



Update Thoraxonkologie 2018

Behandlung des Lungenkarzinoms mit Treibermutationen

Matthias Raspe und Nikolaj Frost, Berlin

Die aktuelle (Erstlinien-)Therapie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms fußt derzeit auf drei Säulen. Neben der weiterhin indizierten klassischen platinbasierten Chemotherapie können Patienten mit einer PD-L1-Expression von mindestens 50 % der Tumorzellen primär mittels Immuntherapie behandelt werden. Schließlich kommt für 15 bis 20 % der Patienten mit Adenokarzinomhistologie bei Nachweis entsprechender Treibermutationen eine zielgerichtete Behandlung infrage. In diesem Übersichtsartikel werden die derzeit verfügbaren Optionen für molekulare Alterationen des EGFR- und BRAF-Gens sowie Translokationen von ALK und ROS1 vorgestellt. Neben der Darstellung der Zulassungsstudien wird die Handhabung in der klinischen Routine besprochen und ein kurzes Schlaglicht auf zu erwartende Nebenwirkungen geworfen.

Arzneimitteltherapie 2018;36:330–7.

Das Lungenkarzinom ist unverändert die bösartige Erkrankung mit der höchsten absoluten Anzahl an Todesfällen in Deutschland. 20 bis 25 % aller Patienten mit einer Krebserkrankung versterben an dieser Krankheit [2, 7, 42]. 50 bis 60 % der Patienten werden in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert, sodass meist eine kurative Behandlung nicht mehr möglich ist. Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt mit über 70 Jahren deutlich höher als bei vielen anderen Malignomen. Zusätzlich weisen die meisten Patienten nach oftmals jahrzehntelangem Nicotin-Konsum Komorbiditäten wie eine koronare Herzerkrankung (KHK) oder eine chronisch obstruktive Bronchitis (COPD) auf [16]. Diese Faktoren lassen die Diagnostik, aber insbesondere die Behandlung der Patienten oftmals zu einer Herausforderung werden.

Rückgrat der Therapie in den vergangenen Jahrzehnten war die klassische Chemotherapie. Das mediane Überleben beträgt darunter etwa 12 Monate [30–32]. In den vergangenen Jahren hat die Therapielandschaft des Lungenkarzinoms jedoch Veränderungen erfahren. Sie fußt mittlerweile auf drei Säulen. Neben der weiterhin für viele Patienten indizierten Chemotherapie stehen mittlerweile immunonkologische Behandlungsansätze und bei Nachweis entsprechender molekularer Alterationen zielgerichtete Therapien zur Verfügung.

Molekulare Veränderungen im Bereich für die Wachstumskontrolle der Zelle relevanter Gene können die Aktivierung einer Treibermutation bewirken, die im Verlauf der Erkrankung das Tumorwachstum mitbestimmt. So ist die chronisch-myeloische Leukämie (CML) von der bcr-abl-Translokation abhängig. Eine medikamentöse Unterbre-

chung dieses Signalwegs stabilisiert die Erkrankung mittlerweile über mehrere Jahre.

Beim Lungenkarzinom relevante und behandelbare Treibermutationen sind bislang nur für Patienten mit Adenokarzinom verfügbar (Abb. 1, Abb. 2). Diese betreffen den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR), die anaplastische Lymphomkinase (ALK), die Proto-Onkogen-Tyrosin-Proteinkinase ROS1 und BRAF (B-Rapidly accelerated fibrosarcoma). Zusammengenommen machen diese Alterationen etwa 15 bis 20 % der Adenokarzinome aus [13]. Deutlich mehr molekulare Veränderungen sind zwar bekannt, entsprechend wirksame Therapieansätze stehen jedoch noch nicht zur Verfügung.

EGFR, ALK und ROS1 sind Rezeptor-Tyrosinkinasen. Eine Ligandenbindung führt zur Aktivierung der intrazellulär gelegenen Kinasedomäne. Die nachgeschaltete Signaltransduktion in den Zellkern steuert Vorgänge wie Mitose und Apoptose bzw. im Falle eines Malignoms daraus abgeleitete Prozesse wie Angiogenese, Apoptoseresistenz und Metastasierung. BRAF dagegen befindet sich intrazellulär und stellt einen Schritt der intrazellulären Signalkaskade des RAS-RAF-MEK-Wegs dar. Das am Anfang dieses Weges befindliche RAS stellt mit der Variante KRAS die häufigste Treibermutation beim Adenokarzinom dar und macht etwa 25

Dr. med. Nikolaj Frost, Dr. med. Matthias Raspe,
Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum,
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und
Pneumologie, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin,
E-Mail: nikolaj.frost@charite.de

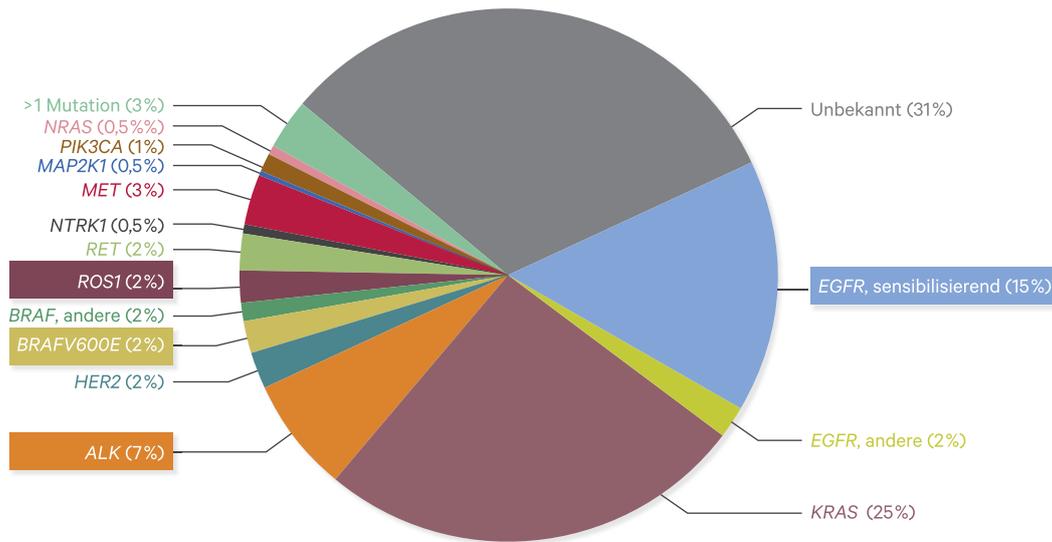


Abb. 1. Molekulare Alterationen beim Adenokarzinom der Lunge und ihre Häufigkeit (mod. nach [13]).

