

Tüdő-adenokarcinómák molekuláris patológiai vizsgálata, *EGFR* T790M rezisztenciamutáció-vizsgálatok

KOHÁNKA ANDREA¹, BÁTHORY-FÜLÖP LÁSZLÓ^{1,2}, TANÁCS-BENCZE ESZTER¹, ENGI HELGA¹, BOGOS KRISZTINA³, MOLDVAY JUDIT^{3,4}, PÁPAI SZÉKELY ZSOLT⁵, SZALAI ZSUZSANNA⁶, SZŐKE JÁNOS^{1,2}, TÓTH ERIKA^{1,2}

Országos Onkológiai Intézet, ¹Sebészeti és Molekuláris Patológiai Osztály, ²Nemzeti Tumorbiológiai Laboratórium, ³Országos Korányi Pulmonológiai Intézet, Budapest, ⁴Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Tüdőgyógyászati Klinika, Szeged, ⁵Fejér Vármegyei Szent György Egyetemi Oktató Kórház, Pulmonológiai Osztály, Székesfehérvár, ⁶Győr-Moson-Sopron Vármegyei Petz Aladár Egyetemi Oktató Kórház, Pulmonológiai Osztály, Győr

Levelezési cím:

Dr. Tóth Erika, Országos Onkológiai Intézet, Sebészeti és Molekuláris Patológiai Osztály, 1122 Budapest, Ráth Gy. u. 7-9., e-mail: dr.toth.erika@oncol.hu

Közlésre érkezett:

2024. október 8.

Elfogadva:

2024. november 20.

Cél: Intézetünkben 2019 óta végzünk *EGFR* T790M rezisztenciamutáció-vizsgálatot, ami az *EGFR*-mutáns tüdő-adenokarcinómák első, második generációs *EGFR*-tirozinkináz-inhibitorral (TKI) történő kezelése közben kialakuló leggyakoribb rezisztenciamutáció. A vizsgálat jelentőségét az adja, hogy e mutáció azonosítása lehetővé teszi egy hatékony harmadik generációs TKI alkalmazását. Jelen cikkünkben a 2022. január–2024. augusztus közötti vizsgálatokról számolunk be, összehasonlítva eredményeinket a 2019–2021-es periódus eredményeivel.

Módszerek: 222 beteg 380, többségében vérmintáját vizsgáltuk ebben a periódusban Super-ARMS *EGFR* Mutation Detection Kit (AmoyDx) segítségével.

Eredmények: Az összes minta 57%-ában azonosítottuk a primer tumorban talált *EGFR*-mutációt, ezek között pedig 38,3%-os gyakorisággal mutattuk ki a T790M mutációt.

Következtetések: Eredményeink az előző periódushoz hasonlóak voltak. Korábban az összes minta 45,6%-ában azonosítottuk az eredeti aktiváló *EGFR*-mutációt, és ezeknek az eseteknek a 48,1%-ában volt T790M rezisztenciamutáció jelen. A rebiopsziák száma lényegében nem változott a 2019–2021-es időszakhoz képest, ami a legfőbb oka lehet annak, hogy az irodalomban leírt találati arányhoz képest jelenleg is alacsonyabb százalékban azonosítottuk a T790M mutációt. *Magy Onkol* 68:334–338, 2024

Kulcsszavak: tüdő-adenokarcinóma, *EGFR* T790M mutáció, cfDNA

Aim: In our institute, we have been testing *EGFR* T790M resistance mutations since 2019, which is the most common resistance mutation that develops during first-line, second-line *EGFR* TKI treatment of *EGFR* mutant lung adenocarcinomas. The importance of this study is that the identification of this mutation will allow the use of an effective third-generation TKI. In this article, we report on studies from January 2022 to August 2024, compared with our results from the 2019–2021 period.

Methods: 380, predominantly blood samples from 222 patients were tested during the present period using Super-ARMS *EGFR* Mutation Detection Kit (AmoyDx).

