



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorado en Medicina  
Departamento de Medicina

**Mutaciones del gen del receptor del factor de crecimiento  
epidérmico (*EGFR*) en pacientes con carcinoma no  
microcítico de pulmón: cribado poblacional, significado  
predictivo y pronóstico y estrategias terapéuticas a la  
progresión.**

*Tesis Doctoral para optar al grado de doctor*

Autora: María Teresa Morán Bueno

Directores: Enriqueta Felip Font, Rafael Rosell Costa

Tutor: Jordi Giralt López de Sagredo

Barcelona, 2019





Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

**Mutaciones del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico  
(EGFR) en pacientes con carcinoma no microcítico de pulmón: cribado  
poblacional, significado predictivo y pronóstico y estrategias  
terapéuticas a la progresión.**

*Tesis Doctoral para optar al grado de doctor*

María Teresa Morán Bueno

Doctoranda

Enriqueta Felip Font

Directora

Rafael Rosell Costa

Director

Jordi Giralt López de Sagredo

Tutor

Barcelona, 2019



A Dani, por tu amor, tu apoyo y tu paciencia.  
A Emma, por tu amor incondicional y tu bondad.  
A Begoña, por enseñarme a valorar la vida desde el dolor.



Al Dr. Rafael Rosell. Gracias por confiar en mi y dejarme formar parte de tu equipo y ser una inspiración para mí. Gracias por tu generosidad y por la dirección de esta tesis doctoral.

A la Dra. Enriqueta Felip. Gracias por tu paciencia y por transmitir esa ilusión y buen hacer siempre. Gracias por la dirección de esta tesis doctoral.

Al Dr. Jordi Giralt. Gracias por brindarse a tutorizar esta tesis doctoral.

A la Dra. Lecia Sequist y al Dr. Jeff Engelman por aceptarme como *Research Fellow* en su equipo del *Massachusetts General Hospital*. Mi gratitud infinita por esta experiencia tan enriquecedora como médico, investigadora y sobre todo como persona.

A mis compañeros del servicio de Oncología Médica. Gracias por vuestro apoyo, paciencia y por estar ahí en los buenos momentos, pero sobre todo en los malos. Gracias equipo A, creo que formamos un buen grupo.

A mis compañeros del Comité de Tórax. Gracias por vuestro trabajo incasable y dedicado, es un placer formar parte de este equipo.

A todos los pacientes que he tenido el privilegio de poder conocer durante todos los años de formación y especialización. Gracias por dejarme formar parte de vuestras vidas. A Ana María, Ana, David, Jordi, Marta, Dolors, Enriqueta, Salvadora, Javier, Olena, Concepció, Óscar, Miriam, Francisco... y tantos otros, gracias por todo lo que me habéis enseñado. Gracias por ayudarme a crecer como médico.

A todos los coautores de los trabajos que conforman la presente tesis doctoral. Gracias por vuestro tesón y trabajo. Esta aventura no habría sido posible en solitario.

A todos los residentes que se han formado en nuestro servicio a lo largo de los años. Vuestra presencia e ilusión me ha enriquecido siempre. Especialmente a las Dras. Silvia Catot, Laia Vilà y María Gil, con las que ahora me une una relación de amistad.

A Dani. Gracias por tu amor y tu apoyo, y gracias por tu paciencia infinita con las revisiones de la tesis doctoral.

A Emma. Gracias por ese amor incondicional y por ayudarme a ver la vida desde una perspectiva mucho más emocionante.

A mis padres, Julio y Teresa, como no. Gracias, gracias, gracias por todo.

A mis hermanos, Begoña, Elena, Chus, Julio, Nuria y David. Gracias por todo, por la vida que nos ha tocado vivir; no me hubieran podido tocar unos hermanos mejores.

A mi familia “sobrevenida”, que es mucha. Gracias por vuestro apoyo, por vuestro cariño y ánimo constantes. Gracias Mercé Martí, por todo y por tu lectura crítica, paciente y didáctica de la tesis doctoral.





## **ABREVIATURAS**



AKT o PKB, del inglés “Protein Kinase B”  
ALT, alanina aminotransferasa  
ASCO, *American Society of Clinical Oncology*  
AST, aspartato aminotransferasa  
BIM, del inglés “Bcl-2-like protein 11”  
CNMP, carcinoma no microcítico de pulmón  
CMP, carcinoma microcítico de pulmón  
Col., colaboradores  
del, deleciones  
DMT, Dosis máxima tolerada  
DR, duración de respuesta  
ECOG, *Easter Cooperative Oncology Group*  
EE, enfermedad estable  
EGF, del inglés “Epidermal Growth Factor”  
EGFR, del inglés “Epidermal Growth Factor Receptor”  
EMT, del inglés “Epithelial Mesenchinal Transition”  
EPA, Programa de acceso expandido  
ERK, del inglés “extracelular signal-regulated kinase”  
FISH, del inglés “Fluorescence in situ hybridization”  
HB, del inglés “Heparin Binding”  
HER, del inglés “Human Epidermal Receptor”  
HR, del inglés “hazard ratio”  
IC, intervalo de confianza  
IGF, del inglés “Insulin Growth Factor”  
IGF1R, del inglés “Insulin Growth Factor Receptor”  
IHQ, inmunohistoquímica  
ITQ, inhibidor de tirosina quinasa  
JAK, del inglés “Janus Kinases”  
KEAP1, del inglés “Kelch-like ECH-associated protein 1”  
KRAS, del inglés “Kristen Rats Sarcoma”.  
LM, lesiones medibles  
LNM, lesiones no medibles  
M1, metástasis  
MEK o MAPK, del inglés “Mitogen-Activated Protein Kinases”  
mEGFR, mutaciones de *EGFR* de sensibilidad  
m-iEGFR, mutaciones infrecuentes de *EGFR*  
mT790M, mutación de resistencia de *EGFR*

MET, del inglés “tyrosine-protein kinase Met”  
mSG, supervivencia global mediana  
mSLP, supervivencia libre de progresión mediana  
n, número de pacientes  
NFκB, del inglés “nuclear factor κB”  
PE, progresión de enfermedad  
PI3K, del inglés “phosphatidylinositol 3-kinase”  
PS, del inglés “performance status”  
PTEN, del inglés “Phosphatase and Tensin Homolog”  
QT, quimioterapia  
RAF, del inglés “Rapidly Accelerated Fibrosarcoma”  
RAS, del inglés “Rats Sarcoma”  
RB, Retinoblastoma  
RC, respuesta completa  
ROS, del inglés “reactive oxygen species”  
RP, respuesta parcial  
RT-PCR, del inglés “Real Time Polymerase chain reaction”  
RR, razón de probabilidades  
RTQ, receptores de tirosina quinasa  
SNC, sistema nervioso central  
STAT, del inglés “Signal Transducer and Activator of Transcription proteins”  
TCE, tasa de control de enfermedad.  
TGF-α, del inglés “Transforming Growth Factor alfa”  
TLD, toxicidad limitante de dosis  
TR, tasa de respuesta  
TFT, tiempo hasta fracaso de tratamiento  
VEGF, del inglés “Vascular Endothelial Growth Factor”  
VEGFR, del inglés “Vascular Endothelial Growth Factor Receptor”  
vs., del latín “en oposición a”

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>14</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>18</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>22</b>
<b>1.- Marco teórico</b> .....	<b>24</b>
<b>2.- Epidemiología del carcinoma no microcítico de pulmón avanzado</b> .....	<b>24</b>
<b>3.- Receptores ERBB y Receptor de crecimiento epidérmico (EGFR)</b> .....	<b>25</b>
3.1- Inhibidores de tirosina quinasa (ITQ) frente a EGFR. Desarrollo clínico inicial. ....	26
3.1.1- Erlotinib.....	26
3.1.2.- Gefitinib.....	27
3.1.3.- Afatinib.....	27
3.2.- Mutaciones de EGFR (mEGFR).....	28
3.2.1.- Epidemiología de las mEGFR.....	28
3.3.- ITQ frente a EGFR. Desarrollo clínico en pacientes con mEGFR. ....	33
3.3.1.- ITQ de EGFR en primera línea de tratamiento.....	33
<b>4.- Resistencia adquirida a ITQ en pacientes con mEGFR</b> .....	<b>38</b>
4.1.- Patrones de progresión a ITQ en pacientes con mEGFR. ....	40
4.1.1.- Patrón clínico.....	40
4.1.2.- Patrón molecular.....	41
<b>5.- Tratamiento de la resistencia</b> .....	<b>49</b>
5.1.- Tratamiento de la resistencia: experiencias iniciales. ....	49
5.1.1.- ITQ de segunda generación. ....	49
5.1.2.- Combinaciones de ITQ de EGFR y otros fármacos.....	49
5.2.- Tratamiento de la resistencia: incorporación de los ITQ de tercera generación. ....	50
5.2.1- Rociletinib.....	51
5.2.2.- Osimertinib.....	52
<b>6.- Determinación de mEGFR en muestras de sangre</b> .....	<b>55</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>64</b>

<i>1.- Evaluación de nuevas opciones terapéuticas tras el fracaso del tratamiento con ITQ de primera generación.....</i>	<i>66</i>
<i>2.- Detección de la mT790M en suero/ plasma y correlación con la respuesta clínica y radiológica en pacientes con mEGFR tratados con ITQ de tercera generación.....</i>	<i>67</i>
<b>COMPENDIO DE PUBLICACIONES ACEPTADAS PARA LA TESIS .....</b>	<b>70</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>88</b>
<i>1.-Evaluación de nuevas opciones terapéuticas en pacientes con mEGFR tras el fracaso del tratamiento con ITQ de primera generación.....</i>	<i>89</i>
<i>2.- Detección de la mT790M en suero/ plasma y correlación con la respuesta clínica y radiológica en pacientes con mEGFR tratados con ITQ de tercera generación.....</i>	<i>93</i>
<b>DISCUSIÓN GLOBAL.....</b>	<b>102</b>
<i>1.- Evaluación de nuevas opciones terapéuticas tras el fracaso del tratamiento con ITQ de primera generación.....</i>	<i>104</i>
<i>2.- Detección de la mT790M en suero/ plasma y correlación con la respuesta clínica y radiológica en pacientes con mEGFR tratados con ITQ de tercera generación.....</i>	<i>109</i>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>116</b>
<b>LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURA.....</b>	<b>120</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>124</b>
<b>GLOSARIO.....</b>	<b>148</b>
<b>APÉNDICE 1.....</b>	<b>156</b>
<b>APÉNDICE 2. ARTÍCULOS RELACIONADOS .....</b>	<b>164</b>

## **RESUMEN**





La presente tesis doctoral se basa en la compilación de dos artículos que versan sobre el estudio de los pacientes con cáncer no microcítico de pulmón (CNMP) portadores de mutaciones en el gen EGFR (*EGFR*). La tesis incluye dos estudios que se centran en las estrategias terapéuticas y de genotipado en sangre en la misma población de pacientes cuya enfermedad ha progresado al tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa (ITQ) de primera y segunda generación. El primer estudio incluye los resultados de seguridad y eficacia de la combinación de afatinib y sirolimus en pacientes con resistencia adquirida a los ITQ de primera generación. El segundo trabajo explora la utilidad de la biopsia líquida en la detección y monitorización de la mutación *T790M* en un grupo de pacientes tratados con osimertinib, un ITQ de tercera generación. La mutación *T790M* representa el principal mecanismo de resistencia en estos pacientes. El estudio explora también la correlación de la evolución de *T790M* en sangre con la respuesta clínica y radiológica de los pacientes.

Las conclusiones han sido las siguientes: 1. La combinación de afatinib y sirolimus en pacientes con CNMP con *mEGFR* en progresión a ITQ de primera y segunda generación proporciona una respuesta similar a la obtenida con afatinib en monoterapia y con una alta tasa de efectos adversos. Estos resultados no justifican el desarrollo de nuevos estudios con esta combinación. 2. La detección de *T790M* en muestra de sangre es factible. La desaparición de *T790M* en sangre en pacientes con CNMP con *mEGFR* y resistencia adquirida a ITQ de primera y segunda generación producida por la *T790M* se asocia a respuesta clínica y radiológica a osimertinib. La reaparición de *T790M* podría ser un marcador de resistencia a osimertinib en aquellos casos en que dicha mutación había desaparecido y permanece como mecanismo principal de resistencia adquirida



## **SUMMARY**



The present doctoral thesis is based on the compilation of two articles that deal with the study and treatment of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) who harbor mutations in the epidermal growth factor receptor gene (*EGFR*). The thesis includes two studies that are focused on therapeutic strategies and blood genotyping in the same population of patients whose disease has progressed to treatment with first- and second-generation tyrosine kinase inhibitors (TKI). The first study includes the safety and efficacy results of the combination of afatinib and sirolimus in patients with acquired resistance to first generation TKI. The second study explores the usefulness of liquid biopsy in the detection and monitoring of the *T790M* mutation in a group of patients treated with osimertinib, a third-generation TKI. The *T790M* mutation represents the main mechanism of resistance in these patients. The study also explores the correlation of the evolution of *T790M* in blood with the clinical and radiological response of patients.

The conclusions have been the following: 1. The combination of afatinib and sirolimus in patients with NSCLC with *mEGFR* in progression to first- and second- generation TKI provides a similar response to that obtained with afatinib monotherapy and with a high rate of adverse effects. These results do not justify the development of new studies with this combination. 2. The detection of *T790M* in blood sample is feasible. The disappearance of *T790M* in blood in patients with *EGFR*-mutant NSCLC and *T790M*-mediated acquired resistance is associated with clinical and radiological response to osimertinib. The reemergence of *T790M* could be a marker of resistance to osimertinib in those patients in whom *T790M* mutation had previously disappeared and remains as the main mechanism of acquired resistance.



## **INTRODUCCIÓN**





## 1.- Marco teórico.

La presente tesis se centra en el estudio de grupo de pacientes con carcinoma no microcítico de pulmón (CNMP) en estadios avanzados que son portadores de una mutación en el gen del receptor de crecimiento epidérmico [del inglés, *Epidermal Growth Factor Receptor (mEGFR)*]. Incluye la evaluación de una nueva estrategia terapéutica una vez estos pacientes progresan al tratamiento estándar con inhibidores de tirosina quinasa (ITQ) de primera generación. Asimismo, comprende la valoración de estrategias de genotipado en sangre para el seguimiento de la aparición de resistencias adquiridas como método alternativo al estándar establecido, basado el análisis en el tejido tumoral. Dicho análisis se plantea en pacientes tratados con un ITQ de tercera generación.

## 2.- Epidemiología del carcinoma no microcítico de pulmón avanzado.

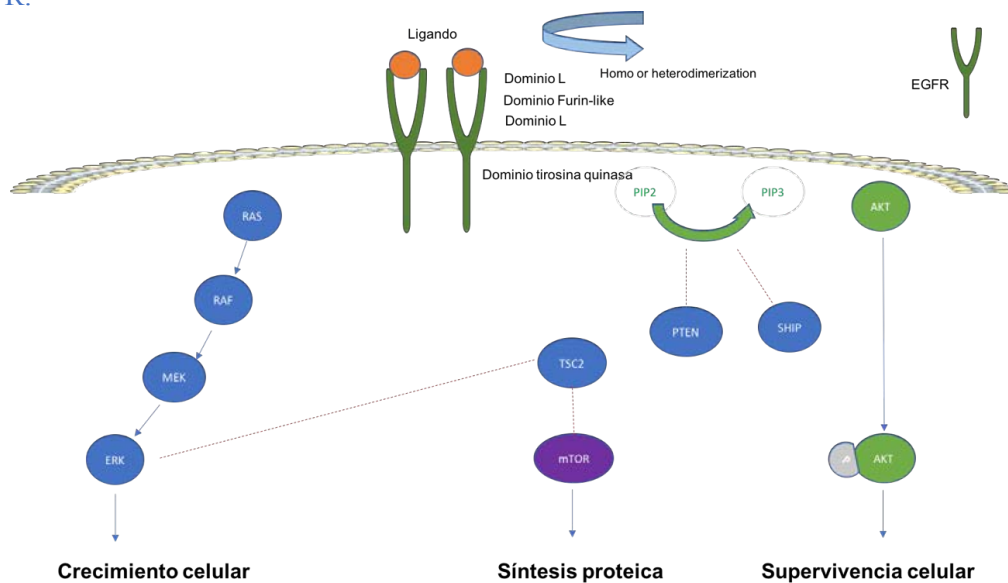
De acuerdo con los datos más actualizados de *Las Cifras del Cáncer en España*, informe anual editado por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y que corresponden al año 2018, la incidencia acumulada de CNMP (número de casos nuevos en una población y en periodo determinado) se estimó en 29503 casos nuevos, situando el cáncer de pulmón como el cuarto cáncer más frecuentemente diagnosticado en la población general, después del cáncer de colon (44937 casos nuevos), próstata (34394 casos nuevos) y mama (32536 casos nuevos) (1). La incidencia del CNMP en varones fue de 22083 casos nuevos en 2018 (representado el tercer tumor más incidente) y en mujeres fue de 7420 casos nuevos (representado el cuarto lugar en cuanto a tumor más incidente). La prevalencia del CNMP (número o proporción de población con una enfermedad determinada durante un periodo o momento concreto) fue muy baja en 2018. El CNMP, a pesar de ser un tumor muy frecuente, tiene una prevalencia a los 5 años baja, debido a su alta letalidad y a la corta duración de la enfermedad. En España, el tumor de pulmón se situó en quinta posición en cuanto a prevalencia después de los tumores de próstata, mama, colon y vejiga en la población general, ocupando la cuarta posición en varones y la novena posición en mujeres, respectivamente. La mortalidad (número de fallecimientos ocurridos en un periodo determinado en una población concreta) fue de 22121 casos en global en 2017, con 17268 muertes en varones y 4853 muertes en mujeres, respectivamente. Estos datos sitúan al cáncer de pulmón como la primera causa de muerte por cáncer en la población general en varones, y como la tercera en mujeres. Datos de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) del año 2019, estimaron la incidencia de CNMP en 29503 casos nuevos, situándolo en la cuarta posición (después del cáncer de colon y recto, del cáncer de próstata, y del cáncer de mama). Por sexos, los tumores de pulmón representaron 22083 casos nuevos en varones y 7420 casos nuevos en mujeres (2).

### 3.- Receptores ERBB y Receptor de crecimiento epidérmico (EGFR).

La familia de receptores tirosina quinasa ERBB está formada por cuatro tipos de receptores: EGFR (también conocido como ERBB1 o HER1), ERBB2 (o HER2), ERBB3 (o HER3) y ERBB4 (o HER4)(3). Estos receptores están localizados en la membrana celular. Pertenecen a la familia de los receptores tirosina quinasa (RTQ). Actúan como reguladores del crecimiento, proliferación y supervivencia celular, mediante la activación en cascada de diferentes elementos que integran las vías de señalización intracelular (4–6). Constan de un dominio extracelular, que actúa como lugar de unión del ligando, un dominio transmembrana y una porción intracelular, donde se localiza el dominio tirosina quinasa (Figura 1).

En condiciones normales, la activación de estos RTQ y de las vías de activación intracelulares está estrechamente regulada, es reversible y depende fundamentalmente de señales extracelulares. Sin embargo, en las células tumorales, la actividad del receptor y las vías de señalización subyacentes está activada de forma constitutiva, es decir, continua y no dependiente de las señales extracelulares.

**Figura 1.-** Estructura de EGFR en la membrana celular y vías de señalización dependientes de EGFR.



*AKT, o PKB Protein Kinase B; EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MEK o MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinases; mTOR, mammalian target of rapamycin; PTEN, Phosphatase and Tensin Homolog; RAF, Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; RAS, Rats Sarcoma; SHIP, SH2-containing Inositol Phosphatase; TSC2, Tuberous Sclerosis Complex 2. (Servier Medical Art)*

Existen diferentes ligandos que se unen a la fracción extracelular del receptor e inducen a la dimerización del mismo, es decir, a la formación de un complejo formado por dos receptores de la familia ERBB. La dimerización del receptor puede ser con un miembro de la misma subclase

(homodimerización), o con un receptor de otra subclase (heterodimerización). HER2 es el receptor que preferentemente forma heterodímeros con EGFR. Se conocen diferentes ligandos capaces de iniciar el proceso de activación de EGFR: EGF (*Epidermal Growth Factor*), TGF $\alpha$  (*Transforming Growing Factor $\alpha$* ), ampirregulina,  $\beta$ -Regulina, epirregulina y HB (*Heparin-Binding EGF*). Tras la unión del ligando al receptor, se activa el dominio citosólico del receptor que se autofosforila y se activan diferentes vías intracelulares de señalización. Estas rutas de señalización incluyen las vías RAS/ RAF/ MAPK, JAK/ STAT y PI3K/ AKT. La activación constitutiva de estas vías intracelulares en las células tumorales, y en ausencia de control, induce la proliferación y la diferenciación celular, la angiogénesis, la inducción de metástasis (M1) y los fenómenos antiapoptóticos (7). Los ITQ ejercen su efecto antitumoral al bloquear todos estos procesos intracelulares de señalización, tras unirse con el sitio de unión del ATP del lugar activo de la quinasa de EGFR (8,9).

EGFR está sobreexpresado en muchos tumores de origen epitelial (10–12). En el cáncer de pulmón ocurre en un 62% de los casos y se asocia a un peor pronóstico (10,13,14). En algunos casos se ha documentado la amplificación de la región cromosómica 7p12 donde se localiza el gen *EGFR* (15). Los ligandos (EGF y TGF $\alpha$ ) también pueden estar sobreexpresados en cáncer de pulmón, produciendo una activación del receptor mediante un circuito autocrino que provoca una hiperactivación del receptor.

### **3.1- Inhibidores de tirosina quinasa (ITQ) frente a EGFR. Desarrollo clínico inicial.**

#### **3.1.1- Erlotinib.**

Erlotinib (OSI-774, Tarceva<sup>®</sup>, Roche Pharma) es una molécula pequeña, de administración oral, que compite con el sitio de unión del ATP en el dominio intracelular de EGFR. De este modo, inhibe la autofosforilación del receptor y bloquea la activación de las vías de señalización intracelulares. Estudios preclínicos demostraron un efecto antitumoral muy prometedor, hecho que motivó un rápido desarrollo clínico en diversos tumores, entre los que se incluyó el CNMP (16,17). Los resultados de los estudios fase I indicaron que la dosis óptima biológica se conseguía con una dosis diaria de erlotinib de 150 miligramos (18). La diarrea fue la toxicidad limitante de dosis (TLD). Posteriormente, dos estudios fase II demostraron una tasa de respuesta (TR) del 12,3% y una estabilización de la enfermedad (EE) en un 38,6% de los casos. La mediana de supervivencia global (mSG) fue de 8,4 meses, con una tasa de supervivencia al año del 40% (19). El estudio BR21 llevó al registro de erlotinib como tratamiento de segunda o tercera línea en pacientes con CNMP por sus resultados positivos frente a placebo (20). Los efectos secundarios más frecuentes fueron *rash*, diarrea e infección, en la mayoría de los casos de grado 1 y 2. Análisis *post-hoc* no demostraron que la SG estuviera influida por el estado de expresión de EGFR, el

número de copias de EGFR o las *mEGFR*. Dos estudios fase III combinaron QT con erlotinib en primera línea: el estudio TALENT (cisplatino y gemcitabina con erlotinib vs. placebo) y el estudio TRIBUTE (paclitaxel y carboplatino con erlotinib vs. con placebo) (21,22). Ninguno de ellos demostró una mejora de la eficacia respecto a la QT sola y sí un incremento de toxicidad derivado de la adición del ITQ.

### 3.1.2.- Gefitinib.

Gefitinib (ZD1839, Iressa<sup>®</sup>, Astra Zeneca) es una anilinoquinazolina de bajo peso molecular y de administración oral, que de forma similar a erlotinib, compite por el sitio de unión del ATP en el dominio intracelular del receptor EGFR. Los estudios iniciales establecieron la dosis de gefitinib en 250 mg/día y demostraron que este fármaco aportaba una respuesta prometedora con una tasa de efectos adversos leves o moderados (grados 1 y 2), siendo los más frecuentes el *rash* y la diarrea (23,24). Estudios fase II demostraron una actividad clínica significativa de gefitinib como tratamiento de segunda y tercera línea en pacientes con CNMP avanzado previamente tratado (25,26). Se llevaron a cabo dos ensayos clínicos de combinación de QT con gefitinib en primera línea. Los estudios INTACT-1 (gefitinib vs. placebo con cisplatino y gemcitabina) e INTACT-2 (gefitinib vs. placebo con paclitaxel y carboplatino) no demostraron diferencias en eficacia entre grupos de tratamiento (27,28). Finalmente, un estudio fase III comparativo de gefitinib frente a placebo evaluó la ventaja potencial en la supervivencia asociada a la administración de gefitinib como segunda y tercera línea de tratamiento en pacientes con CNMP avanzado previamente tratados (29). El estudio no demostró diferencias en la supervivencia. No se continuó con el desarrollo clínico de gefitinib en población no seleccionada de CNMP.

### 3.1.3.- Afatinib.

El desarrollo de afatinib (BIBW 2992, Giotrif<sup>®</sup>, Boeringher Ingelheim) fue posterior en el tiempo. Como se ha expuesto previamente, los receptores EGFR pueden formar uniones entre receptores del mismo tipo o con otros receptores de la familia HER, siendo HER2 el receptor con el que forman heterodímeros con mayor frecuencia. Por ello, se valoraron diferentes fármacos que eran capaces de actuar en la porción extracelular de HER2, como el anticuerpo monoclonal trastuzumab, o en la porción intracelular del receptor donde se localiza el residuo tirosina quinasa, tales como los ITQ lapatinib y afatinib.

A diferencia de gefitinib y erlotinib, afatinib es un inhibidor covalente que contiene un grupo hidrofílico capaz de unirse a los residuos de cisteína localizados en las regiones catalíticas de EGFR (Cys797), HER2 (Cys 805) y HER4 (Cys 803). Mediante esta unión a diferentes receptores produce una inhibición enzimática irreversible que produce una inhibición de la actividad celular más duradera y profunda (30). Estudios preclínicos demostraron que afatinib inhibía el crecimiento celular e inducía apoptosis en líneas celulares de diversos tipos de tumores, incluyendo líneas celulares de tumores de pulmón con *EGFR* mutado y nativo. Esta inhibición,

aunque menos potente que en líneas celulares con *EGFR* mutado (*L858R*), se observó en líneas celulares con *L858R/T790M* resistentes a gefitinib y lapatinib (30). En estudio preclínicos, afatinib demostró su capacidad de inhibir de forma irreversible la actividad de diferentes miembros de la familia ERBB, inhibiendo no sólo la fosforilación del receptor, sino también la fosforilación de moléculas implicadas en las vías de señalización intracelular como ERK y AKT. En modelos ortotópicos de ratones con tumores de pulmón con *T790M*, esta inhibición fue parcial y transitoria (31). Además, en modelos transgénicos de ratones, afatinib demostró una reducción de volumen tumoral en los tumores *L858R/T790M* (31). Otros autores demostraron que, en una población similar de ratones, el genotipo *L858R* respondía a erlotinib, mientras que el genotipo *L858R/T790M* era resistente a erlotinib (32). Afatinib producía respuestas completas de los tumores *L858R*, mientras que en los tumores *L858R/T790M* producía estabilización o progresión de los tumores.

A partir de estas observaciones, se puso en marcha el programa LUX-LUNG para el estudio de afatinib en diversas situaciones clínicas (33). Diversos estudios fase I previos identificaron la dosis de 50 mg/día como la dosis máxima tolerable (DMT), siendo el *rash* y la diarrea las toxicidades de clase más frecuentes (34).

### **3.2.- Mutaciones de *EGFR* (m*EGFR*).**

#### **3.2.1.- Epidemiología de las m*EGFR*.**

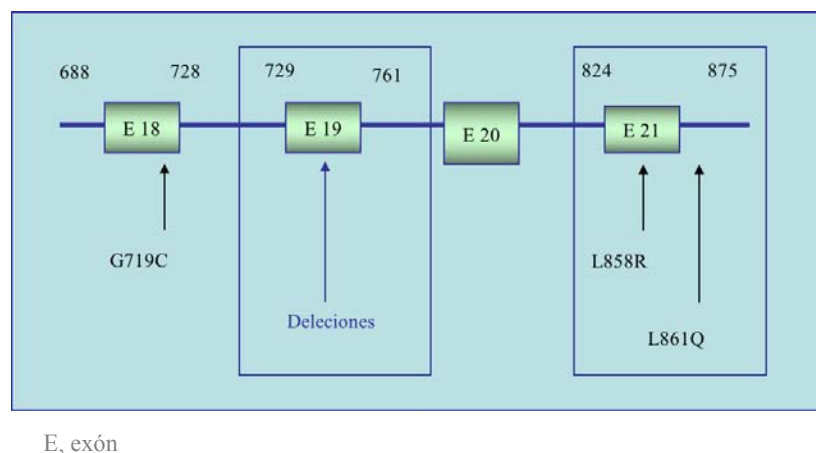
Los estudios iniciales con erlotinib y gefitinib identificaron ciertas características clínicas que se asociaban a una mayor probabilidad de respuesta a este tipo de tratamientos. Estas características incluían el sexo femenino, la histología de adenocarcinoma, la ausencia de tabaquismo previo y el origen asiático de los pacientes. Un 10% de los pacientes incluidos en los ensayos clínicos con ITQ presentaban unas respuestas clínicas y radiológicas rápidas y duraderas. Por ello, uno de los campos en los que se centró la investigación fue la identificación de posibles diferencias moleculares en *EGFR* que justificasen la sensibilidad diferente de ese subgrupo de pacientes a este tipo de tratamientos.

En el año 2004, tres grupos publicaron de forma simultánea sus respectivos trabajos donde se identificaron varias mutaciones somáticas en el dominio TQ de *EGFR* como responsables de la sensibilidad a estos ITQ (35–37). Lynch y colaboradores (col.) identificaron la presencia de estas mutaciones en 8 de los 9 (88,8%) pacientes que presentaron respuesta al tratamiento con ITQ (35). Por el contrario, estas mutaciones no se identificaron en ninguno de los 7 pacientes sin respuesta al tratamiento ( $p < 0,001$ ). Las mutaciones en *EGFR* (m*EGFR*) se localizaban en los exones 18 a 21 del gen. Las mutaciones en el exón 19 consistieron en deleciones (*del19*) de

fragmentos de aminoácidos (fragmento *ELREA*, afecta a los residuos de aminoácidos 747 a 752 y con mayor frecuencia *delE746\_A750*). Las mutaciones en el exón 21 fueron mutaciones puntuales que traducían cambios de aminoácido. La más frecuentemente descrita fue la llamada *L858R*, mutación que suponía un cambio de una arginina por una leucina en esa posición (Figura 2).

De forma paralela, Paez y col. estudiaron la presencia de las mutaciones en pacientes con CNMP que habían respondido a tratamiento con ITQ (37). Las *mEGFR* fueron identificadas en 15 de 58 (25,8%) muestras tumorales de pacientes japoneses y en 1 de 61 (1,6%) muestras de pacientes caucásicos. Se identificaron *delecciones* o *sustituciones* de aminoácidos en los exones 18, 19 y 21 del gen *EGFR* en 13 de las 14 (92,8%) muestras de tumores de pacientes que habían presentado respuesta a gefitinib.

**Figura 2.-** Representación esquemática de la distribución inicial de las *mEGFR*.



E, exón

Pao y col. identificaron las *mEGFR* en 5 de 7 (71,4%) pacientes sensibles a erlotinib. Estas no se identificaron en ninguno de los 10 pacientes refractarios a erlotinib ( $p=0,003$ ) (36). El 90% de las *mEGFR* implicadas en la sensibilidad a gefitinib y erlotinib se localizaron en los exones 19 y 21 del gen *EGFR*.

La presencia de las *mEGFR* condicionaba una modificación de la actividad del receptor, con una activación continua de la quinasa del receptor y que se asociaba la capacidad de producir una adicción oncogénica, es decir, los tumores que presentaban estas mutaciones eran controlados de forma selectiva por la señal que procedía de la activación de dicho receptor, sin verse afectada por señales procedentes de otros receptores. De este modo, con un fármaco apropiado, se podía bloquear esta señal exclusiva produciendo la interrupción del crecimiento celular y la apoptosis (38,39). La unión de moléculas, tales como gefitinib, erlotinib o afatinib, inducía un cambio de

conformación en la estructura del receptor, cambio que no ocurría en condiciones normales en ausencia de estímulo.

El análisis combinado de estos estudios seminales demostró que 23 de los 31 (81%) pacientes que respondieron a gefitinib o erlotinib eran portadores de las *mEGFR*. Además, estas mutaciones estaban presentes con mayor frecuencia en mujeres, no fumadores, en pacientes con histología de adenocarcinoma y en población asiática (35–37).

En un análisis retrospectivo de los pacientes incluidos en el estudio TRIBUTE, se identificaron las *mEGFR* en 29 de 228 pacientes (12,7%) (40). De estos pacientes con *mEGFR*, un 76% eran exfumadores; un 17%, nunca fumadores; y un 7%, fumadores activos. El grupo de pacientes con *mEGFR* tratados con QT y erlotinib presentó una TR del 53%, significativamente superior a la de aquellos pacientes no mutados tratados con la misma combinación (18%) ( $p < 0,01$ ). La mediana de supervivencia libre de progresión (mSLP) fue superior en los pacientes con *mEGFR* que recibieron erlotinib ( $p < 0,09$ ) sin diferencias en la SG. No obstante, el escaso número de eventos de supervivencia en el momento del análisis y el número limitado de pacientes en cada subgrupo pudieron haber influido en estos resultados.

Otros estudios retrospectivos posteriores demostraron que las *mEGFR* eran un factor predictivo independiente de respuesta a ITQ (41–47). La mayoría de los pacientes incluidos en estos estudios habían recibido otros tratamientos previos. La TR comunicada en estos estudios fue superior al 60% (rango, 30-100%), la mSLP fue de 12 meses y la mSG de 20 meses. Se volvió a encontrar una asociación de las *mEGFR* con el sexo femenino, la ausencia de tabaquismo, la población asiática y el adenocarcinoma. Estos subgrupos son los que obtuvieron unas mejores TR. En estas series retrospectivas, la prevalencia de mutaciones en población asiática (30%) fue superior a la encontrada en población caucásica (10%) (41,42,44–50).

Las *mEGFR* tienen implicaciones predictivas y en el pronóstico de la enfermedad. Los receptores codificados por cada una de las mutaciones parecen tener diferencias en sus propiedades bioquímicas. Las *del19* implican, de forma global, un subtipo de enfermedad con un mejor pronóstico. Además condicionan una mejor respuesta y una SG más prolongada que las asociadas a la mutación *L858R*. Esta implicación se conoce desde los estudios iniciales, y se ha confirmado en estudios posteriores (42,43,51–59).

Las *del19* suponen aproximadamente un 45% de las *mEGFR*. La mutación *L858R* en el exón 21 supone un 35-40% de las *mEGFR*. Ambos tipos de mutaciones se integran en el grupo que se



identifica con mayor frecuencia (aproximadamente un 80-85%) y se asocian a una elevada sensibilidad a los ITQ (60,61).

**Figura 3.-** Distribución de mutaciones en exones 18-21 del gen *EGFR*.

				<span style="color: green;">Δ747-753insS</span>								
								T847I <span style="color: green;">L858R</span>				
				V742A		S752Y		<span style="color: red;">L861Q</span>				
P649L	<span style="color: red;">G719X</span>		P733L	E749K		<span style="color: red;">S768I</span>		V851A		A864T	G873A	
P694S	<span style="color: red;">G719S</span>		E746K		A767T		S784F					
L688P	<span style="color: red;">G719A</span>		L730F	G735S	D761N	R776C	T790M	G810S	N826S	L838V	I853T	E866K
Exón 18			Exón 19			Exón 20			Exón 21			

Existen, no obstante, otras mutaciones que aparecen con menor frecuencia y con sensibilidad diferente a los ITQ (Figura 3). Disponemos de datos controvertidos en cuanto a la eficacia de ITQ en tumores portadores de estas mutaciones infrecuentes (también llamadas raras o no comunes). (62–72)

En 2007, dos estudios prospectivos demostraron la eficacia de gefitinib en pacientes asiáticos con *mEGFR* tratados con gefitinib, con una TR del 75%, una SLP de 11,5 meses y una SG de 15,5 y de 18, 6 meses en cada uno de los estudios, respectivamente (49,50). Según los resultados de estudios retrospectivos y prospectivos disponibles en ese momento, se desconocía la prevalencia real de las mutaciones en población caucásica. El Grupo Español de Cáncer de Pulmón puso en marcha un estudio para dar respuesta a esta cuestión (73).

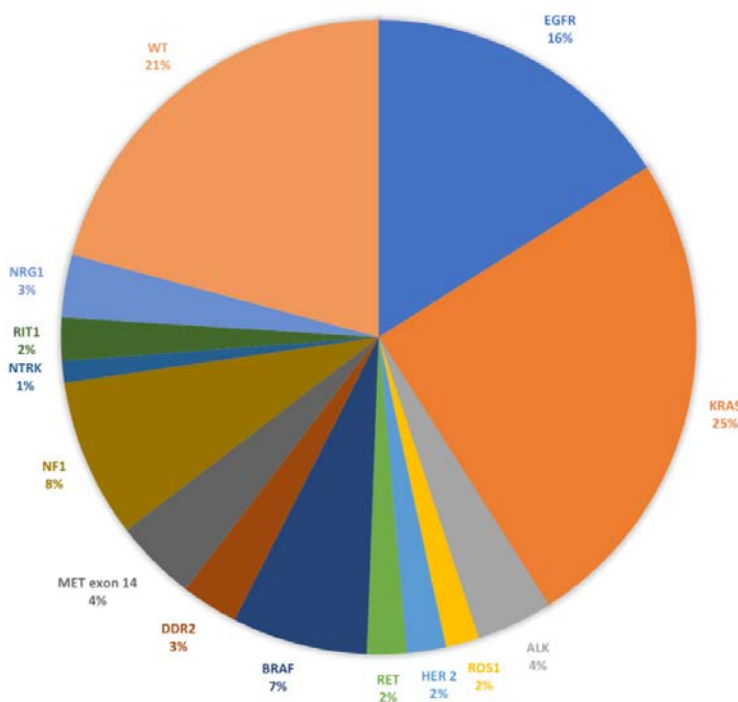
Este fue el primer registro de análisis de las *mEGFR* a gran escala y prospectivo realizado en Europa. Se analizaron las muestras de 2105 pacientes procedentes de diferentes centros de España y se detectó la presencia de las *mEGFR* en 350 pacientes; lo que supuso una prevalencia del 16,6%. La selección de la muestra podría explicar, en parte, la prevalencia superior de las *mEGFR* en nuestra población, comparado con la frecuencia de las *mEGFR* comunicada en análisis previos. La prevalencia de las *mEGFR* en diversos estudios retrospectivos y prospectivos había resultado del 10%. (41,42,44–50).

