Thorac Oncol* 2010;5:1706-13.
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448:561-6.
- Kerr KM, López-Ríos F. Precision medicine in NSCLC and pathology: how does ALK fit in the pathway? *Ann Oncol* 2016;27(Suppl 3):iii16-iii24.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, 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. *Archives of Pathology&Laboratory Medicine* 2018;142:321-46.
- Detection from tumor tissue and algorithm diagnosis in a daily practice. *Cancers* [online]. 2017;9:8. [Accessed 10 June 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5575610/>
- Bergethon K, Shaw AT, OU SH. ROS-1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30:863-70.
- Acquaviva J, Wong Rve, Charest A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 2009;1795:37-52.
- Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, et al. Testing for ROS-1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2016;469:489-503.
- Leonetti A, Facchinetti F, Rossi G, et al. BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): pickaxing another brick in the wall. *Cancer Treatment Reviews* 2018;66:82-94.
- Nguyen-Ngoc T, Bouhaab H, Adjei AA, Peters S. BRAF alterations as therapeutic targets in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2015;10:1396-403.
- Baik CS, Myall YNJ, Wakelee HA. Targeting BRAF-mutant non-small cell lung cancer: from molecular profiling to rationally designed therapy. *The Oncologist* 2017;22:786-96.
- Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AMC, et al. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax* 2016;71:177-84.
- Tan CS, Cho BC, Soo RA. Next-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in epidermal growth factor receptor -mutant non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2016;93:59-68.
- Xu J, Wang J, Zhang S. Mechanisms of resistance to irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and therapeutic strategies in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8:90557-78.
- Ilie M, Hofman V, Long E, et al. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Annals of Translational Medicine* [online] 2014;2:11. Available <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4245510/>
- Normano N, Denis MG, Thress KS, et al. Guide to detecting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in ctDNA of patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2016;8:12501-16.
- Hofman P. Liquid biopsy and therapeutic targets: present and future issues in thoracic oncology. *Cancers* [online] 2017;9:11. [Accessed 10 June 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5704172/>
- Liang H, Huang J, Wang B, et al. The role of liquid biopsy in predicting post-operative recurrence of non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease* 2018;10:838-45.
- Korpanty G. Challenges in NSCLC molecular testing 2012;11:3.

30. Stewart EL, Ttan SZ, Liu G, Tsao MS. Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations-a review. *Translational Lung Cancer Research* 2015;4:67-81.
31. Doebelle RC, PillingAB, Aisner DL, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18:1472-82.
32. Casaluce F, Sgambato A, Sacco PC, et al. Resistance to crizotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with ALK rearrangement: mechanisms, treatment strategies and new targeted therapies. *Current Clinical Pharmacology* 2016;11:77-87.
33. Hofman P. ALK status assessment with liquid biopsies of lung cancer patients. *Cancers* 2017;9:8.
34. Tsao MS, Kerr KM, Dacic S, Yatabe Y, Hirsh FR. IASLC atlas of PD-L1 testing in lung cancer | International Association for the Study of Lung Cancer [online]. [Accessed 11 June 2018]. Available from: <https://www.iaslc.org/publications/iaslc-atlas-pd-l1-testing-lung-cancer>