Results: *EGFR* mutations were identified in 57% of all samples in the primary tumours, with a 38.3% frequency of T790M mutation.

Conclusions: Our results were similar to the previous period. The number of rebiopsies was essentially unchanged compared to the 2019–2021 period, which may be the main reason why we were able to identify the mutation in a lower percentage compared to the T790M hit rate described in the literature.

Kohánka A, Báthory-Fülöp L, Tanács-Bencze E, Engi H, Bogos K, Moldvay J, Pápai Székely Z, Szalai Z, Szőke J, Tóth E. Molecular pathology of lung adenocarcinomas, *EGFR* T790M resistance mutation study. *Magy Onkol* 68:334–338, 2024

Keywords: lung adenocarcinoma, *EGFR* T790M mutation, cfDNA

Napjainkra a célzott terápiák jelentősen átalakították a daganatos betegségek kezelését. Számos daganattípus, így a nem kisajtes tüdőrák, elsősorban a nem dohányos betegeknek kialakuló adenokarcinómák esetén is nagyszámú célzott terápia áll rendelkezésre, és a jelenlegi irányelvek szerint ezeknek a daganatoknak a kezelését a prediktív biomarkerek vizsgálata nélkül nem lehet elkezdni [1, 2]. Ugyanakkor a daganatok kezelésében a számos esetben oly sikeres célzott terápiákkal szembeni legnagyobb kihívást a mindennapi gyakorlatban a rezisztenciamutációk kialakulása okozza [3]. Tüdő-adenokarcinómák esetén az egyik legsikeresebben kezelhető mutációk az *EGFR* gén mutációi, melyek elsősorban nem dohányos betegek adenokarcinómáiban mutathatók ki. A két leggyakoribb *EGFR*-mutáció az exon 19 deléciója és az exon 21 L858R mutáció [4]. A rezisztenciamechanizmus főként az *EGFR* gént, illetve az alternatív jelátviteli útvonalakat érinti a *MET*- és *ERBB2*-amplifikációkon keresztül, illetve a downstream MAPK- vagy PI3K-útvonalak aktiválódása a leggyakoribb [5]. *EGFR*-mutáns tüdő-adenokarcinómák első (erlotinib, gefitinib), második (afatinib) generációs *EGFR*-tirozinkináz-inhibitorokkal (TKI) történő kezelése során leggyakrabban az *EGFR* T790M mutáció okoz terápiareszisztenciát. Ezen mutáció kialakulása esetén hatékony harmadik generációs *EGFR*-TKI (oszimertinib) áll rendelkezésre, ami további hosszú távú hatékony terápiát jelenthet a betegek számára, így a mutáció kimutatása kiemelkedő fontosságú [6].

Mivel a rezisztenciát okozó mutációk általában rendkívül alacsony kópiaszámmal vannak jelen a tumorban, ezek kimutatására érzékeny módszerekre van szükség. A napi gyakorlatban általában valamilyen PCR-alapú módszerrel vagy új generációs szekvenálással történik a rezisztenciamutációk vizsgálata [7]. Emellett a leggyakoribb probléma, hogy a progrediáló daganatból nehéz szövet- vagy citológiai mintát venni. Ezekben az esetekben egyszerű és könnyen hozzáférhető mintát jelent a vér és a mellkasi folyadék. A testüregi folyadékokban és vérben, ha kis mennyiségben is, de kimutatható a daganatból a véráramba, illetve mellkasi folyadékba kerülő tumor-DNS, ami ugyanazokat a mutációkat tartalmazza, mint a daganatszövet, és így alkalmas a rezisztenciamutációk kimutatására is. Intézetünkben 2020 óta végzünk rendszeresen T790M rezisztenciamutáció vizsgálatot. A 2020–2022 közötti eredményeinkről korábban már beszámoltunk [8]. Jelenlegi célunk az volt, hogy vizsgáljuk az azóta eltelt időszakban a klinikai gyakorlat alakulását és az eredményeink áttekintésével ellenőrizzük a laboratórium munkáját.