Los hallazgos de la asociación que existía entre la presencia de las *mEGFR* y la elevada respuesta y supervivencia de los pacientes cuando recibían un tratamiento con un ITQ, supusieron un punto de inflexión en el tratamiento del CNMP, cuando se comparaban con los resultados que habitualmente obtenían estos pacientes con QT convencional (TR de 30%, SLP de 4-5 meses y SG de en torno a 12 meses). Se estableció así un cambio de paradigma en el CNMP: los pacientes portadores de las *mEGFR* constituyen un subtipo molecular de cáncer de pulmón con una respuesta y evolución clínica diferente. La identificación de las *mEGFR* es crucial para poder

individualizar el tratamiento en estos pacientes. Nuestro estudio volvió a demostrar el valor predictivo y pronóstico de las mEGFR.

El descubrimiento de las mEGFR, su detección y cribado poblacional abrió la era del diagnóstico molecular del CNMP. A partir de esa fecha, se recomendó una búsqueda activa de las mEGFR a fin de seleccionar los pacientes que podrían presentar un beneficio al tratamiento dirigido con ITQ frente a EGFR. Más tarde, esta clasificación molecular fue integrando otras alteraciones moleculares, tales como mutaciones (mBRAF, mHER2) y reordenamientos de genes (ALK, ROS1) para los que ya disponemos de tratamientos específicos. Estas alteraciones moleculares, entre otras, conforman el nuevo espectro de la clasificación molecular del CNMP (74). (Figura 4)

**Figura 4.-** Clasificación molecular del CNMP (histología no escamosa)



*ALK, anaplastic lymphoma kinase; BRAF, B-Rapidly Accelated Fibrosarcoma; DDR2, discoidin domain-containing receptor 2; EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; HER2, Human Epidermal Receptor type 2; KRAS, Kristen Rats Sarcoma; NF1, neurofibromatosis tipo 1; NRG1, neuregulin 1; NTRK, tropomyosin receptor kinase; RET, rearranged during transfection; WT, wild type o nativo.*

Este nuevo paradigma en el diagnóstico de los pacientes con CNMP motivó un cambio en el enfoque del paciente desde el momento del diagnóstico. El estudio molecular hacía necesaria la obtención de muestras del tumor de una calidad adecuada para poder realizar el estudio molecular. Fue y sigue siendo precisa, por tanto, una implicación de los equipos de Neumología, Radiología e incluso Cirugía Torácica, encargados del diagnóstico inicial de los pacientes.

El diagnóstico patológico se modificó hasta lograr la obtención de material en mayor cantidad y de mejor calidad para poder realizar el estudio molecular. Además, con la publicación de los resultados de este estudio, se estableció la necesidad de modernizar los servicios de Anatomía Patológica de los centros y ampliar los laboratorios de Biología Molecular para poder dar respuesta a esta nueva necesidad. Se crearon también plataformas de diagnóstico molecular para poder dar servicio a centros de tercer nivel sin posibilidades de realizar el estudio molecular en sus centros. El análisis de las *mEGFR*, con los años, se ha simplificado y, gracias a la aparición de kits comerciales, el análisis puede realizarse en la mayoría de los centros con experiencia en técnicas básicas de patología, no siendo necesarios laboratorios de Biología Molecular, que requieren un personal con un entrenamiento especial y una tecnología más sofisticada.

Dados los resultados de análisis de los datos recogidos en este registro, el Grupo Español de Cáncer de Pulmón puso en marcha el estudio EURTAC, un estudio multicéntrico europeo, fase III, comparativo y abierto, en el que los pacientes portadores de las *mEGFR* fueron asignados aleatoriamente a recibir tratamiento de primera línea con erlotinib vs. QT convencional (54). Los resultados definitivos del estudio EURTAC demostraron un beneficio de erlotinib frente a QT como primera línea de tratamiento sistémico (en términos de TR y SLP) en pacientes caucásicos con *mEGFR*.

### **3.3.- ITQ frente a EGFR. Desarrollo clínico en pacientes con *mEGFR*.**

#### **3.3.1.- ITQ de EGFR en primera línea de tratamiento.**

Los resultados del estudio previo se publicaron en 2009 de forma paralela a los resultados del estudio *IRESSA Pan-Asian Study* (IPASS) (59). El estudio IPASS fue el primero que comparó la eficacia de los ITQ frente a QT convencional en pacientes portadores de las *mEGFR*. Posteriormente, diversos estudios compararon la eficacia de ITQ y la QT en primera línea de tratamiento en pacientes con *mEGFR* (52–57). Con gran solidez, estos estudios demostraron la superioridad de los diferentes ITQ sobre la QT, superioridad en términos de TR y SLP. Esta ventaja fue independiente del ITQ que se comparó (erlotinib, gefitinib y afatinib). Este beneficio era extensivo a todos los pacientes con *mEGFR*, independientemente del origen étnico de los pacientes (Tabla 1). La mayoría de estos ensayos incluyeron evaluación de calidad de vida y demostraron un beneficio en la misma de los ITQ frente a la QT.

Solo un estudio demostró un impacto en la SG (75). El efecto del cruce de tratamiento, por el cual los pacientes asignados a recibir tratamiento de QT de primera línea recibían el ITQ como segunda línea, podría ser el principal factor que explicase la ausencia de diferencias en SG en el

resto de estudios. Sin embargo, existían datos que sugerían una supervivencia más prolongada para aquellos pacientes que, siendo portadores de las *mEGFR*, recibían tratamiento con ITQ.

Un estudio retrospectivo realizado en Japón, incluyó pacientes de dos cohortes históricas de pacientes tratados con gefitinib antes y después de que dicho fármaco se aprobara en Japón. Este estudio demostró que los pacientes con *mEGFR* tratados con la secuencia gefitinib seguida de QT, tras la aprobación de gefitinib, presentaron una SG más larga que aquellos pacientes que recibían QT seguida de gefitinib, en los años previos a la aprobación de gefitinib (27,2 meses frente 13,6 meses;  $p < 0.01$ ) (76).

Otro estudio recogió los datos de eficacia y tolerabilidad de gefitinib en pacientes que estaban recibiendo tratamiento dentro de un programa de acceso expandido (PAE) en Estados Unidos. (77) (78). Una actualización de los datos de eficacia y seguridad con un seguimiento superior a 10 años en 191 pacientes, demostró una tasa de supervivencia a 10 desde el inicio de tratamiento con gefitinib del 86% y a 15 años del 59% (79).

Estos dos estudios tienen limitaciones metodológicas, principalmente por su naturaleza retrospectiva; sin embargo, los datos sugieren una supervivencia prolongada de aquellos pacientes con *mEGFR* que reciben tratamiento con ITQ.

### **3.3.1.1.-Gefitinib.**

El estudio IPASS fue el primer estudio clínico aleatorizado que demostró una no inferioridad de gefitinib respecto a QT (59). El criterio de selección de pacientes se basó en el perfil clínico asociado a la probabilidad de ser portadores de *mEGFR* (adenocarcinoma, nunca fumadores o fumadores leves), y no en una selección molecular mediante la confirmación de la presencia de *mEGFR* en tejido tumoral. Este estudio incluyó población asiática. La prevalencia de las *mEGFR* fue del 21,4% en aquellos pacientes en que se pudo confirmar. El estudio incluyó 1217 pacientes que fueron asignados a recibir gefitinib frente a paclitaxel y carboplatino. Gefitinib demostró ser no inferior a QT en la población general en términos de SLP, que fue el objetivo principal del estudio (HR 0,74; IC95%, 0,65-0,85;  $p < 0,001$ ). Esta diferencia fue mayor en el subgrupo de pacientes que resultó positivo para las *mEGFR* ( $n=261$ ; HR, 0,48; IC95%, 0,36-0,64;  $p < 0,001$ ). La TR fue superior en el grupo que recibió gefitinib en comparación al que recibió la QT (71% vs. 47%;  $p < 0,001$ ). No se encontraron diferencias en SG (21,6 vs. 21,9 meses; HR 0,78; IC95%, 0,5-0,1,2). Aunque la selección de los pacientes se basó en criterios clínicos asociados a una mayor probabilidad de ser portador de las *mEGFR*, aquellos pacientes que recibieron gefitinib y

resultaron *EGFR* nativo en el estudio molecular, presentaron un efecto negativo del tratamiento en SLP (HR, 2,58; IC95%, 2,05-3,98;  $p < 0,001$ ).

Por tanto, la confirmación molecular de la presencia de las *mEGFR* debe ser siempre la base de la selección del tratamiento con ITQ, a fin de evitar el impacto negativo que los ITQ pueden tener cuando se administran en población *EGFR* nativa como primera línea de tratamiento.

Dos estudios adicionales desarrollados en Asia compararon gefitinib con QT en primera línea en función de una selección molecular de los pacientes: el estudio del *North East Japan Study group 002 trial* (NEJ002) y el estudio del *West Japan Thoracic Oncology Group 3405* (WJTOG3405) (56,57). El estudio NEJ002 distribuyó aleatoriamente a 227 pacientes con *mEGFR* (1:1) a recibir gefitinib vs. carboplatino y paclitaxel (56). La TR fue de 74% vs. 31% ( $p < 0,001$ ). La SLP fue de 10,8 vs. 5,4 meses (HR, 0,30; IC95%, 0,22-0,41;  $p < 0,001$ ). No se encontraron diferencias en SG (30,5 vs. 23,6 meses, respectivamente). En una actualización posterior, la SG se mantuvo sin diferencias entre ambos grupos (HR, 0,884; IC95%, 0,634–1,241;  $p = 0,483$ ) (80). El estudio WJTOG-3405 comparó gefitinib frente a cisplatino y docetaxel (57). Ciento setenta y cinco pacientes con *mEGFR* fueron distribuidos aleatoriamente (1:1) en ambas ramas de tratamiento. La TR fue de 62% vs. 32%, ( $p < 0,001$ ). La SLP fue de 9,2 y 6,3 meses, respectivamente (HR, 0,48; IC95%, 0,33-0,71;  $p < 0,001$ ). Una vez más, el cruce de los tratamientos a la progresión de la enfermedad no encontró diferencias en SG.

### **3.3.1.2.-Erlotinib.**

Los estudios OPTIMAL y *European Tarceva vs. Chemotherapy trial* (EURTAC) compararon erlotinib y QT como tratamiento de primera línea en pacientes portadores de *mEGFR* (54,55). El estudio OPTIMAL incluyó 175 pacientes con *mEGFR* que fueron asignados a recibir erlotinib o carboplatino/gemcitabina (55). La TR fue de 83% y 36%, respectivamente. La SLP fue de 13,1 frente a 4,6 meses (HR, 0,16; IC95%, 0,10-0,26;  $p < 0,001$ ). De nuevo, no se encontraron diferencias en SG.

Todos los estudios previamente mencionados fueron desarrollados en Asia (55–57,59). El estudio EURTAC fue el primer estudio realizado en Europa e incluyó población con *mEGFR* exclusivamente caucásica ( $n = 173$ ) (54). La TR fue de 63% y 18% ( $p < 0,001$ ) en la rama de erlotinib y QT, respectivamente. El estudio permitió que el investigador pudiera elegir la combinación de platino con docetaxel o gemcitabina. La SLP fue de 9,4 frente a 5,2 meses (HR, 0,37; IC95%, 0,25-0,54;  $p < 0,001$ ). La SG no difirió en ambos grupos (19,3 vs. 19,5 meses; HR 1; IC95%, 0,65-1,7;  $p = 0,87$ ).

El estudio EURTAC confirmó que el beneficio del tratamiento con ITQ frente a mEGFR dependía de la selección molecular y no del origen étnico de los pacientes.

### 3.3.1.3.- Afatinib.

Posteriormente, se publicaron los resultados del estudio LUX-Lung 3 (53). Este ensayo clínico comparó la eficacia de afatinib frente a QT con cisplatino y pemetrexed. El estudio fue global y permitió la inclusión de pacientes de todas las razas. Se cribaron un total de 1269 pacientes. Se incluyeron 345 pacientes asignados aleatoriamente a recibir ambos tratamientos (1:1). Afatinib se asoció a una SLP más larga (11,1 meses para afatinib y 6,9 meses para QT; HR, 0,58; IC95%, 0,43-0,78; p=0,001). La mSLP para los pacientes con mEGFR (*del 19 y L858R*, n=308) fue de 13,6 meses para afatinib y de 6,9 meses para la QT (HR, 0,47; IC95%, 0,34-0,65; p=0,001). La TR fue significativamente superior en el grupo de afatinib (56% vs. 23%; p<0,001). En la publicación inicial de los resultados del estudio LUX-Lung 3, la SG no se había alcanzado para ninguno de los grupos; no obstante, la mSG no difería en ambos grupos (16,6 meses en el grupo de afatinib y 14,8 meses en el grupo de QT; HR,1,12; IC95%, 0,73-1,73; p=0,6).

**Tabla 1.-** Resumen de resultados de eficacia de estudios comparativos de primera línea de QT e ITQ de primera y segunda generación en pacientes con mEGFR (51–59).

Estudio	N	TR (%)	SLP	HR	OS	HR	HR (SLP) de acuerdo a tipo de mutación de EGFR
LUX Lung 3	345	56 vs 23	13,6 vs 6,9 11,1 vs 6,9	0,58	31,6 vs 28,2	0,78	del19 0,28; L858R 0,73
LUX Lung 6	364	66,9 vs 23	11 vs 5,6	0,28	23,6 vs 23,5	0,83	del19 0,25; L858R 0,32; otras 0,55
EURTAC	174	58 vs 15	10,4 vs 5,1	0,33	22,9 vs 19,6	0,92	del19 0,30; L858R 0,55
OPTIMAL	165	83 vs 36	13,1 vs 4,6	0,16	22,7 vs 28,9	1,04	del19 0,13; L858R 0,26
ENSURE	217	63 vs 34	11 vs 5,5	0,34	NR	NR	del19 0,20; L858R 0,54
WTOG	172	62 vs 32	9,6 vs 6,3	0,49	35,5 vs 38,8	1,04	del19 0,45; L858R 0,51
NEJ002	230	74 vs 31	10,8 vs 5,4	0,3	27,2 vs 26,6	0,89	del19 NR; L858R NR
FIRST SIGNAL	309	84,6 vs 37,5	8,4 vs 6,7	0,54	22,3 vs 22,9	0,93	del19 NR; L858R NR
IPASS	261	71 vs 47	9,5 vs 6,3	0,48	21,6 vs 21,9	1	del19 0,38; L858R 0,55

*Del19*, delección exón 19; *EGFR*, *Epidermal Growth Factor Receptor*; HR, *hazard ratio*; N, número de pacientes; SG, supervivencia global; SLP, supervivencia libre de progresión; TR, tasa de respuesta

El estudio LUX-Lung 6 comparó afatinib y QT (cisplatino y gemcitabina) en primera línea en población asiática con mEGFR (52). Un total de 374 pacientes fueron distribuidos aleatoriamente

a ambas ramas de tratamiento (2:1). La mSLP en este estudio fue significativamente más larga en el grupo de afatinib frente a QT (11 meses vs. 5,6 meses; HR, 0,28; IC95%,0,20-0,39;  $p<0,0001$ ). La TR fue de 66,9% y 23%, respectivamente ( $p<0,0001$ ).

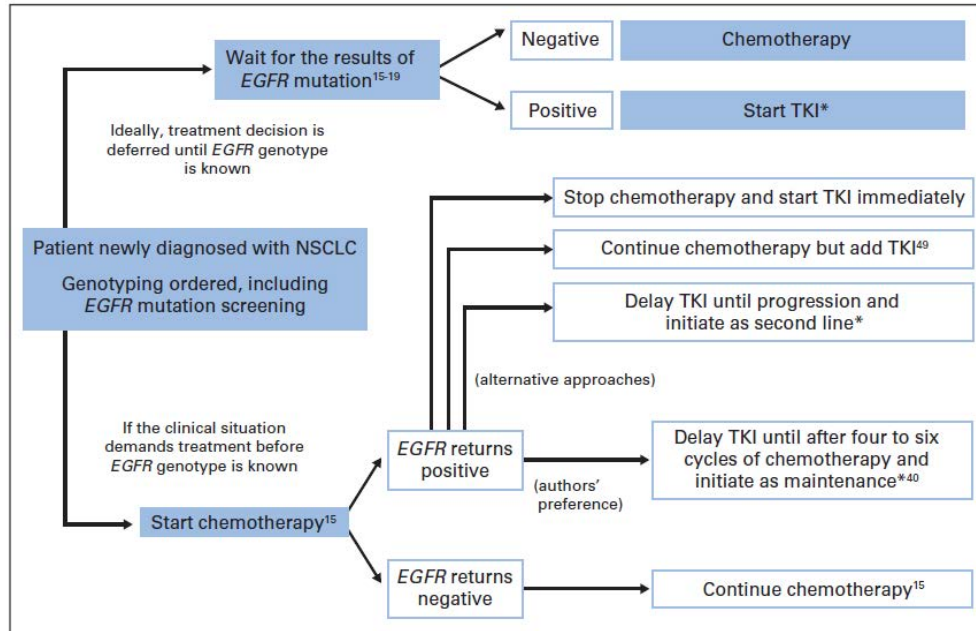
Los resultados definitivos de ambos estudios analizados conjuntamente demostraron una mSG de 28,2 meses para el grupo de afatinib y de 28,2 meses para el grupo de QT (HR, 0,88; IC95%, 0,66-1,18;  $p=0,39$ ). En el estudio LUX-Lung 6, la mSG fue de 23,1 meses en el grupo de afatinib y de 23,5 meses en el de QT. Sin embargo, la SG fue significativamente superior en el subgrupo de pacientes con *del19*. En el estudio LUX-Lung 3, la mSG en los pacientes con *del19* fue de 33,3 meses en el grupo de afatinib vs. 21,1 meses en el grupo de QT (HR, 0,54; IC95%, 0,36–0,79;  $p=0,0015$ ). En el estudio LUX-Lung 6, la mSG en el subgrupo de pacientes con *del19* fue de 31,4 meses (IC95%, 2-35,3) vs. 18,4 (IC95%, 14,6-25,6) en los grupos de afatinib y QT, respectivamente (HR, 0,64; IC95%, 0,44-0,94;  $p=0,023$ ).

Los resultados de todos estos estudios demostraron que el beneficio del tratamiento con ITQ fue superior al tratamiento de quimioterapia como primera línea terapéutica en los pacientes con *mEGFR* (52–54,56,57,59). La mayoría de estos estudios no encontraron diferencias en la SG de los pacientes. Sin embargo, un subgrupo de los pacientes que fueron asignados a recibir tratamiento de QT de primera línea y el ITQ como segunda línea no tuvieron ocasión de recibir el ITQ. Según los resultados de estos estudios fase III comparativos de ITQ frente a QT, entre un 5 y un 42% de pacientes asignados a la rama de QT, nunca recibió el tratamiento con ITQ en el momento de la progresión de la enfermedad. Estos ensayos no se habían diseñado para evaluar el efecto del cruce de las ramas de tratamiento; no obstante, y a pesar de una monitorización estricta de los pacientes incluidos en estos ensayos clínicos, existe un riesgo real de que los pacientes pierdan la opción de recibir este tratamiento si no prescribimos el ITQ como primera línea de tratamiento.

Por tanto, la recomendación en pacientes con *mEGFR* es iniciar el ITQ como primera línea de tratamiento sistémico. En la práctica habitual, esperamos el resultado del análisis molecular antes de iniciar el tratamiento con ITQ. No obstante, esta recomendación se puede ver comprometida cuando debemos iniciar un tratamiento antes de poder disponer de este resultado. Esto puede ocurrir cuando el estado clínico del paciente requiere del inicio urgente del tratamiento o el material para poder realizar el estudio molecular es insuficiente y necesitamos realizar biopsias adicionales. En estas situaciones, la cuestión radica en cómo incorporamos el tratamiento con ITQ en la secuencia terapéutica una vez disponemos de un resultado positivo de *mEGFR* en el tumor y el paciente se encuentra en curso de tratamiento de QT (81). En estos casos existen diferentes alternativas: primero, suspender la QT e iniciar de inmediato el ITQ; segundo, completar un

determinado número de ciclos de QT e iniciar el ITQ como un tratamiento de mantenimiento; y tercero, retrasar el inicio de ITQ hasta que se objetive la progresión de enfermedad (Figura 8).

**Figura 8.-** Propuesta terapéutica de acuerdo con el resultado molecular de las *mEGFR* (81).



*EGFR*, Epidermal Growth Factor Receptor; TKI, Tyrosin Kinase Inhibitor

#### 4.- Resistencia adquirida a ITQ en pacientes con *mEGFR*.

Los resultados de los estudios previamente expuestos demostraron que el uso de los ITQ frente a EGFR como primera línea de tratamiento ofrece las mejores oportunidades de obtener respuestas rápidas y prolongadas, frente a la QT convencional (52–54,56,57,59). Además, la mejor tolerancia que asocian, en comparación con la QT, hace de estos fármacos una opción más atractiva para los pacientes y los clínicos.

Sin embargo, después de un periodo de respuesta, con una toxicidad aceptable y manejable en la mayoría de los casos, todos los pacientes acaban desarrollando resistencia a estos fármacos, hecho que se traduce en una progresión de la enfermedad.

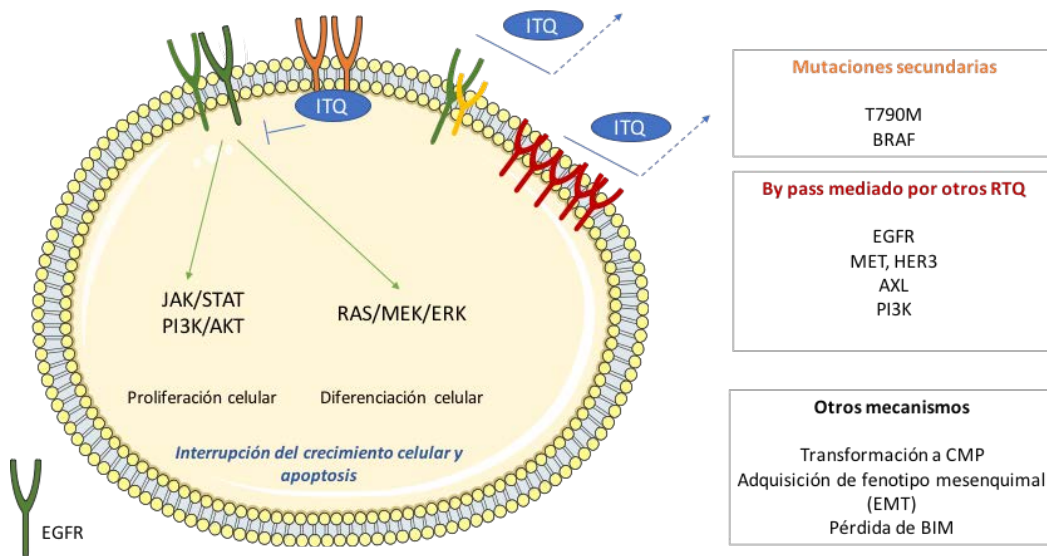
En esta situación existen diferentes consideraciones para la toma de decisiones terapéuticas. En primer lugar, debemos considerar que la población de pacientes con *mEGFR* representa una proporción pequeña de los enfermos con CNMP, hecho que dificulta evaluar diferentes estrategias en el seno de ensayos clínicos clásicos que precisan poblaciones muy extensas. La mayoría de las



recomendaciones clínicas en este grupo de pacientes se han basado en resultados de series de casos y recomendaciones de expertos, y no en resultados de estudios clínicos aleatorizados.

Por otra parte, el patrón de progresión de la enfermedad no es uniforme en todos los pacientes. En la práctica clínica, nos encontramos con un grupo de pacientes que presentan una progresión de su enfermedad rápida y con un empeoramiento sintomático significativo, mientras que otros pacientes presentan una progresión lenta, indolente y asintomática de la enfermedad previamente conocida, sin aparición de nuevas localizaciones M1. Existe un tercer grupo de pacientes cuya progresión de la enfermedad se manifiesta con la aparición de alguna lesión nueva única (oligoprogresión) con respuesta mantenida de la enfermedad previa conocida. Esta tercera situación podría ser reflejo de la resistencia parcial a los ITQ. Mantener el tratamiento con ITQ puede ser útil en estos pacientes. Además, la supresión abrupta del ITQ puede favorecer una progresión acelerada de la enfermedad (82).

**Figura 9.- Mecanismos de resistencia adquirida a ITQ en pacientes con CNMP con mEGFR.**



*AKT, o PKB Protein Kinase B; BIM, Bcl-2-like protein 11; CMP, carcinoma microcítico de pulmón; EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; EMT, Epithelial Mesenchymal Transition; ERK, extracelular signal-regulated kinase; HER, Human Epidermal Receptor; JAK, Janus Kinases; MEK o MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinases; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; RAS, Rats Sarcoma; STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription proteins. (Servier Medical Art)*

Como tercer punto a considerar, la evaluación molecular y patológica de las lesiones M1 en los pacientes con mEGFR en progresión revela diferentes mecanismos implicados en la adquisición de dicha resistencia (Figura 9). La presencia de la mT790M en el exón 20 de EGFR representa el mecanismo más frecuente de resistencia en la población mEGFR (68–71). Esta mutación se

detecta en aproximadamente la mitad de los pacientes en el momento de la resistencia. Otros mecanismos implicados en la resistencia a ITQ incluyen la activación de vías de señalización alternativas a EGFR mediante la amplificación de receptores tales como *EGFR*, *MET* mediante *HER3*, *PI3K* y *AXL*, así como la transformación a carcinoma micrótico de pulmón (CMP), la adquisición de rasgos mesenquimales de los tumores y la pérdida de expresión de BIM (83–87) (Figura 9).

Por último, en los últimos años se ha evaluado en múltiples estudios si el uso de ITQ irreversibles o la combinación de ITQ con otros fármacos puede ser una estrategia adecuada para revertir y/o retrasar la aparición de resistencias. La mayoría de estos estudios no han incluido exclusivamente pacientes con *mEGFR*, sino pacientes previamente tratados con ITQ que han presentado progresión a ITQ (88). Además, la mayoría de estos estudios han obtenido resultados negativos en cuanto a eficacia.

#### **4.1.- Patrones de progresión a ITQ en pacientes con *mEGFR*.**

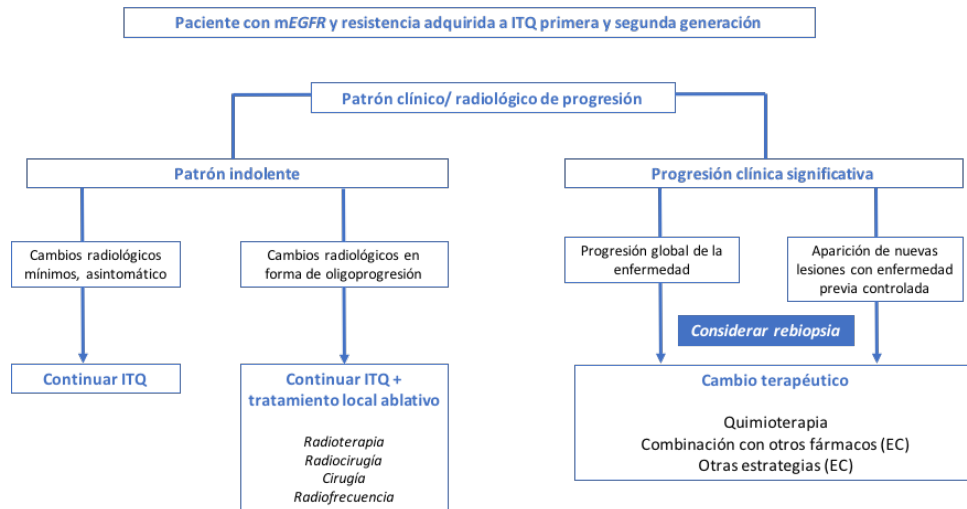
##### **4.1.1.- Patrón clínico.**

La figura 10 recoge el algoritmo de la toma de decisiones en el momento de evaluar a un paciente con *mEGFR* que ha progresado a un ITQ, así como estrategias clásicas que se han planteado para el tratamiento de estos pacientes.

Cuando la progresión ocurre de una forma lenta y asintomática, pero con cambios radiológicos evidentes, podemos plantear la opción de continuar con el ITQ. Basamos esta estrategia en los resultados de estudios retrospectivos (89). El estudio ASPIRATION, que evaluó de forma prospectiva la eficacia de continuar con el ITQ más allá de la progresión radiológica según los criterios RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) y en ausencia de progresión clínica, demostró que continuar con ITQ prolongaba la SLP en 3,4 meses (90).

Cuando el patrón de progresión implica la aparición de enfermedad oligometastásica, mantener el ITQ junto con el tratamiento local ablativo de radioterapia (RT) y radiocirugía sobre la nueva M1 demostró un incremento en la SLP, así como un retraso en la necesidad de cambiar el tratamiento sistémico (91). Previa a la aparición de los ITQ de tercera generación, algunos grupos comunicaron que esta estrategia era especialmente valiosa cuando la *mT790M* era el mecanismo responsable de la resistencia (92).

**Figura 10.-** Algoritmo clásico de decisión de tratamiento en pacientes con *mEGFR* con resistencia adquirida a ITQ.



EC, ensayo clínico; *EGFR*, *Epidermal Growth Factor Receptor*; ITQ inhibidor de tirosina quinasa

La aparición de nuevas lesiones M1 puede producirse en el contexto de un control parcial de la enfermedad previa, hecho que refleja la sensibilidad parcial mantenida al ITQ y la aparición de clonas resistentes que únicamente afectan a los lugares de las nuevas M1. Mantener el ITQ y añadir otro fármaco podría ser una estrategia en esta situación clínica, a fin de evitar el fenómeno de progresión acelerada de la enfermedad (82).

#### 4.1.2.- Patrón molecular.

A pesar de la mejora en las expectativas de los pacientes con *mEGFR* gracias al tratamiento de primera línea con ITQ, todos los pacientes acaban presentando una progresión de la enfermedad. Esta progresión se asocia al desarrollo de diversos mecanismos de resistencia adquirida que podemos clasificar en cuatro grandes grupos: **(1)** la aparición de mutaciones de resistencia en el receptor de membrana, **(2)** la amplificación de receptores u otras proteínas intracelulares que conlleva la activación alternativa de vías de señalización comunes a *EGFR*, **(3)** la presencia de mutaciones en otros elementos intracelulares con efecto activador en las vías de señalización intracelular y **(4)** otros mecanismos (Figura 11).

##### 4.1.2.1. Aparición de mutaciones de resistencia.

###### a) Mutación T790M.

La aparición de la *mT790M* en el exón 20 de *EGFR* es el mecanismo de resistencia adquirida más frecuente. Aparece en un 50-60% según diferentes series. Dicha mutación se localiza en la región de unión del ligando. Su presencia es capaz de restablecer la afinidad del receptor al ATP en un nivel similar a un *EGFR* nativo. Este aumento de afinidad es el responsable de la resistencia a

inhibidores de ITQ, más que a un cambio conformacional del receptor que impida la unión de los ITQ, tal y como se postuló inicialmente. De este modo, la presencia de la *mT790M* reduce la potencia de cualquier inhibidor competitivo de ATP, pudiéndose revertir esta resistencia con inhibidores irreversibles capaces de formar un enlace covalente con el sitio de unión del ATP (71).

La presencia de la *mT790M* como mecanismo de resistencia los ITQ fue descrita en 2005 por dos grupos independientes. Kobayashi y col. comunicaron el caso de una paciente con *del19* cuyas muestras tumorales a la progresión a gefitinib revelaron la presencia de la *mT790M* (93). Modelos estructurales y bioquímicos demostraron que la *mT790M* confería resistencia a ITQ. Pao y col. identificaron la *mT790M* junto a la *mEGFR* inicial en 2 de 5 pacientes que habían progresado a gefitinib o erlotinib (69). La *mT790M* no se identificó en ninguna muestra tumoral de pacientes no hubieran recibido tratamiento previo con un ITQ. Adicionalmente, la *mT790M* se encontró en 6 muestras de pacientes que, después de una resección quirúrgica completa y de haber recibido tratamiento adyuvante con gefitinib, presentaron progresión de su enfermedad.

La *mT790M* se identificó en una proporción pequeña en tumores con *mEGFR* previo al tratamiento con ITQ y se postuló un efecto de selección de esta mutación de resistencia bajo el tratamiento con ITQ. De este modo, el ITQ era capaz de eliminar las clonas de células con mutaciones de sensibilidad; sin embargo, las clonas portadoras de la *mT790M*, que son resistentes a estos tratamientos, acababan apareciendo y eran las responsables de la resistencia adquirida (68). La proporción de *mT790M* presente en los tumores antes del tratamiento fue variable y dependió de la sensibilidad de la técnica empleada en su detección. Se comunicaron unas frecuencias de entre un 35% a un 79% (54,67,94). La presencia de la *mT790M* desde el inicio podría explicar la resistencia primaria que algunos pacientes con *mEGFR* presentan a estos tratamientos, porcentaje que oscila entre un 10-25% de los mismos (64,70,72,95).

La presencia de la *mT790M* en el momento de la resistencia adquirida identificó un subgrupo de pacientes con *mEGFR* con una evolución más indolente en modelos preclínicos (96). Paralelamente, los pacientes con la *mT790M* como mecanismo de resistencia adquirida presentaron una SLP y un tiempo hasta la aparición de nuevas M1 superior a los pacientes cuya resistencia estuvo mediada por otro mecanismo. Por otra parte, los pacientes *mT790M* progresaron con mayor frecuencia en lugares previos de enfermedad o en forma de M1 pulmonares comparado con los pacientes sin la *mT790M* (92).

Adicionalmente, la *mT790M* también se identificó en líneas germinales de algunos pacientes en los que se encontró una asociación familiar de neoplasia pulmonar (97-99). En un análisis

retrospectivo, 11 de 503 pacientes presentaron la *mT790M* basal y su presencia en la línea germinal se pudo evaluar en muestras disponibles de tejido benigno de 10 de estos pacientes. El 50% de los pacientes presentó la *mT790M* germinal. Las técnicas de genotipado empleadas en la clínica para la determinación de *mEGFR* podrían emplearse para el cribado de las *mT790M* en línea germinal y, aunque su frecuencia es baja, los pacientes portadores y sus familias podrían beneficiarse de ser incluidos en programas de consejo genético (100).

#### ***b) Otras mutaciones.***

Existen otras mutaciones secundarias cuya presencia implica la resistencia adquirida a los ITQ. Estas incluyen las mutaciones *D716Y*, *T854A* y *L747S*. Se desconoce la base estructural que confiere esta resistencia y su frecuencia es menor que la *mT790M* (101–103).

#### ***4.1.2.2.- Amplificación de vías alternativas.***

La amplificación de diversos receptores de membrana se ha identificado como mecanismos de resistencia adquirida a ITQ. Esta categoría de resistencia adquirida involucra a otros RTQ que son capaces de activar de forma alternativa las vías de señalización cuando EGFR está siendo inhibido por una ITQ.

#### ***a) Amplificación de MET.***

La amplificación de *MET* fue descrita como un mecanismo de resistencia adquirida en *mEGFR*. La formación de heterodímeros de *MET* y *HER3* producía la activación de PI3K/AKT, que ocurría a pesar de la inhibición de EGFR por el ITQ (83). La amplificación de *MET* se comunicó entre un 5 y un 22% de los pacientes (86,104). La discrepancia de estos porcentajes fue fruto de las diferentes técnicas de detección empleadas. La excesiva producción del ligando natural de MET, el *Hepatic Growth Factor* (HGF), se ha identificado como mecanismo alternativo de resistencia sin la amplificación del receptor. Además, como ocurre con la *mT790M*, se describió la presencia de clones con amplificación de *MET* en muestras iniciales de tumores *mEGFR* que, aunque en una proporción inicial muy pequeña (<1%), emergían bajo la selección que se producía con el tratamiento con ITQ (105).

#### ***b) Amplificación de HER2.***

La amplificación de *HER2* se identificó como mecanismo de resistencia en un 12% de los pacientes con resistencia adquirida a ITQ. Esta amplificación produjo, igual que ocurrió con la amplificación de *MET*, una activación alternativa de las vías de señalización intracelulares (106). Su amplificación también se describió en un 1% de los tumores antes de que hubieran recibido

cualquier tratamiento. La amplificación de *HER2* definió una población de pacientes cuya enfermedad presentaba un comportamiento más agresivo, con una progresión más rápida y un pronóstico peor (107). Su presencia fue mutuamente excluyente con la *mT790M* (106). En modelos preclínicos la combinación de afatinib y cetuximab demostró una inhibición de la fosforilización de *HER2*. Estos resultados sugirieron que *HER2* estaba involucrado en la resistencia y sensibilidad de los tumores con *mEGFR* y apoyó la justificación para evaluar el estado de *HER2* e inhibirlo farmacológicamente (108).

#### *c) Amplificación de EGFR.*

La amplificación de *EGFR* también se describió en un 8% de los pacientes con *mEGFR* y resistencia adquirida a ITQ. La amplificación de *EGFR* se asoció a la presencia de la *mT790M* en todos estos casos (86).

#### *d) Amplificación de MAPK.*

MAPK pertenece a la vía de señalización RAS. Las *mKRAS*, que aparecen en hasta un 25% de los pacientes con CNMP, son mutuamente excluyentes con las *mEGFR* y suelen asociarse al consumo de tabaco. A pesar de dicha exclusión, la amplificación de MAPK fue descrita en una muestra de un paciente *mEGFR* resistente a erlotinib (109). También se identificó una elevación de los elementos de la vía ERK (por amplificación de MAPK o regulación a la baja de los inhibidores de ERK) en muestras a la resistencia a WZ4002, otro ITQ de EGFR de uso preclínico. En este estudio, la exposición a fármacos inhibidores de MEK evitó el desarrollo de dicha resistencia (109). Además, la exposición a inhibidores de MEK fue capaz de revertir la resistencia en tumores con *mEGFR* (110).

#### *e) Activación de AXL.*

El RTQ AXL se ha asociado a la resistencia adquirida a ITQ en pacientes con *mEGFR*. La expresión de AXL y su ligando GAS6 se encontró elevada en un 20 y 25% de las muestras de rebiopsia de pacientes a la progresión al ITQ, respectivamente (85). La expresión de AXL en células resistentes coincidió con la inducción del fenómeno de transición epitelio-mesenquimal (EMT), mecanismo que fue descrito en un grupo de pacientes con *mEGFR* y resistencia a ITQ (85,86). Otros estudios en líneas celulares demostraron que AXL y EMT se asocian con la resistencia intrínseca a los ITQ (111,112).

#### *f) IGFR.*

Estudios *in vitro* demostraron que el IGF1R podía favorecer la resistencia a ITQ gracias a la activación de elementos efectores comunes de las vías de señalización de EGFR e IGF1R (113). Por otra parte, se describió la implicación de la vía de IGF1R en la resistencia adquirida a los ITQ en tumores con *mEGFR* (114). Por ello, la combinación de ITQ frente a EGFR e inhibidores de IGF1R supuso una estrategia atractiva para el tratamiento de la resistencia.

