Prätherapeutische Biomarker des Lungenkarzinoms unter besonderer Berücksichtigung der Bronchoskopie

Role of Pretherapeutic Biomarkers in Lung Cancer with Special Regards to Bronchoscopic Procedures

Autoren K. Darwiche[1], F. Özkan[1], S. Ting[2], G. Johnen[3], T. Brüning[3], A. Soltermann[4], L. C. Huber[5], D. C. Christoph[6], L. Freitag[1], D. Franzen[5]

Institute Die Institutsangaben sind am Ende des Beitrags gelistet.

eingereicht 28.4.2014
akzeptiert nach Revision 15.5.2014

Bibliografie
DOI http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1377299
Online-Publikation: 8.7.2014
Pneumologie 2014; 68: 719–726
© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
ISSN 0934-8387

Korrespondenzadresse
Dr. med. Kaid Darwiche
Abteilung für interventionelle Pneumologie
Westdeutsches Lungenzentrum am Universitätsklinikum Essen
Tüschener Weg 40
45239 Essen
kaid.darwiche@ruhrlandklinik.uk-essen.de

Zusammenfassung

Molekulare Biomarker bekommen eine zunehmende Bedeutung in der Behandlung von Patienten mit einem Lungenkarzinom. Sie unterstützen die Diagnosestellung, die Wahl der Therapie und helfen bei der Einschätzung der Prognose. Aktuell ist die bronchoskopische Probenentnahme mit der Bestimmung Gewebe-basierter Marker das Verfahren der Wahl. Möglicherweise wird sich dies zukünftig ändern, wenn nichtinvasive Methoden zur Markerbestimmung aus Blut oder Ausatemluft etabliert werden können. Bis dahin ist insbesondere von Bedeutung, mit welcher Methodik die Proben entnommen werden und wie sie prozessiert werden auf dem Weg in das pathologische Labor.

Abstract

Molecular biomarkers are becoming increasingly significant in the workup of lung carcinoma patients. They assist in diagnosis, selecting the most adequate therapy and determining prognosis. Obtaining blood based biomarkers or volatile markers in exhaled breath may provide a less invasive method in the future. For the time being, bronchoscopy is still the method of choice to obtain specimen and assess tissue based biomarkers. The techniques how specimen are collected and processed for analysis are of paramount importance.

Hintergrund

„Herr X, Sie haben einen Schatten auf der Lunge!“ Kaum ein Satz eines Arztes erzeugt bei einem Patienten so viel Angst wie diese Aussage. Zugleich weckt er den Wunsch nach einem einfachen Testverfahren, welches die Unsicherheit rasch beendet, die als besonders quälend empfunden wird, und welches hilft, die bestmögliche Therapie auszuwählen. Doch wie weit sind wir entfernt von der raschen, nicht- bis wenig invasiven Diagnostik beim Lungenkrebs? Utopie oder doch greifbare Realität?

Das Lungenkarzinom ist trotz aller Fortschritte in Diagnostik und Therapie die häufigste zum Tode führende maligne Erkrankung mit nahezu unverändert schlechter Prognose. Neben Maßnahmen der Prävention (Rückgang des Rauchverhaltens und verbesserter Nichtraucherschutz) ist eine Änderung dieser Tatsache nur durch Sicherung der Tumore in früheren Stadien als bisher zu erwarten, da die Mehrzahl der Patienten bei Diagnosesicherung bereits in einer palliativen Situation ist. Unlängst konnte im Rahmen großer Screening-Studien („National Lung Screening Trial (NLST)“, „NELSON-Trial“) gezeigt werden, dass eine relative Senkung der Mortalität um bis zu 20% mittels Low-Dose-CT-Screening potenziell erzielt werden kann, indes mit dem Nachteil einer immens hohen Zahl an falsch positiven Befunden (96,4% im NLST) [1,2]. Diese führen zu einer erheblichen psychischen Belastung der Patienten, zu unnötigen weiteren diagnostischen Verfahren mit erhöhter Morbidität und Mortalität und hohen potenziell vermeidbaren Kosten für das Gesundheitssystem. Zudem ist bei jedem fünften Patienten der durch ein CT-Screening entdeckte Tumor nicht die zum Tode führende Erkrankung („Overdiagnosing“) [3].