ALK: anaplastische Lymphomkinase; BRAF: B-rapidly accelerated fibrosarcoma; EGFR: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; HER: humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; KRAS: Kirsten RAS viral oncogene homolog; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MET: mesenchymal epithelial transition factor receptor gene; NRAS: neuroblastoma RAS viral oncogene homolog; NTKR: neurotrophic tyrosine kinase receptor; PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; RAS: rat sarcoma; RET: ret proto oncogene; ROS: ROS proto oncogene tyrosin protein kinase

bis 30 % aller Mutationen aus. Leider konnte bislang keine wirksame Behandlung hierfür erreicht werden.

EGFR

Der EGFR-Wachstumsrezeptor wurde in den 50er-Jahren erstmalig durch den amerikanischen Biochemiker Stanley Cohen beschrieben, der für seine Forschung zu Wachstumsrezeptoren, insbesondere zum „nerve growth factor“ (NGF) 1986 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin geehrt wurde [41].

Der EGFR-Rezeptor (Synonyme: HER1, ErbB1) ist mit den drei weiteren Rezeptoren HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 und HER4/ErbB4 Teil einer Familie von Rezeptor-Tyrosinkinasen. Nach Ligandenbindung erfolgen eine Homodimerisierung des Rezeptors und konsekutive Aktivierung der Tyrosinkinase im Zellinneren mit anschließender Autophosphorylierung. Letztlich wird dadurch eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt, die über zwei wesentliche Signalwege (PI3K/AKT/mTOR und RAS/RAF/MEK/ERK) das Zellwachstum steuern.

Im Gegensatz zum kleinzelligen Lungenkarzinom, das als einer der wenigen soliden Tumore keine Überexpression von EGFR aufweist, ist beim NSCLC in 60 % eine prognostisch ungünstige Überexpression vorhanden. Plattenepithelkarzinome weisen diese deutlich häufiger auf als Adeno- oder großzellige Karzinomen der Lunge [9, 14, 17]. Erst die Entdeckung aktivierender EGFR-Mutationen brachte eine schlüssige Erklärung dafür, weshalb bislang nur ein geringer Teil der Patienten (ca. 10 %) von einer Hemmung der EGFR-vermittelten Signaltransduktion

profitiert hatte. Dies war der Ausgangspunkt einer zielgerichteten, individuellen Tumorthherapie beim Lungenkarzinom.

Mutationen im EGFR-Gen betreffen die Exone 18 bis 22 der Tyrosinkasedomäne [15]. Sie führen über eine Liganden-unabhängige Aktivierung des Rezeptors zu einer unkontrollierten Zellproliferation. Mutationen sind mit einer Häufigkeit von etwa 10 bis 20 % bei kaukasischen und bis zu 50 % bei asiatischen Patienten mit Adenokarzinomen zu finden [6, 12]. Neben der Ethnie korrelieren ein Nie-Raucher-Status, niedriges Alter und weibliches Geschlecht mit der Inzidenz aktivierender EGFR-Mutationen [37]. Deletionen im Exon 19 und Punktmutationen im Exon 21 (L858R; Substitution der Aminosäure Leucin durch Arginin an Position 858) sind mit insgesamt 90 % mit Abstand am häufigsten zu finden. Sie werden daher auch als „common mutations“ bezeichnet. Unten den beiden genannten Mutationen ist die Exon-19-Deletion prognostisch am günstigsten [22].

Zu den selteneren Mutationen gehören Punktmutationen im Exon 18 (G719X und L861G) und 20 (S768I) sowie Insertionen im Exon 20. Seltener Mutationen zeigen ein unterschiedliches Ansprechen auf EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs), sodass nicht bei jeder Mutation eine zielgerichtete Behandlung empfohlen werden kann [1, 46]. Das gilt insbesondere für Insertionen im Exon 20.

In Deutschland sind als Erstgenerations-EGFR-TKIs derzeit Erlotinib (Tarceva®) und Gefitinib (Iressa®) zugelassen. Seit 2013 ist zusätzlich der Zweitgenerations-EGFR-TKI Afatinib (Giotrif®) verfügbar. Im Gegensatz zur kompeti-