### **5.1.2.3.- Mutaciones en proteínas efectoras intracelulares.**

La presencia de mutaciones en proteínas efectoras de las vías de señalización intracelular se ha asociado a la resistencia adquirida tras ITQ en pacientes con *mEGFR*. De modo similar, aunque EGFR esté siendo bloqueado por un ITQ, dichas mutaciones perpetúan la actividad de la vía de señalización con la activación de las vías de PI3K/AKT y MET/ERK, que conducen a un crecimiento, una supervivencia y una división celular descontrolados de las células tumorales (7).

#### **a) Mutaciones en PI3KCA y PTEN.**

La vía PI3K/AKT es una vía efectora clave en la señalización de *EGFR*. La *phosphate and tensine homolog* (PTEN) es una molécula que regula negativamente esta vía de señalización. La *mPTEN* se identificó en un 5% de los tumores con *mEGFR* en el momento de la resistencia (86). Las *mPTEN* también se describieron un 2% de los adenocarcinomas de pulmón en coexistencia con otras mutaciones oncogénicas en el 70% de los casos (115).

#### **b) Mutaciones en BRAF.**

Estudios de modelos *in vitro* para evaluar los mecanismos de resistencia a ITQ demostraron la adquisición de una mutación de *NRAS Q61K* en 1 de las 6 líneas celulares evaluadas con resistencia adquirida a erlotinib (116). De este modo, se realizó un cribado sistemático de mutaciones en *KRAS/NRAS/BRAF/MEK1* en muestras de más de 200 pacientes con *mEGFR* y resistencia adquirida a ITQ (117). No se encontró ninguna mutación en *KRAS, NRAS, MEK1*. Sin embargo, en 2 de las 195 muestras analizadas (1%), se encontró una mutación de *BRAF (G469A y V600E)*. Estudios *in vitro* demostraron que la presencia de estas *mNRAS* y *mBRAF* condicionaban resistencia a erlotinib. Cuando estas líneas celulares fueron tratadas con erlotinib y el inhibidor de MEK, AZD6244, o el inhibidor de BRAF, vemurafenib, el grado de inhibición de crecimiento de las células fue superior al conseguido con AZD6244 y vemurafenib solos. De modo que, aunque la proporción de casos en que *BRAF* aparecía a la resistencia al ITQ fue baja, es una opción a considerar especialmente en aquellos pacientes en que no se detectan otros mecanismos de resistencia a la progresión. También debería considerarse la posibilidad de estudios de combinación de ITQ de EGFR y BRAF o MEK para revertir dicha resistencia.

#### 4.1.2.4.- Otros mecanismos de resistencia.

##### a) Transformación histológica a carcinoma microcítico de pulmón.

La primera evidencia de la transformación histológica de CNMP a CMP se publicó en 2011 (86). En la serie de Sequist y col. que evaluó los cambios genotípicos e histológicos en pacientes con *mEGFR* y resistencia adquirida a ITQ de primera y segunda generación, se identificaron cambios histológicos compatibles con CMP en 5 de 34 (14%) muestras de pacientes en el momento de la progresión. Las biopsias en el momento de la progresión de enfermedad demostraron que las células presentaban una expresión elevada de sinaptofisina y cromogranina, marcadores característicos de la estirpe neuroendocrina. En todas las muestras, se mantuvo la *mEGFR* inicial. Tres pacientes presentaron un curso agresivo de la enfermedad. Cuatro pacientes recibieron tratamiento de QT basada en platino y etopósido y 3 de ellos presentaron respuesta al tratamiento. Los autores demostraron que los tumores que presentaban transformación a CMP adquirirían características del CMP clásico: alteraciones en el gen del retinoblastoma (*RB*, pérdida bialélica de *RBI*); alteraciones en *TP53*; y un perfil de expresión génica similar al CMP clásico con ausencia o reducción de expresión de *EGFR* (118). Paralelamente, en modelos de líneas celulares derivadas de estas células con transformación a CMP, se detectó un aumento de la sensibilidad a inhibidores de BCL-2, como ABT-263. No se encontraron alteraciones en otros genes que con frecuencia se encuentran alterados en CMP, tales como *MYC*, *PTEN* y *FGFR1*.

A pesar de que la pérdida de *RBI* es común en los tumores *mEGFR* resistentes a ITQ que adquieren rasgos neuroendocrinos, no es una condición suficiente para explicar esta transformación (118). Otro estudio evaluó muestras de pacientes obtenidas en diferentes momentos de la evolución de la enfermedad, para intentar reconstruir su evolución clonal e identificar cambios genéticos predictivos de transformación a CMP (119). Los autores demostraron la presencia de tres agrupaciones de mutaciones: un grupo compartido por los adenocarcinomas y CMP, que incluye la *mEGFR* y que representa una mutación troncal; un segundo grupo de mutaciones/alteraciones presentes únicamente en las muestras de adenocarcinoma (*mT790M* y amplificación de *EGFR*); y un tercer grupo de alteraciones exclusivas del CMP (*mPI3KCA* y amplificación de *MYC*). Las muestras seriadas de adenocarcinoma y CMP presentaron pérdida bialélica de *RBI* y *TP53*. Ésta se confirmó mediante estudio de IHQ. Por el contrario, esta pérdida fue infrecuente en aquellas muestras que no presentaron transformación a CMP. Los autores calcularon que esta inactivación basal de *RBI* y *TP53* incrementaba el riesgo relativo de transformación a CMP en 42,8 veces (IC95%, 5,88-311). Por tanto, existe la posibilidad de predicción de riesgo de transformación a CMP previo inicio de cualquier tratamiento con ITQ en los pacientes con *mEGFR*. El estudio de inmunohistoquímica (IHQ) de las muestras basales de los pacientes con *mEGFR* podría tener un valor predictivo de



riesgo de transformación histológica. Así, se podría monitorizar de una manera más estrecha, o recomendar una rebiopsia precoz en caso de progresión en estos pacientes.

#### ***b) Adquisición de rasgos sarcomatoides (EMT).***

Dos de 37 pacientes de la serie publicada por Sequist y col. presentaron rasgos de EMT a la progresión, con la adquisición de una morfología fusiforme y con la expresión de E-caderina y vimentina, todos ellos ausentes en la muestra pretratamiento de los mismos pacientes (86). Los dos pacientes mantuvieron la *mEGFR* en la muestra de la progresión, a pesar del cambio histológico que presentaron. En ambos casos consistió en una *ins20*.

#### ***c) Activación de NF-κB.***

La activación del factor nuclear κB (NF-κB) es un evento central en la respuesta de las células normales a los estímulos inflamatorios y su activación constitutiva conllevó la supervivencia de la célula tumoral (120,121). En las células normales, EGFR estimuló la activación de NF-κB. La inhibición de EGFR disminuyó la activación de NF-κB en diversos tumores. Por el contrario, la activación constitutiva de EGFR indujo resistencia a erlotinib en estas células. Por tanto, EGF actuó como un mediador de NF-κB en las células tumorales (122,123). La vía de NF-κB tuvo un papel crítico en el CNMP, con la inducción de tumores de pulmón (124,125). Aunque el eje EGF-EGFR fue capaz de activar la vía de señalización NF-κB mediante varios efectores (126,127), erlotinib no fue capaz de activar NF-κB en diversos tumores (122,128,129). NF-κB moduló la dependencia a EGFR en los tumores de pulmón y en la resistencia a erlotinib, de modo que la inhibición de NF-κB aumentó la apoptosis mediada por erlotinib en líneas celulares con *mEGFR*, pero sin la *mT790M* (130). Además, la expresión de NF-κB fue mayor en líneas celulares con *mEGFR* resistentes con la *mT790M* (131). Por tanto, la activación de NF-κB pudo intervenir en cualquier momento en la evolución de los tumores con *mEGFR* (pretratamiento y en el momento de la resistencia al ITQ). CNX-2006, un inhibidor de tercera generación, fue capaz de inhibir el crecimiento celular en modelos *in vitro* e *in vivo* con *mEGFR* y la *mT790M*.

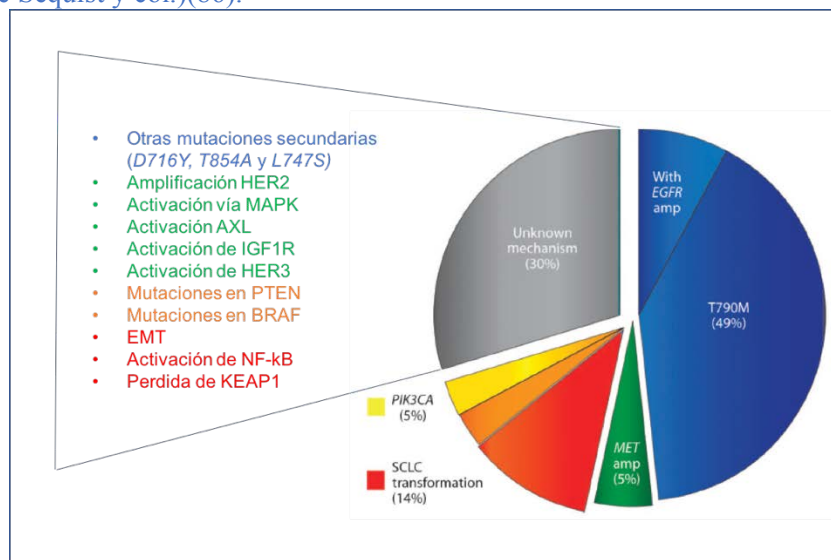
La inhibición selectiva de alguno de los miembros de NF-κB1 fue capaz de antagonizar el efecto de CNX-2006 y producir la resistencia a dicho tratamiento. No obstante, la activación de NF-κB1 en las líneas resistentes pudo estar mediada por una regulación al alza de diversas proteínas de la vía, como IKK y IKB. Por ello, y a pesar de la eficacia limitada que bortezomib demostró en cáncer de pulmón, la inhibición de proteasomas podría ser una opción válida a evaluar para revertir la resistencia a ITQ de EGFR mediada por NF-κB (132).

#### d) Pérdida de KEAP1.

Kelch-like ECH associated protein 1 (KEAP1) es una proteína que actúa como sustrato de unión de Nrf2, para su ubiquitinación y su degradación en los proteosomas (133). La pérdida de KEAP1 conduce a una hiperactivación de Nrf2. Nrf2 es una proteína implicada en la respuesta celular al stress oxidativo. Nrf2 actúa también como oncogén. La hiperactivación de Nrf2 en el cáncer induce la proliferación celular en ausencia de MAPK, modula la formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden contribuir a la tumorigénesis, regula el estado redox, y modula la expresión de enzimas implicadas en la respuesta inflamatoria y proliferativa de los tumores. Recientemente, la pérdida de KEAP1 se describió como un potencial mecanismo de resistencia a inhibidores de diferentes RTQ, entre ellos EGFR, mediante la reducción de formación de ROS y la regulación de diversas vías metabólicas (134).

La inhibición de KEAP1/Nrf2 se evaluó en pacientes con cáncer en un estudio fase I con bardozolona (n=47) (135). La DMT se estableció en 900 mg/día, vía oral, con unas TLD que consistieron en una elevación reversible de las enzimas hepáticas. Se encontró que el tratamiento mejoraba los niveles de tasa de filtrado renal. A pesar de demostrar una cierta actividad antitumoral (TR 4,2%; TCE 23,4%), el desarrollo clínico de esta molécula se centró en pacientes con insuficiencia renal crónica.

**Figura 11.-** Gráfico sectorial con los mecanismos de resistencia a ITQ en pacientes con mEGFR (adaptado de Sequist y col.)(86).



EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; EMT, Epithelial Mesenchymal Transition; HER, Human Epidermal Receptor; IGF1R, Insuline Growth Factor Receptor; KEAP-1, Kelch-like ECH-associated protein 1; MEK o MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinases; NFκB, nuclear factor κB; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; RAF, Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; SCLC, small cell lung cancer.

#### **4.1.2.5.- Otras consideraciones.**

Sequist y col. demostraron que existía un dinamismo en los cambios longitudinales y fenotípicos como respuesta a los diferentes tratamientos a los que los pacientes con *mEGFR* eran expuestos a lo largo de la evolución de su enfermedad (86). De este modo, los pacientes que presentaban transformación a CMP mantenían la mutación inicial de sensibilidad y no asociaban la *mT790M*. No obstante, un porcentaje de pacientes expuestos a QT basada en platino y etopósido mostraba, en una biopsia realizada en el momento de la siguiente progresión, una nueva transformación a CNMP con la presencia de la *mEGFR* inicial. Una siguiente exposición a un ITQ daba como resultado la adquisición de la *mT790M* como mecanismo último de resistencia.

## **5.- Tratamiento de la resistencia.**

### **5.1.- Tratamiento de la resistencia: experiencias iniciales.**

En un intento de revertir la resistencia adquirida a ITQ de primera generación, desde principios de los años 2000, se llevaron a cabo múltiples estudios que evaluaron dos estrategias básicas: el tratamiento con ITQ de segunda generación y la combinación de ITQ con otros fármacos que bloquearan las vías potencialmente implicadas en la resistencia a los ITQ.

#### **5.1.1.- ITQ de segunda generación.**

Diversos estudios valoraron la estrategia de intensificar la inhibición de EGFR para revertir la resistencia, dada la dependencia que, los tumores con *mEGFR*, mantienen de la vía de señalización en esa situación (Tabla 2). Los inhibidores de segunda generación o inhibidores irreversibles de EGFR, tales como neratinib, dacomitinib y afatinib, difieren en su modo de unión al receptor (136,137). En modelos preclínicos, estos inhibidores irreversibles demostraron una actividad prometedora, especialmente en pacientes con la *mT790M*. Sin embargo, los estudios clínicos llevados a cabo en población con *mEGFR* resistentes a los ITQ reversibles erlotinib y gefitinib no demostraron ningún beneficio (Tabla 2) (138–141). Se postuló que la falta de eficacia pudo estar relacionada con la limitación de la dosis administrada por el desarrollo de toxicidad que aparecía al inhibir las formas nativas de *EGFR*.

#### **5.1.2.- Combinaciones de ITQ de EGFR y otros fármacos.**

Con la descripción de los diversos mecanismos de resistencia adquiridos a ITQ de primera generación, y en un intento de revertir esta resistencia, a la vez que se mantenía la inhibición de *EGFR*, se realizaron múltiples estudios de combinación de ITQ con otros fármacos. No obstante, los resultados de esta estrategia fueron, en general pobres, con unas TR inferiores al 10% y unos tiempos de SLP cortos (142–160). La tabla A1 del anexo 1 recoge la información principal de los

criterios de selección de los pacientes y los resultados de dichos estudios. Caben destacar, no obstante, los resultados del estudio de combinación de afatinib y cetuximab (108). Este estudio fase I incluyó pacientes con *mEGFR* (n=126) previamente tratados con ITQ de primera generación. Antes del inicio del tratamiento, fue precisa la realización de una biopsia para el estudio de los mecanismos de resistencia adquirida. La TR fue similar entre los pacientes que presentaban la *mT790M* a la resistencia (32%) y los que presentaron otros mecanismos de resistencia (25%),  $p=0,341$ . La mSLP fue de 4,7 meses (4,3-6,4) y la mDR fue de 5,7 m (1,8-24,4). La combinación presentó una tasa de efectos adversos de grado 3/4 del 44,2%.

**Tabla 2.-** Inhibidores de segunda generación afatinib, neratinib y dacomitinib (138,141,161,162).

Tratamiento	Fase	Población	<i>mEGFR</i>	n	TR	TCE	SLP	SG	Referencia
Dacomitinib	I/II	no seleccionada	no	54	15%	67,50%	4m	6 m	Park 2011
Dacomitinib	I	no seleccionada	si	66	4,6%	57,6%	19,3 s (EGFRm); 11,1 s (EGFR WT)	NR	Campbell 2010
Dacomitinib, erlotinib	II	no seleccionada	no	188	17%, 4%	29,8%, 14,9%	2,86 m; 1,91 m	9,53 m, 7,44 m	Ramalingam 2012
Neratinib	II	no seleccionada	NE	167	28%	64%	15,3 s	NR	Sequist 2010
XL647	II	no seleccionada, criterios clínicos favorables	14	41	20% (57%)	NR	5,3 m (9,3m)	NR	Pietanza 2012
Afatinib	IIb/III	no seleccionada	NE	585	7%, 0,1%	NR	3,3 m; 1,1 m	10,8 m; 12 m	Miller 2012

EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; NE, no especificado; NR, no comunicado; SG, supervivencia global; SLP, supervivencia libre de progresión; TCE, tasa de control de enfermedad; TR, tasa de respuesta

Los resultados de este estudio confirmaron que una proporción de tumores mantenían una dependencia de la vía de EGFR más allá de la progresión de la enfermedad, con un beneficio clínico de la combinación de afatinib y cetuximab independiente de la adquisición de la *mT790M*.

En este contexto se enmarca el primer trabajo que conforma la presente tesis doctoral.

## 5.2.- Tratamiento de la resistencia: incorporación de los ITQ de tercera generación.

Durante largo tiempo, la utilidad de las rebiopsias en la elección de las siguientes terapias una vez ha ocurrido la progresión, ha tenido un valor más académico que real. Algunos ensayos clínicos requerían de la disponibilidad de tejido tumoral en el momento de la progresión y únicamente algunos precisaban de la presencia de una alteración molecular concreta como criterio de

inclusión. En la práctica clínica, la disponibilidad de tejido tumoral a la progresión ha sido de especial utilidad en el caso de la transformación a CMP, a fin de orientar el esquema de QT.

Recientemente, han entrado en el escenario terapéutico los ITQ frente a EGFR de tercera generación, como WZ4002, rociletinib, osimertinib y olmutinib. En estudios preclínicos, estos fármacos demostraron actividad frente a la mT790M (163). Además, estos fármacos presentaban una menor actividad sobre la forma nativa de EGFR y asociaban una toxicidad de clase menor que los ITQ de primera y segunda generación. Su seguridad y eficacia fueron evaluadas en diferentes estudios clínicos.

### 5.2.1- Rociletinib.

Rociletinib (CO-1686, Clovis Oncology) es un inhibidor altamente selectivo tanto de las mEGFR como de la mT790M (89). El estudio fase I (TIGER-X) incluyó una cohorte de escalada de dosis y una cohorte de expansión (164). Se incluyeron un total de 130 pacientes con mEGFR previamente tratados con ITQ cuya enfermedad había progresado a tratamientos previos. Los primeros 57 pacientes fueron tratados con una formulación de CO-1686 libre de base (dosis de hasta 900 mg/12 horas administradas por vía oral). Se realizó un cambio en la formulación del fármaco, que incluyó sales de hidrobromido en su nueva composición para mejorar el perfil farmacocinético, hecho que significó una exposición al principio activo tres veces superior a la de la formulación inicial. Diez pacientes pasaron de una formulación a la otra. La escalada de dosis con la formulación de sales de hidrobromido se planificó hasta 1000 mg/12 horas. Los 63 pacientes adicionales fueron incluidos en esta nueva cohorte.

Los pacientes representaron una población con mEGFR previamente muy tratados (media de 4 líneas terapéuticas previas), todos habían recibido un ITQ de primera y segunda generación, con  $\geq 3$  localizaciones M1 en un 50% de los pacientes y enfermedad en SNC en un 40% de los mismos. La mayoría presentaba *del19* (57%) y *L858R* (32%) y una 10% presentaba otras mEGFR. La presencia de la mT790M se evaluó de forma central y resultó positiva en un 57%, negativa en un 18% y desconocida en un 25%. La DMT no se alcanzó. Se observaron respuestas con unas dosis  $>900$  mg/12 h de la formulación libre de base y en todas las dosis de sales de hidrobromido. Por ello, estas dosis fueron las consideradas como terapéuticas (n= 92 pacientes). Los efectos adversos fueron diferentes a los típicamente asociados a ITQ. La hiperglicemia fue el efecto secundario más frecuente (47%; 22%, grado 3), y se pudo controlar en la mayoría de los casos con antidiabéticos orales. Otros efectos adversos, en su mayor parte de grado 1, fueron: náuseas (35%), diarreas (22%), vómitos (14%) y pérdida de apetito (20%). Un 12% de los pacientes presentó prolongamiento del QTc. La incidencia de *rash* o paroniquia fue anecdótica (n=1). Un

48% de los pacientes requirió una reducción de dosis. En términos de eficacia, la TR en los 46 pacientes con confirmación central de la *mT790M* fue del 59% y la TCE del 93%. La SLP estimada fue de 13,1 meses (IC95%, 5,4-13,1). En los que carecían de confirmación central de la *mT790M* (n= 17), la TR y la TCE fueron del 29% y 59%, respectivamente. En este subgrupo la SLP estimada fue de 5,6 meses (IC95%, 1,3- NA).

En noviembre de 2015, Clovis publicó una actualización de los datos de eficacia de rociletinib de los estudios TIGER-X y TIGER-2 (un estudio fase II de rociletinib en pacientes con *mEGFR* previamente tratados y con la *mT790M* a la progresión). La TR comunicada fue de 28 y 34%, respectivamente (<http://www.businesswire.com/news/home/20151116005513/en/>). Dada la discordancia de estos resultados de eficacia con los datos del estudio TIGER-X previamente publicados, Sequist y col. realizaron un análisis independiente de los datos de eficacia de los pacientes cuyos resultados se habían publicado en este artículo (165). De los 130 sujetos incluidos en el estudio TIGER-X, la TR de los que tenían la *mT790M* confirmada tras un seguimiento completo fue del 45% (frente al 59% publicado previamente) y del 17% en los pacientes sin la *mT790M* (frente al 29% publicado). La actualización de los resultados de SLP fue de 6,1 meses y 1,8 vs. 13,1 y 5,6 meses en pacientes con la *mT790M* positiva y negativa, respectivamente. De acuerdo con estos resultados y con los datos combinados de los estudios TIGER-X y TIGER-2, Clovis decidió interrumpir el desarrollo clínico de esta molécula.

### 5.2.2.- Osimertinib.

Osimertinib (AZD9291, Tagrisso®, Astra Zeneca) es una mono-anilino-pirimidina diseñada como un inhibidor irreversible y selectivo de *EGFR*, tanto de las *mEGFR* como de la *mT790M*. Osimertinib evita las formas nativas de *EGFR* y produce una toxicidad de clase menor que otros ITQ. Osimertinib se une al residuo de cisteína 797 en el sitio de unión del ATP del receptor, formando un enlace covalente. En estudios *in vitro*, osimertinib fue unas 200 veces más potente frente a *L858R/T790M* que frente *EGFR* nativo. Osimertinib demostró una actividad comparable a ITQ de primera y segunda generación frente a *mEGFR*. Osimertinib también demostró actividad frente a la *mT790M*, *m-iEGFR* y *mHER2*.

**Tabla 4.- Programa AURA de desarrollo clínico de osimertinib en pacientes con mEGFR.**

Estudio	AURA I	AURA I extension	AURA 2
	N= 63	N=201	N=210
Fase	I	II (extensión)	II
Diseño	Global, abierto, no aleatorizado	Global, abierto, no aleatorizado	Global, abierto, no aleatorizado
Población	>2L, T790M+ previo ITQ-EGFR	>2L, T790M+ previo ITQ-EGFR	>2L, T790M+ previo ITQ-EGFR
Objetivo primario	TR, Seguridad y tolerabilidad	TR	TR
Objetivos secundarios	SLP, SG, DR, FC/ FD	SLP, SG, DR, FC/ FD	SLP, SG, DR, FC/ FD
Criterios de evaluación	RECIST 1.1	RECIST 1.1	RECIST 1.1

DR, duración de respuesta; EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; FC farmacocinética; FD, farmacodinamia; ITQ, inhibidor de tirosina quinasa; 2L, segunda línea de tratamiento; n, número de pacientes; SG, supervivencia global; SLP, supervivencia libre de progresión; TCE, tasa de control de enfermedades; TR, tasa de respuesta.

El estudio fase I/II AURA evaluó la seguridad y tolerabilidad de osimertinib en pacientes cuyo CNMP había progresado a tratamiento previo con ITQ (166) (Tablas 4 y 5). Los pacientes incluidos en este estudio podían ser portadores de las mEGFR o haberse beneficiado del tratamiento con ITQ sin documentación previa de mEGFR. Se incluyeron 253 pacientes: 31 de ellos fueron incluidos en las 5 cohortes de escalada de dosis (desde 20 a 240 mg/24 horas vía oral) y 222 en las cohortes de expansión. Todos los pacientes incluidos en las cohortes de expansión requirieron de una biopsia para evaluar la presencia de la mT790M. Esta resultó positiva en el 62%. Los datos de toxicidad asociada al fármaco incluyeron los siguientes: diarrea (47%, 2% grado  $\geq 3$ ), rash (40%, 1% grado  $\geq 3$ ), náusea (22%, <0,5% grado  $\geq 3$ ) y pérdida de apetito (21%, 1% grado  $\geq 3$ ). Entre los efectos adversos de especial interés, la hiperglicemia se comunicó en un 1-3% de los pacientes (0%, grado 3), la prolongación del intervalo QTc en un 6% (0%, grado 3) y la enfermedad pulmonar intersticial en un 3,7% (100%, grado 3). En función de estos resultados de toxicidad, la dosis recomendada de osimertinib fue de 80 mg/día. La diarrea y el rash fueron dosis dependientes de osimertinib. Un 7% y un 6% de los pacientes requirieron reducción de dosis e interrupción definitiva del tratamiento a causa de la toxicidad, respectivamente.

La TR fue del 51% en los 239 pacientes evaluables, con una TCE del 84%. La mayoría de ellos (85%) presentaron una respuesta duradera ( $\geq 6$  meses). En el subgrupo de pacientes con la mT790M (n= 127), la TR, TCE y la SLP fueron de 61%, 95% y 9,6 meses, respectivamente. Por el contrario, en los que carecían de mT790M (n=61), la TR fue del 21% y la SLP fue de 2,8 meses.

Posteriormente, se llevó a cabo el estudio AURA 2. Doscientos diez pacientes con la mT790M confirmada recibieron tratamiento con osimertinib (80 mg/día) (167). Este estudio demostró una TR y una TCE del 70% y 92%, respectivamente. La DR fue de 11,4 meses y la SLP fue de 9,9 meses. Osimertinib demostró un perfil de toxicidad manejable. Los efectos adversos más frecuentes fueron el rash, la diarrea, la xerosis y la paroniquia, y aparecieron en un 40%, 33%, 30% y 26%, respectivamente, de grados 1 y 2. Los efectos adversos de grado 3 y 4 fueron el

alargamiento del QTc (2%), la neutropenia (1%) y la trombocitopenia (1%). El resto de toxicidades se presentaron con una incidencia  $\leq 1\%$ . Se comunicó una muerte posiblemente relacionada con enfermedad pulmonar intersticial secundaria al fármaco.

Los resultados de la extensión del estudio AURA confirmaron la eficacia y tolerabilidad de osimertinib (168). Este estudio fase II incluyó 201 pacientes con *mEGFR* previamente tratado con ITQ con la *mT790M* en el momento de la progresión. La mediana de tiempo en tratamiento de los pacientes en este estudio fue de 13,2 meses. La TR fue del 62% (IC95%, 54%-68%) y la TCE del 90% (IC95%, 85%-94%). La DR en los 122 pacientes que respondieron al tratamiento fue de 15,2 meses. La mSLP fue de 12,3 meses (IC95%, 9,5-13,8). Se comunicaron una tasa de diarreas del 43% y de *rash* del 40%, como efectos adversos más frecuentes, de grado  $\geq 3$  inferior al 1% en ambos casos. Ocho pacientes presentaron toxicidad pulmonar (4%, grado 1, n=2; grado 2, n=3, grado 5, n=3).

Un análisis planeado con anterioridad que incluyó los datos de eficacia del estudio AURA2 y de la cohorte de expansión del estudio AURA (n=411) reprodujo los mismos resultados de seguridad y tolerabilidad. Todos los pacientes incluidos en este análisis habían recibido tratamiento con osimertinib 80 mg/día. Las características clínicas de los pacientes incluidos fueron similares en ambos estudios: edades de 62 y 64 años, 66% y 70% mujeres, 58% y 63% asiáticos, 38 % y 34% caucásicos, 66% y 60% PS1, 67% y 76% nunca fumadores. El estudio molecular demostró la siguiente distribución en ambos estudios respectivamente: *del19* 71% y 65%, *L858R* 25% y 32%, *G719X* 2% y 2%, *S786I* 2% y 1%. La afectación del SNC fue del 37% y 41%, respectivamente. Los efectos adversos de cualquier grado más frecuentes fueron la diarrea (42%), el *rash* (41%), la xerosis (31%) y la paroniquia (25%). Los efectos adversos que requirieron una reducción de dosis del fármaco se produjeron en un 4,4 y 5,6%, respectivamente. El alargamiento del QTc (2,2%) y la neutropenia (1,9%) fueron los efectos adversos que motivaron reducción de dosis o interrupción definitiva del tratamiento. Cabe destacar, la aparición de 4 casos de toxicidad grave pulmonar atribuida al fármaco por los investigadores. En términos de eficacia, osimertinib demostró una TR del 59% (IC95%, 54-64), una mDR de 12,5 meses (IC95%, 11,1-NC) y una mSLP de 11 meses (IC95%, 9,6-12,4) en estos estudios. Estos resultados de eficacia y seguridad llevaron a la aprobación de osimertinib por parte de la FDA en 2015 en pacientes con *mEGFR* en progresión tras ITQ y con la *mT790M* (169).

Actualizaciones posteriores han confirmado estos resultados de eficacia y seguridad con una tasa de efectos adversos similar a la ya comunicada y una TR del 66% (IC95%, 61-71), una DR de 12,5 meses (IC95% 11,1-NC), una mSLP de 11 meses (IC95% 9,6-12,4) y una tasa de SLP del 47,5% a los 12 meses (IC95% 42,4-52,5) (170,171).



**Tabla 5.-** Resultados globales de los estudios iniciales del programa AURA en pacientes con *mEGFR*.

Estudio	AURA I N=61	AURA I extensión N=201	AURA 2 N=210
TR	71% (IC95% 57-82)	66% (IC95% 61- 71)	71% (IC95% 64-77)
SLP	9,7 m (IC95% 8,3- 13,6)	11,0 m (IC95% 9.6, 12.4)	8,6 m (IC95% 8,3- 9,7)
DR	9,6 m (IC95% 7,7, 15.6)	12,5 m (IC95% CI 11,1- NC)	7,8 m (IC95% 7,1- NC)

DR, duración de respuesta; IC, intervalo de confianza; m, meses; n, número de pacientes; SLP, supervivencia libre de progresión; TR, tasa de respuesta.

Posteriormente, osimertinib confirmó los resultados de eficacia y seguridad en el estudio AURA 3 (172). Este estudio comparó osimertinib (n= 279) frente a QT basada en platino y pemetrexed (n= 140) en pacientes con *mEGFR* previamente tratados con una ITQ de primera o segunda generación y que presentaron la *mT790M* como mecanismo de resistencia. Osimertinib asoció una SLP más larga respecto a la QT (10,1 vs. 4,4 meses; HR, 0,30; IC95%, 0,23- 0,41;  $p<0,001$ ). El análisis de subgrupos demostró un beneficio en SLP en todos los subgrupos de pacientes (HR<0,5 para todos los subgrupos) a favor de osimertinib, incluidos aquellos pacientes con M1 cerebrales.

La mSLP fue superior en el grupo de pacientes tratados con osimertinib en el que la *mT790M* se encontró en suero respecto a QT (8,2 vs. 4,2 meses, HR 0,42; IC95% 0,29-0,61). La DR fue de 9,7 meses (IC95% 8,3-11,6) en el grupo de osimertinib vs. 4,1 meses (IC95% 3,0-5,6) en el grupo de QT.

La TR fue superior con osimertinib (71%) frente a QT (31%) (RR, 5,39; IC95%, 3,47-8,48;  $p<0,001$ ) en el global de los pacientes. Un resultado similar se obtuvo según la presencia de la *mT790M* en suero a nivel basal, con una TR de 71% y 31% (RR, 4,96; IC95%, 2,49-10,15;  $p<0,001$ ) en los grupos de osimertinib y QT, respectivamente.

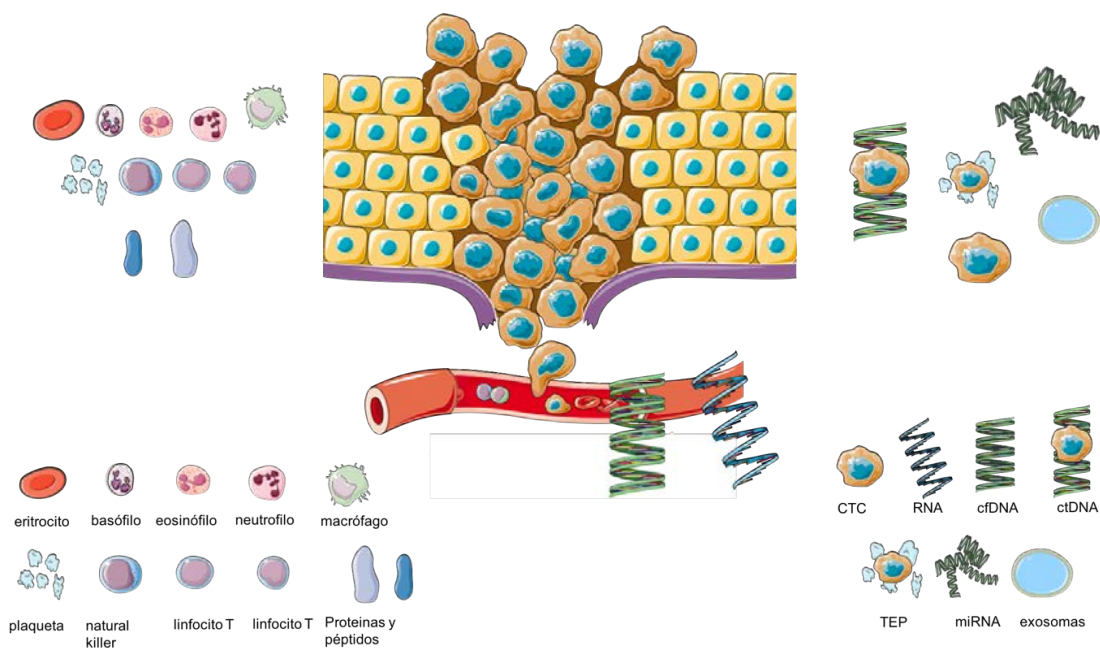
## 6.- Determinación de *mEGFR* en muestras de sangre.

La biopsia tumoral se considera el estándar de oro en el diagnóstico de los tumores sólidos. Permite una caracterización histológica del tumor, además de permitir la identificación de características genéticas con valor predictivo y pronóstico. Por ello, el análisis de dichas alteraciones genéticas se ha establecido con fines diagnósticos y en la selección de los tratamientos. Estas biopsias se obtienen mediante procedimientos invasivos, no exentos de riesgos

para el paciente. Por ello y como alternativa a la biopsia, el estudio de las alteraciones genéticas en la sangre representa una opción atractiva para los pacientes.

El fundamento del análisis molecular en la muestra sanguínea se basa en la presencia de fragmentos de DNA libre en la sangre procedente de las células tumorales (173). A medida que los tumores evolucionan y se tornan más agresivos, se incrementa en grado de necrosis y, en consecuencia, se produce un aumento de la cantidad total de DNA libre circulante (cfDNA). Además de las células sanguíneas y otros componentes normales de la sangre, en un paciente con cáncer existen otros componentes potencialmente identificables, tales como DNA tumoral circulante (ctDNA) que representa una mínima fracción del cfDNA, células tumorales circulantes (CTCs), microRNA, exosomas y plaquetas educadas por el tumor (TEP, *tumor-educated platelets*). Todos ellos representan una fuente muy valiosa de información molecular relacionada con el tumor y una alternativa a la biopsia tumoral (Figura 12).

**Figura 12.-** Componentes de la sangre.



CTC, célula tumoral circulante; ctDNA, DNA circulante total; cfDNA, DNA circulante libre; DNA, ácido desoxirribonucleico; RNA, ácido ribonucleico; miRNA, microRNA, TEP, Tumor-educated platelets (*Servier Medical Art*)

Para establecer una técnica como potencial alternativa en el diagnóstico molecular, debe existir una concordancia con la técnica estándar, en este caso la biopsia tumoral. Diversos estudios han demostrado una sensibilidad de entre el 61% al 93% en muestras de sangre respecto al tejido en pacientes con *mEGFR* (174). Se han empleado diferentes técnicas para el aislamiento de cfDNA en pacientes con *mEGFR* (172,174–176) (Tabla 6).

Las limitaciones generales de algunas de estas técnicas son el coste, el tiempo hasta la obtención de los resultados, y la exactitud y el contexto clínico en que han sido utilizadas. Idealmente, los resultados obtenidos con estas técnicas deberían haber sido validados de forma prospectiva y comparativa con los resultados en tejido; no obstante, la validación retrospectiva de los resultados del suero o plasma obtenidos en estudios prospectivos se considera aceptable (177). Estas técnicas empleadas suelen presentar una alta especificidad con un valor predictivo negativo alto, aunque a expensas de una sensibilidad menor (174).

**Tabla 6.- Técnicas para estudio de DNA libre circulante (cfDNA)**

Técnicas para estudio de cfDNA en plasma				
	PCR		NGS	
Características	PCR alelo específica	Emulsion PCR	Basado en amplicon	Basado en técnicas de captura
Variantes detectadas	Únicamente variantes conocidas y predefinidas	Únicamente variantes conocidas y predefinidas	Cualquier mutación, ganancia número de copias (FP por artefactos de la secuenciación)	Cualquier mutación, ganancia número de copias (FP por artefactos de la secuenciación)
Cuantificación	Semicuantitativa	Cuantificación absoluta/ relativa	Cuantificación relativa de fracción alélica	Cuantificación relativa de fracción alélica
Rapidez; complejidad	Rápido, fácil de interpretar	Rápido, fácil de interpretar	Potencialmente rápido; complejidad de interpretación (bioinformática)	Lento; complejidad de interpretación (bioinformática)
Coste	(+)	(++)	(+++)	(++++)
Ejemplos	Cobas (Roche); Therascreen (Qiagen); PNA-PCR	ddPCR (Biorad); BEAMing (Sysmex Inostics)	Tam-Seq (Invitae)	Guardant360 (Guardant); Cancerselect (Personal Genome Diagnostics)

ddPCR, digital droplet PCR; FP, falsos positivos; NGS, next generation sequencing; PCR, polymerase chain reaction.