Zur Verbesserung der Frühdiagnostik bedarf es daher optimierter Strategien, die die „Vortestwahrscheinlichkeit“ für die diagnosesichernde invasive Diagnostik erhöhen. Nicht invasiv gewonnene molekulargenetische Biomarker (diagnostische Biomarker) können die Spezifität und den positiven Vorhersagewert (PPV) erhöhen und werden hierfür aktuell getestet [4].

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

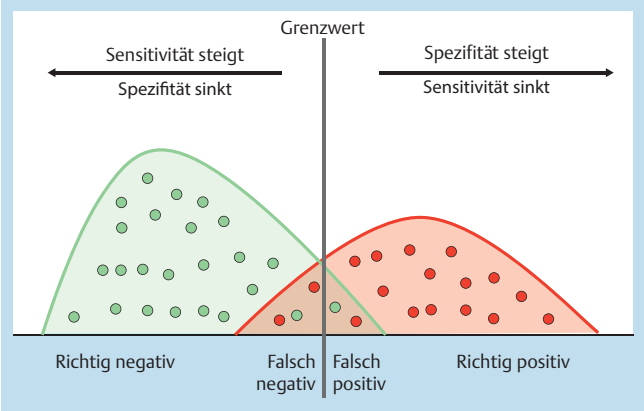

Abb. 1 Bei jedem Biomarker kann durch Verschiebung des Grenzwertes die Sensitivität auf Kosten der Spezifität erhöht werden und umgekehrt. Die grüne Gruppe sind die Gesunden, die rote die Erkrankten.

Ein weiteres Anwendungsgebiet molekulargenetischer Biomarker ergibt sich aus der Frage, welche Therapie für den betroffenen Patienten angewendet werden sollte. Tests auf Mutationen des *EGFR*-Gens oder von *EML4-ALK*-Translokationen sind bereits klinisch etabliert – weitere sind zu erwarten. Diese prädiktiven Biomarker ermöglichen es, den Patienten der individuell bestmöglichen Systemtherapie zuzuführen und sind somit grundlegend im Konzept der personalisierten Krebsmedizin. Die hierfür zur Verfügung stehenden Gewebeproben werden im Zeitalter des EBUS allerdings immer kleiner und die molekularen Untersuchungsmethoden an diesen Proben vielfältiger, sodass ein „ökonomischer" und abgestimmter Umgang mit dem Probenmaterial an Bedeutung gewinnt. Es besteht die Hoffnung, dass die Gewebe-basierte molekulargenetische Charakterisierung des Tumors auch zur Entwicklung von Biomarkern führt, die sich dann auch in Atemluft, im Blut oder im Urin bestimmen lassen können.

Grundsätzliche Herausforderungen der klinischen Anwendung

Onkologische Biomarker können grundsätzlich Informationen liefern, ob ein Tumor vorliegt (diagnostische Marker), auf welche Therapie er anspricht (prädiktive Marker) und wie die Prognose des Patienten einzuschätzen ist (prognostische Marker) [5]. Diagnostische Marker trennen in der Idealvorstellung eindeutig Gesunde von betroffenen Personen, wobei Überschneidungen im Grenzbereich (**Abb. 1**) nahezu immer vorliegen. Von besonderer Bedeutung ist daher die Festlegung des Grenzwertes. Liegt dieser mehr im gesunden Kollektiv so wird die Sensitivität erhöht zu Ungunsten der Spezifität. Umgekehrt sinkt die Sensitivität bei steigender Spezifität, wenn man den Grenzwert in das erkrankte Kollektiv legt.