BETEGEK, MÓDSZEREK

2022 januárjától 2024 augusztusáig 222 beteg 380 (vérplazma, mellkasi folyadék, citológia, sejtblokk és formalinfixált szövet) mintáját vizsgáltuk. A betegek első vagy második generációs *EGFR*-TKI-kezelésben részesültek. A vérmintákat K2EDTA S-Monovette csövekben (Sarstedt, Nümbrecht, Németország) vagy Cell-Free DNA BCT Streck csövekben (Streck, La Vista, NE, USA) érkeztek a laboratóriumba. Az

első esetben a minta feldolgozása két órán belül megtörtént. Streck csövek esetén 7 napig stabil a minta 6–37 °C-on történő tárolás esetén.

DNS-kivonás

A szabad keringő DNS (cfDNA) optimális tisztaságához kétlépcsős centrifugálást alkalmaztunk, először 10 percig 3000 g-s, majd második lépésben 10 percig 12 000 g-s centrifugálás történt. Az így nyert plazmamintákból a DNS-izolálás a Cobas cfDNA Sample Preparation Kit (Roche) segítségével történt a gyártó utasításainak megfelelően. Ugyanezen kittel végeztük a mellkasi folyadékból a DNS-izolálást. Itt 1700 g-s sebességgel 10 perces centrifugálás után a felülúszóból nyertük ki a cfDNS-t. A formalinfixált és citológiai mintákból a korábban leírtaknak megfelelően történt a DNS-kivonás [8].

EGFR T790M mutáció kimutatásának módszere

A 2022 óta eltelt időszakban az *EGFR* T790M mutáció vizsgálatát a korábban leírt Super-ARMS *EGFR* Mutation Detection Kit (AmoyDx) segítségével végeztük a LightCycler 480 II készüléken (Roche). A reagenseket a gyártó protokollja szerint használtuk. A teszt az Amplification Refractory Mutation System (ARMS) és a valós idejű PCR technológiát alkalmazza, amely specifikus primereket és fluoreszcens szondákat tartalmaz 42 szomatikus mutáció kvalitatív kimutatására az *EGFR* gén 18., 19., 20. és 21. exonjában. Az eredményeket a LightCycler 480 SW 1,5 (Roche) szoftver segítségével értékeltük ki. A módszer előnye, hogy korlátozott mennyiségű és minőségű DNS-minta esetén is hatékonyan működik. A módszer érzékenysége 1% formalinfixált paraffinba ágyazott (FFPE) és 0,2% plazmaminták esetén [9].

Statisztikai analízis

A szignifikancia számítása χ^2 -tesztel történt.

EREDMÉNYEK

222 beteg 380 mintáját vizsgáltuk 2022. január 1.–2024. augusztus 31. között. 18 beteg 18 vérmintájának a vizsgálata sikertelen volt, nem tudtunk megfelelő mennyiségű cfDNS-t kinyerni a plazmából. Ez az összes vizsgált eset 4,7%-a (18/380). Összesen 362 sikeres vizsgálat történt.

Egy betegből átlagosan 1,94 minta érkezett. Az 1. táblázatban látható részletezve a sikeres vizsgálatoknak megfelelően 204 beteghez tartozó mintaszám. 122 beteg esetében egyetlen minta érkezett, ritkábban fordult elő, hogy négy-nél több mintát kaptunk egy betegből. A legtöbb a 10 minta volt egy beteg esetében. Itt többszöri próbálkozás után sem sikerült a rebiopszia, a betegség pedig lassú progressziót mutatott. A betegek közel felében egyetlen plazmamintából kimutatható volt a T790M mutáció. A folyadékbiopsziás vizsgálatok ismétlése nem növelte a találati arányt. Azokban az esetekben, ahol egy betegből 4, 6, 7 minta érkezett, jellemzően az utolsó minták lettek pozitívak és ezek rebiopsziák, sejtblokk és citológiai minták voltak.