La información obtenida de la biopsia tumoral representa de forma parcial la enfermedad. Sabemos que existe variabilidad entre la información genética obtenida entre diversas biopsias del tumor primario y M1, hecho que conlleva una heterogeneidad intra- e intertumoral (178). Diversos estudios han demostrado la variabilidad de los mecanismos de resistencia adquirida en los pacientes con *mEGFR*. En un estudio retrospectivo que incluyó 145 pacientes con *mEGFR* y resistencia adquirida a ITQ, 30 de ellos disponían de biopsias de diversas lesiones y otros 24 disponían de varias biopsias de la misma lesión (179). En 22 pacientes que disponían de biopsias de lesiones de SNC y tórax, 12 presentaron la *mT790M* en las lesiones torácicas y no en las lesiones cerebrales. Tres de los 24 pacientes con biopsias de la misma localización presentaron un patrón molecular diferente. Además, en 5 pacientes se identificó la *mT790M* y, tras un periodo sin tratamiento con ITQ, una nueva biopsia de la misma localización demostró la ausencia de la

*mT790M*. Estos 5 pacientes fueron tratados de nuevo con ITQ de forma efectiva, y en el momento de la siguiente progresión, una tercera biopsia demostró, de nuevo, la presencia de la *mT790M*. Otros autores demostraron la discordancia del patrón molecular en las diferentes muestras de biopsia en el momento de la resistencia en un mismo paciente (86,180). También se demostró que la exposición a diversos tratamientos de forma secuencial implica cambios dinámicos en los mecanismos de resistencia adquirida en pacientes con *mEGFR* (86,181).

El programa TIGER incluyó el estudio de los mecanismos de resistencia a rociletinib (182). De 12 pacientes con la *mT790M* en el momento previo al tratamiento con rociletinib, 6 mantuvieron la *mT790M* en la biopsia realizada en el momento de la progresión, mientras que otros 6 resultaron *T790M* negativo en la rebiopsia. De este segundo grupo, 2 biopsias demostraron transformación a CMP y otras 3 presentaron amplificación de *EGFR*. Además, en las biopsias pre-rociletinib se identificó la coexistencia de clonas con *T790M* mutada y nativa. La fracción de *mT790* pre-tratamiento podría condicionar la respuesta a rociletinib. En el análisis de cfDNA de los mismos pacientes se identificaron dos patrones: un incremento de las *mEGFR* con la presencia de la *mT790M* y la presencia de *mEGFR* sin la identificación de la *mT790M*. No se encontró *C797S* ni otras mutaciones adquiridas en las muestras de ningún paciente.

En el mejor de los casos, se debería poder integrar la información obtenida de múltiples biopsias de diversas localizaciones en el mismo paciente para poder establecer un plan terapéutico que fuese capaz de cubrir tal heterogeneidad. No obstante, la obtención de múltiples biopsias no es viable en la práctica clínica debido al riesgo asociado a cualquier procedimiento invasivo, a la incomodidad para los pacientes y al coste económico, además de la imposibilidad técnica de acceso al tumor y/o M1 en muchas ocasiones, del riesgo de diseminación tumoral secundaria al procedimiento y del retraso en el inicio del tratamiento que conllevaría la realización de estos procedimientos. En la práctica clínica habitual, la biopsia líquida representa una alternativa óptima ya que proporciona una información de la heterogeneidad espacio-temporal del tumor primario y las M1, se puede repetir tantas veces como sea necesario con una mínima incomodidad y riesgo para los pacientes, y ofrece un grado de concordancia elevado con la información obtenida en la biopsia tumoral. Otra limitación añadida del análisis de las *mEGFR* en tejido radica en la escasez de material tumoral obtenido en las biopsias en pacientes con CNMP avanzado, la mayoría de las veces disponible mediante fibrobroncoscopia (183–186).

La detección de *mEGFR* en suero o plasma se ha propuesto como un método alternativo a su estudio en la biopsia tumoral. En el caso de *mEGFR*, estudios iniciales mostraron una concordancia entre tejido y suero de un 70% (187). Posteriormente, dicha concordancia se ha evaluado en diversos estudios. Cabe destacar un estudio prospectivo que evaluó la posibilidad de

la detección de la *mT790M* en sangre en una cohorte de 42 pacientes con *mEGFR* en progresión al tratamiento previo con ITQ de primera y segunda generación. El objetivo principal del estudio fue evaluar la concordancia entre el resultado de la biopsia tumoral y el resultado en sangre mediante el análisis de las CTCs (184). El objetivo secundario fue evaluar la concordancia de los resultados respecto al DNA tumoral circulante (ctDNA). Finalmente, fueron evaluables 30 pacientes. El grado de concordancia en la detección de la *mT790M* fue del 57% entre tejido y CTCs, del 60% entre tejido y ctDNA, y del 65% entre CTCs y ctDNA. La tasa de detección global de la *mT790M* para las tres técnicas fue del 50%, con un grado de discrepancia entre ellas atribuible tanto a las diferencias propias de cada técnica como a las diferencias biológicas intrínsecas de cada paciente.

Entre otras aplicaciones prometedoras de la biopsia líquida están la detección precoz de una recaída del tumor tras un tratamiento radical, así como la identificación de mutaciones de resistencia en pacientes que están recibiendo un tratamiento dirigido. Con la aprobación de osimertinib para el tratamiento de los pacientes con *mEGFR* con la *mT790M*, cobra especial interés la posibilidad de detectar esta mutación de resistencia (172,188).

Los primeros resultados que correlacionaron la eficacia clínica de osimertinib (TR y SLP) con la detección de la *mT790M* en suero se obtuvieron de los pacientes incluidos en el estudio AURA (189) (Figura 13). El análisis de ctDNA para la identificación de *mEGFR* se realizó en 216 muestras de plasma mediante la tecnología BEAMing (Figura 8). Estos resultados se compararon con la información obtenida en la muestra tumoral analizada mediante Cobas®. La sensibilidad en el plasma para la detección de *mEGFR* fue del 82% y 86% para *del19* y *L858R*, respectivamente; y del 70,3% para la *mT790M*. La *mT790M* se aisló en el 80% de los pacientes junto a *mEGFR*, frente a un 5% de pacientes en los que se detectó la *mT790M* aislada ( $p<0,01$ ). La especificidad del plasma para la identificación de *del19* y *L858R* fue del 98% y 97%, respectivamente. Sin embargo, de 58 pacientes con *T790M*- en tejido, 18 (31%) resultaron *T790M*+ en plasma (especificidad del 69%). En un intento de confirmar estos resultados y descartar la posibilidad de falsos positivos en plasma, estas muestras se analizaron mediante otras técnicas que confirmaron los resultados en 14 de las 18 muestras (78%). Estos resultados sugirieron una heterogeneidad de la *mT790M* en las diferentes localizaciones.

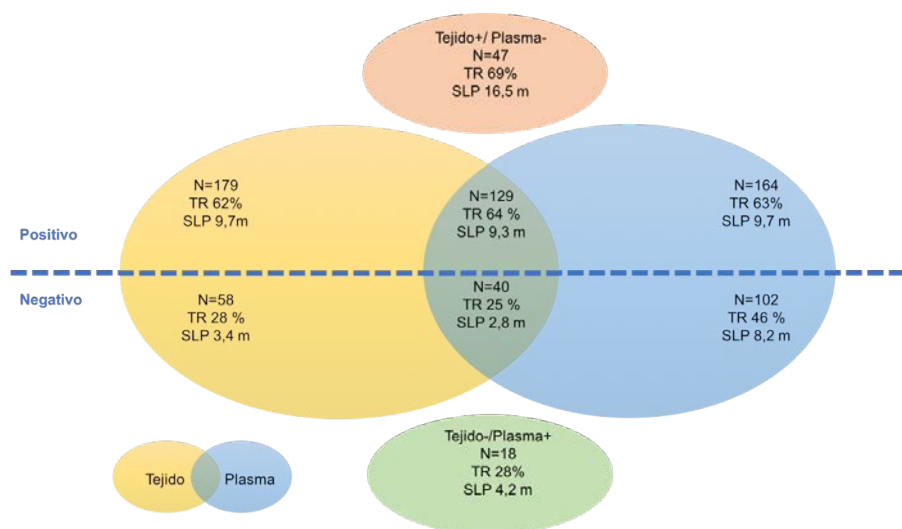
Un total de 231 fueron evaluables para eficacia. La TR fue de 62% en *T790M*+ frente a un 26% en *T790M*- en tumor ( $p<0,001$ ). La mSLP fue superior en pacientes *T790M*+ frente a *T790M*- en tumor (9,7 meses; IC95%, 8,3-12,5 vs. 3,4 meses; IC95%, 2,1-4,3;  $p<0,001$ ). De acuerdo con el resultado en plasma, la TR fue de 63% y la SLP fue de 9,7 meses (IC95%, 8,3-11,1) en caso de *T790M*+ en plasma, resultados muy similares a los obtenidos en el tejido. La TR fue de 46% en

pacientes con *T790M*-en plasma, con una mSLP similar en ambos grupos (8,1 meses; IC95%, 5,3-10,9;  $p=0,188$ ).

Dado que la sensibilidad en el plasma fue de entre 70 a 86% para la *mT790M*, se realizaron análisis adicionales en el grupo de pacientes *T790M*- en plasma. Dividiendo los pacientes *T790M*- en plasma conforme al resultado en tejido, la TR fue superior en caso de *T790M*+ en tejido (69%; IC95%, 53-82%) comparado con los pacientes *T790M*- en tejido (25%; IC95%, 13-41%). La mSLP fue superior en el mismo subgrupo (16,5 vs. 2,8 meses,  $p<0,004$ ).

Los resultados de eficacia en pacientes con *T790M*+ en plasma también se analizaron en relación con los resultados en tejido. La TR y SLP fueron superiores en pacientes *T790M*+ en tejido (TR 64%; SLP 9,3 meses) respecto a los pacientes *T790M*- en tejido (TR 28%,  $p=0,004$ ; SLP 4,2 meses,  $p=0,0002$ ).

**Figura 13.-** Eficacia clínica de osimertinib de acuerdo con estado de la *mT790M* en plasma y/o tejido (189).



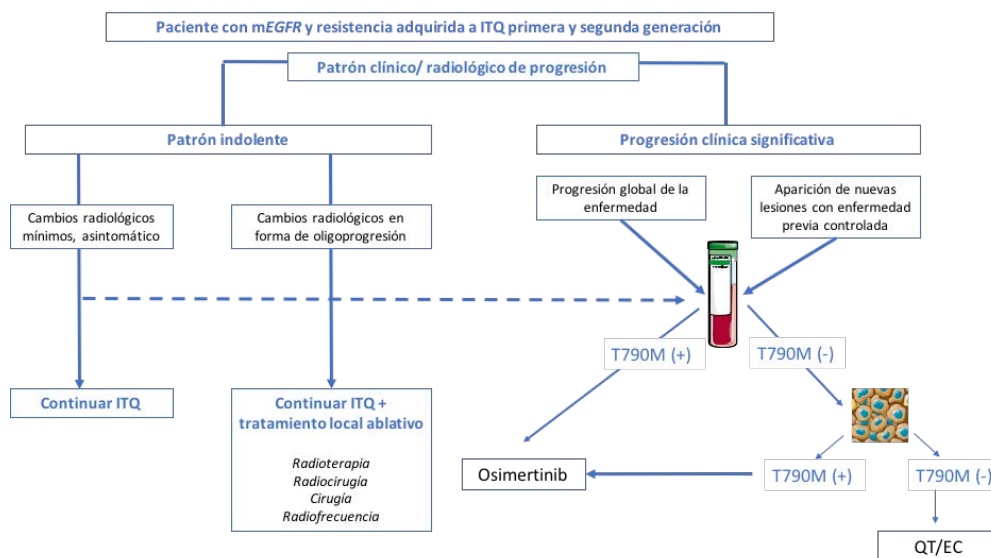
m, meses; n, numero de pacientes; SLP, supervivencia libre de progresión, TR, tasa de respuesta

Por tanto, en un 70% de los pacientes, la información de la presencia de la *mT790M* en suero puede ser suficiente para la recomendación de tratamiento con osimertinib en el momento de la progresión. Existe, no obstante, un 30% de los pacientes cuyo resultado negativo en plasma requiere un confirmación en tejido. Este análisis en tejido es crucial para diferenciar el grupo de los verdaderos negativos para la *mT790M*, con escasa probabilidad de beneficiarse del tratamiento, del grupo de pacientes *T790M*+ en plasma/- en tejido, con una probabilidad de respuesta similar a la observada en el grupo de pacientes verdaderos negativos para la *mT790M* en plasma y tejido.

Por ello, en la práctica clínica, un resultado positivo de la *mT790M* en la biopsia líquida podría ser suficiente para la recomendar el inicio de tratamiento con osimertinib, mientras que, en caso de un resultado negativo en sangre, debería realizarse una biopsia a fin de determinar su presencia o ausencia definitiva. Por otra parte, en caso de confirmarse la ausencia de la *mT790M*, el tejido obtenido en la rebiopsia podría emplearse en la identificación de otros mecanismos de resistencia (Figura 14).

Paralelamente, la biopsia líquida ha permitido el estudio de los mecanismos de resistencia a osimertinib. Los primeros resultados de resistencia en esta situación demostraron la presencia de una mutación adquirida (*C797S*) en 1 de las 7 muestras a la progresión mediante el estudio de cfDNA en plasma (190). En muestras de cfDNA de 15 pacientes adicionales se demostró la presencia de la *mT790M* antes del tratamiento; pero en el momento de la progresión, se evidenciaron tres patrones moleculares diferentes: persistencia aislada de la *mT790M* (n=5), persistencia de la *mT790M* junto con adquisición de *C797S* (n=6); y pérdida de la *mT790M* sin adquisición de *C797S* (n=4).

**Figura 14.-** Algoritmo actual de tratamiento en pacientes con *mEGFR*.



EC, ensayo clínico; *EGFR*, *Epidermal Growth Factor Receptor*; ITQ inhibidor de tirosina quinasa; QT, quimioterapia

En otro estudio, se identificaron tres tipos de mutaciones de resistencia en líneas celulares con *mEGFR* resistentes a WZ4002, rociletinib y osimertinib (191). *L718Q*, *L844V* y *C797S* provocaron la resistencia a WZ4002 y rociletinib. *C797S* causó también resistencia a osimertinib. Las células con *mEGFR* (*del19/L858R*) junto con *L718Q/L844V* fueron sensibles a tratamiento con gefitinib y afatinib. *C797S* junto con *del19/L858R* presentó resistencia a todos los ITQ de

primera y segunda generación, sin embargo, *L858R/C797S/T790M* fue parcialmente sensible a cetuximab.

Estudios posteriores confirmaron la complejidad de la heterogeneidad en los mecanismos de resistencia, y la potencial utilidad de la biopsia líquida en la predicción de la aparición de dichos mecanismos (192–194).

Diversos estudios han demostrado la utilidad de la biopsia líquida en la monitorización de los cambios de las *mEGFR* a lo largo del tratamiento con ITQ y en la detección de la *mT790M* a la progresión (177,195). Se habían publicado resultados de detección de la *mT790M* en muestras de sangre y orina en pacientes tratados con rociletinib (196). En este último estudio, se demostró que los niveles de la *mT790M* disminuían en sangre y orina poco después del inicio de tratamiento con rociletinib, no obstante, no existía seguimiento longitudinal de los cambios en la *mT790M* durante el tiempo de tratamiento (197).

El segundo trabajo que conforma la presente tesis doctoral se enmarca en el contexto del uso de una técnica validada, sencilla, y de coste económico asequible, para monitorizar la presencia de la *mT790M* en suero. Se pretendió establecer el papel predictivo de respuesta clínica y radiológica de la *mT790M* en suero en pacientes en tratamiento con osimertinib.





## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



La presente tesis tiene por objetivo profundizar en el estudio de las *mEGFR* en pacientes con CNMP, concretamente en relación a dos aspectos:

- Evaluación de nuevas opciones terapéuticas tras fracaso al tratamiento con ITQ de primera generación.
- Aplicabilidad del estudio de mutación de resistencia (*mT790M*) en suero/ plasma para el seguimiento de pacientes con *mEGFR* en tratamiento con ITQ de tercera generación y su correlación con la respuesta clínica y radiológica.

### **1.- Evaluación de nuevas opciones terapéuticas tras el fracaso del tratamiento con ITQ de primera generación.**

En el contexto de la resistencia adquirida a ITQ, el primer objetivo de esta tesis consiste en explorar nuevas opciones terapéuticas en pacientes con *mEGFR* que han progresado a tratamiento con ITQ de primera generación. Para ello, se diseñó un estudio fase IB de combinación de afatinib y sirolimus en una población de pacientes con CNMP y *mEGFR* en progresión al tratamiento previo con ITQ de primera generación. En este estudio pretendimos evaluar la seguridad y la actividad de la combinación de afatinib y sirolimus como estrategia terapéutica para revertir la resistencia adquirida a ITQ de primera generación en una población de pacientes con *mEGFR* previamente tratados con erlotinib o gefitinib y en progresión a dichos tratamientos.

El objetivo principal de este estudio es la evaluación de la DMT de la combinación de afatinib y sirolimus.

Los objetivos secundarios son los siguientes:

1. Evaluación de la seguridad de la combinación según la escala CTCAE (versión 3.0).
2. Estudio farmacocinético de las concentraciones de afatinib y sirolimus, en muestras de sangre y plasma, respectivamente.
3. Evaluación de la actividad antitumoral de acuerdo con los criterios RECIST (versión 1.1).

Este estudio derivó en el siguiente trabajo:

[A phase Ib trial of continuous once-daily oral afatinib plus sirolimus in patients with epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small cell lung cancer and/or disease progression following prior erlotinib or gefitinib.](#)

Moran T, Palmero R, Provencio M, Insa A, Majem M, Reguart N, Bosch-Barrera J, Isla D, Costa EC, Lee C, Puig M, Kraemer S, Schnell D, Rosell R. Lung Cancer 2017;108:154-160; doi: 10.1016/j.lungcan.2017.03.009.

**IMPACT FACTOR (Sci Journal): 4,29**

## **2.- Detección de la *mT790M* en suero/ plasma y correlación con la respuesta clínica y radiológica en pacientes con *mEGFR* tratados con ITQ de tercera generación.**

La aparición de la mutación de resistencia *T790M* es el mecanismo de resistencia adquirida más frecuente en pacientes con *mEGFR*, después de un tiempo de beneficio clínico bajo tratamiento con ITQ de primera y segunda generación. El análisis en una muestra de tejido tumoral es el método considerado estándar para la detección de dicha mutación. Hemos visto, no obstante, la utilidad de la biopsia líquida para la detección de *mT790M* en este contexto clínico. Según estudios previos, la detección de la *mT790M* en sangre podría ser suficiente para establecer que la resistencia a ITQ de primera y segunda generación está producida por dicho mecanismo, e iniciar así tratamiento con un ITQ de tercera generación. De este modo, se podría obviar la realización de una nueva biopsia. La biopsia líquida ha demostrado su utilidad en la monitorización de *mEGFR*. En este segundo estudio, nos planteamos la utilidad potencial de la biopsia líquida en la monitorización de la evolución de la *mT790M* durante el tratamiento con el inhibidor de tercera generación.

Nuestro estudio incluye pacientes con la *mT790M* detectada en plasma/suero, independientemente de la información en tejido, que reciben tratamiento con osimertinib. Se realiza una monitorización periódica de la *mT790M* en plasma/suero para determinar la evolución de la misma. El objetivo principal de este estudio fue evaluar si la *mT790M* se puede monitorizar en plasma/suero en los pacientes tratados con osimertinib.

Los objetivos secundarios exploratorios de este segundo estudio son los siguientes:

1. Evaluar si la pérdida de la *mT790M* se asocia a la respuesta clínica.
2. Evaluar si la pérdida de la *mT790M* se asocia a la respuesta radiológica.
3. Evaluar si el comportamiento dinámico de la *mT790M* puede indicar respuesta (en caso de desaparición) y posterior progresión (en caso de reaparición de la *mT790M*).

Este estudio derivó en el siguiente trabajo:

[Monitoring of \*EGFR\*-T790M mutation in serum/plasma for prediction of response to third generation inhibitors](#)

Teresa Moran, Eudald Felip, Joaquim Bosch-Barrera, Itziar de Aguirre, Jose Luis Ramirez, Carles Mesia, Enric Carcereny, Diana Roa, Elia Sais, Yolanda García, Remei Blanco, Silvia Sanchez, Claudia Rosa Villacorta, Cristina Queralt, Jose María Velarde, Rafael Rosell. *Oncotarget* 2018, 9(43): 27074-27086. doi.org/10.18632/oncotarget.25478

**IMPACT FACTOR (Sci Journal): 5,168**



**COMPENDIO DE PUBLICACIONES ACEPTADAS  
PARA LA TESIS**





[A phase Ib trial of continuous once-daily oral afatinib plus sirolimus in patients with epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small cell lung cancer and/or disease progression following prior erlotinib or gefitinib.](#)

Moran T, Palmero R, Provencio M, Insa A, Majem M, Reguart N, Bosch-Barrera J, Isla D, Costa EC, Lee C, Puig M, Kraemer S, Schnell D, Rosell R. Lung Cancer 2017;108:154-160; doi: 10.1016/j.lungcan.2017.03.009.



## Correction: Monitoring *EGFR*-T790M mutation in serum/plasma for prediction of response to third-generation *EGFR* inhibitors in patients with lung cancer

Teresa Morán<sup>1</sup>, Eudald Felip<sup>1</sup>, Joaquim Bosch-Barrera<sup>2</sup>, Itziar de Aguirre<sup>3</sup>, Jose Luis Ramirez<sup>3</sup>, Carles Mesia<sup>4</sup>, Enric Carcereny<sup>1</sup>, Diana Roa<sup>2</sup>, Elia Sais<sup>2</sup>, Yolanda Garcia<sup>5</sup>, Remei Blanco<sup>6</sup>, Silvia Sanchez<sup>7</sup>, Claudia Rosa Villacorta<sup>7</sup>, Cristina Queralt<sup>3</sup>, Jose María Velarde<sup>8</sup> and Rafael Rosell<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology - Badalona, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology-Girona, Hospital Universitari Doctor Trueta Girona, Girona, Spain

<sup>3</sup> Molecular Biology Laboratory of Cancer Dr. Rosell, Can Ruti Campus: Institute Germans Trias i Pujol (IGTP), Catalan Institute of Oncology, Badalona, Spain

<sup>4</sup> Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology - Hospital Duran i Reynalds, l'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>5</sup> Medical Oncology Department, Hospital Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, Spain

<sup>6</sup> Medical Oncology Department, Consorci Sanitari de Terrassa, Terrassa, Barcelona, Spain

<sup>7</sup> Research Nurse Team, Catalan Institute of Oncology - Badalona, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>8</sup> Statistics Department, Fundació Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>9</sup> Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

**Published:** April 02, 2019

**Copyright:** Morán et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**This article has been corrected:** The correct affiliation information is given below:

<sup>1</sup> Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology - Badalona, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

Original article: Oncotarget. 2018; 9:27074-27086. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25478>

## Monitoring *EGFR*-T790M mutation in serum/plasma for prediction of response to third-generation *EGFR* inhibitors in patients with lung cancer

Teresa Morán<sup>1</sup>, Eudald Felip<sup>1</sup>, Joaquim Bosch-Barrera<sup>2</sup>, Itziar de Aguirre<sup>3</sup>, Jose Luis Ramirez<sup>3</sup>, Carles Mesia<sup>4</sup>, Enric Carcereny<sup>1</sup>, Diana Roa<sup>2</sup>, Elia Sais<sup>2</sup>, Yolanda García<sup>5</sup>, Remei Blanco<sup>6</sup>, Silvia Sanchez<sup>7</sup>, Claudia Rosa Villacorta<sup>7</sup>, Cristina Queralt<sup>3</sup>, Jose María Velarde<sup>8</sup> and Rafael Rosell<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology - Badalona, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology-Girona, Hospital Universitari Doctor Trueta Girona, Girona, Spain

<sup>3</sup>Molecular Biology Laboratory of Cancer Dr. Rosell, Can Ruti Campus: Institute Germans Trias i Pujol (IGTP), Catalan Institute of Oncology, Badalona, Spain

<sup>4</sup>Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology - Hospital Duran i Reynalds, l'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Medical Oncology Department, Hospital Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, Spain

<sup>6</sup>Medical Oncology Department, Consorci Sanitari de Terrassa, Terrassa, Barcelona, Spain

<sup>7</sup>Research Nurse Team, Catalan Institute of Oncology - Badalona, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>8</sup>Statistics Department, Fundació Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

**Correspondence to:** Teresa Morán, **email:** mmoran@iconcologia.net

**Keywords:** *EGFR*-T790M mutation; serum/plasma; osimertinib; acquired resistance; *EGFR* tyrosine kinase inhibitors

**Received:** March 19, 2018

**Accepted:** May 02, 2018

**Published:** June 05, 2018

**Copyright:** Morán et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### ABSTRACT

**Background:** Osimertinib is efficacious in lung cancer patients with epidermal growth factor receptor (*EGFR*) mutations and acquired resistance (AR) to *EGFR* tyrosine kinase inhibitors due to *EGFR*-T790M mutation (T790M). We sought to describe T790M changes in serum/plasma during osimertinib therapy and correlate these changes with treatment outcomes.

**Material and methods:** Serum/plasma from *EGFR*-mutant lung cancer patients with T790M-AR was collected before and during osimertinib treatment. Changes in T790M were evaluated using a peptide-nucleic acid-PCR assay, and correlated with clinical and radiographic response.

**Results:** Thirteen patients were included. Median time on osimertinib treatment was 10.6 months with a median progression-free survival of 13.6 months. Best response to osimertinib was partial response (PR), stable disease (SD) or progression (PD) in 46.1%, 30.8% and 23.1% of patients, respectively.

Most of the patients were paucisymptomatic at baseline. Symptom improvement was reported in 66.6% of responder patients; while symptoms remained stable in 75% of patients with SD, and 66% of patients with PD had clinical deterioration.

Three patterns of T790M changes during osimertinib treatment were identified. T790M remained detectable with PD or a short-lasting SD in 15.4% of the patients. T790M disappeared in 69.2% of patients with PR or SD. T790M disappeared, despite clinical and/or radiographic progression in 15.4% of the patients.

**Conclusion: Changes of T790M in serum/plasma in EGFR-mutant lung cancer patients with T790M-AR might be a useful marker of symptomatic and radiographic outcome to osimertinib. Longer follow-up is needed to establish if subsequent emergence of T790M could be a marker of resistance.**

## INTRODUCTION

First- and second-generation tyrosine kinase inhibitors (TKIs), erlotinib, gefitinib and afatinib, as well as the combination of erlotinib and bevacizumab, have demonstrated a clinically meaningful benefit as upfront therapy in patients harboring epidermal growth factor receptor (*EGFR*) mutations [1]. However, despite an initial clinical benefit, acquired resistance (AR) invariably develops, mainly due to the emergence of the secondary mutation *EGFR*-T790M (T790M) [2, 3]. Several clinical trials have tested different drugs to treat patients with AR to first- and second-generation TKIs with modest results [4–10]. Therefore, standard chemotherapy and best supportive care have remained the main treatment options for these patients. Currently, third-generation TKIs with the ability to inhibit both T790M and the sensitizing *EGFR* mutations have entered the clinical scenario [11, 12]. Osimertinib, a third-generation TKI, has demonstrated a clinically meaningful benefit in patients with *EGFR* mutations who have developed AR to TKIs. In clinical studies with osimertinib, patients with T790M-positive tumors reported an overall response rate (ORR) of 61% and median progression-free survival (mPFS) of 9.6 months, with a favorable toxicity profile [12]. Recently, osimertinib has also demonstrated significant advantages in terms of response and progression-free survival in *EGFR*-mutant lung cancer patients treated in first line [13].

One limitation for *EGFR* mutation testing is the scarcity of tumor tissue in patients with advanced disease. Detecting *EGFR* mutations in serum or plasma has been proposed as an alternative to tumor tissue. Using serum and plasma for molecular testing relies on the fact that mutant DNA fragments from necrotic neoplastic cells are freely circulating in blood [14]. As tumors become more aggressive there is more necrosis, leading to an increase in the absolute amount of circulating DNA that can be detected. Initial studies report that *EGFR* mutations could be detected in paired tumor and plasma samples in more than 70% of the patients with *EGFR*-mutant lung cancer [15]. Moreover, different sources of tumor DNA present in the peripheral blood provide dynamic information of the disease, reflecting not only the assessment of the primary tumor, but also of the metastatic sites.

Different techniques, including emulsion polymerase chain reaction (PCR) (ddPCR and ddPCR Beaming), reverse transcription PCR (RT-PCR), peptide-nucleic acid (PNA), amplification refractory mutation system (ARMS), and Scorpion, have been used to detect *EGFR* mutations with a sensitivity ranging from 61% to

93% for the sensitizing mutations and from 41% to 81% for T790M [16]. *EGFR* mutations in serum and plasma have been used to monitor the evolution of the sensitizing mutations during treatment. In addition, the presence of *EGFR* mutations in serum and plasma has been associated with poorer prognosis [17, 18]. Recently, peripheral blood has become a useful source to detect the presence of T790M as a mechanism of AR [19]. Interestingly, T790M can be detected in 70% of the patients with AR to first- and second-generation TKIs, which implies that tumor rebiopsy could be obviated in patients with positive result in plasma. ORR and mPFS were identical in both T790M– plasma-positive and tumor-positive patients. In addition, urine samples were also evaluated concurrently with serum and tissue samples in patients who received treatment with rociletinib, another third-generation *EGFR*-TKI [20]. Together, urine and plasma samples identified a higher proportion of T790M than tissue alone (89% vs. 75%), and T790M levels decreased in the urine samples of patients who responded or had stable disease (SD) shortly after starting treatment.

For the present study, we postulated that if detected at baseline in serum/plasma once AR to first- and second-generation TKIs has occurred, T790M mutation could be monitored during treatment with a T790M TKI. We hypothesized that this T790M monitoring in *EGFR* mutant patients with a T790M mutation as an AR mechanism receiving a T790M TKI could indicate response to therapy and subsequent progressive disease (PD). Moreover, T790M loss during treatment could potentially be correlated to clinical and radiographic response and to a quick time to response, should T790M disappear in plasma/serum. Thus, the follow-up of T790M mutation in plasma/serum could be used as a monitoring tool of response in patients receiving a T790M inhibitor.

## RESULTS

Twenty-one patients with *EGFR* mutations were treated with osimertinib between January 2016 and June 2017 after confirmed PD to a prior TKI. All the patients harbored the T790M mutation, which was evaluated in serum/plasma and also in tissue when available. Only patients with T790M in serum/plasma were eligible. Eight patients were excluded from the analyses because T790M was only detected in tissue, but not in serum/plasma. Thirteen patients were analyzed. Patients who were alive at data cut-off, 19 January 2018, were censored at that date.

### Clinical characteristics

All 13 patients included in the analysis, were Caucasian, with a median age of 59 years, and had adenocarcinoma histology. The type of TKI-sensitizing *EGFR* mutation was a deletion in exon 19 in all the cases except 1 patient who harbored an uncommon *EGFR* mutation, G719A in exon 18. Sixty-nine percent of the patients had stage IV at diagnosis. The mean number of metastatic (M1) sites was 2 (range 1–5), with the lung, bone, and brain being the most frequent M1 sites (Table 1).

All the patients had previously received a TKI (gefitinib in 46.1% of patients, afatinib in 15.4% of patients, and erlotinib in 38.5% of patients). The majority of patients (76.9%) received an *EGFR* TKI as first-line therapy, with best responses of a PR in 60% of patients and SD in 30% of patients (Table 2).

In addition to T790M evaluation in serum/plasma, 6 patients underwent a rebiopsy after the TKI progression. T790M mutation was detected in tissue in 3 of these patients and was not detected in 2 patients, while in 1 patient the rebiopsy tissue was insufficient for the molecular analysis. The most frequent M1 sites prior to osimertinib treatment were the lung and the bone (61.5% and 30.8% of patients, respectively). Most (77%) patients presented Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG PS) 0-1 before starting osimertinib (Table 3).

### Efficacy

Median patient follow-up time was 45.3 months (range 11.2–113.9). Median time on osimertinib therapy was 10.6 months (range 1.5–22.5). All 13 patients were evaluable for response to osimertinib. Six patients presented a partial response (PR) as best response (46.1%), while 4 patients presented SD (30.8%), for an overall disease control rate of 77%. In 3 out of the 4 patients with SD (75%), size of tumor lesions according to RECIST decreased in the first radiographic evaluation, while in 1 patient RECIST increased in 11%, resulting in a PD in the subsequent evaluation. Three patients presented PD in the first evaluation (23.1%). Two of these patients discontinued treatment with osimertinib due to radiological and clinical criteria, while in the other patient, osimertinib was maintained despite the RECIST progression due to clinical benefit.

Median PFS was 13.6 months (95% CI 11.1–26.2). Median OS was 80.5 months (95% CI 12.8–148.2).

### Symptom burden and radiographic response

The majority of patients included in this study presented few disease-related symptoms at baseline, with a median of symptomatic burden of 2 points (range 0–8) according to the proposed symptomatic scale. (Table 4)

Four patients scored 0 at baseline. Nevertheless, all the patients were included in order to evaluate potential symptomatic changes during treatment. Four of the 6 patients (66.6%) who responded to osimertinib improved symptoms in the first visit after osimertinib initiation, while the other 2 patients remained symptomatically stable throughout treatment. One patient experienced transient respiratory deterioration in the context of a pulmonary embolism and disease progression was ruled out. Among patients with SD (n=4) as best response to osimertinib, 3 patients remained with stable symptoms (75%), while 1 patient presented a clinical improvement. Among patients with PD (n=3) during osimertinib treatment, 2 patients experienced clinical deterioration (66.6%) and osimertinib was stopped, while 1 patient experience symptomatic improvement and osimertinib was maintained despite radiographic progression according to RECIST criteria (Figures 1 and 2).

### T790M in serum/plasma

The majority of patients had blood draws every 6 weeks according to the routine outpatient visits; however, 5 patients had blood draws as soon as 3 weeks after starting treatment with osimertinib. On the other hand, the first blood draw occurred in 3 patients at week 12, 21, and 24 weeks, respectively after osimertinib initiation. Some samples were missing, mainly due to clinical or technical reasons (Figure 3).

Overall, we identified three patterns of T790M behavior in serum/plasma during treatment with osimertinib. In one group of patients (n=9; 69.2%), T790M became undetectable in blood during osimertinib treatment; in some of the patients this occurred as early as 3 weeks after therapy initiation (n=3). All of the patients included in this group achieved a PR or SD (66.7% and 33.3%, respectively). Three out of the 9 patients (33.3%) included in this group reported symptom improvement, while the other 6 (66.7%) remained symptomatic stable; although the majority of these patients were paucisymptomatic at baseline (88.9%). Only 1 out of 9 patients (11.1%) presented PD after 6 months on osimertinib. In this patient, T790M became detectable again in the blood sample drawn at PD. As of the cut-off date, 2 patients in this subgroup had died: in 1 patient, the death was not considered related to disease progression but to an empyema, and the second patient developed a fatal pulmonary infection with metachronous pleural effusion. The severe condition of this patient prevented from performing a thoracentesis to rule out PD in the pleura. In both cases, T790M was negative in serum/plasma in the last sample drawn before death. Median PFS for the patients included on this group was no calculable (NC).

The second group of patients included two patients (15.4%) in whom T790M persisted during osimertinib treatment throughout the serial blood analyses. These

**Table 1: Clinical and demographic characteristics of 13 patients treated with osimertinib**

	N=13 n (number of patients)	%
Gender		
Male	3	23.1
Female	10	76.9
Ethnicity		
Caucasian	13	100
Age, years		
Mean (y)	61	
Median (y)	59	
Range (y)	37–70	
Histology		
Adenocarcinoma	13	100
Smoking history		
Never smoker	10	76.9
Ever smoker	3	23.1
Initial type of <i>EGFR</i> mutation		
del 19	12	92.3
G719A	1	7.7
Stage at diagnosis		
IA	1	7.7
IIIA	3 <sup>a</sup>	23.1
IV	9	69.2
Baseline metastatic sites		
Mean number of M1 sites	2	
Range	1–5	
Baseline M1 sites		
Lung	9	69.2
Bone	6	46.1
Brain	3	23.1
Lymph nodes	2	15.4
Liver	1	7.7
Adrenal gland	1	7.7
Pleura	1	7.7

<sup>a</sup>: all patients received CT and PORT.

Abbreviations: CT, chemotherapy; del, deletion; M1, metastatic; PORT, postoperative radiotherapy; y, years.

patients presented a short-lasting SD and PD as best radiographic response. Median PFS for these patients was 1.8 months (95% CI, NC-NC). The symptomatic

burden remained unchanged for 1 patient while the other presented a symptomatic improvement.



**Table 2: Therapeutic history of 13 patients prior to osimertinib treatment**

	N=13 n (number of patients)	%
<b>Prior treatments</b>		
Mean (number of treatments)	1.6	
Range	1–6	
Previous TKI	13	100
Prior CT	5	38.5 <sup>a, b</sup>
<b>1st line TKI</b>		
N	10	76.9
Time to treatment failure (m)	11.25	
Range (m)	1–19	
Best response		
PR	6	60
SD	3	30
PD	1 <sup>c</sup>	10
<b>2nd line TKI<sup>d</sup></b>		
N	3	23.1
Time to treatment failure (m)	29	
Range (m)	5–76	
Best response		
PR	1	33.3
SD	2	66.6
<b>3rd line TKI</b>		
N	1	7.7
Time to treatment failure (m)	29	
Best response, PR	1	100
Type of TKI		
Gefitinib <sup>e</sup>	7	53.8
Afatinib	2	15.4
Erlotinib	5	38.5

<sup>a</sup>: This CT regimen included CT for advanced disease.

<sup>b</sup>: 2 patient received two different CT schedules.

<sup>c</sup>: This patient presented CNS PD, was treated with WBRT, and continued on TKI with TTF of 5 extra months.

<sup>d</sup>: Includes 1 patient that was reinduced with TKI.

<sup>e</sup>: 1 patients was reinduced with gefitinib after erlotinib.

Abbreviations: CNS, central nervous system; CT, chemotherapy; PD, progressive disease; PR, partial response; SD, stable disease; TKI, tyrosine kinase inhibitor; TTF, time to treatment failure; WBRT, whole brain radiotherapy.

The third group included two patients (15.4%) who presented PD as best response to osimertinib even though they experienced a rapid disappearance of T790M in serum/plasma. Median PFS for these patients was 1.5

months (95% CI, NC-NC). One of the patients presented clinical benefit to osimertinib and the treatment was continued post-progression. Interestingly, the second patient presented PD as best response with symptomatic

**Table 3: Specific details of the 13 patients prior to osimertinib therapy**

	N=13 n (number of patients)	%
<b>T790M in serum</b>	13	100
<b>Tumor rebiopsy</b>		
no	7	58.8
yes	6	46.1
Presence of T790M in tissue	3 <sup>a</sup>	50
M1 sites prior osimertinib initiation		
Mean (number of sites)	2.8	
Range	1–6	
Progressive M1 sites		
Lung	8	61.5
Bone	4	30.8
Brain	1	7.7
Pleura	1	7.7
Meningeal	1	7.7
Liver	1	7.7
ECOG PS prior to osimertinib initiation		
0	5	38.5
1	5	38.5
2	3	23.1

<sup>a</sup>: the rebiopsy material was insufficient for molecular testing in 1 patient and T790M was negative in tissue in 2 patients. Abbreviations: ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; M1, metastatic; PS, performance status.

deterioration that led to osimertinib discontinuation. However, the rebiopsy of the progressive disease performed on the liver metastasis prior to osimertinib initiation did not reveal the presence of T790M. Unfortunately, shortly after disease progression was confirmed the patient suffered a stroke with disabling sequels that did not allow for subsequent rebiopsy or treatment.