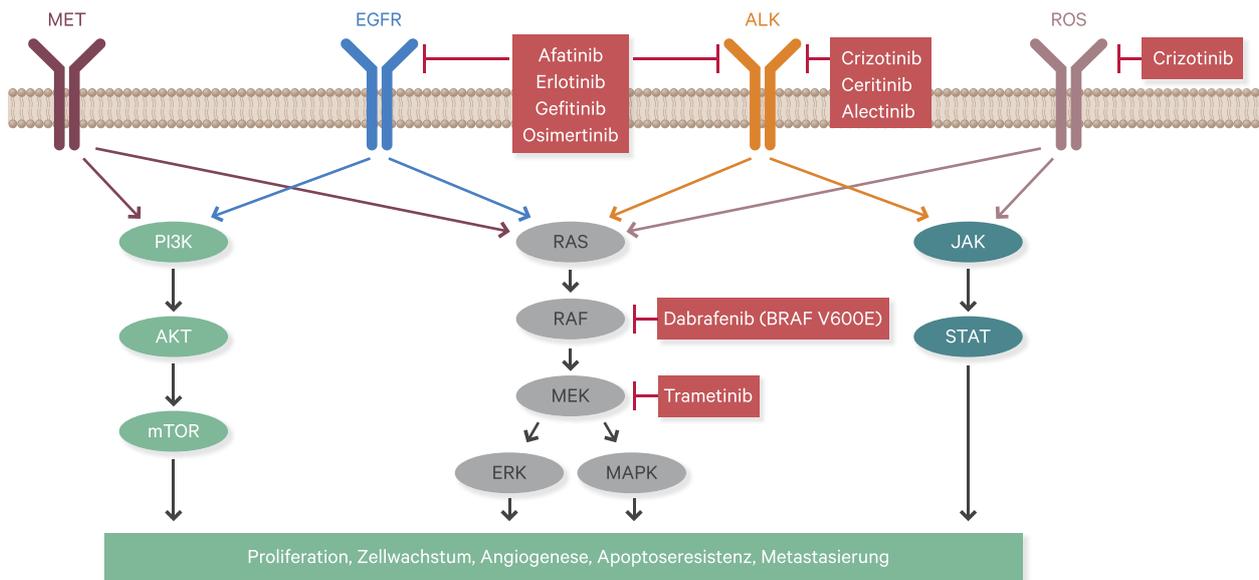


Abb. 2. Angriffspunkte bislang zugelassener Targettherapeutika beim Adenokarzinom der Lunge mit Nachweis entsprechender molekularer Veränderungen
 ALK: anaplastische Lymphomkinase; BRAF: B-Rapidly accelerated fibrosarcoma; EGFR: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; mTOR: mammalian target of rapamycin; ROS: Proto-Onkogen-Tyrosin-Proteinkinase

tiven Bindung der Erstgenerationssubstanzen binden die Zweitgenerations-EGFR-TKI mit kovalenter Bindung irreversibel an allen vier Subtypen der Tyrosinkinase-Inhibitoren [25] (pan-HER-Inhibitor). In den frühen Zulassungsstudien konnte durch eine zielgerichtete Behandlung eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (PFS) und der Lebensqualität aufgezeigt werden. Eine Lebensverlängerung war jedoch nicht nachweisbar. Dies wurde wiederholt durch die hohe Rate an Patienten, die im Rahmen der Studien von einem Arm in den anderen überwechselten (Cross-over), erklärt. Lediglich für Afatinib war trotz hohen Cross-overs auch ein Überlebensvorteil in der gepoolten Analyse der Zulassungsstudien LUX-Lung-3 und -6 nachweisbar.

EGFR-TKIs bieten ein klassisches Bild an Nebenwirkungen, über die der Patient vor Therapieeinleitung gut aufgeklärt werden muss. Weiterhin ist eine engmaschige Therapiekontrolle notwendig. Zu den sehr häufigen Nebenwirkungen (≥ 1 von 10 Patienten) gehören Paronychien, Appetitlosigkeit, Epistaxis, Mukositiden mit Diarrhöen und Übelkeit/Erbrechen sowie Hautausschläge oder eine akneiforme Dermatitis. Diese Nebenwirkungen sind unter dem Zweitgenerations-EGFR-TKI Afatinib stärker ausgeprägt als unter Erlotinib oder Gefitinib. Zurückzuführen ist das möglicherweise auf die irreversible Hemmung und eine zusätzliche Inhibition des Wildtyp-EGFR [4].

Unter Therapie mit Erst- und Zweitgenerations-EGFR-TKI treten im Mittel nach 10 bis 15 Monaten Resistenzen auf. Die Mechanismen sind dabei unterschiedlich [8]. Mit 50

bis 60 % am häufigsten ist die T790M-Punktmutation im Exon 20. Der größere Methionin-Rest verhindert in diesem Fall die Bindung von Erst- und Zweitgenerations-TKI, während die katalytische Aktivität der EGFR-Kinase-Domäne erhalten bleibt [10].

Mit dem Präparat Osimertinib (Tagrisso®) ist in Deutschland seit 2016 ein potenter und irreversibel bindender Drittgenerations-EGFR-TKI zugelassen. Er inhibiert spezifisch die durch die T790M-Mutation alterierte Tyrosinkinase, ist aber auch bei TKI-naiven Patienten mit aktivierenden EGFR-Mutationen wirksam (Details s. unten bei Daten zu Osimertinib). Daher sollte im Progress eine Re-Biopsie zum Nachweis der Resistenz am Tumorgewebe angestrebt werden. Ist diese nicht möglich, kann auch eine Blutanalyse (Liquid biopsy) versucht werden – allerdings um den Preis einer geringeren Sensitivität.

Aufgrund einer selektiveren Bindung an den mutierten EGFR-Rezeptor ist Osimertinib besser verträglich als die Inhibitoren der ersten beiden Generationen.

Seltener Gründe für eine Resistenz gegenüber Erst- und Zweitgenerations-TKI liegen in der Aktivierung paralleler (z. B. cMET oder HER2) oder nachgeschalteter (z. B. PIK-3CA oder BRAF) Signalwege begründet. In einem kleinen Teil der Fälle sind darüber hinaus die Transformation in ein kleinzelliges Lungenkarzinom oder eine sarkomatoide Transformation beschrieben worden. In der Regel sollte der TKI bis zum Beginn einer nachfolgenden Therapie nicht abgesetzt werden, da in diesem Fall fulminant progrediente Krankheitsverläufe beschrieben worden sind.

Erlotinib

Der Erstgenerations-EGFR-TKI Erlotinib (Tarceva®) wird mit einer empfohlenen Dosis von 150 mg nüchtern einmal täglich eingenommen (Tab. 1).