1. TÁBLÁZAT. A betegekhez tartozó mintaszámok, mintatípustól függetlenül

Betegek száma (204)	Mintaszám/beteg (összes minta 362)	T790M mutáció, betegek száma
122	1	51 (41,8%)
42	2	14 (33,3%)
25	3	8 (32%)
6	4	2 (33,3%)
2	5	0 (0%)
5	6	3 (60%)
1	7	1 (100%)
1	10	0 (0%)

Az esetek többségében, 324 esetben vérből történt a rezisztenciamutáció vizsgálata. 28 esetben végeztek rebiopsziát, illetve 10 esetben mellkasi folyadékából történt a vizsgálat. 7 betegnél sejtblokk készült, ahol igazoltan tumorsejtet tartalmazott a minta és 3 mellkasi folyadék esetén cfDNA-ból vizsgáltuk a rezisztenciamutációt.

156/362 mintában, az esetek 43%-ában sem a primer tumorban azonosított *EGFR*-mutáció, sem a T790M mutáció nem volt kimutatható. A 2. táblázatban foglaltuk össze a mutációanalízis eredményét az eredeti *EGFR*-mutációk tükrében. Az összes minta 57%-ában (206/362) detektáltuk a primer tumorban is azonosított *EGFR*-mutációt. Ezek között pedig 38,3%-ban (79/206) tudtuk kimutatni a T790M rezisztenciamutációt.

A minta típusának a mutációk jelenlétével való összefüggését a 3. táblázatban részleteztük. A nem vérplazma vizsgálat során az esetek 45%-ában (17/38 eset) azonosítottuk a T790M

mutációt, míg plazmavizsgálat esetén 19%-ban (62/324 eset) kaptunk pozitív eredményt az összes vizsgált esetre nézve. A T790M mutáció találati arányát tekintve a plazma és nem plazma minták között szignifikáns volt a különbség (χ^2 -teszt $p=0,0003$).

3. TÁBLÁZAT. A minta típusának a T790M mutáció jelenlétével való összefüggése

Minta típusa	Összes eset (362)	T790M-pozitív eset (79)
Plazma	324 (89,5%)	62 (19%)
Mellkasi folyadék	3 (0,8%)	1 (33%)
Biopszia	23 (6,3%)	7 (30%)
Sejtblokk	7 (1,9%)	5 (71%)
Citológiai kenet	4 (1,1%)	3 (75%)
Reszekció	1 (0,2%)	1 (100%)

MEGBESZÉLÉS

Napjainkra a tüdődaganatok kezelésében a biomarker-tesztelés az onkológiai kezelés alapfeltételévé vált. Nemcsak előrehaladott (lokálisan előrehaladott és metasztatikus) nem kisesejtű tüdőrák esetén kötelező a célzott terápiákhoz szükséges mutációk és fúziók vizsgálata, hanem már a korai stádiumoktól (IB) javasolt a terápiák megkezdése előtt a molekuláris patológiai vizsgálat (10, 11). A jelenlegi irányelvek szerint komplex multigén vizsgálat javasolt, elsősorban új generációs szekvenálással a rendelkezésre álló terápiás célpontok meghatározására (12–14). Emellett az immunellenőrzőpont-gátló terápiák alkalmazásához elengedhetetlen a PD-L1-expresszió vizsgálata. A jelenleg rutinszerűen vizsgálandó, illetve további FDA/EMA által jóváhagyott terápiák prediktív genetikai eltéréseit a 4. táblázatban foglaltuk össze.

Ahogy a táblázatban látható, a célzott terápiákra alkalmas mutációk közül az *EGFR* gén mutációi a leggyakoribbak (15). Hatékony első, második generációs *EGFR*-TKI-k állnak rendelkezésre, azonban egy idő után mindig kialakul a rezisztencia, ami az irodalmi adatok szerint az esetek 50–70%-ában *EGFR* T790M mutáció (16). Ennek azonosítása esetén a betegek további harmadik generációs, a T790M mutáció esetén is hatásos terápiát kaphatnak. A jelenlegi irányelvek alapján ennek a rezisztenciamutációnak a vizsgálata javasolt első, második generációs *EGFR*-TKI-terápia alatti progresszió esetén (12). A többi célzott terápiás kezelés esetén rezisztenciamutáció vizsgálata jelenleg nem kötelező.