## DISCUSSION

In the present study, we report the results of the prospective evaluation of detecting T790M in serum/plasma and its correlation with both clinical and radiographic response in patients with lung adenocarcinoma harboring *EGFR* mutations who were resistant to first- and second-generation TKIs and who were receiving treatment with osimertinib.

Several mechanisms of resistance to first- and second-generation TKIs have been described, with the acquisition of a T790M secondary mutation as the main mechanism of AR [21]. After the approval of osimertinib for *EGFR*-mutant patients with such a resistant mutation, its detection becomes of particular interest [22].

Using liquid biopsy as a technique to detect tumor abnormalities is of great interest, especially in the lung cancer field where the rebiopsy process can be challenging due to small sample size or lack of available tumor tissue for molecular assessment, which ranges from 15 to 23% according to different clinical series, or even the location or size of relapsing disease that may difficult the access for a new biopsy [23–26]. Moreover, tumor heterogeneity is a well-recognized issue that makes a single metastatic site not representative of the entire disease in a specific patient [21, 27–30]. In this regard, information obtained from blood could better depict this tumor heterogeneity and evolution of multiple metastatic sites during therapy [31].

**Table 4: Patients' symptom burden scale based on the main symptoms related to lung cancer**

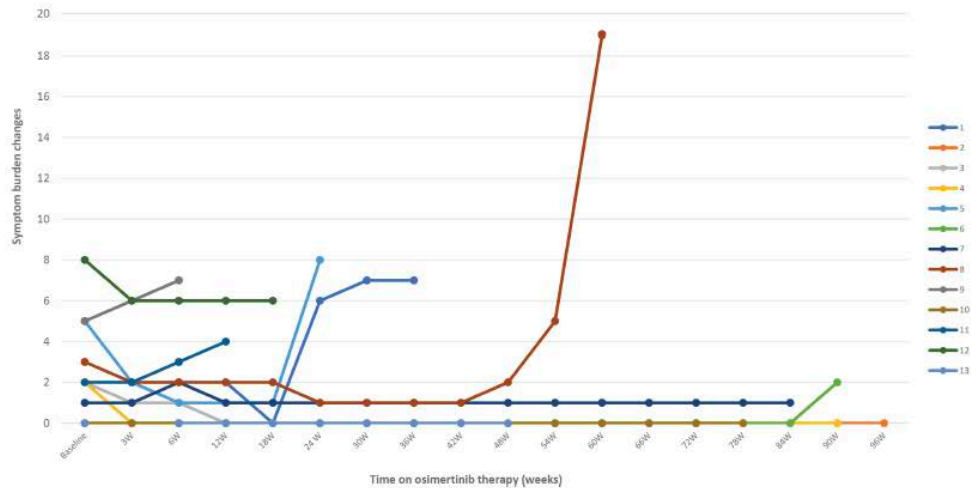
Symptom/grade	0 or none	1 or mild	2 or moderate	3 or severe	4 or life-threatening	5 or death
Cough						
Pain						
Weight loss						
Fatigue						
Anorexia						
Dyspnea						
Hemoptysis						

Based on the CTCAE 4.03 criteria, symptom changes were evaluated by using the information annotated in the medical records. Baseline and subsequent symptom burden was calculated by adding the overall score at each scheduled visit regarding the items included in the table.

Indeed, T790M has been reported exclusively in plasma in 31% and 35% of patients whose biopsy was T790M-negative or indeterminate [19, 24]. Additional advantages of the liquid biopsy include the potential use of a marker in a dynamic fashion to monitor the efficacy of the drug

and the early detection of a resistant mutation. Moreover, the minimally invasive procedure required makes it of special interest for patients.

All of the patients in our study were included on the basis of a positive T790M liquid biopsy result. Rebiopsy



**Figure 1: Changes in the symptomatic burden of the 13 patients with lung cancer with EGFR-mutations during treatment with osimertinib after acquired resistance to an EGFR TKI due to an EGFR T790M mutation.**

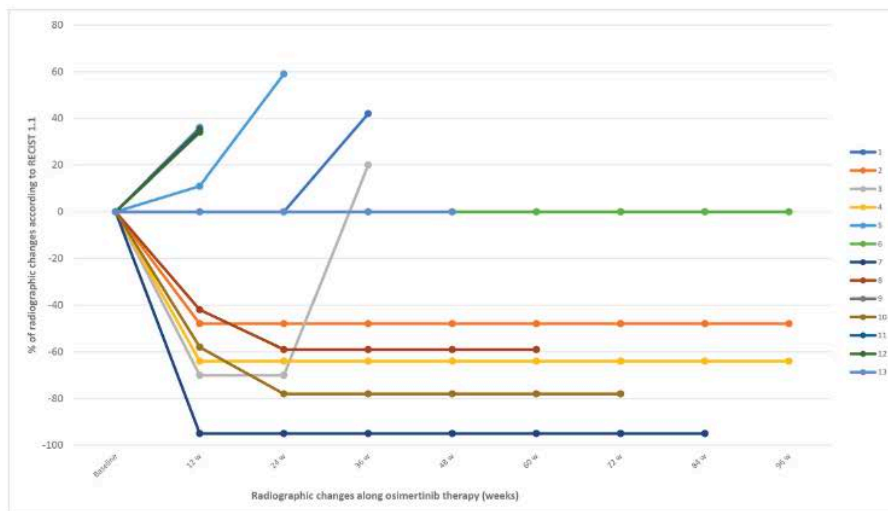
W, weeks of therapy.

Patient 1 presented symptomatic worsening in the context of an osteoporotic fracture.

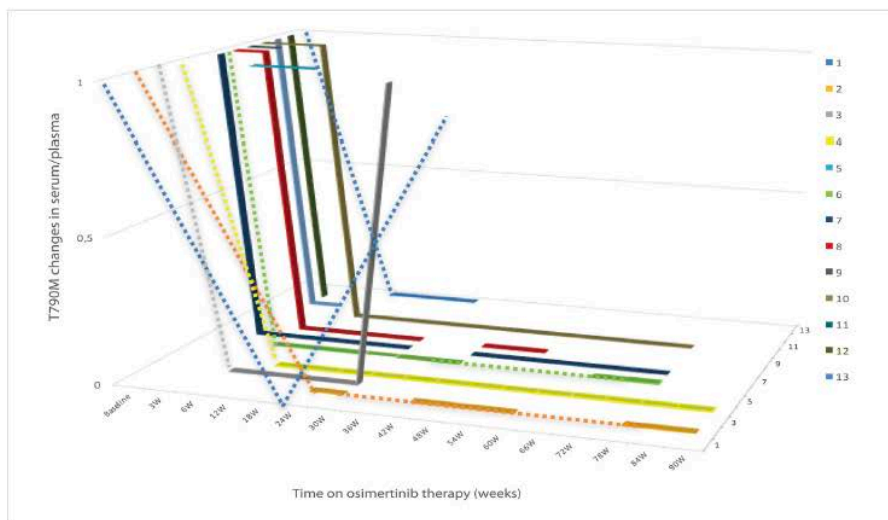
Patient 2 experienced clinical respiratory deterioration due to pulmonary embolism. Progressive disease and osimertinib-related pneumonitis were ruled out.

Patient 6 experienced respiratory deterioration at week 90. Osimertinib-related pneumonitis was considered the most likely diagnosis at data cut-off.

Patient 8 was admitted due to pneumonia with metachronous pleural effusion with severe respiratory deterioration that led to patient death.



**Figure 2: Radiographic changes according to RECIST 1.1.** During treatment with osimertinib in the 13 patients with lung cancer with *EGFR*-mutations after acquired resistance to an *EGFR* TKI due to an *EGFR* T790M mutation. W, weeks of therapy.



**Figure 3: T790M evolution in plasma/serum at baseline and during treatment with osimertinib in the 13 patients with lung cancer with *EGFR*-mutations after acquired resistance to an *EGFR* TKI due to an *EGFR* T790M mutation.** W, weeks of therapy. Each line corresponds to one individual patient. The dashed sections correspond to periods of time where the plasma/serum sample was not drawn or no result was available.

could be performed only in 6 patients (46.1%) with a confirmative result in 3 of them. According to our series, 8 patients (38%) who ultimately benefited from osimertinib therapy were excluded from the present analysis since T790M was not detected in serum, strengthening the need of a rebiopsy for those patients whose result in liquid biopsy is negative. Moreover, results in serum/plasma resulted accurate for therapeutic decisions in 11 out of 13 patients (85%), regardless of the tissue results, which implies that biopsies could be obviated when T790M is detected in liquid biopsy such has been proposed [19].

Several studies have demonstrated that liquid biopsy can be useful to monitor the disappearance of a sensitizing *EGFR* mutations with *EGFR* TKI therapy, its reappearance after a period of treatment and the emergence of the T790M at progression [31, 32]. However, little has been reported regarding the behavior of T790M in liquid biopsy specifically during treatment with osimertinib. Some data in this regard were reported in both serum and urine samples in patients treated with rociletinib, a third generation TKI no longer available. In a small group of patients with serial urine samples, T790M levels decreased after a short period of therapy [20]. However, no longitudinal changes in plasma were reported [33]. Recently, a great spectrum of mechanisms of AR to osimertinib have been reported. Again, data on longitudinal changes along treatment with osimertinib have not been included [34].

In our study, blood samples were drawn periodically. According to our results, T790M monitoring during osimertinib therapy might predict those patients who will or will not respond to this drug. However, a solid conclusion cannot be drawn in terms of prediction of recurrence according to the reemergence of T790M in serum. Longer follow-up would be necessary to confirm if T790M mutation reappears in serum once the progression occurs, since a high proportion of patients are still on treatment with no evidence of progressive disease. Moreover, we can hypothesize that a proportion of patients will present the T790M once progression occurs, while other patients will acquire other mechanisms of resistance. T790M serial monitoring could be less useful for the subset of patients who develop additional mechanism of resistance to third-generation TKIs, including other novel mutations such as C797S, small cell lung cancer transformation, or MET amplification [34–36]. Our results are in contrast to other experiences that have reported contradictory results; patients with T790M loss in a cohort of 22 patients with AR to osimertinib experienced a shorter time to treatment failure than those who maintained T790M at resistance, suggesting the subclonal nature of this T790M in the blood and the potential emergence of a variety of alternative mechanisms of resistance [37].

Regarding the patient with a positive T790M in blood but negative in tissue, rapid decrease of T790M despite progression could be explained by T790M being

present as a minor clone with the potential coexistence with other mechanisms of AR. Previously, patients with such molecular pattern have demonstrated a lower benefit from osimertinib compared with those who are plasma and tissue positive or plasma negative and tissue positive for T790M (19).

General efficacy results in our cohort of patients demonstrated a lower RR to osimertinib than reported in prior studies [12, 38]. Our series included a more pretreated population and patients with PS 2. On the other hand, OS in our cohort of patients is longer than previously reported. Several factors could potentially explain this result, such as the initial early stage diagnosis (30%), the presence of del19 (92.3%), the mean number of 1.6 metastatic sites and a high proportion of exclusive lung disease (46.1%). In addition, one patient has presented an outstanding survival that has lasted twelve years so far. The survival of this particular patient could have potentially influenced the OS of this small cohort of patients.

Different plasma genotyping assays have been used to isolate cfDNA [16, 18, 39, 40]. Each assay has advantages and drawbacks that should be considered. General limitations include the cost, the turn-around time, the imperfect accuracy, and the clinical context in which these tests are used. Ideally, plasma genotyping assays should be prospectively validated on paired plasma and tissue samples [32]. However, retrospective validation using plasma sample from large clinical trials paired with tissue sample have also been considered acceptable [18, 20]. A consistent trend among these well-validated plasma genotyping assays is the high specificity and a positive predictive value with a more limited sensitivity [16]. The advantages of the PNA-based PCR used in our study were its availability, its cost, and its favorable turn-around time (median of 3 days).

Our study includes several limitations. First, the number of patients included is small, but it actually reflects clinical practice and the target population being not possible to obtain robust conclusion and it should be considered an exploratory study. Second, the lack of assessment of other non-T790M mediated mechanisms of AR to osimertinib once the persistence or reemergence of T790M has been ruled out. Third, even after a long follow-up period, half of the patients were still on treatment and free of progression, and the molecular results in serum at progression are still unknown.

In conclusion, although our findings must clearly be interpreted with caution due to our small sample size, we have found that the disappearance or persistence of T790M in the serum/plasma in patients with lung adenocarcinoma and *EGFR* mutations and AR to first- and second-generation TKIs mediated by T790M may be a useful marker of symptomatic and radiographic evolution to osimertinib, a third-generation TKI able to target both *EGFR* sensitizing and T790M mutations. Longer follow-

up is needed to establish if the subsequent emergence of T790M could be a marker of resistance, at least in the proportion of patients who did not develop additional mechanism of resistance to osimertinib.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Patients with lung cancer with *EGFR* mutations who had progressed to a previous TKI and were selected for T790M inhibitor therapy based on positive T790M results in serum/plasma plus tissue were included in the analysis. The objectives were first, to describe the patient clinical characteristics by reviewing their medical records; second, to describe the tumor molecular characteristics; third, to detail the patients' symptomatic burden at baseline; fourth, to specify patient clinical outcomes by evaluating symptom changes during osimertinib treatment using the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) 4.03 criteria; fifth, to interpret radiographic outcomes using the Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) 1.1 criteria during treatment; and seventh, to describe the changes in T790M mutation in serum/plasma during osimertinib treatment and try to correlate this changes with clinical and radiographic response.

All the patients received osimertinib as third-generation TKI at a standard dose of 80 mg/day orally as part of a clinical trial (NCT02474355) or per clinical practice. Treatment was maintained until disease progression or loss of clinical benefit. Visits were scheduled every six weeks. All the patients were followed up until death, withdrawal of consent, or loss of follow-up. Baseline is defined as the patient situation prior to osimertinib initiation.

In order to describe changes in the patients' symptom burden and in the absence of formal questionnaires of quality of life, a scale that includes the main symptoms related to lung cancer was used. This scale was designed by reviewing the clinical records and assigning points to the following symptoms: cough, pain, dyspnea, hemoptysis, fatigue, anorexia, and weight loss (Table 4).

RECIST 1.1 was used to evaluate the radiographic response during treatment. CT scans were performed every 12 weeks, unless any clinical condition required additional imaging test to be performed. Response was evaluated by investigator.

### Molecular analyses

To evaluate T790M in tumor tissue, tumor genomic DNA was obtained from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections from the rebiopsy tumor sample. Briefly, samples were reviewed by a pathologist

to estimate the percentage of neoplastic cells. Five  $\mu\text{m}$  unstained tissue sections were obtained, and manually macrodissected if necessary, to ensure more than 50% of neoplastic cell content. DNA extraction was performed with the Cobas® DNA sample preparation kit (Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, NJ, USA) according to the manufacturer's protocol. The extracted DNA was quantified using a DS-11 spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA). *EGFR* mutations were determined with the Cobas® *EGFR* Mutation Test v2 (Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, NJ, USA) according to the manufacturer's recommendations. These analyses were performed at the Pathology Department of Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain.

T790M mutations was tested in all patients in both serum and plasma as per our protocol. For T790M assessment in serum/plasma, peripheral blood was collected from patients in both a 10 ml Vacutainer tube for serum and a 10 ml EDTA tube for plasma (Becton Dickinson, Plymouth, UK). Tubes were centrifuged twice at 2300 rpm for 10 min and the supernatant transferred to sterile 1.5 ml tubes and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Circulating DNA was purified, using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. This process was performed in independent duplicates. T790M mutations were examined by allelic discrimination Taqman assay performed in presence of a peptide-nucleic acid (PNA) designed to completely inhibit the amplification of the wt allele. All circulating-free DNA (cfDNA) samples were also tested without PNA to confirm the presence of DNA.

Primers, probes and PNA were described previously by our group [18, 41]. Blood draws were performed before starting osimertinib and periodically during the treatment. Blood draws were schedule every 6 weeks according to the clinical visits. These analyses were performed at the Molecular Biology Laboratory (Dr Rosell) at the Institute Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain.

All the patients signed the informed consent for their participation in the study, which included the clinical chart review, the molecular testing in the rebiopsy, when available, and periodic blood drawn and serial molecular testing. Approval was obtained from the IRB of our institution (RegTumTor2014).

### Statistical analyses

Data were described in terms of ranges, medians, frequencies and percentages. Overall survival (OS) was defined as the time from the initial diagnosis to death from any cause. PFS was defined as the time from starting osimertinib to documented disease progression or death. Time on treatment (ToT) was calculated from the starting date to the last dose of osimertinib. Patients who were still alive at the date of last contact were censored. OS and

PFS were calculated with the Kaplan-Meier method. All statistical calculations were done with Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, NY, USA) and Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) version 24 for Microsoft Windows.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Aurora O'Brate for assistance in drafting the manuscript.

## CONFLICTS OF INTEREST

Authors declare no conflicts of interest.

## FUNDING

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## REFERENCES

1. Chen Y, Yang J, Li X, Hao D, Wu X, Yang Y, He C, Wang W, Wang J. First-line epidermal growth factor receptor (EGFR)-tyrosine kinase inhibitor alone or with whole-brain radiotherapy for brain metastases in patients with EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*. 2016; 107:1800–05.
2. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*. 2005; 2:e73.
3. Inukai M, Toyooka S, Ito S, Asano H, Ichihara S, Soh J, Suehisa H, Ouchida M, Aoe K, Aoe M, Kiura K, Shimizu N, Date H. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2006; 66:7854–58.
4. Price KA, Azzoli CG, Krug LM, Pietanza MC, Rizvi NA, Pao W, Kris MG, Riely GJ, Heelan RT, Arcila ME, Miller VA. Phase II trial of gefitinib and everolimus in advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2010; 5:1623–29.
5. Johnson ML, Riely GJ, Rizvi NA, Azzoli CG, Kris MG, Sima CS, Ginsberg MS, Pao W, Miller VA. Phase II trial of dasatinib for patients with acquired resistance to treatment with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors erlotinib or gefitinib. *J Thorac Oncol*. 2011; 6:1128–31.
6. Scagliotti GV, Krzakowski M, Szczesna A, Strausz J, Makhson A, Reck M, Wierzbiicki RF, Albert I, Thomas M, Miziara JE, Papai ZS, Karaseva N, Thongprasert S, et al. Sunitinib plus erlotinib versus placebo plus erlotinib in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial. *J Clin Oncol*. 2012; 30:2070–78.
7. Janjigian YY, Smit EF, Groen HJ, Horn L, Gettinger S, Camidge DR, Riely GJ, Wang B, Fu Y, Chand VK, Miller VA, Pao W. Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations. *Cancer Discov*. 2014; 4:1036–45.
8. Reguart N, Rosell R, Cardenal F, Cardona AF, Isla D, Palmero R, Moran T, Rolfo C, Pallarès MC, Insa A, Carcereny E, Majem M, De Castro J, et al. Phase I/II trial of vorinostat (SAHA) and erlotinib for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations after erlotinib progression. *Lung Cancer*. 2014; 84:161–67.
9. Moran T, Felip E, Keedy V, Borghaei H, Shepherd FA, Insa A, Brown H, Fitzgerald T, Sathyanarayanan S, Reilly JF, Mauro D, Hsu K, Yan L, Johnson DH. Activity of dalotuzumab, a selective anti-IGF1R antibody, in combination with erlotinib in unselected patients with Non-small-cell lung cancer: A phase I/II randomized trial. *Exp Hematol Oncol*. 2014; 3:26.e Collection 2014.
10. Moran T, Palmero R, Provencio M, Insa A, Majem M, Reguart N, Bosch-Barrera J, Isla D, Costa EC, Lee C, Puig M, Kraemer S, Schnell D, Rosell R. A phase Ib trial of continuous once-daily oral afatinib plus sunitinib in patients with epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small cell lung cancer and/or disease progression following prior erlotinib or gefitinib. *Lung Cancer*. 2017; 108:154–60.
11. Sequist LV, Soria JC, Goldman JW, Wakelee HA, Gadgeel SM, Varga A, Papadimitrakopoulou V, Solomon BJ, Oxnard GR, Dziadziuszko R, Aisner DL, Doebele RC, Galasso C, et al. Rocicetinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015; 372:1700–09.
12. Jänne PA, Yang JC, Kim DW, Planchard D, Ohe Y, Ramalingam SS, Ahn MJ, Kim SW, Su WC, Horn L, Haggstrom D, Felip E, Kim JH, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015; 372:1689–99.
13. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, Dechaphunkul A, Imamura F, Nogami N, Kurata T, Okamoto I, Zhou C, Cho BC, et al, and FLAURA Investigators. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018; 378:113–25.
14. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA Jr, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:16368–73.
15. Kimura H, Kasahara K, Kawaiishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, Nishio K. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the

- response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:3915–21.
16. Sacher AG, Komatsubara KM, Oxnard GR. Application of Plasma Genotyping Technologies in Non-Small Cell Lung Cancer: A Practical Review. *J Thorac Oncol.* 2017; 12:1344–56.
  17. Wu YL, Sequist LV, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, Li W, Hou M, Schuler M, Mok T, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, et al. EGFR mutation detection in circulating cell-free DNA of lung adenocarcinoma patients: analysis of LUX-Lung 3 and 6. *Br J Cancer.* 2017; 116:175–85.
  18. Karachaliou N, Mayo-de las Casas C, Queralt C, de Aguirre I, Melloni B, Cardenal F, Garcia-Gomez R, Massuti B, Sánchez JM, Porta R, Ponce-Aix S, Moran T, Carcereny E, et al, and Spanish Lung Cancer Group. Association of EGFR L858R mutation in circulating free DNA with survival in the EURTAC trial. *JAMA Oncol.* 2015; 1:149–57.
  19. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrance R, Paweletz CP, Cantarini M, Yang JC, Barrett JC, Jänne PA. Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (AZD9291) in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2016; 34:3375–82.
  20. Reckamp KL, Melnikova VO, Karlovich C, Sequist LV, Camidge DR, Wakelee H, Perol M, Oxnard GR, Kosco K, Croucher P, Samuels E, Vibat CR, Guerrero S, et al. A highly sensitive and quantitative test platform for detection of NSCLC EGFR mutations in urine and plasma. *J Thorac Oncol.* 2016; 11:1690–700.
  21. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, Bergethon K, Shaw AT, Gettinger S, Cospoer AK, Akhavanfard S, Heist RS, Temel J, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med.* 2011; 3:75ra26.
  22. Greig SL. Osimertinib: First Global Approval. *Drugs.* 2016; 76:263–73.
  23. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, Kris MG, Miller VA, Ladanyi M, Riely GJ. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:2240–47.
  24. Sundaresan TK, Sequist LV, Heymach JV, Riely GJ, Jänne PA, Koch WH, Sullivan JP, Fox DB, Maher R, Muzikansky A, Webb A, Tran HT, Giri U, et al. Detection of T790M, the acquired resistance EGFR mutation, by tumor biopsy versus noninvasive blood-based analyses. *Clin Cancer Res.* 2016; 22:1103–10.
  25. Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, Walker J, Dearden S, Webster A, Milenkova T, McCormack R. 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.
  26. Bosc C, Ferretti GR, Cadranel J, Audigier-Valette C, Besse B, Barlesi F, Decroisette C, Lantuejoul S, Arbib F, Moro-Sibilot D. Rebiopsy during disease progression in patients treated by TKI for oncogene-addicted NSCLC. *Target Oncol.* 2015; 10:247–53.
  27. Piotrowska Z, Niederst MJ, Karlovich CA, Wakelee HA, Neal JW, Mino-Kenudson M, Fulton L, Hata AN, Lockerman EL, Kalsy A, Digumarthy S, Muzikansky A, Raponi M, et al. Heterogeneity underlies the emergence of EGFR<sup>T790</sup>wild-type clones following treatment of T790M-positive cancers with a third-generation EGFR inhibitor. *Cancer Discov.* 2015; 5:713–22.
  28. Graziano P, de Marinis F, Gori B, Gasbarra R, Migliorino R, De Santis S, Pelosi G, Leone A. EGFR-Driven Behavior and Intrapatient T790M Mutation Heterogeneity of Non-Small-Cell Carcinoma With Squamous Histology. *J Clin Oncol.* 2015; 33:e115–18.
  29. Kuiper JL, Heideman DA, Thunnissen E, Paul MA, van Wijk AW, Postmus PE, Smit EF. Incidence of T790M mutation in (sequential) rebiopsies in EGFR-mutated NSCLC-patients. *Lung Cancer.* 2014; 85:19–24.
  30. Hata A, Katakami N, Yoshioka H, Kaji R, Masago K, Fujita S, Imai Y, Nishiyama A, Ishida T, Nishimura Y, Yatabe Y. Spatiotemporal T790M heterogeneity in individual patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer after acquired resistance to EGFR-TKI. *J Thorac Oncol.* 2015; 10:1553–59.
  31. Yanagita M, Redig AJ, Paweletz CP, Dahlberg SE, O'Connell A, Feeney N, Taibi M, Boucher D, Oxnard GR, Johnson BE, Costa DB, Jackman DM, Jänne PA. A prospective evaluation of circulating tumor cells and cell-free DNA in EGFR-mutant non-small cell lung cancer patients treated with erlotinib on a phase II trial. *Clin Cancer Res.* 2016; 22:6010–20.
  32. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, Alden RS, O'Connell A, Feeney N, Mach SL, Jänne PA, Oxnard GR. Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2016; 2:1014–22.
  33. Karlovich C, Goldman JW, Sun JM, Mann E, Sequist LV, Konopa K, Wen W, Angenendt P, Horn L, Spigel D, Soria JC, Solomon B, Camidge DR, et al. Assessment of EGFR Mutation Status in Matched Plasma and Tumor Tissue of NSCLC Patients from a Phase I Study of Rociletinib (CO-1686). *Clin Cancer Res.* 2016; 22:2386–95.
  34. Lin CC, Shih JY, Yu CJ, Ho CC, Liao WY, Lee JH, Tsai TH, Su KY, Hsieh MS, Chang YL, Bai YY, Huang DD, Thress KS, Yang JC. Outcomes in patients with non-small-cell lung cancer and acquired Thr790Met mutation treated with osimertinib: a genomic study. *Lancet Respir Med.* 2018; 6:107–16.
  35. Kim TM, Song A, Kim DW, Kim S, Ahn YO, Keam B, Jeon YK, Lee SH, Chung DH, Heo DS. Mechanisms of Acquired Resistance to AZD9291: A Mutation-Selective, Irreversible EGFR Inhibitor. *J Thorac Oncol.* 2015; 10:1736–44.



36. Oxnard GR, Thress K, Paweletz C, Stetson D, Dougherty B, Lai Z, Markovets A, Felip E, Vivancos A, Kuang Y, Sholl L, Redig AJ, Cantarini M, et al. Mechanisms of Acquired Resistance to AZD9291 in EGFR T790M Positive Lung Cancer ORAL17.07. *J Thorac Oncol.* 2015; 9:S207.
37. Oxnard G, Hu Y, Mileham K, Tracy P, Feeney N, Sholl L, Paweletz C, Thress K, Jänne P. Osimertinib Resistance Mediated by Loss of EGFR T790M Is Associated with Early Resistance and Competing Resistance Mechanisms. *J Thorac Oncol.* 2017; 12:S1767.
38. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, Shepherd FA, He Y, Akamatsu H, Theelen WS, Lee CK, Sebastian M, Templeton A, et al, and AURA3 Investigators. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017; 376:629–40.
39. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001; 61:1659–65.
40. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta.* 2001; 313:139–42.
41. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez JM, Porta R, Cobo M, Garrido P, et al, and Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Français de Pneumo-Cancérologie and Associazione Italiana Oncologia Toracica. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13:239–46.

## **RESULTADOS**

En este apartado se presenta un resumen de los resultados de los artículos aprobados por la Comisión Académica del Doctorado en Medicina.

### 1.-Evaluación de nuevas opciones terapéuticas en pacientes con *mEGFR* tras el fracaso del tratamiento con ITQ de primera generación.

Treinta y nueve pacientes con CNMP avanzado y *mEGFR* en progresión a ITQ de primera generación fueron incluidos en el estudio fase IB de combinación de afatinib y sirolimus. Las características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio quedan resumidas en la Tabla 7.

**Tabla 7.-** Características basales clínicas y demográficas de los pacientes incluidos que recibieron la combinación de afatinib y sirolimus.

Características	n=39 (%)		
Edad media, años (DE)	58,9 (12,3)		
Sexo n (%)			
Mujer	24 (61,5)		
ECOG performance status, n (%)			
0	16 (41,0)		
1	22 (56,4)		
2	1 (2,6)		
Hábito tabáquico, n (%)			
Nunca Fumadores	22 (56,4)		
Fumadores activos; ex-fumadores	17(43,6)		
Subtipo histológico, n (%)			
Adenocarcinoma	33 (84,6)		
Carcinoma escamoso	3 (7,7)		
Carcinoma de célula grande	3 (7,7)		
Tratamiento previo con ITQ, n (%)			
Sí	39 (100.0)		
Tratamiento previo con QT, n (%)			
0	6 (15,4)		
1	16 (41,0)		
2	10 (25,6)		
≥3	6 (15,4)		
Desconocido	1 (2,6)		
Estado de la mutación <i>EGFR</i> , n (%)	Tumor (laboratorio local)	Tumor (laboratorio central)	Suero (previo al tratamiento)
Positivo	10 (25,6)	11 (28,2)	17 (43,6)
Negativo	2 (5,1)	1 (2,5)	21 (53,8)
Desconocido	27 (69,2)	27 (69,2)	1 (2,5)

DE, desviación estándar; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; EGFR, epidermal growth factor receptor; ITQ inhibidor de tirosina quinasa; n, número de pacientes; QT, quimioterapia.

El diseño inicial del estudio incluía cinco cohortes con diferentes niveles de dosis de ambos fármacos en cada una de ellas (1, 1a, 2, 3 y 4). La cohorte 1 se planeó con unas dosis de afatinib de 30 mg y sirolimus de 5 mg (Tabla 8). Ninguno de los 3 pacientes incluidos en esta cohorte presentó TLD.

**Tabla 8.- Cohortes planeadas y cohortes finales tras enmiendas del protocolo.**

Cohorte	Afatinib, mg/día	Sirolimus, mg/día
		(excepto para cohorte -1)
-1**§	30	1 cada 48 h
0a*	30	1
0b*	40	1
0c*	30	3
0d**§	40	3
1	30	5
1a	30	10
2	40	5
3 <sup>†§</sup>	40	10
4 <sup>†§</sup>	50	10

\*Nuevas cohortes tras enmienda 2; \*\*Nuevas cohortes tras enmienda 3; <sup>†</sup>Cohortes retiradas tras enmienda 2; <sup>§</sup>Cohortes sin dosis administradas.

En azul, las cohortes predeterminadas; en gris, las cohortes adicionales a las inicialmente previstas.

En la cohorte 2 (afatinib 40 mg y sirolimus 5 mg) 3 pacientes presentaron TLD, por lo que se incluyeron 3 pacientes en la cohorte 1a (afatinib 30 mg y sirolimus 10 mg). Estos 3 pacientes nuevos presentaron TLD. Por ello se realizó una extensión de la cohorte 1 y se incluyeron 3 nuevos pacientes en esta cohorte 1. Dos de estos 3 nuevos pacientes presentaron TLD. De este modo, un total de 2 de los 6 pacientes asignados a dosis de afatinib 30 mg y sirolimus 5 mg (cohorte 1) presentaron TLD. Ante estos resultados, se procedió a una enmienda del protocolo y se procedió a la retirada de las cohortes 3 y 4. Se añadieron 3 cohortes nuevas, lo que permitía la inclusión de pacientes en unos niveles de dosis menores de ambos fármacos [cohorte 0a, afatinib 30 mg y sirolimus 1mg, (n=9); cohorte 0b, afatinib 40 mg y sirolimus 3 mg, (n=3); cohorte 0c, afatinib 30 mg y sirolimus 3 mg, (n=9); y cohorte de expansión 0a, afatinib 30 mg y sirolimus 1mg, (n=3)].

De forma global, 6 de los 18 pacientes tratados en estos niveles de dosis presentaron TLD. De acuerdo con estos resultados de toxicidad de la combinación, se procedió a la finalización del estudio.

Treinta pacientes de los 39 incluidos fueron evaluables para TLD (Tabla 9). Las razones de no inclusión en el análisis de seguridad de los 9 pacientes restantes fueron las siguientes: no cumplimiento de algún criterio de inclusión/exclusión (n=4), retirada de consentimiento (n=2), diarrea no tratada correctamente conforme a las recomendaciones del protocolo (n=1) y progresión de enfermedad antes de completar un segundo ciclo de tratamiento (n=2). El 43,6% de los 30 pacientes evaluables para seguridad presentó 24 eventos que se consideraron definitivos de TLD. La mayoría de ellos ocurrieron al principio de la exposición a la combinación (76,5% en los primeros 14 días de tratamiento). No obstante, el 23,5% de estos efectos secundarios considerados como TLD aparecieron entre los días 37 y 49 de tratamiento. Las TLD más frecuentemente comunicadas fueron la diarrea y la inflamación mucosa (29,1% y 33,3%, respectivamente). La mayoría de estos eventos fueron de grado 3 (83,3%). Un paciente presentó una elevación de creatinín-fosfoquinasa (CPK) de grado 4.

**Tabla 9.-** Pacientes con TLD durante los ciclos 1 y 2 de afatinib/ sirolimus en las diferentes cohortes.

Cohorte	Afa/Siro (mg/día)	P tratados (n)	Evaluable para TLD (n)	p con TLD (n)	TLD, evento, n
0a*	30/1	12	9 <sup>†§</sup>	2	G3 diarrea y G3 estomatitis (n=1)
					G3 inflamación mucosa (n=1)
0b	40/1	3	3 <sup>†§</sup>	2	G4 elevación CPK (n=1)
					G3 diarrea (n=1)
0c	30/3	9	6 <sup>†§</sup>	2	G3 diarrea (n=1)
					G3 inflamación mucosa (n=1)
1	30/5	9	6 <sup>§</sup>	2	G3 inflamación mucosa y G2 diarrea (n=1)
					G3 estomatitis y G3 dolor cavidad oral (n=1)
1a	30/10	3	3	3	G3 diarrea (n=1)
					G3 inflamación mucosa (n=1)
					G3 diarrea, G3 astenia, G3 hiporexia (n=1)
2	40/5	3	3	3	G3 inflamación mucosa (n=1)
					G3 diarrea (n=1)
					G3 estomatitis (n=1)

\*Incluye una cohorte de expansión de 3 pacientes.

†Indica TLD más allá del periodo de evaluación de los dos primeros ciclos (8 semanas) de acuerdo con la enmienda del protocolo. En el resto de cohortes, el periodo de evaluación de TLD fue durante las 4 primeras semanas.

§TLD Eventos de TLD identificados durante el proceso de revisión de los resultados que no fueron considerados en el proceso de escalada de dosis. La revisión de dichos eventos mostró que aunque se hubieran identificado durante el periodo de escalada de dosis, no hubieran alterado las decisiones de tratamiento.

Afa, afatinib; CPK, creatinín fosfoquinasa; G, grado de toxicidad de según CTCAE; n, número de pacientes; p, pacientes; siro, sirolimus; TLD, toxicidad limitante de dosis.

Todos los pacientes (n=39) presentaron alguna toxicidad (de grado 3 en un 66,7% y como efecto adverso grave en 56,4%), siendo la diarrea el más frecuente (94,9%, de grados 1, 2 y 3 en 41,0%, 23,1% and 30,8%, respectivamente). La inflamación mucosa ocurrió en un 61,5% de los pacientes con un 38,5% y 15,4% de grado 2 y 3, respectivamente. La estomatitis apareció en un 20,5% (10,3% de grado 1). El *rash* fue de grado 2 y 3 en un 23,1% y 2,6%, respectivamente. Otras toxicidades cutáneas incluyeron fisuras en los pulpejos y xerosis, (12,8% para ambas toxicidades) y paroniquia (17,9%). La mayoría estas toxicidades en piel y anejos se clasificó como de grado 1. El 10,3% de los pacientes presentó una elevación de ALT, con un 7,7% de grado 1. Un paciente (2,6%) presentó una elevación de CPK de grado 4.

Un 23,1% de los pacientes presentó un efecto adverso que llevó a la interrupción definitiva del tratamiento. Los más frecuentes incluyeron: inflamación mucosa (n=3; 7,7%) y diarrea (n=2; 5,1%). Diez pacientes (25,6%) presentaron un efecto adverso que requirió una reducción de dosis del tratamiento, incluyendo diarrea (n=5; 12,8%), inflamación mucosa (n=4; 10,3%) y estomatitis (n=2; 5,1%).

El estudio de farmacocinética demostró que afatinib se absorbió rápidamente, alcanzando picos de concentración plasmática entre las 2 y 5 horas después de su administración. Los niveles estables de afatinib se alcanzaron en el día 7 y permanecieron estables durante el periodo de observación. La presencia de sirolimus no modificó los niveles plasmáticos de afatinib, con unos niveles estables mantenidos y con un rango de valores individuales que se superpusieron. Sirolimus se absorbió rápidamente, alcanzando un pico en sangre a las 1-3 horas y unos niveles estables de concentración plasmática a los 7 días de administración, que se mantuvieron estables durante el periodo de observación. Afatinib no originó diferencias intraindividuales en el rango de sirolimus. En los pacientes que recibieron afatinib a dosis de 30 mg o 40 mg, los niveles plasmáticos de sirolimus fueron similares a los encontrados durante la fase de inducción previa al inicio de la combinación.

Treinta y nueve pacientes fueron evaluables para respuesta. Se observó RP en un 12,8% de los pacientes. Dos pacientes (5,1%) presentaron una RP confirmada (en el nivel de dosis de afatinib 30 mg y sirolimus 5 mg y 40 mg y sirolimus 5 mg, respectivamente). Tres pacientes (7,7%) presentaron una RP no confirmada a las dosis de afatinib 30 mg y sirolimus 1 mg, afatinib 30 mg y sirolimus 5 mg y afatinib 40 mg y sirolimus 5 mg. Las RP confirmadas y no confirmadas aparecieron en pacientes con el siguiente perfil molecular: *del19*, *del19+T790M* en suero, *L858R+T790M* en suero, ausencia de alguna mutación de sensibilidad o *T790M* en suero y *del19+T790M* en tejido. Dieciocho pacientes (46,2%) presentaron EE, siendo esta frecuencia comparable entre las cohortes de los diferentes niveles de dosis. La SLP fue evaluada en los 12

pacientes que recibieron el tratamiento a una DMT (afatinib 30 mg y sirolimus 1 mg). Esta fue de 3,4 meses (IC95%, 1,8-6,3 meses) con una SLP estimada a los 6 y 12 meses del 33,3% y 8,3%, respectivamente.