In der Phase-III-Studie EURTAC wurde in Frankreich, Italien und Spanien erstmals eine westliche Patientengruppe mit aktivierenden EGFR-Mutationen (Exon-19-Deletion oder L858R-Mutation) untersucht [29]. Das progressionsfreie Überleben (PFS) der 86 Patienten im Erlotinib-Arm war mit 9,7 Monaten signifikant höher als das der 87 Patienten im Chemotherapie-Arm (Platin mit Gemcitabin oder Docetaxel) mit 5,2 Monaten (Hazard-Ratio [HR] 0,37; 95%-Konfidenzintervall [KI] 0,25–0,54; $p < 0,0001$). Auch die Verträglichkeit war unter Erlotinib deutlich besser. Durch die Möglichkeit eines Cross-over von Patienten mit Progress unter Chemotherapie in den Erlotinib-Arm ist der Therapieeffekt vermutlich unterschätzt. Die Phase-III-Studie OPTIMAL hatte sechs Monate zuvor noch deutlichere Ergebnisse in einem chinesischen Patientenkollektiv gezeigt [48]. Hier lag das PFS im Erlotinib-Arm (82 Patienten) bei 13,1 Monaten ebenfalls signifikant länger als im Chemotherapie-Arm (72 Patienten) mit 4,6 Monaten (HR 0,16; 95%-KI 0,10–0,26; $p < 0,0001$).

Gefitinib

Der Erstgenerations-EGFR-TKI Gefitinib (Iressa®) wird mit einer empfohlenen Dosis von 250 mg nüchtern einmal täglich eingenommen.

In der großen, primär als Nichtunterlegenheitsstudie angelegten Phase-III-Studie IPASS in einer asiatischen Patientengruppe mit mehr als 1200 Patienten wurde die Gabe von Gefitinib mit einer Chemotherapie aus Carboplatin und Paclitaxel verglichen [24]. Das Vorliegen einer aktivierenden EGFR-Mutation war jedoch kein zwingendes Einschlusskriterium. Etwa 25 % des Kollektivs wiesen entsprechende Mutationen auf. Primärer Endpunkt war das PFS. Innerhalb von 12 Monaten zeigte sich dennoch im Gefitinib-Arm ein signifikant überlegenes PFS von 24,9 % gegenüber 6,7 % im Chemotherapie-Arm (HR für Progression oder Tod 0,74; 95%-KI 0,65–0,85; $p < 0,001$), was auf den deutlichen PFS-Vorteil der Patienten mit aktivierenden EGFR-Mutationen im Gefitinib-Arm zurückgeführt wurde. So lag in der Subgruppe von 261 Patienten mit Nachweis einer EGFR-Mutation der PFS-Vorteil auf Seiten des Gefitinib-Arms (HR 0,48; 95%-KI 0,36–0,46) und bei 176 Patienten ohne Mutation der Vorteil auf Seiten des Chemotherapie-Arms (HR 2,85; 95%-KI 2,05–3,98).

Afatinib

Der Zweitgenerations-EGFR-TKI Afatinib (Giotrif®) wird mit einer empfohlenen Dosis von 40 mg einmal täglich nüchtern eingenommen.

Afatinib wurde in der internationalen Phase-III-Studie LUX-Lung-3 2:1 randomisiert mit einer Chemotherapie aus Cisplatin und Pemetrexed bei 345 Patienten mit NSCLC im Stadium IIIB/IV und nachgewiesener EGFR-Mutation verglichen [33]. Das PFS unter Afatinib (230 Patienten) war mit 11,1 Monaten signifikant gegenüber dem Chemotherapie-Arm (115 Patienten) mit 6,9 Monaten verlängert (HR 0,58; 95%-KI 0,43–0,78).

In der lediglich in Asien durchgeführten Schwesterstudie LUX-Lung-6 (ebenfalls mit 2:1-Randomisierung) mit 364 Patienten aus China, Thailand und Südkorea wurde Afatinib mit einer Chemotherapie aus Cisplatin und Gemcitabin verglichen [44]. Auch hier war das PFS im Afatinib-Arm (242 Patienten) mit 11 Monaten signifikant gegenüber dem Chemotherapie-Arm (122 Patienten) mit 5,6 Monaten überlegen (HR 0,28; 95%-KI 0,20–0,39). Konnte in den vorgenannten Studien ein verbessertes PFS und Verträglichkeit nachgewiesen werden, wurde mit einer gepoolten und vorher definierten Analyse der LUX-Lung-3- und -6-Studien erstmals ein verbessertes Gesamtüberleben (OS) für Patienten mit Exon-19-Deletion belegt [47]: Bei diesen Patienten war das OS im Afatinib-Arm mit 33,3 (LUX-Lung-3) bzw. 31,4 Monaten (LUX-Lung-6) gegenüber dem Chemotherapie-Arm mit 21,1 bzw. 18,4 Monaten verlängert (HR 0,54 mit 95%-KI 0,36–0,79 bzw. HR 0,64 mit 95%-KI 0,44–0,94). Bei Patienten mit L858R-Exon-21-Mutation konnte dieses Vorteil nicht belegt werden. Hier schnitten die Patienten im Chemotherapie-Arm sogar tendenziell besser ab.

Mit der Phase-IIb-Studie LUX-Lung-7 lag erstmals ein direkter Vergleich zweier EGFR-TKIs vor. Hier wurden Gefitinib und Afatinib bei Patienten im Stadium IIIB/IV und einer der beiden häufigen aktivierenden EGFR-Mutationen miteinander verglichen [26]. Das mediane OS unterschied sich nach einem medianen Beobachtungszeitraum von 42,6 Monaten mit 27,9 Monaten im Afatinib- (146 Patienten) und 24,5 Monaten im Gefitinib-Arm (151 Patienten) nicht signifikant (HR 0,86; 95%-KI 0,66–1,12; $p = 0,2580$). Hinsichtlich des PFS ergab sich mit 11 Monaten im Afatinib- versus 10,9 Monaten im Gefitinib-Arm jedoch ein signifikanter Unterschied zugunsten des Zweitgenerations-TKI (HR 0,74; 95%-KI 0,57–0,95; $p = 0,0178$).