Besondere Bedeutung haben in den letzten Jahren die sog. „-omics"- Techniken gewonnen, benannt nach der gemeinsamen Endung von Genomics, Proteomics, Metabolomics, etc. Diese Disziplinen beschreiben die Testung und bildliche Darstellung der Gesamtheit der Gene (Genom), Proteine (Proteom) oder Metabolite (Metabolom) in einem abgegrenzten Kompartiment (Zelle, Gewebe) zu einem definierten Zeitpunkt. Die Auswertung erfolgt häufig durch Mustererkennung und bedarf erheblicher biostatistischer Expertise. Bei extrem großen Datenmengen und sehr vielen Variablen steigt die Möglichkeit, vermeintliche Zusammenhänge irrtümlich zu identifizieren. Diese Pseudo-Zusammenhänge, auch „Voodoo-Korrelationen" genannt, müssen bei kritischer Analyse enttarnt werden [6]. Ein Bezug der gefundenen Muster zu biochemischen Prozessen ist mit diesen Methoden zudem nur schwer möglich.

Ein grundsätzliches Problem der Biomarkerforschung ist die fehlende Darstellung prätherapeutischer Biomarker im DRG-System. Obwohl das „D" in DRG für Diagnostik steht, ergeben sich Erlöse ganz besonders durch Therapien bzw. Prozeduren und nicht durch Verbesserung diagnostischer Verfahren. Dies erschwert die klinische Einführung selbst effizienter Biomarker ganz erheblich.

Obwohl bereits seit Jahren eine nicht unerhebliche Zahl an molekulargenetischen Lungenkrebs-Markern zur Optimierung der Diagnostik entwickelt und getestet wurde, hat es bis dato keiner der diagnostischen Biomarker geschafft, in den klinischen Alltag einzuziehen. Die oben genannten Probleme sind hierfür ursächlich.

Gewebe-basierte Biomarker

Die endobronchiale Biopsie (EBB) sowie die transbronchiale Biopsie (TBB) werden standardmäßig zur Lungenkarzinom-Diagnostik eingesetzt und weisen typischerweise einen Durchmesser von 1–3 mm auf. Bis vor nicht allzu langer Zeit war diese Diagnostik mit der Aussage „Nicht-kleinzelliges Karzinom" versus „Kleinzelliges Karzinom" erledigt. Es ist wichtig zu wissen, dass eine reine Malignitätsdiagnose auf einem einzelnen Hämatoxylin-Eosin (HE) Schnitt mit nur wenigen Tumorzellen (50 bis 100) möglich ist, falls diese eindeutig invasiv wachsen, z. B. unterhalb der respiratorischen Bronchialschleimhaut oder in Form einer Lymphangiosis carcinomatosa (**Abb. 2**). Mit dem Aufkommen der prädiktiven genomischen Alterationen haben sich die Anforderungen geändert und der Verteilungskampf um das Biopsat begonnen. Es muss nun häufig neben der HE und den Schleim- und Bindegewebsfärbungen Alcianblue-Periodic Acid Schiff (AB-PAS) und Elastica van Gieson (EvG) Immunhistochemie (IHC) durchgeführt werden, typischerweise ein 2er- oder 4er-Panel (TTF1, p63/40, CK7, CK5/6) zur Differenzialdiagnose Adenokarzinom versus Plattenepithelkarzinom. Weitere Leerschnitte werden zur Bestimmung einer evtl. *EML4-ALK*-Translokation (Vorselektion mittels IHC, Bestätigung mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) sowie weiteren IHC- oder FISH-Untersuchungen für *ROS1, RET, c-MET* (Adenokarzinom) und Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (*FGFR1*, Plattenepithelkarzinom) verwendet. Schlussendlich sollten noch genügend Tumorzellen übrig sein für die DNA-Extraktion mit anschließender PCR-Sequenzierung für z. B. *EGFR*-, *BRAF*- oder *HER2*-Mutationen (**Abb. 3**). Leider sind die HE, AB-PAS und EvG gefärbten Schnitte für die DNA-Extraktion nur beschränkt brauchbar, da die verwendeten Säuren die DNA degradieren.