## **2.- Detección de la *mT790M* en suero/ plasma y correlación con la respuesta clínica y radiológica en pacientes con *mEGFR* tratados con ITQ de tercera generación.**

Veintidós pacientes con *mEGFR* previamente tratados con ITQ de primera y segunda generación, recibieron tratamiento con osimertinib entre enero de 2016 y junio de 2017 en el momento de la progresión de la enfermedad. Todos los pacientes recibieron tratamiento con osimertinib conforme a un resultado positivo de la *mT790M* en la muestra de rebiopsia tumoral o en la muestra de suero/plasma. Sólo 13 pacientes con la *mT790M* presente en suero/plasma fueron elegibles para el análisis. Las características clínicas, demográficas y moleculares de los pacientes quedan recogidas en la tabla 10. Los 13 pacientes incluidos representaban un grupo con las características clínicas propias de esta población con *mEGFR* [mayor porcentaje de mujeres (77%), no fumadores (77%), con estadio avanzado al diagnóstico (69%)]. La media de localizaciones M1 al diagnóstico fue de 2 (rango 1-5) y la localización más frecuente fue el pulmón (70%). Doce de los 13 pacientes incluidos fueron portadores de una *del19*.

La tabla 11 recoge la historia del tratamiento de los pacientes previa al tratamiento con osimertinib. Todos los pacientes habían recibido un ITQ de primera (92,3%) o de segunda generación (15,4%). Un paciente presentó toxicidad con erlotinib, lo que obligó a suspender su administración e iniciar gefitinib. En un paciente se reintrodujo el ITQ en segunda línea. La mayoría de los pacientes recibió el tratamiento con ITQ en primera línea de tratamiento (77%). La respuesta al ITQ de primera y segunda generación fue la esperable (70%). La *mTFT* también fue la esperable en primera línea (11,2 meses), y en segunda y tercera excedió el tiempo esperado. En segunda línea, 1 de los 3 pacientes presentó una RP prolongada en el tiempo (76 m) y 1 único paciente recibió en ITQ en tercera línea con un *TFT* de 29 meses.

**Tabla 10.-** Características clínicas y demográficas iniciales de los 13 pacientes tratados con osimertinib.

	n (número de pacientes)	
	n=13	%
<b>Sexo</b>		
Varón	3	23,1
Mujer	10	76,9
<b>Raza caucásica</b>	13	100
<b>Edad, años</b>		
Media (a)	61	
Mediana (a)	59	
Rango (a)	37–70	
<b>Histología</b>		
Adenocarcinoma	13	100
<b>Hábito tabáquico</b>		
Nunca Fumador	10	76,9
Fumador/ Ex-fumador	3	23,1
<b>Mutación de sensibilidad de EGFR</b>		
<i>del19</i>	12	92,3
<i>G719A</i>	1	7,7
<b>Estadio al diagnóstico</b>		
IA	1	7,7
IIIA	3 <sup>a</sup>	23,1
IV	9	69,2
<b>M1 basales</b>		
Media de localizaciones M1	2	
Rango	1–5	
<b>Localizaciones basales M1</b>		
Pulmón	9	69,2
Hueso	6	46,1
SNC	3	23,1
Ganglionar	2	15,4
Hígado	1	7,7
Adrenal	1	7,7
Pleura	1	7,7

a, años, *del*, deleción, *EGFR*, *Epidermal Growth Factor Receptor*, M1, metástasis, SNC, sistema nervioso central.



**Tabla 11.-** Historia terapéutica previa de los 13 pacientes tratados con osimertinib.

	n (número de pacientes)		%
	n=13		
<b>Tratamientos previos</b>			
Media (líneas de tratamiento previas)	1,6		
Rango	1–6		
ITQ previo	13		100
QT previa	5		38,5
<b>Primera línea de ITQ</b>			
n	10		76,9
Tiempo hasta fracaso de tratamiento (m)	11,25		
Rango (m)	1–19		
Mejor respuesta			
PR	6		60
SD	3		30
PD	1		10
<b>Segunda línea de ITQ</b>			
n	3		23,1
Tiempo hasta fracaso de tratamiento (m)	29		
Rango (m)	5–76		
Mejor respuesta			
RP	1		33,3
EE	2		66,6
<b>Tercera línea de ITQ</b>			
n	1		7,7
Tiempo hasta fracaso de tratamiento (m)	29		
Mejor respuesta RP	1		100
<b>Tipo de ITQ</b>			
Gefitinib	7		53,8
Afatinib	2		15,4
Erlotinib	5		38,5

a, años; del, delección; EE, enfermedad estable; *EGFR*, *Epidermal Growth Factor Receptor*; ITQ, inhibidor de tirosina quinasa; m, meses; n, número de pacientes; RP, respuesta parcial.

En relación a los detalles clínicos previos al inicio de tratamiento con osimertinib (tabla 12), se intentó una rebiopsia en 6 pacientes. El material obtenido fue insuficiente en 1 paciente y en 2 de ellos no se detectó la *mT790M*. Como era de esperar, el número de localizaciones M1 aumentó respecto al diagnóstico inicial y al patrón de distribución de M1 fue el característico de esta población. Dos pacientes presentaban enfermedad en SNC. El estado general fue correcto (ECOG-PS 0 y 1) en la mayoría de los pacientes (77%).

**Tabla 12.-** Detalles clínicos previos al inicio de osimertinib en los 13 pacientes tratados con osimertinib.

	n (número de pacientes)		%
	n=13		
<b>T790M en suero</b>	13		100
<b>Rebiopsia (muestra de tumor)</b>			
no	7		58,8
si	6		46,1
T790M en tejido	3		50
<b>M1 previo inicio osimertinib</b>			
Media de localizaciones M1	2,8		
Rango	1–6		
Localización de M1			
Pulmón	8		61,5
Hueso	4		30,8
SNC	1		7,7
Pleura	1		7,7
Meninge	1		7,7
Hígado	1		7,7
<b>ECOG PS previo al inicio de osimertinib</b>			
0	5		38,5
1	5		38,5
2	3		23,1

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; m, meses; M1, metástasis; PS, performance status; RP, respuesta parcial, SNC, sistema nervioso central.

La carga sintomática se evaluó mediante la escala sintomática propuesta en la tabla 16 y de acuerdo con la información clínica anotada en la historia de cada paciente. Los síntomas basales y en cada visita se calcularon mediante la suma total de la puntuación de los síntomas incluidos en la tabla 13.

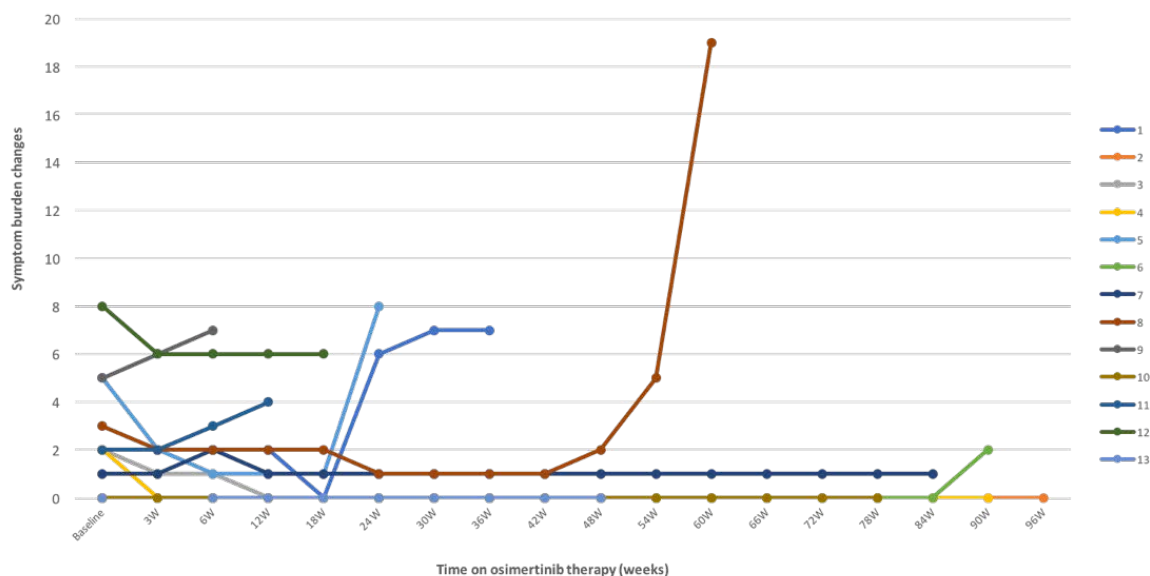
**Tabla 13.-** Escala de evaluación de la carga sintomática, en función de los síntomas más frecuentes del cáncer de pulmón.

Síntoma/ grado	0 o ninguno	1 o leve	2 o moderado	3 o grave		
Tos						
Dolor						
Pérdida de peso						
Astenia						
Síntoma/ grado	0 o ninguno	1 o leve	2 o moderado	3 o grave	4 o amenazante para la vida	5 o muerte
Anorexia						
Disnea						
Hemoptisis						

La mediana de seguimiento fue de 45,3 meses (11,2-113,9). La mediana de tiempo en tratamiento con osimertinib fue de 10,6 meses (1,5-22,5). Todos los pacientes fueron evaluables para respuesta radiológica. Seis pacientes (46,1%) presentaron RP y 4 pacientes (30,8%) EE como mejor respuesta, respectivamente. La TCE fue de 77%. Tres pacientes (23,1%) presentaron PE en la primera evaluación radiológica, 2 de ellos interrumpieron el tratamiento con osimertinib, mientras que 1 paciente continuó osimertinib por beneficio clínico, a pesar de la progresión radiológica según los criterios RECIST. La mSLP fue de 13,6 meses (IC95% 1,1-26,2). La mSG fue de 80,5 meses (IC95%, 12,8-148,2).

Respecto a la respuesta clínica, la mayoría de los pacientes incluidos en este estudio estaban paucisintomáticos en el momento de inicio del tratamiento con osimertinib, con una media de 2 puntos (rango 0-8) según la escala de carga sintomática propuesta en la tabla 13. Cuatro de los 6 pacientes que respondieron a osimertinib (66,6%) presentaron una mejora sintomática, mientras que 2 pacientes mantuvieron los síntomas estables durante el tratamiento. Tres de los 4 pacientes con EE presentaron estabilidad sintomática. El cuarto paciente presentó mejoría clínica. Del grupo de pacientes con PE (n=3), 2 pacientes presentaron deterioro clínico y el tratamiento con osimertinib fue interrumpido, mientras que 1 paciente presentó mejora sintomática y el tratamiento con osimertinib se mantuvo a pesar de la PE radiológica conforme a los criterios RECIST (Figura 15 y 16).

**Figura 15-** Cambios en la carga sintomática en 13 pacientes con *mEGFR* tratados con osimertinib tras resistencia adquirida a ITQ mediada por la *mT790M* (198).



W, semanas de tratamiento

La paciente 1 presentó deterioro clínico por una fractura vertebral osteoporótica.

La paciente 2 experimentó empeoramiento respiratorio secundario a un tromboembolismo pulmonar. Se descartó progresión de enfermedad y toxicidad pulmonar asociada a osimertinib.

La paciente 6 presentó deterioro respiratorio en la semana 90 de tratamiento. El diagnóstico más probable fue de neumonitis secundaria a osimertinib.

La paciente 8 ingresó por una neumonía grave con derrame pleural metacrónico con insuficiencia respiratoria asociada que produjo su fallecimiento.

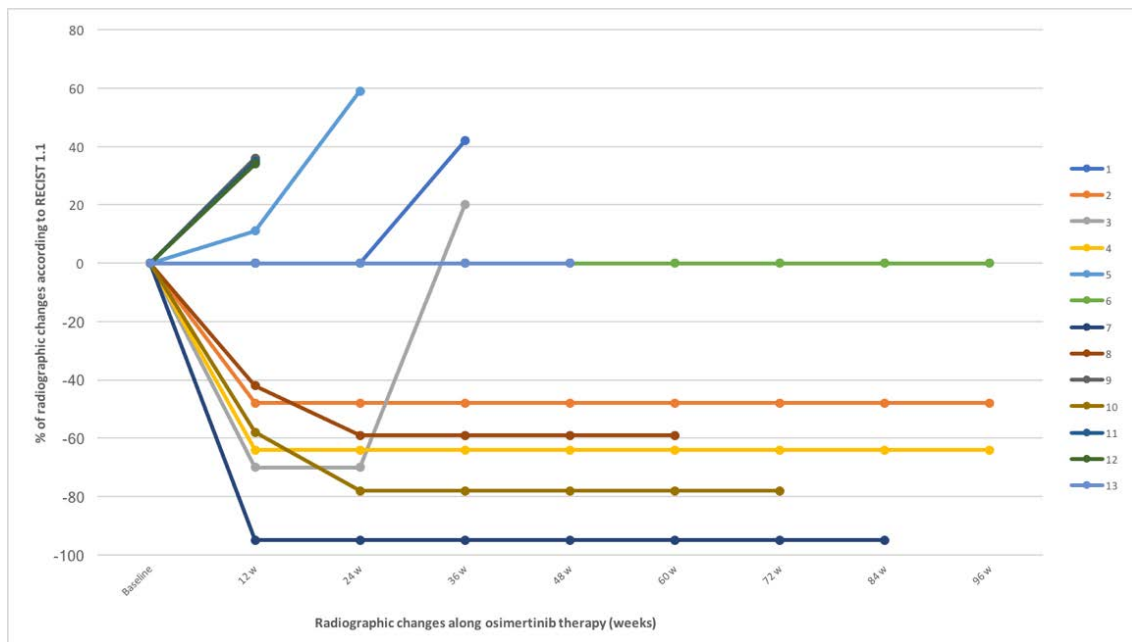
Se identificaron tres patrones de evolución de la *mT790M* en suero/plasma durante el tratamiento con osimertinib (Figura 17). En el primer grupo (n=9, 69,2%) la *mT790M* se volvió indetectable durante el tratamiento con osimertinib. En algunos pacientes, esta negativización se observó de forma temprana (en 3 pacientes ocurrió a las tres semanas del inicio del tratamiento). Los 9 pacientes incluidos en este grupo presentaron RP o EE como mejor respuesta al tratamiento (66,7% y 33,3%, respectivamente). Tres pacientes presentaron mejora sintomática (33,3%) mientras que 6 pacientes (66,6%) permanecieron sintomáticamente estables, aunque la mayoría de estos pacientes estaban paucisintomáticos antes del inicio de tratamiento (88,9%). Un paciente (11,1%) presentó PE después de 6 meses de tratamiento. En este paciente, la *mT790M* se volvió a encontrar en sangre a la progresión. En el momento del corte de datos, 2 pacientes de este grupo habían fallecido. En 1 paciente la muerte se atribuyó a una neumonía complicada y en otra paciente fue debida a un empiema. El deterioro clínico de la segunda paciente en ese momento no permitió la realización de una toracocentesis que hubiera descartado o confirmado la PE. La mSLP en este subgrupo fue no calculable.

El segundo grupo incluyó 2 pacientes (15,4%) en los que la *mT790M* persistió en los análisis seriados de sangre durante el tratamiento con osimertinib. Los pacientes presentaron una EE breve

y PD, respectivamente, como mejores respuestas al tratamiento. Un paciente presentó mejora sintomática y otro no presentó cambios en los síntomas. La mSLP para estos pacientes fue de 1,8 meses (IC 95%, NC-NC).

La tabla 14 resume la correlación de los resultados de la respuesta clínica y radiológica y del comportamiento de *T790M* con osimertinib.

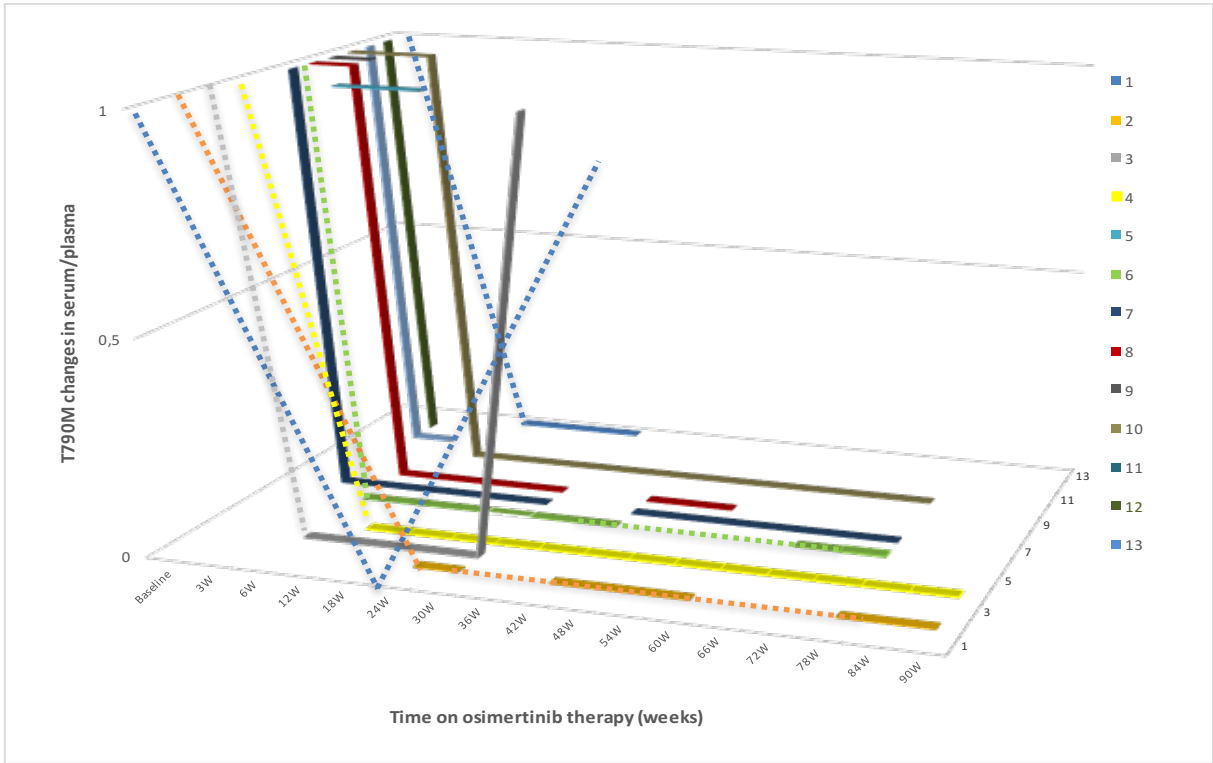
**Figura 16.-** Respuesta radiográfica de acuerdo con los criterios RECIST 1.1 en 13 pacientes con *mEGFR* tratados con osimertinib tras resistencia adquirida a ITQ mediada por la *mT790M* (198).



W, semanas de tratamiento

El tercer grupo incluyó 2 pacientes (15,4%) que presentaron una PD como mejor respuesta a osimertinib a pesar de detectarse una desaparición de la *mT790M* en sangre. La mSLP fue de 1,5 meses (IC95% NC-NC) en este subgrupo. Una paciente continuó con el tratamiento con osimertinib más allá de la PE radiológica, dado el beneficio clínico obtenido. La segunda paciente presentó una PE clínica y radiológica que llevó a interrumpir el tratamiento. A pesar de haber presentado la *mT790M* en suero, el análisis de la *mT790M* en la muestra de la rebiopsia pretratamiento de esta segunda paciente resultó negativa.

**Figura 17.-** Evolución de *T790M* en plasma/ suero durante el tratamiento con osimertinib en 13 pacientes con *mEGFR* tras resistencia adquirida a ITQ mediada por *T790M* (198).



W, semanas en tratamiento

Cada línea corresponde a un paciente. La línea quebrada corresponde con periodos de tiempo en que no se obtuvo resultado de las muestras en suero/plasma, debido a razones técnicas/ clínicas.

**Tabla 14.** Correlación entre respuesta clínica, radiológica y comportamiento de *T790M* con osimertinib

N	Respuesta radiológica	Respuesta clínica	Evolución de <i>T790M</i>
6	RP	4 mejora sintomática 2 estabilidad sintomática	6 negativización
4	EE	3 estabilidad sintomática 1 mejora sintomática	3 negativización 1 persistencia
3	PE	2 empeoramiento clínico 1 mejora sintomática	1 persistencia 1 negativización 1 negativización

EE, enfermedad estable; N, número de pacientes; RP, respuesta parcial; PE, progresión de enfermedad



## **DISCUSIÓN GLOBAL**





## 1.- Evaluación de nuevas opciones terapéuticas tras el fracaso del tratamiento con ITQ de primera generación.

*“La mejor estructura no garantizará los resultados ni el rendimiento. Pero la estructura equivocada es una garantía de fracaso” (Peter Ferdinand Drucker, economista, 1909-2005).*

Un ejemplo claro de la afirmación anterior lo tenemos en el abordaje terapéutico de los pacientes con *mEGFR* en el momento de la adquisición de la resistencia a los ITQ. A pesar del conocimiento exhaustivo de los mecanismos que subyacen en la resistencia adquirida a los ITQ en pacientes con *mEGFR*, la estrategia terapéutica de combinar diversos fármacos con los ITQ, en un intento de mantener la inhibición de las clonas aún dependientes de EGFR y revertir el mecanismo de resistencia adquirida, ha supuesto un fracaso en la mayoría de estos ensayos clínicos. Las limitaciones de los estudios en los que se evaluaron estas combinaciones farmacológicas fueron las siguientes: tamaño muestral pequeño, inclusión de pacientes no necesariamente portadores de *mEGFR* sino con beneficio demostrado a ITQ en función de los criterios de Jackman y la toxicidad excesiva derivada de dichas combinaciones, que no permitía su recomendación en los pacientes (88). Además, debemos considerar que, a pesar del conocimiento de los mecanismos de resistencia, la mayoría de estos estudios no los evaluaron de una manera formal para detectar su presencia antes de iniciar la combinación. Todas estas razones pudieron tener un mayor o menor impacto en la justificación de las TR inferiores al 10% y SLP inferiores a los 4 meses en la mayoría de estos estudios.

La alteración de la vía PI3K/AKT/*mTOR* es uno de los mecanismos implicados en la resistencia a los ITQ. En modelos preclínicos, la alteración en esta vía de señalización se asoció a la resistencia primaria a ITQ (199,200). Hay también evidencia preclínica de que los inhibidores de *mTOR* restablecen la sensibilidad a ITQ (201). En líneas celulares se demostró que existía sinergia entre ambos tratamientos, y estos resultados justificaron la evaluación de la combinación de ambos tratamientos.

Estudios previos habían evaluado la combinación de ITQ con inhibidores de *mTOR*. Un estudio fase II evaluó la combinación de gefitinib y everolimus en una cohorte de pacientes con CNMP (n=62), con enfermedad avanzada, divididos en dos grupos: pacientes previamente tratados (n=31) y pacientes sin tratamiento previo (n=31) (153). Este estudio demostró una TR del 13% (IC95%, 5-21), resultado que no alcanzó el objetivo de respuesta previsto, que se había calculado en un 19%. La SLP fue de 4 meses (1-26) y la mSG fue de 12 meses (grupo previamente tratado, 11 meses; grupo sin tratamiento previo, 27 meses). Las toxicidades más frecuentes fueron el *rash*, la diarrea, la estomatitis y la astenia. Trece pacientes experimentaron toxicidad no hematológica

de grado  $\geq 3$  (diarrea, 6%; estomatitis, 2%; anorexia y astenia, 2%, hiponatremia, 8%). La toxicidad hematológica de grado  $\geq 3$  se presentó en forma de anemia (2%) y linfopenia (21%). La tasa de reducción de dosis fue del 11% y la tasa de interrupción definitiva del tratamiento por toxicidad fue del 31%. Se realizaron estudios moleculares en las muestras previas al inicio de tratamiento (*mEGFR*, n=59; *mKRAS*, n=55). Tres (5,1%) y 16 (29%) pacientes resultaron portadores de *mEGFR* y *mKRAS*, respectivamente. Dos de los 8 pacientes con RP fueron portadores de *mKRAS*. Tres pacientes con *mEGFR* respondieron al combinación, como cabía esperar al incluir el tratamiento un ITQ.

**Tabla 15.-** Resultados de eficacia y toxicidad de estudios de combinación de ITQ e inhibidores de mTOR.

Combinación	n	TR	TCE	SLP	SG	Toxicidad $\geq 3$	Otros	Correlación molecular
gefitinib + everolimus <i>Price 2010</i>	62	13% <b>(19%)</b>	80,6%	4 m	12 m	Grado $\geq 3$ : 21% Todos los grados: rash 60%; diarrea 56% estomatitis 52%; anorexia 18%; astenia 45%; hiponatremia 10%; anemia 8%; linfopenia 23%	reducción de dosis 11%; interrupción de tratamiento 31%	<i>mKRAS</i> 29%; <i>mEGFR</i> 4,8% RP: 2 <i>mKRAS</i> ; 3 <i>mEGFR</i> ; 5 sin alteración
	31, con tratamiento previo	9,7%	64,7%	NC	11 m			
	31, sin tratamiento previo	16,1%	77,1%	NC	27 m			
erlotinib+ everolimus vs. erlotinib <i>Besse 2014</i>	66, erlotinib+ everolimus	12,1%	39,4% <b>(40%)</b>	2,9 m	9,1 m	Grado $\geq 3$ : 72,2% Todos los grados: diarrea 72,7%; estomatitis 72,7%; rash 53%	reducción de dosis 57,6%; interrupción de tratamiento 18,5%	NC
	67, erlotinib	10,4%	28,40%	2 m	9,7 m	Grado $\geq 3$ 32,3%. Todos los grados: diarrea 55,4%; estomatitis 23,1%; rash 46,2%	reducción de dosis 10,6%; interrupción de tratamiento 4,6%	NC
afatinib +sirolimus <i>Moran 2017</i>	39	5,1%	59%	3,4 m	NC	Grado $\geq 3$ : 61,6% Todos los grados: diarrea 95%; estomatitis 20,5%; inflamación mucosa 61,5% rash 53,8%	reducción de dosis 25,6%; interrupción de tratamiento 23,1%	RP confirmadas 5,1% RP no confirmadas 7,7% Niveles de dosis : Afa 30y sir 5 y afa 40 y sir 5 Perfil molecular <i>del19</i> , <i>del19+T790M</i> suero; <i>del19+T790M</i> en tejido, no detección de <i>mEGFR</i> ni <i>T790M</i> en suero

afa, afatinib, *del19*, deleción exón 19; g, grado; m, meses; *mEGFR*, mutaciones de *EGFR*; n, número de paciente; NC, no comunicado; RP, respuesta parcial, SG, supervivencia global; siro, sirolimus, SLP, supervivencia libre de progresión TCE, tasa de control de enfermedad, TR, tasa de respuesta

Otro estudio fase II evaluó la eficacia y seguridad de la combinación de everolimus y erlotinib (n=66) vs. erlotinib (n=67) en pacientes con CNMP avanzado tratado con, al menos, una línea de tratamiento de QT previa (202). La TCE a los 3 meses (objetivo principal del estudio) resultó de 39,4% y 28,4%, respectivamente. La probabilidad de una diferencia en la TCE a 3 meses  $\geq 15\%$  se estimó en 29,8%, resultado inferior al 40% esperado. La TR fue del 12,1% y 10,4%, respectivamente. La mSLP fue de 2,9 meses (IC95%, 2,4-3,9) y 2 meses (IC95%, 1,1-2,8; HR,

0,77; IC95% 0,5-1,2), respectivamente. La mSG fue de 9,1 meses (IC95%, 7,5-11,1) con la combinación vs. 9,7 meses (IC95%, 6,9-13,7) con erlotinib.

En términos de toxicidad, todos los pacientes presentaron al menos un efecto adverso. Los efectos adversos más frecuentes con la combinación y con erlotinib fueron la diarrea (72,7% vs. 55,4%), la estomatitis (72,7% vs. 23,1%) y el *rash* (53% vs. 46,2%). La toxicidad de grado  $\geq 3$  apareció en un 72,7 y un 32,3% de los casos, respectivamente. Las reducciones e interrupciones de dosis fueron más frecuentes con la combinación (57,6% y 10,6%) frente a erlotinib (18,5% y 4,6%). Este estudio no evaluó las posibles alteraciones moleculares subyacentes. De acuerdo con los resultados de este estudio el exceso de toxicidad y la ausencia de eficacia de la combinación respecto a erlotinib, no justificaban estudios adicionales, al menos en pacientes sin selección molecular. Todos los datos preclínicos y clínicos previos proceden de modelos preclínicos y de pacientes no seleccionados de acuerdo a la presencia de las *mEGFR*.

Sirolimus es un antibiótico de la familia de los macrólidos con propiedades inhibitorias en la vía de *mTOR*. Sirolimus también inhibe la angiogénesis y la proliferación de células endoteliales *in vitro* e *in vivo* (203–205). Datos preclínicos demostraron que la combinación de afatinib y sirolimus era capaz de producir regresiones casi completas de tumores con *L858R/T790M* en modelos animales y que esta respuesta se asociaba a una disminución de la fosforilación de la proteína S6, que es un biomarcador de la vía de *mTOR* (31).

Planteamos la hipótesis de que la inhibición conjunta de las vías de EGFR y PI3K/AKT/mTOR podría tener un efecto antitumoral aditivo o sinérgico. Por ello, nuestro estudio se diseñó como un estudio fase IB y evaluó la combinación de afatinib y sirolimus en una población de pacientes con CNMP con *mEGFR* y/o en progresión a erlotinib o gefitinib, después de haber conseguido respuesta o estabilización con estos ITQ de primera generación. Los resultados de seguridad demostraron que la DMT fue afatinib 30 mg/sirolimus 1 mg, que representó la dosis mínima evaluada en este estudio. Las TLD fueron la diarrea y la inflamación mucosa. Los efectos adversos más frecuentes fueron la diarrea, la inflamación mucosa, el *rash* y la astenia con una frecuencia comparable en los diferentes niveles de dosis. El perfil de toxicidad individual de afatinib y sirolimus fue el esperable. No obstante, la tasa de efectos adversos graves de la combinación fue muy superior a la esperada en función de otros estudios de afatinib en monoterapia o en combinación con otros fármacos. La frecuencia y severidad de los efectos adversos, incluso en el nivel de DMT, implicó que la tolerancia a esta combinación fue muy pobre.

El estudio de farmacocinético no demostró interacciones relevantes entre afatinib y sirolimus que pudieran haber justificado un incremento de la toxicidad.

En términos de eficacia, la combinación de afatinib y sirolimus demostró una actividad antitumoral baja (12,8% de RP y 46,2% de EE). No obstante, la RP se observó en niveles de dosis superiores a los que asociaron una toxicidad excesiva. Estos datos de eficacia fueron similares a los obtenidos por otros estudios de monoterapia de afatinib.

El estudio LUX-LUNG 1 fue un estudio fase IIB/III que incluyó pacientes con adenocarcinoma de pulmón previamente tratados con ITQ de primera generación y que habían presentado progresión (n=585) (138). Se distribuyeron aleatoriamente (2:1) a recibir afatinib 50 mg/día o placebo. La determinación de las *mEGFR* no fue un criterio de inclusión. El tratamiento con afatinib demostró una actividad mayor frente a placebo en términos de TR y SLP (TR 7% vs. 0,5% y SLP 3,3 vs. 1,1 meses (HR; 0,38; p<0,0001) en afatinib y placebo, respectivamente). No obstante, este beneficio no se observó en SG (mediana de 10 vs. 12 meses en afatinib y placebo, respectivamente). La ausencia de diferencia en beneficio en SG podría explicarse por el mayor número de tratamientos posteriores recibidos por los pacientes asignados a la rama de placebo, incluidos los ITQ.

El estudio LUX-LUNG 4 obtuvo resultados similares (206). Este estudio fase II incluyó 62 pacientes japoneses previamente tratados con erlotinib o gefitinib que recibieron afatinib 50 mg/día y demostró una TR del 8%, una TCE del 66% y una SLP de 4,4 meses.

Un estudio fase II exploró la actividad de afatinib en pacientes con adenocarcinoma de pulmón previamente tratados con ITQ y que fuesen portadores de *mEGFR* (n=32), amplificación de EGFR evaluado por FISH (n=2) o *mHER2* (n=7)(139). Todos los pacientes recibieron tratamiento con afatinib (50 mg/día). El grupo de pacientes con *mEGFR* presentó una TR del 3,2%, una TCE de 53% con una mDR de 4,8 meses y una SLP de 3,65 meses.

Considerando los resultados de estos estudios de afatinib en monoterapia (tabla 16), incluso en población seleccionada por la presencia de *mEGFR*, la combinación de afatinib y sirolimus no aportó ningún beneficio adicional en términos de eficacia, a expensas de un incremento notable de la toxicidad (138,139). Al analizar los resultados de eficacia de otros estudios de combinación de inhibidores de *mTOR* con inhibidores de primera generación, la administración de afatinib y sirolimus tampoco incrementó las TR, TCE ni SLP respecto a las que se obtuvieron en esos estudios (153,202). Debemos considerar, no obstante, que la intensidad de dosis administrada de la combinación de afatinib y sirolimus fue muy inferior a la inicialmente prevista a causa de los efectos adversos debidos al tratamiento. De nuevo, el estudio de farmacocinético no demostró

interacciones relevantes entre afatinib y sirolimus que pudieran haber justificado esta pobre actividad clínica.

**Tabla 16.- Resultados de eficacia y toxicidad de estudios de afatinib en monoterapia.**

Combinación	n	TR	TCE	SLP	SG	Toxicidad ≥g3	Otros	Correlación molecular
afatinib vs. placebo LUX Lung 1 Miller 2012	390, afatinib 50 mg	7%	58%	3,3 m	10 m	Grado ≥3: 60% Todos los grados: rash 78%; diarrea 87% estomatitis 61%;	reducción de dosis 38%; interrupción de tratamiento 18,4%	mEGFR 62/93 (67%) mSLP 3,3 m vs. 2,8 m en EGFR nativo
	195, placebo	0,5%	18%	1,1 m	12 m	Grado ≥3: 15% Todos los grados: rash 16%; diarrea 9% estomatitis 3%;	reducción de dosis NC; interrupción de tratamiento 1NC	mEGFR 34/48 (71%) mSLP 1,0 m vs. 1,8 m en EGFR nativo
afatinib LUX Lung 4 Katakami 2013	62 (72,6% mEGFR)	8%	66%	4,4	19 m	Grado ≥3: 79% Todos los grados: diarrea 100%; estomatitis 85,5%; rash 91,9%	reducción de dosis 57,6%; interrupción de tratamiento 18,5%	2 de 5 RP: <i>del19+T790M</i> y <i>L858R+ T790M</i>
afatinib <i>De Grève, Moran 2015</i>	32, mEGFR 2, aEGFR 7, mHER2	3%	53%	3,6	NC	Grado ≥ 3 NC. Todos los grados: diarrea 95%; estomatitis 46%; rash 80%	reducción de dosis 44%; interrupción de tratamiento 20%	NC
afatinib +sirolimus <i>Moran 2017</i>	39	5,1%	59%	3,4 m	NC	Grado ≥3: 61,6% Todos los grados: diarrea 95%; estomatitis 20,5%; inflamación mucosa 61,5% rash 53,8%	reducción de dosis 25,6%; interrupción de tratamiento 23,1%	RP confirmadas 5,1% RP no confirmadas 7,7% Niveles de dosis : Afa 30y sir 5 y afa 40 y sir 5 Perfil molecular <i>del19, del19+T790M</i> suero; <i>del19+T790M</i> en tejido, no detección de mEGFR ni T790M en suero

a, amplificación; afa, afatinib, *del19*, deleción exón 19; g, grado; m, meses; mEGFR, mutaciones de EGFR; n, número de paciente; NC, no comunicado; RP, respuesta parcial, SG, supervivencia global; siro, sirolimus, SLP, supervivencia libre de progresión TCE, tasa de control de enfermedad, TR, tasa de respuesta

No se encontró ninguna correlación entre el perfil molecular y el efecto del tratamiento; sin embargo, las limitaciones en este estudio incluyen el tamaño de muestra pequeño y la ausencia de evaluación formal de la mT790M en el momento de la progresión e inclusión en el estudio. Por otra parte, en el momento de desarrollo del presente estudio no existían aún datos de eficacia de los ITQ de tercera generación (166,172). De otro modo, la detección de la mT790M hubiese sido el objetivo principal a evaluar en estos pacientes a fin de poder recomendar el tratamiento con un inhibidor de tercera generación.

De modo global, la toxicidad de la combinación de afatinib y sirolimus, junto con la imposibilidad de administrar una dosis de ambos fármacos potencialmente más activa de la que se pudo llegar a administrar, más los resultados pobres de eficacia obtenidos, no justifican nuevos estudios en población seleccionada o no seleccionada que evalúen la combinación de este tipo de fármacos.

## 2.- Detección de la *mT790M* en suero/ plasma y correlación con la respuesta clínica y radiológica en pacientes con *mEGFR* tratados con ITQ de tercera generación.

Como ya se ha comentado en la introducción, se han descrito diversos mecanismos de resistencia a los ITQ de primera y segunda generación en pacientes con *mEGFR*. La adquisición de la *mT790M* es el mecanismo más frecuente, que aparece en la mitad de los pacientes (86). Tras la aprobación de osimertinib en pacientes previamente tratados conforme a los resultados del programa AURA, la detección de la *mT790M* cobra especial interés (172,188). La biopsia líquida en este contexto clínico tiene una gran importancia, dada la potencial dificultad en la obtención de nuevas muestras de tejido (183–186). Un hecho muy relevante es que la información de la biopsia líquida puede superar a la información unidimensional que se obtiene de la muestra de tejido, y que no es capaz de representar la heterogeneidad espacio-temporal de la enfermedad y su evolución en el curso del tratamiento (86,179–182). En estudios previos, la *mT790M* se había encontrado de forma exclusiva en plasma en 31% y 35% de pacientes cuyo resultado había sido negativo en el tejido (184,189). Por otra parte, la biopsia líquida presenta el atractivo de su uso potencial para monitorizar la eficacia de un tratamiento y la detección precoz de mecanismos de resistencia, todo ello con una técnica mínimamente invasiva para el paciente (Tabla 17).

Todos los pacientes en nuestro estudio se incluyeron en función del resultado positivo de la *mT790M* en suero/plasma. La rebiopsia fue posible únicamente en 6 pacientes (46,1%) con un resultado confirmatorio de la *mT790M* positivo en tejido en 3 de ellos. En nuestra serie, 8 pacientes que se beneficiaron de tratamiento con osimertinib no fueron incluidos en este estudio dado el resultado negativo basal de la *mT790M* en suero/plasma. Además, los resultados de suero/plasma resultaron adecuados para la selección del tratamiento en 11 de 13 pacientes (85%) independientemente del resultado en tejido. Estos resultados refuerzan la necesidad de obtener una nueva muestra de tumor en caso de un resultado negativo en la biopsia líquida, así como la posibilidad de obviar dicho procedimiento ante un resultado en suero/plasma positivo, tal y como ha sido propuesto por otros autores (189).