Osimertinib

Der Drittgenerations-EGFR-TKI Osimertinib (Tagrisso®) wird mit einer empfohlenen Tagesdosis von 80 mg einmal täglich unabhängig von der Nahrungsaufnahme eingenommen.

Osimertinib wurde in der internationalen und hauptsächlich unter asiatischen Patienten (65 % des Kollektivs) durchgeführten Phase-III-Studie AURA 2:1 randomisiert gegenüber einer konventionellen Chemotherapie getestet. Insgesamt wurden 419 Patienten mit nachgewiesener

Tab. 1. Dosierungsempfehlungen in der Thoraxonkologie [Fachinformationen]

Angriffspunkt	Wirkstoff (Handelsname)	Dosierungsempfehlung	Anmerkung
Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)	Afatinib (Giotrif®)	40 mg einmal täglich	Einnahme nüchtern
	Erlotinib (Tarceva®)	150 mg einmal täglich	Einnahme nüchtern
	Gefitinib (Iressa®)	250 mg einmal täglich	Einnahme nüchtern
	Osimertinib (Tagrisso®)	80 mg einmal täglich	Einnahme unabhängig von der Nahrungsaufnahme
Anaplastische Lymphomkinase (ALK)	Alectinib (Alecensa®)	600 mg zweimal täglich	Einnahme zusammen mit Nahrungsmitteln
	Ceritinib (Zykadia®)	750 mg einmal täglich	Einnahme nüchtern
	Crizotinib (Xalkori®)	250 mg zweimal täglich	Einnahme unabhängig von der Nahrungsaufnahme

T790M-Mutation und Progress unter Erstlinientherapie mit einem EGFR-TKI in die Studie eingeschlossen. Für Patienten im Chemotherapie-Arm bestand bei neuerlichem Progress die Möglichkeit zum Cross-over [23]. Das mediane PFS war im Osimertinib-Arm (279 Patienten) mit 10,1 Monaten dem Platin/Pemetrexed-Arm (140 Patienten) mit 4,4 Monaten signifikant überlegen (HR 0,30; 95%-KI 0,23–0,41; $p < 0,001$). Diese Überlegenheit zeigte sich auch für Patienten mit Hirnmetastasen (8,5 Monate versus 4,2 Monate; HR 0,32; 95%-KI 0,21–0,49). Insgesamt war die Verträglichkeit im Osimertinib-Arm besser als unter Chemotherapie.

In der kürzlich veröffentlichten Phase-III-Studie FLAURA wurde Osimertinib in der Erstlinienbehandlung bei Patienten mit häufigen aktivierenden EGFR-Mutationen gegen die Erstgenerations-EGFR-TKIs Erlotinib oder Gefitinib verglichen [40]. Das mediane PFS war unter den 279 Patienten im Osimertinib-Arm mit 18,9 Monaten gegenüber 277 Patienten im Erlotinib/Gefitinib-Arm mit 10,2 Monaten signifikant überlegen (HR 0,46; 95%-KI 0,37–0,57; $p < 0,001$). Mit 34 % versus 45 % \geq Grad-3-Toxizitäten war Osimertinib zudem besser verträglich. Das überlegene PFS zeigte sich auch bei Patienten mit ZNS-Metastasen (15,2 vs. 9,6 Monate; HR 0,47; 95%-KI 0,30–0,74). Da zum Zeitpunkt der Datenerhebung lediglich 25 % der OS-Ereignisse aufgetreten waren, sind die Überlebensdaten derzeit noch nicht abschließend publiziert. Dennoch kann Osimertinib seit Juli 2018 nun auch in der Erstlinienbehandlung unabhängig vom Nachweis einer T790M-Mutation bei Vorliegen einer häufigen aktivierenden EGFR-Mutation verordnet werden.

ALK

Neben Mutationen im EGFR-Gen stellen Translokationen im Gen der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) die zweitgrößte Gruppe onkogener Mutationen beim Adenokarzinom der Lunge dar. Sie treten bei ca. 5 bis 7 % der Patienten auf [13, 21] – loko-regional sind deutliche Abweichungen möglich. Erstmalig wurde 2007 ein EML4(Echinoderm microtubule-associated protein-like

4)-ALK-Fusionsprotein beschrieben [38]. Mittlerweile sind viele Varianten bekannt, die jedoch alle für die gleiche intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne kodieren, und analog den EGFR-Mutationen in das Zellwachstum eingreifen.

Als Goldstandard zum Translokations-Nachweis gilt die Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) mit einem Schwellenwert für Positivität von ≥ 15 % Bruchereignissen. Aber auch die Immunhistochemie hat insbesondere wegen hoher Kosten und Zeitbedarf der FISH ihren Stellenwert. So muss bei negativer Immunhistochemie (IHC) keine zusätzliche FISH erfolgen [43] und der Befund gilt insgesamt als ALK-negativ, sodass sich die IHC als guter Screening-Parameter eignet.

Der erste zugelassene ALK/ROS1/cMET-Multikinase-Inhibitor ist Crizotinib (Xalkori®). Auch unter ALK-Inhibitoren tritt ähnlich den EGFR-TKI nach 8 bis 12 Monaten ein Wirkverlust verbunden mit einem Progress der Erkrankung auf. Aufgrund einer geringen Liquorgängigkeit manifestiert sich der Progress unter Crizotinib häufig zerebral. Mittlerweile sind die Zweitgenerations-ALK-TKIs Alectinib (Alecensa®) und Ceritinib (Zykadia®) erhältlich, die auch zerebral wirksam sind. Beide sind kürzlich auch für die Erstlinientherapie zugelassen worden. Drittgenerations-ALK-Inhibitoren wie beispielsweise Brigatinib oder Lorlatinib stehen vor der Zulassung.