A laboratóriumunkban végzett vizsgálatok feldolgozása során részben az előző periódushoz hasonló eredményeket kaptunk. A T790M rezisztenciamutáció találati aránya elmarad a nemzetközi irodalomban látható eredményektől. Ennek fő oka véleményünk szerint a rebiopsziák alacsony száma (17–19). Szignifikánsan magasabb volt a találati arány a biopsziás minták és citológiai kenetek vizsgálatakor. Az egy betegből

2. TÁBLÁZAT. Super-ARMS AmoyDx teszt *EGFR* T790M mutáció vizsgálata

<i>EGFR</i> -mutációk típusa	Primer mutáció azonosítható (206)	T790M mutáció azonosítható (79)
EXON 19 DEL	122	49 (40,2%)
EXON 21 L858R	66	28 (42,4%)
EXON 21 L861Q	4	0
EXON 18 G719X	5	1 (20%)
EXON 18 G719X és EXON 20 S768I	5	1 (20%)
EXON 21 L858R és EXON 18 G719X	1	0
EXON 21 L861Q és EXON 18 G719X	1	0
EXON 19 DEL és EXON 21 L858R	1	0
EXON 20 INS	1	0

4. TÁBLÁZAT. Nem kis Sejtes tüdőrák FDA által jóváhagyott célzott terápiás gyógyszereinek prediktív markerei

Biomarker	Módszerek	Gyakoriság	Célzott terápiás szer
<i>EGFR</i> -mutáció 18., 19., 20., 21. exon	PCR, NGS	12–15%	gefitinib, erlotinib, afatinib, oszimertinib
<i>EGFR</i> 20. exon inszerció	PCR, NGS	4%	amivantamab
<i>KRAS</i> -mutáció 2., 3. exon	PCR, NGS	30–35%	szotoraszib (G12C), adagraszib (G12C)
<i>BRAF</i> -mutáció 15. exon	PCR, NGS	2–3%	dabrafenib, trametinib
<i>ERBB2</i> -mutáció	NGS	2%	trasztuzumab deruxtekán
<i>MET</i> exon 14 skipping	NGS	4%	krizotinib, kapmatinib, tepotinib
<i>ALK</i> -fúzió	IHC, FISH, NGS	3–5%	krizotinib, ceritinib, alektinib, lorlatinib, brigatinib
<i>ROS1</i> -fúzió	IHC, FISH, NGS	1–2%	krizotinib, ceritinib, entrektinib
<i>RET</i> -fúzió	NGS	2%	pralszetinib, szelperkatinib
<i>NTRK1-3</i> fúzió	IHC, FISH, NGS	0,5%	entrektinib, larotrektrinib
<i>NRG1</i> -fúzió	NGS	7% (mucinózus adenokarcinóma)	afatinib
<i>MET</i> -amplifikáció	FISH, NGS	2%	kapmatinib, tepotinib, krizotinib