**Tabla 17.-** Ventajas y desventajas de las determinaciones de *mEGFR* en muestras de sangre frente al tejido.

Ventajas de la determinación de las <i>mEGFR</i> en muestra de sangre	Desventajas de la determinación de <i>mEGFR</i> en muestra de sangre
Concordancia con resultados en tejido. (sensibilidad 61-93%)	Falsos negativos hasta en un 30% de los casos
Información dinámica del tumor primario y metástasis	
Monitorización de eficacia de tratamiento	
Monitorización de aparición de resistencias	
Comodidad para el paciente	
Prevención de los riesgos asociados a procedimientos invasivos	
Menor tiempo hasta resultados (3 días frente a 27)	

Diversos estudios han demostrado la utilidad de la biopsia líquida en la monitorización de los cambios de las *mEGFR* a lo largo del tratamiento con ITQ y en la detección de la *mT790M* en el momento de la progresión (177,195). No obstante, hasta el momento de la publicación del presente artículo, no se habían publicado resultados de la monitorización de la *mT790M* en muestra de biopsia líquida en pacientes tratados con osimertinib. Se habían publicado resultados de detección de la *mT790M* en muestras de sangre y orina en pacientes tratados con rociletinib (196). Dicho estudio demostró que los niveles de la *mT790M* disminuían en sangre y orina poco después del inicio de tratamiento con rociletinib; no obstante, no existía un seguimiento longitudinal de los cambios en la *mT790M* durante el tiempo de tratamiento (196,197).

Recientemente, se han publicado resultados de los mecanismos de resistencia asociados al tratamiento con osimertinib

Un primer estudio presentó resultados de los mecanismos de resistencia en pacientes incluidos en el estudio AURA (192). Se obtuvieron muestras de tejido previas al inicio del tratamiento con osimertinib y de plasma a nivel basal y cada 6 semanas durante el tratamiento. La realización de una nueva biopsia en el momento de la progresión fue opcional. Se evaluaron los mecanismos de resistencia, incluidas las *mEGFR*, *T790M*, *C797S* y se evaluó su asociación con la SG, SLP y SG a partir de la PE a osimertinib (supervivencia postprogresión, SPP). Cincuenta y tres de los 71 pacientes fueron elegibles para el análisis. La mSLP y SG fue de 11,1 meses (IC95%, 8,1-13,9) y 16,9 (IC95%, 11,7-29,1), respectivamente. La mSPP fue de 5,4 meses (IC95%; 4.1-10,0). El análisis en las muestras de plasma a la progresión (n=40) demostró la presencia de la *mT790M* en un 30% (n=12); 4 presentaron *C797S* de forma concomitante. Los pacientes en los que no se



encontró la *mEGFR* antes del tratamiento presentaron la mejor SG y SPP (22,4 meses; IC95%, 15,6-NA; 10,8 meses; IC95% 7,2-NA). La pérdida de la *mT790M* junto con la presencia de *mEGFR* se asoció con la SLP más corta (2,2 meses; IC95%, 1,3-NA). En muestras de tejido (n=22), se describieron los siguientes mecanismos de resistencia a osimertinib: transformación a CMP (n=1); transformación a carcinoma escamoso (n=1); *T790M* (50%, n=9 de 18); *C797S* (17%, n=2 de 12); amplificación de *MET* (50%, n=5 de 10); *mBRAF* (8%, n=1 de 13) y *mKRAS* (8%, n=1 de 13). Por tanto, en el momento de la progresión a osimertinib, la mitad de los pacientes presentarán una pérdida de la *mT790M*.

En otra cohorte de pacientes con la *mT790M* tratados con osimertinib (n=143 cohorte multiinstitucional; n= 110 cohorte de validación con muestras de plasma seriadas de pacientes incluidos en el estudio AURA) se evaluaron los mecanismos de resistencia en biopsia tumoral y en cfDNA (193). De los 143 pacientes, 41 (28,7%) disponían de muestra de rebiopsia. El estudio de las muestras mediante NGS demostró la persistencia de la *mT790M* en 13 pacientes (32%); junto con *C797S* en 9 pacientes (22%). Se identificaron diversos mecanismos de resistencia en las muestras de los 28 pacientes que resultaron *T790M* negativa a la resistencia: transformación a CMP (n=6); amplificación de *MET* (n=4); *mBRAF* (n=2); *mPI3K* (n=1); *mKRAS* (n=1); fusiones con otros genes (n=3). El tiempo hasta la interrupción del tratamiento fue menor en los pacientes que presentaron la *mT790M* a la progresión (6,1 vs 15,2 meses); hecho que sugería una emergencia de clonas preexistentes de la *mT790M*. El análisis en las muestras de plasma demostró la pérdida de la *mT790M* en 52 (47%) pacientes y su persistencia en 58 (53%). Los pacientes con pérdida de la *mT790M* en plasma presentaron un tiempo hasta la interrupción del tratamiento menor que los que la mantuvieron (5,5 vs 12,6 meses; p=0,006).

De estos resultados los autores concluyeron la existencia de dos tipos de patrones de resistencia producida por la *mT790M*: **a)** la *mT790M* como mecanismo dominante y **b)** la *mT790M* como mecanismo no dominante en el contexto de una heterogeneidad de mecanismos de resistencia. En el primero caso, los pacientes tendrían una respuesta más duradera a osimertinib; mientras que, en el segundo, la inhibición de la *mT790M* conseguiría un beneficio transitorio y menos duradero. Este segundo patrón implicaría que los mecanismos diferentes a la *mT790M* no se adquieren durante el tratamiento con osimertinib, sino que coexisten con la *mT790M* y emergen como resultado del tratamiento. Además, un porcentaje elevado de pacientes (67%) con la *mT790M* no detectable, desarrolla mecanismos de resistencia alternativos e identificables con técnicas de NGS.

Recientemente, se han presentado los resultados de los mecanismos de resistencia en 73 pacientes tratados con osimertinib a la progresión de la enfermedad a un ITQ de primera/ segunda

generación dentro del estudio AURA 3. Todos ellos tenían la *mT790M* en tejido y disponían de una muestra de plasma previo al inicio de osimertinib y a la progresión al mismo (194). Se evaluaron los mecanismos de resistencia en muestras de plasma por NGS (Guardant360 assay) con los siguientes resultados: **a**) adquisición de nuevas mutaciones (21%, *C797S*, *C797X*), **b**) amplificación de *MET* (19%), **c**) amplificación de *HER2* [5%, con aparición simultánea de *L792X+C797X*+amplificación de *PI3KCA* (1%), *G796S*+amplificación de *HER2* (15%) y amplificación de *HER2* exclusiva (1%]; **d**) amplificación/ mutación de *PI3KCA* (5%), **e**) mutación de *BRAF V600E* (3%) y **f**) fusiones oncogénicas adquiridas (1%) Por tanto, a la progresión a osimertinib, la mitad de los pacientes presentaron una pérdida de la *mT790M*. En este estudio, la mSLP de los pacientes que presentaron pérdida de la *mT790M* fue levemente inferior a la de aquellos pacientes con persistencia de la *mT790M* (5,5 meses (IC95%, 4,14-9,69) vs. 7,1 meses (IC95%, 5,62-10,97) (194)

De nuevo, no se han presentado datos de los cambios longitudinales de estos mecanismos de resistencia durante el tratamiento con osimertinib. En nuestro estudio, las muestras de sangre se obtuvieron de forma periódica durante el tratamiento con osimertinib. Según los resultados de nuestro estudio, la monitorización de la *mT790M* podría ayudar a predecir qué pacientes responderán o no al tratamiento. No obstante, no podemos concluir de una manera sólida el papel predictivo de la progresión según la reaparición de la *mT790M* en sangre después de un periodo de beneficio clínico, dado que, a pesar de un seguimiento de 45 meses, una alta proporción de pacientes no había progresado y estaba aún en tratamiento en el momento del análisis. Así pues, podemos generar la hipótesis de que, en el momento de la progresión a osimertinib, un porcentaje de pacientes desarrollará otros mecanismos de resistencia diferentes a la *mT790M* (192,207).

En relación a la paciente de nuestra serie con la *mT790* positiva en suero y negativa en tejido, la negativización en suero tras el inicio de tratamiento con osimertinib, a pesar de la progresión clínica y radiológica, podría explicarse por la presencia de un clon minoritario en coexistencia con otros mecanismos de resistencia. Previamente, ya se había publicado un patrón molecular similar con un menor beneficio de osimertinib respecto a los pacientes con la *mT790M* positiva en plasma y tejido o positiva en tejido y negativa en plasma (189)

En relación a la eficacia de osimertinib en términos de respuesta, en los pacientes incluidos en nuestro estudio, la TR fue inferior a la obtenida en estudios previos, posiblemente por incluir pacientes con PS2 y con un mayor número de tratamientos previos (166,172). Nuestro estudio identificó un grupo de pacientes que presentó una negativización de la *mT790M* en suero/plasma, en ocasiones temprana. La mayoría de los pacientes de este grupo presentaron respuesta o estabilización de la enfermedad. Otro grupo de pacientes presentó PE radiológica con un beneficio

clínico del tratamiento con osimertinib administrado más allá de la progresión en una proporción muy pequeña de los pacientes. Los pacientes incluidos en este segundo grupo presentaron persistencia de la *mT790M* en muestra de suero/plasma. Un tercer grupo de pacientes incluyó pacientes que presentaron una negativización de la *mT790M* a pesar de presentar progresión de la enfermedad. Otros estudios no han evaluado la respuesta radiológica de los pacientes a osimertinib en función de la evolución de la *mT790M* en la muestra de sangre (216-218, 220, 221). Tampoco se han publicado resultados de la respuesta clínica en los pacientes que han recibido tratamiento con osimertinib de acuerdo con la evolución de la *mT790M* en la muestra de la biopsia líquida (216-218, 220, 221).

Nuestros resultados de SLP son opuestos a los presentados por otros grupos en que la SLP fue inferior en aquellos pacientes con pérdida de la *mT790M* a la progresión a osimertinib respecto a los que se seguía detectando (193,194). No podemos excluir que el tamaño de muestra pequeño de nuestra serie haya podido contribuir a este resultado.

Por otra parte, la SG de nuestra serie es mayor que la previamente comunicada. Posibles explicaciones a estas diferencias podemos encontrarlas en el elevado número de pacientes con diagnóstico inicial como estadio local (30%), el número medio de localizaciones M1 (1,6) y la elevada proporción de pacientes con afectación pulmonar exclusiva (46,1%). Además, cabe destacar la supervivencia individual próxima a los 12 años de 1 paciente en el momento del análisis, dato que, en esta cohorte pequeña de pacientes, podría haber influido en los resultados de la SG.

Se han empleado diferentes técnicas para el aislamiento de cfDNA (172,174–176). En conjunto, las limitaciones que comportan algunas de ellas son el coste, el tiempo hasta la obtención de los resultados, la exactitud y el contexto clínico en que han sido utilizados. En el mejor de los casos, los resultados obtenidos con estas técnicas deberían ser validados de forma prospectiva y comparativa con los resultados en tejido; no obstante, la validación retrospectiva de los resultados del suero o plasma obtenidos en estudios prospectivos se consideran aceptables (177). En general, estas técnicas empleadas presentan una alta especificidad, y con un valor predictivo alto, aunque sea a expensas de una sensibilidad menor (174).

En nuestro estudio, empleamos la determinación en suero y plasma de la *mT790M* basada en PNA-PCR. Las ventajas de esta técnica fueron la disponibilidad de la misma, su coste y el reducido tiempo hasta la obtención de resultados (media de 3 días). Es, además, una técnica validada de forma retrospectiva en estudios con obtención de muestra de sangre de forma prospectiva (208).

Nuestro estudio incluyó las siguientes limitaciones: el escaso número de pacientes, la ausencia de evaluación de otros mecanismos de resistencia diferentes a la *mT790M*, y la falta de progresión de un porcentaje significativo de los pacientes del estudio, incluso con un seguimiento prolongado, hecho que no permite conocer aún los mecanismos de resistencia a la progresión a osimertinib.



## **CONCLUSIONES**



1.- Afatinib en combinación con sirolimus ha demostrado actividad antitumoral. No obstante, la respuesta en pacientes con CNMP con *mEGFR* en progresión a ITQ de primera generación fue pobre y la toxicidad elevada. Por ello, el desarrollo de nuevos estudios con esta combinación no está justificado.

1.1.- La combinación de afatinib y sirolimus asoció una alta tasa de efectos adversos. Dicha toxicidad no tuvo relación con la existencia de interacción farmacocinética entre ambos fármacos.

1.2.- La respuesta tumoral en pacientes con CNMP con *mEGFR* en progresión a ITQ de primera generación fue similar a la obtenida con afatinib en monoterapia, y se produjo administrando una dosis que excedía la máxima tolerable.

2.- La monitorización de la *mT790M* en muestras de suero/plasma es factible.

2.1.- El comportamiento dinámico (desaparición o persistencia) de la *mT790M* en el suero/plasma en pacientes con CNMP con *mEGFR* y resistencia adquirida a ITQ de primera y segunda generación producida por la *mT790M* es un marcador de respuesta clínica y radiológica, o ausencia de ellas, a osimertinib.

2.2.- La reaparición de la *mT790M* en suero/plasma, en aquellos casos en que había desaparecido durante el tratamiento, podría ser un marcador de resistencia a osimertinib en una proporción de pacientes cuyo tumor no desarrolla otros mecanismos adicionales de resistencia.





## **LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURA**



## **1.- Evaluación de nuevas opciones terapéuticas tras el fracaso del tratamiento con ITQ de primera generación.**

[A phase IB trial of continuous once-daily oral afatinib plus sirolimus in patients with epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small cell lung cancer and/or disease progression following prior erlotinib or gefitinib. \*Lung Cancer\* 2017;108:154-60.](#)

La aparición de los inhibidores de tercera generación ha modificado el algoritmo de tratamiento para los pacientes que presentan resistencia a los ITQ de primera y segunda generación producida por la aparición de la *mT790M*. Pero no podemos olvidar que un porcentaje sustancial de pacientes van a presentar una resistencia por otro mecanismo independiente a la *mT790M*. Para estos pacientes, la alternativa a recomendar es el tratamiento con QT. A pesar del gran esfuerzo en el desarrollo de ensayos clínicos de combinación, la mayoría de ellos han resultado negativos.

Deberíamos intentar subsanar los errores del pasado en el diseño de ensayos clínicos y considerar ensayos que evalúen el mecanismo de resistencia de una forma prospectiva en el momento de la progresión.

También deberíamos plantear la inclusión, no sólo de pacientes con *mEGFR*, sino también con *m-iEGFR*. Las técnicas de diagnóstico molecular actuales permiten la identificación de este segundo grupo de pacientes del que no disponemos de información, dada su exclusión de estudios previos.

## **2.- Detección de la *mT790M* en suero/ plasma y correlación con respuesta clínica y radiológica en pacientes con *mEGFR* tratados con osimertinib.**

[Monitoring of \*EGFR\*-T790M mutation in serum/plasma for prediction of response to third generation inhibitors. \*Oncotarget\* 2018, 9\(43\):27074-86.](#)

La biopsia líquida representa un método alternativo a la muestra tumoral en la identificación y monitorización de mecanismos de resistencia en pacientes con *mEGFR*. En concreto, la identificación de los mecanismos de resistencia a osimertinib permitirá la posibilidad de seleccionar a aquellos pacientes con una probabilidad de respuesta más corta a este tratamiento y poder plantear un cambio de estrategia terapéutica. Ésta incluiría la recomendación de QT u otras opciones disponibles en la actualidad en régimen de ensayos clínicos. Dicha individualización del

tratamiento podría tener un impacto positivo en la sostenibilidad del sistema sanitario, además de incrementar el conocimiento de los mecanismos de resistencia.

En nuestro trabajo, la mayoría de los pacientes no habían progresado en el momento del análisis, a pesar de un tiempo de seguimiento largo. Se ha continuado con la extracción de muestras de sangre de estos pacientes y se han realizado nuevas biopsias en alguno de ellos en el momento de la progresión. Hemos incorporado pacientes adicionales a este estudio, a fin de aumentar el tamaño de la muestra. Planteamos la realización de biopsias a la progresión en todos aquellos pacientes en los que sea posible. Con estas muestras adicionales pretendemos dar respuesta a las cuestiones que han quedado pendientes en nuestro estudio: aumento del número de pacientes, un seguimiento completo, la eficacia del tratamiento en la cohorte completa de pacientes y la evaluación de otros mecanismos resistencia adicionales a la *mT790M*, en muestra de sangre y tejido (ésta última cuando esté disponible).

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Las Cifras del Cáncer en España 2014. *Soc Española Oncol Médica* 2014;1–24.
2. Galceran J, Amejeide A, Carulla M, Mateps A, Quirós JR, Alemán A, et al. Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa. *Red Española Regist Cáncer*. 2014;1–58.
3. Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Park J, Salonga D, et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin Cancer Res*. 2001;7(7):1850–5.
4. Yarden Y, Sliwkowski. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:127–37.
5. Pawson T, Gish GD, Nash P. SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol*. 2001;11(12):504–11.
6. Lemmon M a, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*. 2010; 141(7):1117–34.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144(5):646–74.
8. Barker AJ, Gibson KH, Grundy W, Godfrey AA, Barlow JJ, Healy MP, et al. Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001;11(14):1911–4.
9. Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Barker AJ, et al. ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res*. 2002;62(20):5749–54.
10. Nicholson R., Gee JM., Harper M. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001;37:9–15.
11. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):341–54.
12. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *N Engl J Med*. 2005;353(2):172–87.



13. Ohsaki Y, Tanno S, Fujita Y, Toyoshima E, Fujiuchi S, Nishigaki Y, et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients with p53 overexpression. *Oncol Rep.*;7(3):603–7.
14. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Di Maria M V., Veve R, Bremnes RM, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: Correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol.* 2003;21(20):3798–807.
15. Taguchi T, Cheng GZ, Bell DW, Balsara B, Liu Z, Siegfried JM, et al. Combined chromosome microdissection and comparative genomic hybridization detect multiple sites of amplification DNA in a human lung carcinoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997; 20(2):208–12.
16. Moyer JD, Barbacci EG, Iwata KK, Arnold L, Boman B, Cunningham A, et al. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res.* 1997;57(21):4838–48.
17. Pollack VA, Savage DM, Baker DA, Tsaparikos KE, Sloan DE, Moyer JD, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358,774: dynamics of receptor inhibition in situ and antitumor effects in athymic mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 291(2):739–48.
18. Sandler A. Clinical experience with the HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitor erlotinib. *Oncology (Williston Park)* 2003; 17(11 Suppl 12):17–22.
19. Perez-Soler R. The Role of Erlotinib (Tarceva, OSI 774) in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(12):4238S–4240S.
20. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353(2): 123–32.
21. Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, Kaukel E, Roubec J, De Rosa F, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: The Tarceva lung cancer investigation trial. *J Clin Oncol.* 2007; 25(12): 1545–52.
22. Herbst RS, Prager D, Hermann R, Fehrenbacher L, Johnson BE, Sandler A, et al. TRIBUTE: A Phase III Trial of Erlotinib Hydrochloride (OSI-774) Combined With

- Carboplatin and Paclitaxel Chemotherapy in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23(25): 5892–9.
23. Nakagawa K, Tamura T, Negoro S, Kudoh S, Yamamoto N, Yamamoto N, et al. Phase I pharmacokinetic trial of the selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib (“Iressa”, ZD1839) in Japanese patients with solid malignant tumors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2003;14(6):922–30.
  24. Ranson M, Hammond LA, Ferry D, Kris M, Tullo A, Murray PI, et al. ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: Results of a phase I trial. *J Clin Oncol*. 2002;20(9):2240–50.
  25. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(12):2237–46.
  26. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch, Jr TJ, Prager D, Belani CP, et al. Efficacy of Gefitinib, an Inhibitor of the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase, in Symptomatic Patients With Non–Small Cell Lung Cancer. *JAMA*. 2003;290(16):2149.
  27. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, et al. Gefitinib in Combination With Gemcitabine and Cisplatin in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Trial—INTACT 1. *J Clin Oncol*. 2004;22(5):777–84.
  28. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol*. 2004;22(5):785–94.
  29. Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, von Pawel J, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet*. 2005; 366(9496): 1527–37.
  30. Solca F, Dahl G, Zoephel A, Bader G, Sanderson M, Klein C, et al. Target Binding Properties and Cellular Activity of Afatinib (BIBW 2992), an Irreversible ErbB Family Blocker. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;343(2):342–50.
  31. Li D, Ambrogio L, Shimamura T, Kubo S, Takahashi M, Chirieac LR, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models.

- Oncogene [Internet]. 2008 Aug 7 [cited 2018 Mar 25];27(34):4702–11.
32. Regales L, Gong Y, Shen R, de Stanchina E, Vivanco I, Goel A, et al. Dual targeting of EGFR can overcome a major drug resistance mutation in mouse models of EGFR mutant lung cancer. *J Clin Invest*. 2009;119(10):3000–10.
  33. Metro G, Crinò L. The LUX-Lung clinical trial program of afatinib for non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011;11(5):673–82.
  34. Yap TA, Vidal L, Adam J, Stephens P, Spicer J, Shaw H, et al. Phase I trial of the irreversible EGFR and HER2 kinase inhibitor BIBW 2992 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2010;28(25):3965–72.
  35. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med*. 2004; 350(21):2129–39.
  36. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(36):13306–11.
  37. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004; 304(5676):1497–500.
  38. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-Sensitizing EGFR Mutations in Lung Cancer Activate Anti-Apoptotic Pathways. *Science*. 2004;305(2004):1163–7.
  39. Sharma S V., Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 1;7(3):169–81.
  40. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, et al. Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor and in KRAS Are Predictive and Prognostic Indicators in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer Treated With Chemotherapy Alone and in Combination With Erlotinib. *J Clin Oncol*. 2005; 23(25): 5900–9.
  41. Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, Horio Y, Hida T, Mori S, et al. Mutations of the

- Epidermal Growth Factor Receptor Gene Predict Prolonged Survival After Gefitinib Treatment in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer With Postoperative Recurrence. *J Clin Oncol.* 2005; 23(11):2513–20.
42. Riely GJ. Clinical Course of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer and Epidermal Growth Factor Receptor Exon 19 and Exon 21 Mutations Treated with Gefitinib or Erlotinib. *Clin Cancer Res.* 2006;12(3):839–44.
  43. Jackman DM, Yeap BY, Sequist L V, Lindeman N, Holmes AJ, Joshi VA, et al. Exon 19 Deletion Mutations of Epidermal Growth Factor Receptor Are Associated with Prolonged Survival in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Gefitinib or Erlotinib. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(13):3908–14.
  44. Taron M. Activating Mutations in the Tyrosine Kinase Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Are Associated with Improved Survival in Gefitinib-Treated Chemorefractory Lung Adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2005;11(16):5878–85.
  45. Cortes-Funes H, Gomez C, Rosell R, Valero P, Garcia-Giron C, Velasco A, et al. Epidermal growth factor receptor activating mutations in Spanish gefitinib-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol.* 2005;16(7):1081–6.
  46. Han S-W, Kim T-Y, Hwang PG, Jeong S, Kim J, Choi IS, et al. Predictive and Prognostic Impact of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Gefitinib. *J Clin Oncol.* 2005;23(11):2493–501. 8
  47. Takano T, Ohe Y, Sakamoto H, Tsuta K, Matsuno Y, Tateishi U, et al. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(28):6829-37.
  48. Jackman DM, Yeap BY, Sequist L V., Lindeman N, Holmes AJ, Joshi VA, et al. Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res.* 2006;12(13):3908–14.
  49. Tamura K, Okamoto I, Kashii T, Negoro S, Hirashima T, Kudoh S, et al. Multicentre prospective phase II trial of gefitinib for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations: results of the West Japan Thoracic Oncology Group trial (WJTOG0403). *Br J Cancer.* 2008; 98(5):907–14.
  50. Sequist L V, Martins RG, Spigel D, Grunberg SM, Spira A, Jänne PA, et al. First-Line

- Gefitinib in Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer Harboring Somatic EGFR Mutations. *J Clin Oncol*. 2008;26(15):2442–9.
51. Wu YL, Zhou C, Liang CK, Wu G, Liu X, Zhong Z, et al. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: Analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Ann Oncol*. 2015;26(9):1883–9.
  52. Wu Y-L, Zhou C, Hu C-P, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(2):213–22.
  53. Sequist L V., Yang JC-H, Yamamoto N, O’Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III Study of Afatinib or Cisplatin Plus Pemetrexed in Patients With Metastatic Lung Adenocarcinoma With EGFR Mutations. *J Clin Oncol*. 2013;31(27):3327–34.
  54. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012; 13(3):239–46.
  55. Zhou C, Wu Y-L, Chen G, Feng J, Liu X-Q, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2011;12(8):735–42.
  56. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or Chemotherapy for Non–Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *N Engl J Med*. 2010; 362(25):2380–8.
  57. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(2):121–8.
  58. Han JY, Park K, Kim SW, Lee DH, Kim HY, Kim HT, et al. First-SIGNAL: First-line single-agent irressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung. *J Clin Oncol*. 2012;30(10):1122–8.

59. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, et al. Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009; 361(10): 947–57.
60. Greulich H, Chen T-H, Feng W, Jänne PA, Alvarez J V., Zappaterra M, et al. Oncogenic Transformation by Inhibitor-Sensitive and -Resistant EGFR Mutants. Rosen N, editor. *PLoS Med*. 2005;2(11):e313.
61. Politi K. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev*. 2006;20(11):1496–510.
62. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, et al. Clinical and Biological Features Associated With Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Cancers. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2005;97(5):339–46.
63. He M, Capelletti M, Nafa K, Yun C-H, Arcila ME, Miller VA, et al. EGFR Exon 19 Insertions: A New Family of Sensitizing EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2012;18(6):1790–7.
64. Pan Y, Zhang Y, Li Y, Hu H, Wang L, Li H, et al. Prevalence, Clinicopathologic Characteristics, and Molecular Associations of EGFR Exon 20 Insertion Mutations in East Asian Patients with Lung Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(4):490-6.
65. Kancha RK, Peschel C, Duyster J. The Epidermal Growth Factor Receptor-L861Q Mutation Increases Kinase Activity without Leading to Enhanced Sensitivity Toward Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitors. *J Thorac Oncol*. 2011;6(2):387–92.
66. Costa C, Molina MA, Drozdowskyj A, Gimenez-Capitan A, Bertran-Alamillo J, Karachaliou N, et al. The Impact of EGFR T790M Mutations and BIM mRNA Expression on Outcome in Patients with EGFR-Mutant NSCLC Treated with Erlotinib or Chemotherapy in the Randomized Phase III EURTAC Trial. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(7):2001–10.
67. Su K-Y, Chen H-Y, Li K-C, Kuo M-L, Yang JC-H, Chan W-K, et al. Pretreatment Epidermal Growth Factor Receptor ( EGFR ) T790M Mutation Predicts Shorter EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Response Duration in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(4):433–40.
68. Inukai M, Toyooka S, Ito S, Asano H, Ichihara S, Soh J, et al. Presence of Epidermal

- Growth Factor Receptor Gene T790M Mutation as a Minor Clone in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 2006; 66(16):7854–8.
69. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain. Liu ET, editor. *PLoS Med.* 2005;2(3):e73.
  70. Lee JK, Shin JY, Kim S, Lee S, Park C, Kim JY, et al. Primary resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in patients with non-small-cell lung cancer harboring TKI-sensitive EGFR mutations: an exploratory study. *Ann Oncol.* 2013;24(8):2080–7.
  71. Yun C-H, Mengwasser KE, Toms A V., Woo MS, Greulich H, Wong K-K, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(6):2070–5.
  72. Yasuda H, Park E, Yun C-H, Sng NJ, Lucena-Araujo AR, Yeo W-L, et al. Structural, Biochemical, and Clinical Characterization of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Exon 20 Insertion Mutations in Lung Cancer. *Sci Transl Med.* 2013;5(216):216ra177-216ra177.
  73. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2009; 361(10):958–67.
  74. Rosell R, Karachaliou N. Large-scale screening for somatic mutations in lung cancer. *Lancet.* 2016;387(10026):1354–6.
  75. Yang JC-H, Wu Y-L, Schuler M, Sebastian M, Popat S, Yamamoto N, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol.* 2015;16(2):141–51.
  76. Takano T, Fukui T, Ohe Y, Tsuta K, Yamamoto S, Nokihara H, et al. EGFR Mutations Predict Survival Benefit From Gefitinib in Patients With Advanced Lung Adenocarcinoma: A Historical Comparison of Patients Treated Before and After Gefitinib Approval in Japan. *J Clin Oncol.* 2008;26(34):5589–95.
  77. Mccarthy AM, Kux L, Woodcock J, Woodcock J. *Federal Register.* 2012;77(80):53–4.

78. Bunn PA, Pisters K, Gore I, Croft EF, Devincenzo D, Stein D, Freivogel K SF, FR H. Long-term Tolerability Among IRESSA Clinical Access Program (ICAP) Participants in the United States (US). *UBC*. 2015;(1):5–6
79. Hirsch FR, Sequist L V., Gore I, Mooradian M, Simon G, Croft EF, et al. Long-term safety and survival with gefitinib in select patients with advanced non–small cell lung cancer: Results from the US IRESSA Clinical Access Program (ICAP). *Cancer*. 2018;124(11):2407–14.
80. Inoue A, Kobayashi K, Maemondo M, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin–paclitaxel for chemo-naïve non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002). *Ann Oncol*. 2013;24(1):54–9.
81. Moran T, Sequist L V. Timing of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Patients With Lung Cancer With EGFR Mutations. *J Clin Oncol*. 2012; 30 (27):3330–6.
82. Chaft JE, Oxnard GR, Sima CS, Kris MG, Miller VA, Riely GJ. Disease Flare after Tyrosine Kinase Inhibitor Discontinuation in Patients with EGFR-Mutant Lung Cancer and Acquired Resistance to Erlotinib or Gefitinib: Implications for Clinical Trial Design. *Clin Cancer Res*. 2011;17(19):6298–303.
83. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Joon OP, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007;316(5827):1039–43.
84. Niederst MJ, Hu H, Mulvey HE, Lockerman EL, Garcia AR, Piotrowska Z, et al. The Allelic Context of the C797S Mutation Acquired upon Treatment with Third-Generation EGFR Inhibitors Impacts Sensitivity to Subsequent Treatment Strategies. *Clin Cancer Res*. 2015; 21 (17):3924–33.
85. Zhang Z, Lee JC, Lin L, Olivas V, Au V, LaFramboise T, et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat Genet*. 2012;44(8):852–60.
86. Sequist L V, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Sci Transl Med*. 2011; 3(75):75ra26-75ra26.



87. Faber AC, Corcoran RB, Ebi H, Sequist L V, Waltman BA, Chung E, et al. BIM Expression in Treatment-Naive Cancers Predicts Responsiveness to Kinase Inhibitors. *Cancer Discov.* 2011;1(4):352–65.
88. Jackman D, Pao W, Riely GJ, Engelman JA, Kris MG, Jänne PA, et al. Clinical Definition of Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(2):357–60.
89. Lo PC, Dahlberg SE, Nishino M, Johnson BE, Sequist L V., Jackman DM, et al. Delay of treatment change after objective progression on first-line erlotinib in epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer. *Cancer.* 2015;121(15):2570–7.
90. Park K, Yu C-J, Kim S-W, Lin M-C, Sriuranpong V, Tsai C-M, et al. First-Line Erlotinib Therapy Until and Beyond Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Progression in Asian Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2016;2(3):305.
91. Weickhardt AJ, Scheier B, Burke JM, Gan G, Lu X, Bunn PA, et al. Local ablative therapy of oligoprogressive disease prolongs disease control by tyrosine kinase inhibitors in oncogene-addicted non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012;7(12):1807–14.
92. Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, Riely GJ, Chmielecki J, Kris MG, et al. Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Lung Cancer: Distinct Natural History of Patients with Tumors Harboring the T790M Mutation. *Clin Cancer Res.* 2011;17(6):1616–22.
93. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR Mutation and Resistance of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med.* 2005;352(8):786–92.
94. Costa C, Molina MA, Drozdowskyj A, Gimenez-Capitan A, Bertran-Alamillo J, Karachaliou N, et al. The Impact of EGFR T790M Mutations and BIM mRNA Expression on Outcome in Patients with EGFR-Mutant NSCLC Treated with Erlotinib or Chemotherapy in the Randomized Phase III EURTAC Trial. *Clin Cancer Res.* 2014;20(7):2001–10.
95. Yu HA, Arcila ME, Hellmann MD, Kris MG, Ladanyi M, Riely GJ. Poor response to erlotinib in patients with tumors containing baseline EGFR T790M mutations found by routine clinical molecular testing. *Ann Oncol.* 2014;25(2):423–8.

96. Chmielecki J, Foo J, Oxnard GR, Hutchinson K, Ohashi K, Somwar R, et al. Optimization of Dosing for EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer with Evolutionary Cancer Modeling. *Sci Transl Med*. 2011;3(90):90ra59-90ra59.
97. Bell DW, Gore I, Okimoto RA, Godin-Heymann N, Sordella R, Mulloy R, et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet*. 2005;37(12):1315–6.
98. Girard N, Lou E, Azzoli CG, Reddy R, Robson M, Harlan M, et al. Analysis of genetic variants in never-smokers with lung cancer facilitated by an internet-based blood collection protocol: A preliminary report. *Clin Cancer Res*. 2010;16(2):755–63.
99. Yu HA, Arcila ME, Harlan Fleischut M, Stadler Z, Ladanyi M, Berger MF, et al. Germline EGFR T790M Mutation Found in Multiple Members of a Familial Cohort. *J Thorac Oncol*. 2014;9(4):554–8.
100. Oxnard GR, Miller VA, Robson ME, Azzoli CG, Pao W, Ladanyi M, et al. Screening for germline EGFR T790M mutations through lung cancer genotyping. *J Thorac Oncol*. 2012;7(6):1049–52.
101. Bean J, Riely GJ, Balak M, Marks JL, Ladanyi M, Miller VA, et al. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(22):7519–25.
102. Costa DB; Schumer ST; Tenen DG; Kobayashi S. In reply. *J Clin Oncol*. 2008;26(7):1182-4.
103. Balak MN, Gong Y, Riely GJ, Somwar R, Li AR, Zakowski MF, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2006;12(21):6494–501.
104. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res*. 2011;17(5):1169–80.
105. Turke AB, Zejnullahu K, Wu Y, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, et al. Preexistence and Clonal Selection of MET Amplification in EGFR Mutant NSCLC. *Cancer Cell*. 2010;

17(1):77–88.

106. Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME, Nebhan CA, Song X, de Stanchina E, et al. HER2 Amplification: A Potential Mechanism of Acquired Resistance to EGFR Inhibition in EGFR -Mutant Lung Cancers That Lack the Second-Site EGFR T790M Mutation. *Cancer Discov.* 2012;2(10):922–33.
107. Altavilla G, Arrigo C, Tomasello C, Santarpia M, Mondello P, Benecchi S, et al. Occurrence of HER2 amplification in EGFR-mutant lung adenocarcinoma with acquired resistance to EGFR-TKIs. *J Clin Oncol.* 2013;31(15\_suppl): 8047.
108. Janjigian YY, Smit EF, Groen HJM, Horn L, Gettinger S, Camidge DR, et al. Dual Inhibition of EGFR with Afatinib and Cetuximab in Kinase Inhibitor-Resistant EGFR-Mutant Lung Cancer with and without T790M Mutations. *Cancer Discov.* 2014;4(9):1036–45.
109. Ercan D, Xu C, Yanagita M, Monast CS, Pratilas CA, Montero J, et al. Reactivation of ERK signaling causes resistance to EGFR Kinase inhibitors. *Cancer Discov.* 2012;2(10):934–47.
110. Huang MH, Lee JH, Chang YJ, Tsai HH, Lin YL, Lin AMY, et al. MEK inhibitors reverse resistance in epidermal growth factor receptor mutation lung cancer cells with acquired resistance to gefitinib. *Mol Oncol.* 2013;7(1):112–20.
111. Meyer AS, Miller MA, Gertler FB, Lauffenburger DA. The Receptor AXL Diversifies EGFR Signaling and Limits the Response to EGFR-Targeted Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Sci Signal.* 2013;6(287):ra66-ra66.
112. Byers LA, Diao L, Wang J, Saintigny P, Girard L, Peyton M, et al. An Epithelial-Mesenchymal Transition Gene Signature Predicts Resistance to EGFR and PI3K Inhibitors and Identifies Axl as a Therapeutic Target for Overcoming EGFR Inhibitor Resistance. *Clin Cancer Res.* 2013;19(1):279–90.
113. Guix M, Faber AC, Wang SE, Olivares MG, Song Y, Qu S, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2609–19.
114. Cortot AB, Repellin CE, Shimamura T, Capelletti M, Zejnullahu K, Ercan D, et al. Resistance to Irreversible EGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors through a Multistep Mechanism Involving the IGF1R Pathway. *Cancer Res.* 2013;73(2):834–43.

115. Chaft JE, Arcila ME, Paik PK, Lau C, Riely GJ, Pietanza MC, et al. Coexistence of PIK3CA and Other Oncogene Mutations in Lung Adenocarcinoma-Rationale for Comprehensive Mutation Profiling. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(2):485–91.
116. Ohashi K, Sequist L V., Arcila ME, Moran T, Chmielecki J, Lin Y-L, et al. Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(31):E2127–33.
117. Ohashi K, Sequist L V., Arcila ME, Lovly CM, Chen X, Rudin CM, et al. Characteristics of Lung Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clin Cancer Res.* 2013;19(9):2584–91.
118. Niederst MJ, Sequist L V., Poirier JT, Mermel CH, Lockerman EL, Garcia AR, et al. RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nat Commun.* 2015;6(1):6377.
119. Lee JK, Lee J, Kim S, Kim S, Youk J, Park S, et al. ClonalHistory & genetic predictors of transformation into small-cell carcinomas from lung adenocarcinomas. *J Clin Oncol.* 2017;35(26):3065–74.
120. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- $\kappa$ B. *J Clin Invest.* 2001;107(3):241–6.
121. Perkins ND. The diverse and complex roles of NF- $\kappa$ B subunits in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(2):121–32.
122. Lu T, Sathe SS, Swiatkowski SM, Hampole C V., Stark GR. Secretion of cytokines and growth factors as a general cause of constitutive NF $\kappa$ B activation in cancer. *Oncogene.* 2004;23(12):2138–45.
123. Sethi G, Ahn KS, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Epidermal growth factor (EGF) activates nuclear factor- $\kappa$ B through I $\kappa$ B $\alpha$  kinase-independent but EGF receptor-kinase dependent tyrosine 42 phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *Oncogene.* 2007;26(52):7324–32.
124. Stathopoulos GT, Sherrill TP, Cheng D-S, Scoggins RM, Han W, Polosukhin V V, et al. Epithelial NF-kappaB activation promotes urethane-induced lung carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(47):18514–9. t
125. Meylan E, Dooley AL, Feldser DM, Shen L, Turk E, Ouyang C. Requirement for NF- $\kappa$ B signaling in a mouse model of lung cancer. *Nature.* 2009;462(7269):104–7.