Frisch entnommene Gewebeproben werden üblicherweise in Formalin fixiert und dann in Paraffin eingebettet (FFPE). Dieses Verfahren ist etabliert, standardisiert und relativ kostengünstig. Nachteilig ist allerdings, dass hierdurch molekulargenetische Untersuchungen negativ beeinflusst werden können und insbesondere die RNA-Qualität leidet. Daher wird zunehmend Gewebe – insbesondere für wissenschaftliche Zwecke – möglichst kurzfristig nach der Entnahme in Flüssigstickstoff kryokonserviert und qualitätsgesichert in Biobanken gelagert. Dieses Verfahren lässt zwar auch im weiteren Verlauf alle molekulargenetischen Unter-

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

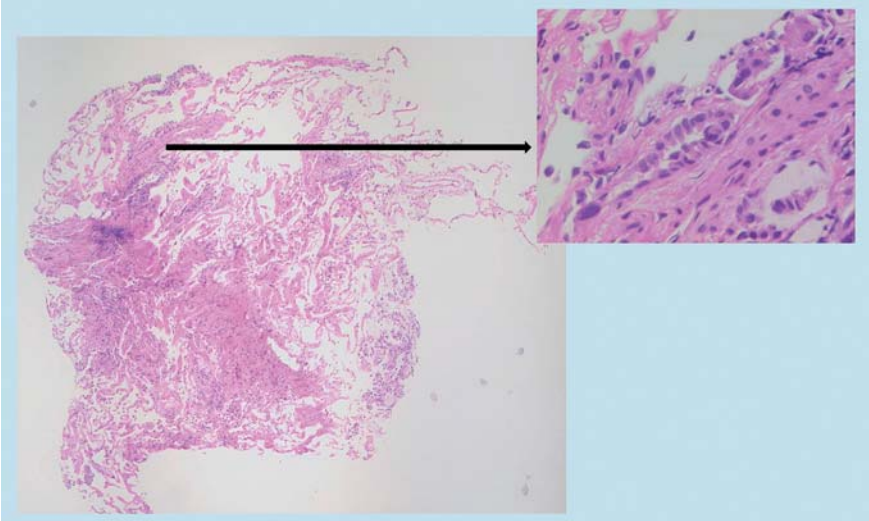

Abb. 2 Transbronchiale Biopsie von 2 x 2 mm Ausdehnung mit drei atypischen Drüsenstrukturen, ca. 50 Zellen innerhalb von Lymphgefäßen und damit Nachweis einer Lymphangiosis carcinomatosa. Befund diagnostisch für wenig differenziertes Adenokarzinom, aber Gewebe nicht ausreichend für weitere Molekularpathologie (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 25-fach bzw. 200-fach)

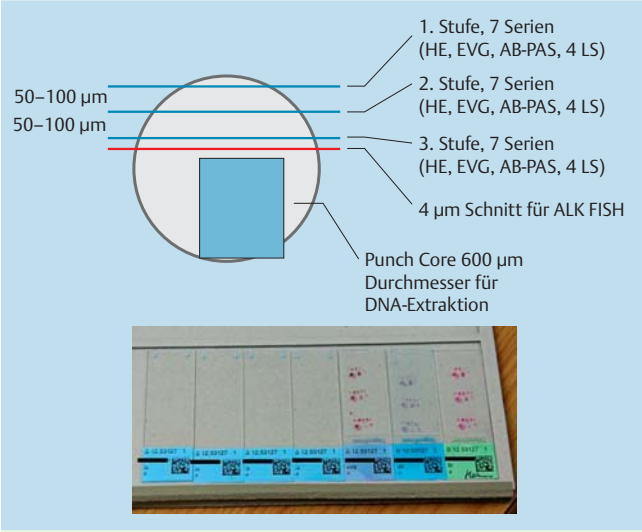

Abb. 3 Aufarbeitung einer Lungenbiopsie. Insgesamt 21 Schnitte aus den ersten drei Stufen mit vier Leerschnitten (LS) für Immunhistochemie (TTF1, p63, CK7, und CK5/6). HE = Hämatoxylin-Eosin, Schleimfärbung Alcianblue-Periodic Acid Schiff (AB-PAS), Bindegewebsfärbung Elastica van Gieson (EvG)

suchungen zu, ist aber deutlich kosten- und personalintensiver. Zudem besteht insbesondere bei kleineren Biopsien Unsicherheit hinsichtlich des verbliebenen Tumoranteils in der Gewebeprobe, nachdem ein Anteil zur Diagnosestellung verwendet wurde.