származó mintaszám növekedésével nem javult a T790M mutáció kimutathatósága, illetve ahol több mintát kaptunk egy betegből, ott általában a rebiopszia vagy a sejtblokk, illetve az ismételt citológiai kenet vizsgálata volt sikeres. Az összes minta 10%-a volt nem plazmaminta. Ez az arány lényegében nem változott az előző időszakhoz képest, hisz korábban 9% volt a rebiopszia aránya. Az irodalmi adatokkal összhangban T790M rezisztenciamutáció elsősorban *EGFR* 19. exon delécio és 21. exon L858R pontmutációk esetén volt megfigyelhető [20]. Ebben a periódusban vizsgált mintáink között az azonos vizsgálati módszer ellenére alacsonyabb százalékban azonosítottunk T790M mutációt. Korábban az összes primer *EGFR*-mutációt tartalmazó minta 48%-ában volt T790M mutáció, míg jelenleg ez az arány 38,3%. Ennek egyik magyarázata lehet, hogy a minták között a biopsziák esetén alacsonyabb volt a találati arány, mint korábban, 5/23 biopszia esetén a tumorsejt-ép sejt arány 5% alatti volt. Annak ellenére, hogy a módszerünk érzékenysége paraffinos minták esetén 1%, az 5% alatti tumor-épsejt arány okozhat álnegatív eredményt. Ugyanakkor a sejtblokk- és citológiai minták esetén az irodalomban találhatóhoz hasonló, 70% körüli arányban azonosítottuk a mutációt jelenleg is, illetve a plazmamintákat tekintve, korábban az összes plazmaminta 16,9%-a, míg a jelenlegi periódusban 19%-a volt pozitív. A módszerünk megbízhatóságát jelzi, hogy laboratóriumunk 2022-ben részt vett egy „pilot” nemzetközi vizsgálatban *EGFR* T790M mutáció plazmából történő azonosítására, ahol 100%-os eredménnyel azonosítottuk a kapott mintákban a mutációt. 2/25 laboratórium nyújtott 100%-os teljesítményt a körvizsgálatban. Az általunk használt AmoyDx teszt mellett a másik 100%-os teljesítményt nyújtó laboratórium digitális droplet PCR technikával dolgozott [21].

Összességében elmondhatjuk, hogy a laboratóriumunk eredményei az elmúlt öt évet tekintve a nemzetközi irodalomban látható eredményekkel összhangban állnak. A plazmavizsgálatok egymás utáni ismétlése jelentősen nem növeli a T790M találati arányt. Negatív plazmavizsgálat esetén törekedni kell a rebiopsziára, illetve amennyiben malignus mellkasi folyadékgyülem formájában jelent meg a progresszió, úgy a mellkasi folyadék és/vagy az abból származó sejtblokk vizsgálatára.

A JÖVŐ

Az elkövetkező években várható, hogy növekedni fog azon rezisztenciamutációk száma, amelyeket terápiás célból vizsgálnunk kell. Emiatt fontos a monogénés módszerek mellett a cfDNA vizsgálatára alkalmas multigénés NGS-alapú vizsgálatok bevezetése [22]. Intézetünkben az AmoyDx teszt mellett 2024-ben bevezettünk egy új generációs szekvenálás alapú módszert a folyadékbiopsziák vizsgálatára (Oncomine Precision Assay, Ion Torrent Genexus szekvenáló készüléken, ThermoFisher), ami megfelelő cfDNA-mennyiség esetén 0,1–0,5%-os érzékenységgel képes a T790M mutáció és további rezisztenciamutációk azonosítására. Ez egy 52 génes panel, ami a teljes nukleinsav izolálása után a mutációk mellett kópiaszám-eltérések és fúziók azonosítására is alkalmas, így azon tüdő-adenokarcinómás betegeknek, akiknél nincs elérhető sejt- vagy szövetminta a primer molekuláris vizsgálatra, ezzel a módszerrel a primer molekuláris patológiai vizsgálat is elvégezhető majd vérből a rezisztenciamutációk azonosítása mellett.