126. Alberti C, Pinciroli P, Valeri B, Ferri R, Ditto A, Umezawa K, et al. Ligand-dependent EGFR activation induces the co-expression of IL-6 and PAI-1 via the NF $\kappa$ B pathway in advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Oncogene*. 2012;31(37):4139–49.
127. De S, Dermawan JKT, Stark GR. EGF receptor uses SOS1 to drive constitutive activation of NF B in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(32):11721–6.
128. Sun SC. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Res*. 2011;21(1):71–85.
129. Tang X, Liu D, Shishodia S, Ozburn N, Behrens C, Lee JJ, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions. *Cancer*. 2006;107(11):2637–46.
130. Bivona TG, Hieronymus H, Parker J, Chang K, Taron M, Rosell R, et al. FAS and NF- $\kappa$ B signalling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR. *Nature*. 2013;471(7339):523–6.
131. Galvani E, Sun J, Leon LG, Sciarrillo R, Narayan RS, Sjin RTT, et al. NF- $\kappa$ B drives acquired resistance to a novel mutant-selective EGFR inhibitor. *Oncotarget*. 2015 Dec 15;6(40).
132. Escobar M, Velez M, Belalcazar A, Santos ES, Raez LE. The Role of Proteasome Inhibition in Non small Cell Lung Cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:1–10.
133. Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2017;1863(2):585–97.
134. Krall EB, Wang B, Munoz DM, Ilic N, Raghavan S, Niederst MJ, et al. KEAP1 loss modulates sensitivity to kinase targeted therapy in lung cancer. *Elife*. 2017; 6 (e18970): 1–21.
135. Hong DS, Kurzrock R, Supko JG, He X, Naing A, Wheler J, et al. A phase I first-in-human trial of bardoxolone methyl in patients with advanced solid tumors and lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3396–406.
136. Kwak EL, Sordella R, Bell DW, Godin-Heymann N, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(21):7665–70.
137. Engelman JA, Zejnullahu K, Gale CM, Lifshits E, Gonzales AJ, Shimamura T, et al. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with

- EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. *Cancer Res.* 2007; 67(24): 11924–32.
138. Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, Chen Y-M, Park K, Kim S-W, et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(5):528–38.
  139. De Grève J, Moran T, Graas M-P, Galdermans D, Vuylsteke P, Canon J-L, et al. Phase II study of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, in demographically and genotypically defined lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2015;88(1):63–9.
  140. Ramalingam SS, Boyer MJ, Park K, Barrios C, Krzakowski M, Taylor I, et al. Randomized phase 2 study of PF299804, an irreversible human epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor, versus (V) erlotinib (E) in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) after chemotherapy (CT) failure: *Ann Oncol.* 2010;21:122–3.
  141. Sequist L V., Besse B, Lynch TJ, Miller VA, Wong KK, Gitlitz B, et al. Neratinib, an irreversible pan-ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor: Results of a phase II trial in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(18):3076–83.
  142. Jänne PA, Cohen RB, Laird AD, Macé S, Engelman JA, Ruiz-Soto R, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of the PI3K/mTOR inhibitor SAR245409 (XL765) in combination with erlotinib in patients with advanced solid tumors. *J Thorac Oncol.* 2014;9(3):316–23.
  143. Tan DS-W, Lim KH, Tai WM, Ahmad A, Pan S, Ng QS, et al. A phase Ib safety and tolerability study of a pan class I PI3K inhibitor buparlisib (BKM120) and gefitinib (gef) in EGFR TKI-resistant NSCLC. *J Clin Oncol.* 2013;31(15\_suppl):8107.
  144. Neal JW, Dahlberg SE, Wakelee HA, Aisner SC, Bowden M, Huang Y, et al. Erlotinib, cabozantinib, or erlotinib plus cabozantinib as second-line or third-line treatment of patients with EGFR wild-type advanced non-small-cell lung cancer (ECOG-ACRIN 1512): a randomised, controlled, open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17(12):1661–71.
  145. Sequist L V., Von Pawel J, Garmey EG, Akerley WL, Brugger W, Ferrari D, et al. Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(24):3307–15.

146. Spigel DR, Ervin TJ, Ramlau RA, Daniel DB, Goldschmidt JH, Blumenschein GR, et al. Randomized Phase II Trial of Onartuzumab in Combination With Erlotinib in Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(32):4105–14.
147. Janjigian YY, Smit EF, Groen HJM, Horn L, Gettinger S, Camidge DR, et al. Dual Inhibition of EGFR with Afatinib and Cetuximab in Kinase Inhibitor-Resistant EGFR-Mutant Lung Cancer with and without T790M Mutations. *Cancer Discov.* 2014;4(9):1036–45.
148. Reguart N, Rosell R, Cardenal F, Cardona AF, Isla D, Palmero R, et al. Phase I/II trial of vorinostat (SAHA) and erlotinib for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations after erlotinib progression. *Lung Cancer.* 2014;84(2):161–7.
149. Von Pawel J, Tseng J, Dediu M, Schumann C, Moritz B, Mendell-Harary J, et al. Phase 2 HERALD study of patritumab (P) with erlotinib (E) in advanced NSCLC subjects (SBJs). *J Clin Oncol.* 2014;32(15\_suppl):8045.
150. Paz-Arez L, Serwatowski P, Szczęśna A, Von Pawel J, Toschi L, Tibor C, et al. P3.02b-045 Patritumab plus Erlotinib in EGFR Wild-Type Advanced Non–Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Part a Results of HER3-Lung Study. *J Thorac Oncol.* 2017;12(1):S1214–5.
151. Campelo RG, Felip E, Massuti B, Majem M, Carcereny Costa E, Palmero R, et al. Phase IB study to evaluate efficacy and tolerability of olaparib (AZD2281) plus gefitinib in patients (P) with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation positive advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) (NCT=1513174/GECP-GOAL). *J Clin Oncol.* 2014; 32(15\_suppl): 8079.
152. Massuti B, Campelo RG, Arrieta O, Rodríguez-Abreu D, Granados ALO, Majem M, et al. P1.03-054 A Phase II Randomized Trial of Gefitinib Alone vs Olaparib Plus Gefitinib in Advanced NSCLC EGFRmut + Goal Trial Spanish Lung Cancer Group. *J Thorac Oncol.* 2017;12(11):S1971–2.
153. Price KA, Azzoli CG, Krug LM, Pietanza MC, Rizvi NA, Pao W, et al. Phase II Trial of Gefitinib and Everolimus in Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2010;5(10):1623–9.
154. Moran T, Felip E, Keedy V, Borghaei H, Shepherd FA, Insa A, et al. Activity of dalotuzumab, a selective anti-IGF1R antibody, in combination with erlotinib in unselected

- patients with Non-small-cell lung cancer: a phase I/II randomized trial. *Exp Hematol Oncol.* 2014;3(1):1.
155. Yu HA, Perez L, Chang Q, Gao SP, Kris MG, Riely GJ, et al. A Phase 1/2 Trial of Ruxolitinib and Erlotinib in Patients with EGFR -Mutant Lung Adenocarcinomas with Acquired Resistance to Erlotinib. *J Thorac Oncol.* 2017;12(1):102–9.
  156. Park JS, Kim HR, Hong MH, Cho BC. P2.06-003 A Phase Ib Study of the Combination of Afatinib and Ruxolitinib in EGFR Mutant Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Progressed on EGFR-TKI. *J Thorac Oncol.* 2017;12(1):S1069–70.
  157. Johnson ML, Riely GJ, Rizvi NA, Azzoli CG, Kris MG, Sima CS, et al. Phase II Trial of Dasatinib for Patients with Acquired Resistance to Treatment with the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors Erlotinib or Gefitinib. *J Thorac Oncol.* 2011;6(6):1128–31.
  158. Haura EB, Tanvetyanon T, Chiappori A, Williams C, Simon G, Antonia S, et al. Phase I/II Study of the Src Inhibitor Dasatinib in Combination With Erlotinib in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(8):1387–94.
  159. Wakelee HA, Gettinger S, Engelman J, Jänne PA, West H, Subramaniam DS, et al. A phase Ib/II study of cabozantinib (XL184) with or without erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;79(5):923–32.
  160. Wu Y-L, Zhang L, Kim D-W, Liu X, Lee DH, Yang JC-H, et al. Phase Ib/II Study of Capmatinib (INC280) Plus Gefitinib After Failure of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitor Therapy in Patients With EGFR -Mutated, MET Factor-Dysregulated Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(31):3101–9. 6
  161. Ramalingam SS, Blackhall F, Krzakowski M, Barrios CH, Park K, Bover I, et al. Randomized Phase II Study of Dacomitinib (PF-00299804), an Irreversible Pan-Human Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor, Versus Erlotinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30(27):3337–44.
  162. Pietanza MC, Gadgeel SM, Dowlati A, Lynch TJ, Salgia R, Rowland KM, et al. Phase II Study of the Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitor XL647 in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2012;7(5):856–65.
  163. Zhou W, Ercan D, Chen L, Yun CH, Li D, Capelletti M, et al. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature.* 2009;462(7276):1070–4.



164. Sequist L V., Soria J-C, Goldman JW, Wakelee HA, Gadgeel SM, Varga A, et al. Rociletinib in *EGFR* -Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(18):1700–9.
165. Sequist L V., Soria J-C, Camidge DR. Update to Rociletinib Data with the RECIST Confirmed Response Rate. *N Engl J Med.* 2016;374(23):2296–7.
166. Jänne PA, Yang JC-H, Kim D-W, Planchard D, Ohe Y, Ramalingam SS, et al. AZD9291 in EGFR Inhibitor-Resistant Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015; 372(18): 1689–99.
167. Goss G, Tsai C-M, Shepherd FA, Bazhenova L, Lee JS, Chang G-C, et al. Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2016 ;17(12):1643-52.
168. Yang JC, Ahn M, Kim D-W, Ramalingam SS, Sequist L V, Su W, et al. Osimertinib in Pretreated T790M-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: AURA Study Phase II Extension Component. *J Clin Oncol.* 2017;35(12):1288–96.
169. Fda. TAGRISSO (osimertinib)  
[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/208065s0081b1.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/208065s0081b1.pdf).  
Accessed 2019, February 27.
170. Yang J, Ramalingam SS, Jänne PA, Cantarini M, Mitsudomi T. LBA2\_PR: Osimertinib (AZD9291) in pre-treated pts with T790M-positive advanced NSCLC: updated Phase 1 (P1) and pooled Phase 2 (P2) results. *J Thorac Oncol.* 2016;11(4 Suppl):S152-3.
171. Ahn M-J, Tsai C-M, Shepherd FA, Bazhenova L, Sequist L V, Hida T, et al. Osimertinib in patients with T790M mutation-positive, advanced non-small cell lung cancer: Long-Term follow-up from a pooled analysis of 2 phase 2 studies. *Cancer.* 2018 4;1–10.
172. Mok TS, Wu Y-L, Ahn M-J, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, et al. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017; 376(7): 629–40.
173. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102(45):16368–73.
174. Sacher AG, Komatsubara KM, Oxnard GR. Application of Plasma Genotyping

- Technologies in Non–Small Cell Lung Cancer: A Practical Review. *J Thorac Oncol*. 2017 Sep;12(9):1344–56.
175. Karachaliou N, Mayo-de las Casas C, Queralt C, de Aguirre I, Melloni B, Cardenal F, et al. Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial. *JAMA Oncol*. 2015;1(2):149.
  176. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta*. 2001; 313(1–2):139–42. 1
  177. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, Alden RS, O’Connell A, Feeney N, 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.
  178. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883–92.
  179. Hata A, Katakami N, Yoshioka H, Kaji R, Masago K, Fujita S, et al. Spatiotemporal T790M Heterogeneity in Individual Patients with EGFR-Mutant Non–Small-Cell Lung Cancer after Acquired Resistance to EGFR-TKI. *J Thorac Oncol*. 2015;10(11):1553–9.
  180. Graziano P, de Marinis F, Gori B, Gasbarra R, Migliorino R, De Santis S, et al. EGFR - Driven Behavior and Inpatient T790M Mutation Heterogeneity of Non–Small-Cell Carcinoma With Squamous Histology. *J Clin Oncol*. 2015;33(31):e115–8.
  181. Kuiper JL, Heideman DAM, Thunnissen E, Paul MA, van Wijk AW, Postmus PE, et al. Incidence of T790M mutation in (sequential) rebiopsies in EGFR-mutated NSCLC-patients. *Lung Cancer*. 2014; 85(1):19–24.
  182. Piotrowska Z, Niederst MJ, Karlovich CA, Wakelee HA, Neal JW, Mino-Kenudson M, et al. Heterogeneity Underlies the Emergence of EGFR T790 Wild-Type Clones Following Treatment of T790M-Positive Cancers with a Third-Generation EGFR Inhibitor. *Cancer Discov*. 2015 Jul 1;5(7):713–22.
  183. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clin Cancer Res*. 2013;19(8):2240–7.

184. Sundaresan TK, Sequist L V., Heymach J V., Riely GJ, Janne PA, Koch WH, et al. Detection of T790M, the Acquired Resistance EGFR Mutation, by Tumor Biopsy versus Noninvasive Blood-Based Analyses. *Clin Cancer Res.* 2016;22(5):1103–10.
185. Douillard J, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, 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(9):1345–53.
186. Bosc C, Ferretti GR, Cadranet J, Audigier-Valette C, Besse B, Barlesi F, et al. Rebiopsy during disease progression in patients treated by TKI for oncogene-addicted NSCLC. *Target Oncol.* 2015;10(2):247–53.
187. Kimura H, Kasahara K, Kawaishi M, Kunitoh H, Tamura T, Holloway B, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(13):3915–21.
188. Greig SL. Osimertinib: First Global Approval. *Drugs.* 2016;76(2):263–73.
189. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrence R, Paweletz CP, Cantarini M, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34(28):3375–82.
190. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non–small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med.* 2015;21(6):560–2.
191. Ercan D, Choi HG, Yun C-H, Capelletti M, Xie T, Eck MJ, et al. EGFR Mutations and Resistance to Irreversible Pyrimidine-Based EGFR Inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(17):3913–23.
192. Lin C-C, Shih J-Y, Yu C-J, Ho C-C, Liao W-Y, Lee J-H, et al. Outcomes in patients with non-small-cell lung cancer and acquired Thr790Met mutation treated with osimertinib: a genomic study. *Lancet Respir Med.* 2018;6(2):107–16.
193. Oxnard GR, Hu Y, Mileham KF, Husain H, Costa DB, Tracy P, et al. Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients With EGFR T790M–Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib. *JAMA Oncol.* 2018;4(11):1527.

194. Papadimitrakopoulou VA, Wu Y-L, Han J-Y, Ahn M-J, Ramalingam SS, John T, et al. LBA51 Analysis of resistance mechanisms to osimertinib in patients with EGFR T790M advanced NSCLC from the AURA3 study. *Ann Oncol.* 2018;29(suppl\_8).
195. Yanagita M, Redig AJ, Paweletz CP, Dahlberg SE, O'Connell A, Feeney N, et al. A Prospective Evaluation of Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Erlotinib on a Phase II Trial. *Clin Cancer Res.* 2016;22(24):6010–20.
196. Reckamp KL, Melnikova VO, Karlovich C, Sequist L V., Camidge DR, Wakelee H, et al. A Highly Sensitive and Quantitative Test Platform for Detection of NSCLC EGFR Mutations in Urine and Plasma. *J Thorac Oncol.* 2016;11(10):1690–700.
197. Karlovich C, Goldman JW, Sun J-M, Mann E, Sequist L V., Konopa K, et al. Assessment of EGFR Mutation Status in Matched Plasma and Tumor Tissue of NSCLC Patients from a Phase I Study of Rociletinib (CO-1686). *Clin Cancer Res.* 2016;22(10):2386–95.
198. Morán T, Felip E, Bosch-Barrera J, de Aguirre I, Ramirez JL, Mesia C, et al. Monitoring EGFR-T790M mutation in serum/plasma for prediction of response to third-generation EGFR inhibitors in patients with lung cancer. *Oncotarget.* 2018;9(43): 27274-86.
199. Janmaat ML, Kruyt FAE, Rodriguez JA, Giaccone G. Response to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells: Limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways. *Clin Cancer Res.* 2003;9(6):2316–26.
200. Kokubo Y, Gemma A, Noro R, Seike M, Kataoka K, Matsuda K, et al. Reduction of PTEN protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer.* 2005;92(9):1711–9. 9
201. La Monica S, Galetti M, Alfieri RR, Cavazzoni A, Ardizzoni A, Tiseo M, et al. Everolimus restores gefitinib sensitivity in resistant non-small cell lung cancer cell lines. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(5):460–8.
202. Besse B, Leigh N, Bennouna J, Papadimitrakopoulou VA, Blais N, Traynor AM, et al. Phase II study of everolimus-erlotinib in previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2014;25(2):409–15.
203. Huang S, Liu LN, Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Houghton PJ. p53/p21(CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and determine the cellular response

- to rapamycin. *Cancer Res.* 2001;61(8):3373–81. 5
204. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med.* 2002;8(2):128–35.
205. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, et al. Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 Expression and Function by the Mammalian Target of Rapamycin. *Mol Cell Biol.* 2002;22(20):7004–14.
206. Katakami N, Atagi S, Goto K, Hida T, Horai T, Inoue A, et al. LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *J Clin Oncol.* 2013;31(27):3335–41.
207. Kim TM, Song A, Kim D-W, Kim S, Ahn Y-O, Keam B, et al. Mechanisms of Acquired Resistance to AZD9291. *J Thorac Oncol.* 2015;10(12):1736–44
208. Karachaliou N, Mayo-de las Casas C, Queralt C, de Aguirre I, Melloni B, Cardenal F, et al. Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial. *JAMA Oncol.* 2015 ;1(2):149.

## **GLOSARIO**



**ADICCIÓN ONCOGÉNICA:** Proceso por el que una célula tumoral, a pesar de estar expuesta a diferentes señales de crecimiento y supervivencia, es dependiente de una única vía de señalización para su proliferación y supervivencia. Este término fue acuñado por primera vez en el año 2000 por Bernard Weinstein. Existen diferentes tumores cuya supervivencia viene determinada por este proceso (por ejemplo, tumores de pulmón con *mEGFR*, reordenamientos en *ALK* y *ROS1*; melanoma con *mBRAF*, leucemia linfática crónica o tumores del estroma gastrointestinal con *mBRCA-ABL*, *c-KIT* o *PDGFR-β*). Implícita a esta dependencia, la adicción oncogénica supone una sensibilidad a fármacos que son capaces de inhibir el oncogén causante de esta dependencia.

**CRITERIOS RECIST.** Las diferentes técnicas de imágenes biomédicas permiten diagnosticar, estadificar, controlar y valorar la efectividad de los procedimientos terapéuticos a los que son sometidos los pacientes con cáncer. Los criterios RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) son el método estándar para monitorizar la respuesta al tratamiento mediante las medidas unidimensionales de los tumores, obtenidas con técnicas de imagen reproducibles como son la TC, la RM y la PET. Las lesiones pueden considerarse diana o medibles (LM) o no diana o medibles (LNM). Según el cambio en el sumatorio de las LM, la respuesta tumoral se puede categorizar de la siguiente manera:

- Respuesta completa (RC): desaparición de todas las LM (las adenopatías deben medir <10mm).
- Respuesta parcial (RP): disminución de al menos un 30% en la suma de los diámetros de las LM (SLD).
- Enfermedad estable (EE): no existe aumento o disminución suficiente para considerar el cambio del SLD como EE ni progresión.
- Progresión de enfermedad (PE): aumento de, al menos, un 20% en el SLD comparando con el momento de máxima respuesta y con un incremento absoluto de al menos 5 mm.

La evaluación RECIST también tiene en cuenta el comportamiento de las LNM, así como la aparición de nuevas lesiones. Considerando todos estos factores, la respuesta tumoral se categoriza del siguiente modo:



Lesión medible	Lesión no medible	Nueva lesión	RESPUESTA
RC	CR	No	RC
RC	No RC/No PE	No	RP
RP	No PE	No	RP
EE	No PE	No	EE
PE	cualquiera	Si/No	PE
cualquiera	PE	Si/No	PE
cualquiera	cualquiera	SI	PE

**CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES (CTCS).** Células tumorales presentes en el torrente circulatorio.

**DNA CIRCULANTE.** Fracción de DNA que se encuentra fuera del espacio intracelular y proviene de la digestión celular como resultado de la apoptosis o muerte celular. Se localiza en espacios extracelulares como la sangre, la orina o el líquido cefalorraquídeo, y puede aislarse mediante el procesamiento de estas muestras. El DNA circulante puede tener dos naturalezas: el DNA que proviene de fragmentos de células normales (cDNA) y que el proviene de fragmentos de células tumorales. Este último incluye el denominado ctDNA (cell tumor DNA o DNA tumoral circulante) y el cfDNA (cell free DNA o DNA libre circulante).

Existen diversas técnicas para analizar la información derivada del DNA circulante:

- **Cariotipado digital:** se utiliza en DNA circulante para calcular las variaciones en el número de copias (CNVs) de ciertas regiones del genoma. Estas CNVs son determinantes a la hora de identificar un cáncer.
- **Personalized analysis of rearranged ends (PARE):** esta técnica de detección de reordenamientos cromosómicos se ha trasladado al DNA circulante con la ayuda de la secuenciación masiva.
- **Metilación de DNA:** la detección de los distintos patrones de metilación mediante el tratamiento con bisulfito.
- **PCR cuantitativa (qPCR):** es la técnica básica en este tipo de análisis. Emplea cebadores o *primers* dirigidos para detectar marcadores concretos del DNA circulante.
- **Digital droplet PCR (ddPCR):** una técnica basada en PCR con una mayor sensibilidad al adecuarse a las bajas concentraciones del DNA circulante y que tiene aplicaciones similares a la PCR cuantitativa.

- **BEAMing:** (“beads, emulsion, amplification, magnetics”) consiste en una combinación de un PCR y citometría de flujo para la identificación de mutaciones somáticas presentes en el DNA circulante. Es más sensible que la PCR cuantitativa aislada.
- **Técnicas que incluyen la secuenciación masiva:**
  - *Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq)*
  - *Tagged AMplicon deep Sequencing (TAM-Seq)*
  - *Safe-Sequencing (Safe-Seq)*
  - *Duplex sequencing*
  - *Integrated Digital Error Suppression (iDES)-enhanced CAPP-Seq*

**DOSIS MÁXIMA TOLERADA.** Se define como la dosis máxima de un fármaco o tratamiento que produce el efecto deseado sin efectos secundarios inaceptables

**ESCALA DE LA ECOG DEL PERFORMANCE STATUS (PS).** Escala de evaluación del estado general funcional de los pacientes según grado de actividad que son capaces de desarrollar a lo largo del día. Esta escala ha sido desarrollada por el Eastern Cooperative Oncology Group (Oken M Ann J Clin Oncol 1982; 5: 649-655)

GRADO	ECOG PERFORMANCE STATUS
0	Actividad completamente normal, sin restricciones,
1	Actividad limitada con ejercicio extenuante, pero capaz de mantener trabajo de tipo sedentario, ambulatorio
2	Actividad física limitada, ambulatorio, capaz de autocuidado pero no de desarrollar actividad laboral de ningún tipo; >50% del día levantado
3	Capaz de actividades limitadas de autocuidado; >50% en cama o silla
4	Total dependencia, incapaz de autocuidado, todo el día en cama o silla
5	Muerte

**FACTOR PREDICTIVO (en Oncología).** Variable concreta que ayuda a predecir si el cáncer de una persona responderá a un tratamiento específico. Un factor predictivo (predisponente) también puede describir aquello que aumenta el riesgo de una persona de presentar una afección o enfermedad. Hay que considerar que existen determinadas variables que pueden tener valor predictivo y pronóstico al mismo tiempo.

**FACTOR PRONÓSTICO (en Oncología).** Variable concreta que ayuda a determinar el comportamiento biológico natural de un tumor. Pueden dar información de supervivencia y de recaída de la enfermedad tumoral y es independiente del tratamiento administrado. Hay que considerar que existen determinadas variables que pueden tener valor pronóstico y predictivo al mismo tiempo.

**INHIBIDORES DE TIROSINA QUINASA.** Grupo de fármacos capaces de ejercer una acción opuesta a la de la TQ en los RTQ. Se caracterizan por ser moléculas de pequeño tamaño. Se administran por vía oral.

- **ITQ covalentes:** ITQ que se une de forma irreversible al RTQ.
- **ITQ no covalentes:** ITQ que se une de forma reversible al RTQ.

**INCIDENCIA.** Medida de frecuencia de enfermedad que refleja el número de casos nuevos con una característica o problema de salud analizada en un periodo concreto. Generalmente se utiliza esta medida para evaluar enfermedades con un periodo de inducción corto (infecciones). Se utiliza cuando interesa evaluar el flujo de número de casos que van apareciendo en un periodo de tiempo. Se calcula:

$$I = \text{número de eventos} / \text{periodo}$$

**INCIDENCIA ACUMULADA.** Proporción de individuos que desarrolla un determinado evento durante un periodo de seguimiento. Tiene en cuenta el número de pacientes susceptibles de sufrir el evento al inicio del periodo. Se calcula:

$$IA = \text{número de eventos nuevos} / \text{número de individuos susceptibles al comienzo del periodo}$$

**MUTACIONES.** Cambios en la secuencia de un nucleótido en el DNA que produce una variación característica en la información codificada por este, que se traduce en una variación de la actividad de la proteína que se deriva (pérdida o ganancia de función). En el proceso del cáncer existen dos tipos de mutaciones:

- **CONDUCTORAS.** Son mutaciones responsables de la génesis de los tumores, ya que su presencia propicia la formación y crecimiento de los mismos.

- **PASAJERAS.** Aquellas mutaciones que no están relacionadas con la aparición de tumores. No obstante, estas mutaciones junto con las conductoras, puede condicionar una mayor predisposición a la génesis de los tumores.

**PREVALENCIA.** Medida de frecuencia de enfermedad que refleja la proporción de una población que presenta una característica o estado de salud en un momento determinado. Generalmente se utiliza este término para realizar análisis de patologías crónicas. Es posible diferenciar entre la prevalencia de periodo (revela la proporción en un momento incierto) y la prevalencia puntual (en un momento concreto). Ambas medidas de frecuencia reflejarían una foto fija de la variable que se está estudiando. Se calcula:

$$P = \frac{\text{número de casos}}{\text{número total de individuos}}$$

**QUIMIOTERAPIA CITOTÓXICA.** Conjunto de fármacos cuya administración provoca la muerte de células en fase de proliferación, especialmente las células tumorales. Sus efectos secundarios se asocian a la inhibición de la proliferación de las células normales, con una ventana de selectividad muy estrecha para las células tumorales.

**RECEPTORES TIROSINA QUINASA (RTQ).** Receptores de membrana celular capaces de activar cascadas de señalización intracelular, gracias a la presencia de un residuo de tirosina quinasa.

**RESISTENCIA.** Proceso por el que un tumor no responde a un determinado tratamiento. En caso de tumores que presentan adicción oncogénica, la resistencia puede presentarse *de novo* (PRIMARIA o INTRÍNSECA) o después de un tiempo en tratamiento, habiendo demostrado que dicho tratamiento estaba siendo eficaz (ADQUIRIDA)

- **RESISTENCIA INTRÍNSECA:** resistencia de las células tumorales debida a características basales del tumor presentes previamente a la exposición de un determinado tratamiento.
- **RESISTENCIA ADQUIRIDA:** resistencia de las células tumorales que aparece tras la exposición a un determinado fármaco y un período inicial de sensibilidad a dicho fármaco. Dicha resistencia es debida a la aparición de nuevas alteraciones moleculares.

**SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN.** Tiempo transcurrido durante y después de un tratamiento en el que no existe evidencia de crecimiento ni diseminación de la enfermedad.

**SUPERVIVENCIA GLOBAL.** Tiempo transcurrido entre el diagnóstico de la enfermedad tumoral y la fecha de fallecimiento de un paciente.

**TASA DE CONTROL DE ENFERMEDAD.** Medida de evaluación de respuesta a un tratamiento. Se define como el número de pacientes que presenta respuesta parcial, respuesta completa y estabilidad de la enfermedad mediante evaluación radiológica al ser expuestos a un determinado tratamiento respecto al total de los pacientes expuestos a dicho tratamiento.

**TASA DE RESPUESTA.** Medida de evaluación de respuesta a un tratamiento. Se define como el número de pacientes que presenta respuesta parcial y completa radiológica al ser expuestos a un determinado tratamiento respecto al total de los pacientes expuestos a dicho tratamiento.

**TOXICIDAD LIMITANTE DE DOSIS.** Tipo de efecto secundario a la administración de un fármaco que impide la escalada de dosis y establece la DMT.

**TRATAMIENTO DIRIGIDO o ANTIDIANA.** Fármacos que son capaces de inhibir proteínas específicas relevantes en el crecimiento y supervivencia tumoral y que generalmente son irrelevantes para las células normales. Los efectos secundarios asociados a estos fármacos son menos severos que los asociados a la quimioterapia citotóxica. No obstante, la inhibición efectiva de la proteína diana puede no traducirse en una terapia clínicamente efectiva

## APÉNDICE 1



**Tabla A1.-** Estudios de combinación de ITQ en el momento de aparición de la resistencia adquirida

Estrategia de combinación ITQ	Fase	Población	EGFR m	n	TR	TCE	SLP	SG	Toxicidad	Referencia
<b>Anti-MEK</b>										
erlotinib+MEK162	I/IB	KRAS m/ EGFR m	sí, NE	44	NC	NC	NC	NC	NC	clinicaltrials.gov
gefitinib+selumetinib	I/II	EGFRm, ITQ previo	sí	34	NC	NC	NC	NC	NC	clinicaltrials.gov
<b>Anti-PI3K/mTOR</b>										
erlotinib+XL765	I	tumores sólidos (EGFR m)	sí	46 (37)	0	37,50%	NC	NC	diarrea (35%), rash (35%), náuseas (28%)	Janne 2014
gefitinib +buparlisib(BKM120)	Ib	ITQ previo (criterios de Jackman), EGFR m 80%	50% T790M, 40% METa, 0% PI3K m	15	NC (descenso SUV PET>25% en 40%)	NR	2,8 m	NC	rash (80%), diarrea(73%), fatiga(60%), anorexia (47%), mucositis (40%)	Tan 2013
gefitinib+everolimus	I/II	cohorte a) CP avanzado no tratado previamente, b) CP avanzado tratado previamente con platino	4,80%	62	13% (8% EGFRm)		4 m	12 m (27 en cohorte a y 11 en cohorte b)	rash (60%), diarrea (56%), estomatitis (52%), fatiga (45%), náuseas (31%)	Price 2010
erlotinib+ buparlisib (BKM120)	II	EGFR m, ITQ previo	sí	37	3,40%	NC	SLP a 3 m 50,4%	12,2 m	rash (27%), diarrea (78%), fatiga 54%, náuseas (46%)	clinicaltrials.gov

EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; EGFRm, mutaciones; ITQ, inhibidor de tirosina quinasa; m, meses, n, número de pacientes; NC, no comunicados, NE, no evaluado; TCE, tasa de control de enfermedad; TR, tasa de respuesta; SG, supervivencia global, SLP, supervivencia libre de progresión.



**Tabla A1.-** Estudios de combinación de ITQ en el momento de aparición de la resistencia adquirida (continuación)

Estrategia de combinación ITQ	Fase	Población	EGFR m	n	TR	TCE	SLP	SG	Toxicidad	Referencia
<b>Anti-IGF1R</b>										
erlotinib+dalotuzumab	I/II	no seleccionada, fase 2 (erlo vs erlo+dalotuzumab)	sí, NE	75	fase 2 8% vs. 2,7%	63,2 vs. 59,4%	1,6 vs. 2,5 m	10,4 vs. 6,6 m	diarrea (81%), náuseas (45%), estomatitis (11%), astenia (38%), hiperglicemia (19%)	Moran 2014
afatinib +xentuzumab	Ib	EGFR m, ITQ previo	sí	32	NC	NC	NC	NC	NC	clinicaltrials.gov
<b>Anti-JAK/STAT</b>										
afatinib+dasatinib	I	selección clínica y/o molecular EGFR m	sí	25	NC	NC	NC	NC	NC	clinicaltrials.gov
erlotinib+ruxoletinib	I/II	EGFR m	sí	22	5%	45%	2,2 m	NC	rash (14%), diarrea (32%), AST (27%)	Yu 2016
afatinib+ruxoletinib	Ib	EGFR m	sí	15	40%	86,70%	8,8 m	NC	diarrea (46%), rash (33%), estomatitis 26%)	Park 2017

EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; EGFRm, mutaciones; ITQ, inhibidor de tirosina quinasa; m, meses; n, número de pacientes; NC, no comunicados, NE, no evaluado; TCE, tasa de control de enfermedad; TR, tasa de respuesta; SG, supervivencia global, SLP, supervivencia libre de progresión; vs. versus

**Tabla A1.-** Estudios de combinación de ITQ en el momento de aparición de la resistencia adquirida (continuación)

Estrategia de combinación ITQ	Fase	Población	EGFR m	n	TR	TCE	SLP	SG	Toxicidad	Referencia
<b>Anti-Src</b>										
dasatinib/ dasatinib+erlotinib	II	no selección	sí	21(9; 12)	0	0	0,5; 0,9 m	NC	Derrame pleural	Johnson 2011
erlotinib+dasatinib	II	no selección	NE	34	7%	63%	NC	NC	diarrea (88%), rash (74%), anemia (53%), derrame pleural (35%)	Haura 2010
<b>Anti-AXL</b>										
erlotinib+BGB324	I/II	no selección molecular en fase I		66	NC	NC	NC	NC	NC	clinicaltrials.gov
<b>Anti-VEGF</b>										
erlotinib+ramucirumab	III	EGFR m	sí	543	NC	NC	NC	NC	NC	clinicaltrials.gov
<b>Anti-EGFR mAb</b>										
afatinib+cetuximab	Ib	EGFR m, ITQ previo	sí	126	29%	70%	4,7 m (DR 5,7m)	NC	rash 90%; diarrea 71%; ungueal 57%; estomatitis 56%, fatiga 47%	Janjigian 2014

DR, duración de la respuesta; EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*; EGFRm, mutaciones; ITQ, inhibidor de tirosina quinasa; m, meses, n, número de pacientes; NC, no comunicados, NE, no evaluado; TCE, tasa de control de enfermedad; TR, tasa de respuesta; SG, supervivencia global, SLP, supervivencia libre de progresión.

**Tabla A1.-** Estudios de combinación de ITQ en el momento de aparición de la resistencia adquirida (continuación)

Estrategia de combinación ITQ	Fase	Población	EGFR m	n	TR	TCE	SLP	SG	Toxicidad	Referencia
<b>Anti-MET</b>										
Ib: erlotinib+cabozantinub; II, caboz vs cabo+ erlotinib	Ib/II	EGFR m, ITQ previo	sí	64/ 15; 13	8,2%; 6,7%	8,2%; 6,7%	3,7; 1,9 m	NC	diarrea (97,3%), HTA(26,6%)	Wakalee 2017
Gefitinib+capmatinib	I/II	EGFR m, amplificación MET, ITQ previo	sí	61/100	27%, FII 47% si GCN $\geq$ 6	80%	NC	NC	náusea (28%), edema (22%), anorexia (21%), rash (20%)	Wu 2018
erlotinib, cabozantinib , erlotinib+cabozantinib	II	EGFR WT, previa QT	no	125 (42, 40, 43)	3%, 115; 3%	19%, 23%, 7%	1,8; 4,3; 4,7 m	5,1; 9,2, 13.3*m	diarrea (8%, 8%, 28%); HTA (0%, 25%, 3%); TEP (0%, 8%, 5%)	Neal 2016
erlotinib+tivantinib, erlotinib+placebo	II	no selección	sí, NE	167 (84,83) EGFRm 17	10%, 7%		3,8; 2,3 m	NC	rash (65,5%; 53%); diarrea (48%; 54%); anorexia (30%; 34%)	Sequist 2011
erlotinib+onotuzumab, erlotinib+placebo	II	no selección	sí, NE	137 (7;6)	5,8%, 4,4%	NC	2,2; 2,6 m	8,9; 7,4 m	rash (60%); diarrea (52,2%; 40,6%); edema (23,2%, 7,5%); neumonia (7,2%, 4,5%)	Spigel 2013

EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; EGFRm, mutaciones; ITQ, inhibidor de tirosina quinasa; m, meses, n, número de pacientes; NC, no comunicados, NE, no evaluado; TCE, tasa de control de enfermedad; TR, tasa de respuesta; SG, supervivencia global, SLP, supervivencia libre de progresión; WT, wild type.

**Tabla A1.- Estudios de combinación de ITQ en el momento de aparición de la resistencia adquirida (continuación)**

Estrategia de combinación ITQ	Fase	Población	EGFR m	n	TR	TCE	SLP (m)	SG	Toxicidad	Referencia
<b>Inhibidor HDAC</b>										
erlotinib+vorinostat	I/II	EGFR m, ITQ previo	sí	33	0%	28% (EE)	TTP 8 s; SLP12 s 28%	10,3 m	anemia 80%; diarrea 76%; <i>rash</i> 48%	Reguart 2014
<b>Anti-HER3</b>										
erlotinib+patritumab DA, DB, global, placebo	Ib/II	no seleccionada	NE	212			3,4; 3; 3 y 1,4 m; HRGa HR 0,92	6,1; 10,7; 9,7; 5; HRGa HR 1,05	diarrea (11,4%, 8,5%, 4,2%); <i>rash</i> (5,7%, 7,0%, 2,8%)	Von Pawel 2014
erlotinib+patritumab, erlotinib+placebo	III	no seleccionada	NE	145	HGRa 2,4 vs 7,5%; HGRb 4,8 vs 15,8%	HGRa 52,4 vs 65%; HGRb 47,6 vs 63,2%	HGRa 1,9 vs 2,9 m; HGRb 1,5 vs 2,8 m	HGRa 5,2 vs 8,2 m; HGRb 7,1 vs 6,8 m	diarrea (51,4%, 31%); <i>rash</i> (37,8%, 36,6%)	Paz Ares 2017
<b>Otros</b>										
gefitinib+olaparib (iPARP)	Ib	EGFR m, (previamente tratados)	sí	22 (8)	62%% (35,5%)	90,5% (75%)	NC	NC	NC	Garcia Campelo 2014; 2017
erlotinib+quinacrine	Ib	no seleccionada	NE	12	NC	NC	NC	NC	NC	clinicaltrials.gov

EE, enfermedad estable; EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; EGFRm, mutaciones; HGR, heregulin; ITQ, inhibidor de tirosina quinasa; m, meses; n, número de pacientes; NC, no comunicados; NE, no evaluado; TCE, tasa de control de enfermedad; TR, tasa de respuesta; SG, supervivencia global; SLP, supervivencia libre de progresión.



## **APÉNDICE 2. ARTÍCULOS RELACIONADOS**