ALK-Inhibitoren bieten ein klassisches Bild an Nebenwirkungen, über die der Patient vor Therapieeinleitung gut aufgeklärt und auf die hin Patienten unter Therapie engmaschig überwacht werden sollten. Zu den sehr häufigen (≥ 1 von 10 Patienten) Nebenwirkungen unter Crizotinib gehören Leukopenien/Anämien, Elektrolytstörungen, periphere Ödeme, Appetitlosigkeit, Neuropathien, Sehstörungen, Schwindel, Bradykardien, gastrointestinale Unverträglichkeit (Übelkeit/Erbrechen, Diarrhö, Obstipation), Transaminasenerhöhungen, Exantheme und Müdigkeit. Ceritinib weist ein insgesamt ungünstigeres insbesondere gastrointestinales Verträglichkeitsprofil auf (82 % Diarrhö, 74 % Übelkeit). Hier kann eine reduzierte Dosis in Kombination mit Nahrungsaufnahme Abhilfe schaffen.

Crizotinib

Der Erstgenerations-ALK-TKI Crizotinib (Xalkori®) wird mit einer empfohlenen Tagesdosis von zweimal 250 mg unabhängig von der Nahrungsaufnahme eingenommen.

In der 1007-Phase-III-Studie PROFILE wurde Crizotinib bei Patienten mit ALK-Translokation in der Zweitlinientherapie nach Plantindoublette gegen eine Monochemotherapie aus Docetaxel oder Pemetrexed verglichen [34]. Das mediane PFS war im Crizotinib-Arm (173 Patienten) mit 7,7 Monaten signifikant gegenüber dem Chemotherapie-Arm (174 Patienten) mit drei Monaten überlegen (HR 0,49; 95%-KI 0,37–0,64; $p < 0,001$).

Die 1014-Phase-III-Studie PROFILE verglich Crizotinib mit einer konventionellen Chemotherapie aus Platin/Pemetrexed und führte zur Zulassung von Crizotinib in der Erstlinientherapie [39]. Das mediane PFS war im Crizotinib-Arm (172 Patienten) mit 10,9 Monaten signifikant gegenüber dem Chemotherapie-Arm (171 Patienten) mit sieben Monaten verlängert (HR 0,45; 95%-KI 0,35–0,60; $p < 0,001$).

Ceritinib

Der Zweitgenerations-TKI Ceritinib (Zykadia®) wird mit einer empfohlenen Tagesdosis von 750 mg einmal täglich nüchtern eingenommen.

In der Phase-III-Studie ASCEND-5 wurde Ceritinib bei Patienten mit ALK-Translokation in der Zweitlinientherapie nach einer sequenziellen Therapie aus Platindoublette (1 bis 2 Linien) und Crizotinib gegen eine Monochemotherapie aus Docetaxel oder Pemetrexed verglichen [35]. Das mediane PFS war im Ceritinib-Arm (115 Patienten) mit 5,4 Monaten signifikant gegenüber dem Chemotherapie-Arm (116 Patienten) mit 1,6 Monaten überlegen (HR 0,49; 95%-KI 0,36–0,67). Die häufigste beobachtete Grad-3- oder -4-Toxizität unter Ceritinib waren Erhöhungen der Leberenzyme bei 16 bis 24 % der Patienten.

Die Phase-III-Studie ASCEND-4 verglich Ceritinib in der Erstlinienbehandlung bei Patienten mit ALK-Translokation und fortgeschrittenem NSCLC gegen eine Chemotherapie aus Platin und Pemetrexed (inkl. Erhaltungstherapie mit Pemetrexed im Chemotherapie-Arm). Das mediane PFS der 189 Patienten im Ceritinib-Arm war mit 16,6 Monaten statistisch signifikant gegenüber dem Chemotherapie-Arm (187 Patienten) mit 8,1 Monaten verlängert (HR 0,55; 95%-KI 0,42–0,73; $p < 0,00001$). Ceritinib ist mittlerweile als Erstlinientherapie bei ALK-Translokation zugelassen worden.

Aufgrund der schlechten gastrointestinalen Toleranz der Substanz ist eine Studie zur Medikamentenaufnahme mit einer Mahlzeit durchgeführt worden (ASCEND-8). Mit einer Dosis von 450 mg wurden ähnliche Plasmaspiegel erreicht wie mit der Standarddosierung [3]. Daten zur Effektivität stehen aus.

Alectinib

Der Zweitgenerations-TKI Alectinib (Alecensa®) wird mit einer empfohlenen Tagesdosis von 600 mg zweimal täglich zusammen mit Nahrungsmitteln eingenommen.

In einer gepoolten Analyse zweier Phase-II-Studien (NP28761 und NP28673) wurde Alectinib bei 225 Patienten mit Progress unter Crizotinib untersucht [45]. Das mediane PFS betrug 8,3 (95%-KI 7,0–11,3) und das mediane Gesamtüberleben 26 Monate (95%-KI 21,4 bis „nicht erreicht“). Toxizitäten \geq Grad 3 traten bei 40 % der Patienten auf.

In der weltweit durchgeführten Phase-III-Studie ALEX wurde Alectinib in der Erstlinientherapie bei nachgewiesener ALK-Translokation im Stadium IIIB/IV gegen Crizotinib verglichen [27]. Vorgänger dieser Untersuchung war die Phase-III-Studie J-ALEX, die in Japan durchgeführt worden war [11]. In der ALEX-Studie war die PFS-Rate im Alectinib-Arm (152 Patienten) nach 12 Monaten mit 68,4 % signifikant der Rate im Crizotinib-Arm (151 Patienten) mit 48,7 % überlegen (HR 0,47; 95%-KI 0,34–0,65; $p < 0,001$). Das mediane PFS von Alectinib war zum Zeitpunkt der Publikation nicht erreicht. Des Weiteren konnte eine überlegene ZNS-Wirksamkeit von Alectinib nachgewiesen werden. Im Alectinib-Arm entwickelten 18 Patienten (12 %) und im Crizotinib-Arm 68 Patienten (45 %) Hirnmetastasen (HR 0,16; 95%-KI 0,10–0,28; $p < 0,001$).

Alectinib ist mittlerweile in der Erst- und Zweitlinientherapie bei ALK-Translokation in Deutschland zugelassen.