Etikai engedély: Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT TUKEB), engedély száma: BMEÜ/15046-1/2024/EKU

IRODALOM

1. Min HY, Lee HY: Molecular targeted therapy for anticancer treatment. *Exp Mol Med* 54:1670-1694, 2022
2. Shuel SL: Targeted cancer therapies: Clinical pearls for primary care. *Can Fam Physician* 68:515-518, 2022
3. Sabnis AJ, Bivona TG: Principles of resistance to targeted cancer therapy: lessons from basic and translational cancer biology. *Trends Mol Med* 25:185-197, 2019
4. Graham RP, Treece AL, Lindeman NI, et al: Worldwide frequency of commonly detected EGFR mutations. *Arch Pathol Lab Med* 142:163-167, 2018
5. Oxnard GR, Hu Y, Mileham KF, et al: Assessment of resistance mechanisms and clinical implications in patients with EGFR T790M-positive lung cancer and acquired resistance to osimertinib. *JAMA Oncol* 4:1527, 2018
6. Tan CS, Cho BC, Soo RA: Next-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in epidermal growth factor receptor-mutant non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 93:59-68, 2016
7. Engi H, Tóth E: Folyadékbiopsziából végzett vizsgálatok jelentősége szolid tumorok esetén. *Magy Onkol* 67:125-130, 2023
8. Bencze E, Bogos K, Kohánka A, et al: EGFR T790M mutation detection in patients with non-small cell lung cancer after first line EGFR TKI therapy: summary of results in a three-year period and a comparison of commercially available detection kits. *Pathol Oncol Res* 28:1610607, 2022
9. Li X, Zhou C: Comparison of cross-platform technologies for EGFR T790M testing in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 8:100801-100818, 2017
10. Daly ME, Singh N, Ismaila N, et al: Management of stage III non-small cell lung cancer: ASCO guideline rapid recommendation update. *J Clin Oncol* 42:3058-3060, 2024
11. Gosney JR, Paz-Ares L, Jänne P, et al: Pathologist-initiated reflex testing for biomarkers in non-small-cell lung cancer: expert consensus on the rationale and considerations for implementation. *ESMO Open* 8:101587, 2023
12. Hendriks LE, Kerr KM, Menis J, et al: Oncogene-addicted metastatic nonsmall-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 34:339-357, 2023
13. Pei G, Li M, Min X, et al: Molecular identification and genetic characterization of early-stage multiple primary lung cancer by large-panel next-generation sequencing analysis. *Front Oncol* 11:653988, 2021
14. Hofman P: EGFR status assessment for better care of early stage non-small cell lung carcinoma: what is changing in the daily practice of pathologists? *Cells* 10:2157, 2021
15. Hondelink LM, Ernst SM, Atmodimedjo P, et al: Prevalence, clinical and molecular characteristics of early stage EGFR-mutated lung cancer in a real-life West-European cohort: Implications for adjuvant therapy. *Eur J Cancer* 181:53-61, 2023
16. Pereira I, Gaspar C, Pina M, et al: Real-world T790M mutation frequency and impact of rebiopsy in patients with EGFR-mutated advanced non-small cell lung cancer. *Cureus* 12:e12128, 2020
17. Wang ZF, Ren SX, Li W, Gao GH: Frequency of the acquired resistant mutation T790 M in non-small cell lung cancer patients with active exon 19 Del and exon 21 L858R: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 18:148, 2018
18. Sundaresan TK, Sequist LV, Heymach JV, et al: Detection of T790M, the acquired resistance EGFR mutation, by tumor biopsy versus noninvasive blood-based analyses. *Clin Cancer Res* 22:1103-1110, 2016
19. Jenkins S, Yang JCH, Ramalingam SS, et al: Plasma ctDNA analysis for detection of the EGFR T790M mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 12:1061-1070, 2017
20. Seto T, Nogami N, Yamamoto N, et al: Real-world EGFR T790M testing in advanced non-small cell lung cancer: a prospective observational study in Japan. *Oncol Ther* 6:203-215, 2018
21. Filipits M, Kainz V, Sebek V, Zach H, on behalf of the Liquid Biopsy Collaborative Study Group: Epidermal growth factor receptor T790M mutation testing in non-small cell lung cancer: an international collaborative study to assess molecular EGFR T790M testing in liquid biopsy. *Cancers* 15:3528, 2023
22. Testa U, Castelli G, Pelosi E: Alk-rearranged lung adenocarcinoma: From molecular genetics to therapeutic targeting. *Tumori* 110:88-95, 2024