Brigatinib

Der Drittgenerations-ALK-TKI Brigatinib wurde in der Phase-II-Studie ALTA bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC, ALK-Translokation und Crizotinib-refraktärer Erkrankung in zwei Dosisregimen untersucht. 112 Patienten erhielten einmal täglich 90 mg (Arm A), 110 Patienten wurden mit 180 mg behandelt (Arm B) [19]. Das mediane PFS war mit 12,9 Monaten (95%-KI 11,1 bis „nicht erreicht“) unter der höheren Dosierung gegenüber 9,2 Monaten deutlich verlängert (95%-KI 7,4–15,6). Das Ansprechen (ORR, objective response rate) im ZNS war mit 67 % (12/18 Patienten) in Arm B höher als in Arm A mit 42 % (11/26 Patienten). Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehörten Übelkeit (Arm A/B, 33/40 %), Durchfall (19/38 %), Kopfschmerzen (28/27 %) und Husten (18/34 %).

Eine Zulassung von Brigatinib in der höheren Dosierung wird noch für 2018 erwartet.

ROS1

Translokationen im ROS1-Gen führen über einen den Rearrangements im Bereich der ALK-Gens sehr ähnlichen Mechanismus zur Überaktivierung der entsprechenden Tyrosinkinase. ROS1-Translokationen sind mit 1 bis 2 % der Adenokarzinome eher selten.

In einer Phase-I-Studie wurden 50 Patienten mit ROS1-Translokation mit Crizotinib in der Standarddosierung (250 mg zweimal täglich) behandelt [36]. 42 % der Patienten waren mit einer und weitere 44 % mit mehr als einer Therapielinie vorbehandelt. Die Ansprechrates (ORR) betrug 72 % (95%-KI 58–84) mit einem medianen Therapieansprechen von 17,6 Monaten (95%-KI 14,5 bis „nicht erreicht“). Das mediane PFS lag bei 19,2 Monaten (95%-KI 14,4 bis „nicht erreicht“).

Die Phase-II-Studie EUCROSS untersucht derzeit die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Crizotinib bei ROS1-Translokation in einem europäischen Patientenkollektiv.

Als weitere Tyrosinkinase-Inhibitoren werden Ceritinib (NCT02186821), Lorlatinib (präklinische Daten) [49] und Cabozantinib (präklinische Daten) [18] bei ROS1-Translokation untersucht. Crizotinib ist bei ROS1-Translokation in Deutschland derzeit noch nicht zugelassen.

BRAF

BRAF-Mutationen sind mit 1(–3)% der NSCLC-Adenokarzinome ebenfalls selten. Im Gegensatz zu allen vorhergehenden molekularen Alterationen ist BRAF keine Rezeptortyrosinkinase, sondern befindet sich intrazellulär im Bereich des MAPK-Signalwegs [5]. Auch das Patientenkollektiv unterscheidet sich von dem mit anderen Mutationen. So finden sich BRAF-Mutationen am häufigsten bei ehemaligen Rauchern. Mit etwa 50 % machen V600E-Punktmutationen die größte Gruppe aus. Hier wurde die Kombination aus dem BRAF-Inhibitor Dabrafenib mit dem

im gleichen Signalweg weiter „downstream“ ansetzenden MEK-Inhibitor Trametinib untersucht.

In einer Phase-II-Studie wurden 36 therapienaive Patienten aus 19 Zentren in Nordamerika, Europa und Asien mit nachgewiesener BRAF-V600E-Mutation mit einer Kombination aus Dabrafenib (Tafinlar®) 150 mg zweimal täglich und Trametinib (Mekinist®) 2 mg einmal täglich behandelt [28]. Nach einem medianen Beobachtungszeitraum von 15,9 Monaten war bei 64 % (95%-KI 46–79) ein Ansprechen zu verzeichnen (2 Patienten/6 % mit kompletter Remission und 21 Patienten/58 % mit partieller Remission). 69 % (25 von 36) der Patienten hatten mindestens eine Grad-3- oder -4-Toxizität. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Fieber, Erhöhungen der Leberenzyme, Hypertonie und Übelkeit. Die Kombination aus Dabrafenib/Trametinib ist in Deutschland bei Patienten mit fortgeschrittenen NSCLC und nachgewiesener BRAF-V600E-Mutation zugelassen.

Zusammenfassung

Molekular getriebene und derzeit auch behandelbare Adenokarzinome der Lunge betreffen etwa 15 bis 20 % der Patienten. Durch eine zielgerichtete Therapie lässt sich für diese Patienten mittlerweile ein deutlich verbessertes Überleben über mehrere Jahre hinweg erzielen [20]. Einer dezidierten molekularpathologischen Diagnostik vor Einleitung einer palliativen Systemtherapie kommt dabei eine Schlüsselposition zu. Viele weitere molekulare Alterationen werden derzeit im Rahmen klinischer Studien untersucht. Insbesondere für das Plattenepithel- und kleinzellige Lungenkarzinom fehlt es bislang jedoch an überzeugenden molekularen Therapieansätzen.

Interessenkonflikterklärung

NF erklärt, Honorare für Vortragstätigkeit von Berlinchemie, Boehringer Ingelheim, Pfizer und Roche sowie für Beratertätigkeit von AbbVie, AstraZeneca, Berlinchemie, BMS, Boehringer Ingelheim, Eli Lilly, MSD, Novartis, Pfizer, Roche und Teva Oncology erhalten zu haben.

MR erklärt, Honorare für Vorträge, Stellungnahmen oder Artikel von Boehringer Ingelheim erhalten zu haben.

Update thorax oncology 2018 – therapy of lung carcinoma with driver mutations

Lung cancer is the leading cause of cancer-related death worldwide. 15–20 % of patients with the histology of adenocarcinoma can be treated with targeted therapies in the presence of specific molecular alterations, thereby enabling a long-term survival. The alterations include activating mutations of the receptor for the epidermal growth factor (EGFR) and the BRAF gene as well as rearrangements of ALK and ROS1. The current therapeutic landscape will be presented in this review article. Furthermore, implications for the clinical routine and potential adverse events will be discussed.

Key words: ALK; BRAF; driving mutations; EGFR; lung cancer



Dr. med. Nikolaj Frost,
Charité Universitätsmedizin
Berlin



Dr. med. Matthias Raspe,
Charité Universitätsmedizin
Berlin

Literatur

1. Arrieta O, Cardona AF, Corrales L, Campos-Parra AD, et al. The impact of common and rare EGFR mutations in response to EGFR tyrosine kinase inhibitors and platinum-based chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2015;87:169–75.
2. Bray F, Ferlay J, Laversanne M, Brewster DH, et al. Cancer incidence in five continents: Inclusion criteria, highlights from volume X and the global status of cancer registration. *Int J Cancer* 2015;137:2060–71.
3. Cho BC, Kim DW, Bearz A, Laurie SA, et al. ASCEND-8: A randomized phase 1 study of ceritinib, 450 mg or 600 mg, taken with a low-fat meal versus 750 mg in fasted state in patients with anaplastic lymphoma kinase (ALK)-rearranged metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Thorac Oncol* 2017;12:1357–67.
4. Cortinovis D, Abbate M, Bidoli P, Capici S, et al. Targeted therapies and immunotherapy in non-small-cell lung cancer. *Eccancermedscience* 2016;10:648.
5. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949–54.
6. Dearden S, Stevens J, Wu YL, Blowers D. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mut-Map). *Ann Oncol* 2013;24:2371–6.
7. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359–86.
8. Gainor JF, Shaw AT. Emerging paradigms in the development of resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:3987–96.
9. Gazdar AF. Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: the evolving role of individualized therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:37–48.
10. Godin-Heymann N, Ulkus L, Brannigan BW, McDermott U, et al. The T790M „gatekeeper“ mutation in EGFR mediates resistance to low concentrations of an irreversible EGFR inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2008;7:874–9.
11. Hida T, Nokihara H, Kondo M, Kim YH, et al. Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet* 2017;390:29–39.
12. Hirsch FR, Bunn PA, Jr. EGFR testing in lung cancer is ready for prime time. *Lancet Oncol* 2009;10:432–3.
13. Hirsch FR, Suda K, Wiens J, Bunn PA, Jr. New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer. *Lancet* 2016;388:1012–24.
14. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2009;28(Suppl 1):S32–7.
15. Irmer D, Funk JO, Blaukat A. EGFR kinase domain mutations – functional impact and relevance for lung cancer therapy. *Oncogene* 2007;26:5693–701.
16. Janssen-Heijnen ML, Schipper RM, Razenberg PP, Crommelin MA, et al. Prevalence of co-morbidity in lung cancer patients and its relationship with treatment: a population-based study. *Lung Cancer* 1998;21:105–13.
17. John T, Liu G, Tsao MS. Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009;28(Suppl 1):S14–23.
18. Katayama R, Kobayashi Y, Friboulet L, Lockerman EL, et al. Cabozantinib overcomes crizotinib resistance in ROS1 fusion-positive cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:166–74.
19. Kim DW, Tiseo M, Ahn MJ, Reckamp KL, et al. Brigatinib in patients with crizotinib-refractory anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer: A randomized, multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* 2017;35:2490–8.
20. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA* 2014;311:1998–2006.
21. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1693–703.
22. Lee CK, Wu YL, Ding PN, Lord SJ, et al. Impact of specific epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations and clinical characteristics on outcomes after treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors versus chemotherapy in EGFR-mutant lung cancer: A meta-analysis. *J Clin Oncol* 2015;33:1958–65.
23. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2017;376:629–40.
24. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947–57.
25. Ou SH. Second-generation irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs): a better mousetrap? A review of the clinical evidence. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012;83:407–21.
26. Paz-Ares L, Tan EH, O'Byrne K, Zhang L, et al. Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. *Ann Oncol* 2017;28:270–7.
27. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, et al. Alectinib versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2017;377:829–38.
28. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017;18:1307–16.
29. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, 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;13:239–46.
30. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2542–50.
31. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3543–51.
32. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002;346:92–8.
33. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* 2013;31:3327–34.
34. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013;368:2385–94.
35. Shaw AT, Kim TM, Crino L, Gridelli C, et al. Ceritinib versus chemotherapy in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer previously given chemotherapy and crizotinib (ASCEND-5): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017;18:874–86.
36. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371:1963–71.
37. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:339–46.
38. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448:561–6.
39. Solomon BJ, Mok T. First-line crizotinib in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2015;372:782.
40. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018;378:113–25.
41. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1986 [Available from: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1986/ (Zugriff am 14.09.2018)].
42. Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung cancer statistics. *Adv Exp Med Biol* 2016;893:1–19.
43. von Laffert M, Schirmacher P, Warth A, Weichert W, et al. [ALK-diagnostics in NSCLC – immunohistochemistry (IHC) and/or fluorescence-in-situ hybridisation (FISH)]. *Pneumologie* 2016;70:277–81.
44. Wu YL, Zhou C, Hu CP, Feng J, 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;15:213–22.
45. Yang JC, Ou SI, De Petris L, Gadgeel S, et al. Pooled systemic efficacy and safety data from the pivotal phase II studies (NP28673 and NP28761) of alectinib in ALK-positive non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2017;12:1552–60.
46. Yang JC, Sequist LV, Geater SL, Tsai CM, et al. Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *Lancet Oncol* 2015;16:830–8.
47. Yang JC, Wu YL, Schuler M, Sebastian M, 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;16:141–51.
48. Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, 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;12:735–42.
49. Zou HY, Li Q, Engstrom LD, West M, et al. PF-06463922 is a potent and selective next-generation ROS1/ALK inhibitor capable of blocking crizotinib-resistant ROS1 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:3493–8.