Moderne bronchoskopische Biopsieverfahren

▼

EBUS-TBNA

Auf Grund einer inzwischen nahezu flächendeckenden Verfügbarkeit der Methode und der breiten Evidenz in Bezug auf die diagnostische Sicherheit, ist die EBUS-TBNA inzwischen das primäre Verfahren zur mediastinalen Lymphknotenstadiierung [7]. Die diagnostische Sicherheit steigt bis zur dritten Probenentnahme an, wobei bei sichtbarem Stanzzylinder („Würmchen") im Biopsat, zwei EBUS-TBNA ausreichend sind [8]. In der Forschung ist dieses derart gewonnene Gewebsmaterial allerdings deutlich unterrepräsentiert. Die weitaus meisten wissenschaftlichen Untersuchungen erfolgen an operativ entnommenem Tumorgewebe. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass alle aktuell klinisch bedeutsamen prädiktiven Marker und auch umfassende genomische Untersuchungen an EBUS-TBNA-Proben sicher durchzuführen sind, obschon das Tumormaterial, welches durch die EBUS-TBNA gewonnen werden kann, sehr klein ist [9–11]. Bei ausgedehnter molekularer Diagnostik oder zu Forschungszwecken sind allerdings mindestens vier EBUS-TBNA pro Lymphknotenstation angeraten. Die Zahl der prädiktiven Marker steigt weiter an und noch ist unklar, ob auch zukünftig alle notwendigen molekulargenetischen Untersuchungen an wenig Tumormaterial bestimmt werden können, insbesondere da bei zunehmendem Wissen über Resistenzmechanismen Re-Biopsien nach Chemo- oder Strahlentherapie notwendig werden [12]. Ob diese Proben für unterschiedliche Analysen ohne Qualitätsverlust aufgeteilt werden können, ist noch nicht geklärt. Zudem ist unklar, wie hoch der Tumorzellgehalt der Probe ist. Ein zu geringer Anteil an Tumorzellen kann das molekulare Testergebnis negativ beeinflussen. Es ist daher zwingend notwendig, den Prozess der Probenentnahme, -behandlung und -analyse zu standardisieren.

Kryobiopsie

Die Kryobiopsie ist eine vielversprechende neue Technologie in der Bronchoskopie (▶ **Abb. 4**). Die Sonde ermöglicht die Entnahme einer wesentlich größeren Biopsie. Die mittlere Biopsieoberfläche liegt bei 10,4 mm^2 gegenüber 5,2 mm^2 im Vergleich zu Zangenbiopsien, die Artefakt-freie Oberfläche 9,6 mm^2 vs. 3,6 mm^2. TBBs können bis zu > 15 mm^2 Oberfläche haben. Das Gefrieren geschieht über den Joule-Thomson Effekt auf bis – 90° C mittels N_2O/CO_2 Gas, was zu geringen Gewebe-Artefakten führen soll. Blutungskomplikationen sind in Studien nicht signifikant häufiger [13]. Die Kryobiopsie wird anschließend ebenfalls mittels Formalin-Fixation und Paraffin-Einbettung verarbeitet, oder ein Teil wird direkt in eine Gefrier-Tumorbank gegeben. Bis zu 50 000 Tumorzellen können so gewonnen werden, was grundsätzlich eine weitergehende molekularpathologische Analytik wie NGS („next generation sequencing") erlaubt.

Navigationsbronchoskopie/Radialer Ultraschall

Zur Verbesserung der Rundherddiagnostik werden die elektromagnetische Navigation (EMN) und die radiale Ultraschallsonde („Minisonde") eingesetzt. Mit diesen beiden Methoden ist es, im Vergleich zur konventionellen transbronchialen Biopsie, mit

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

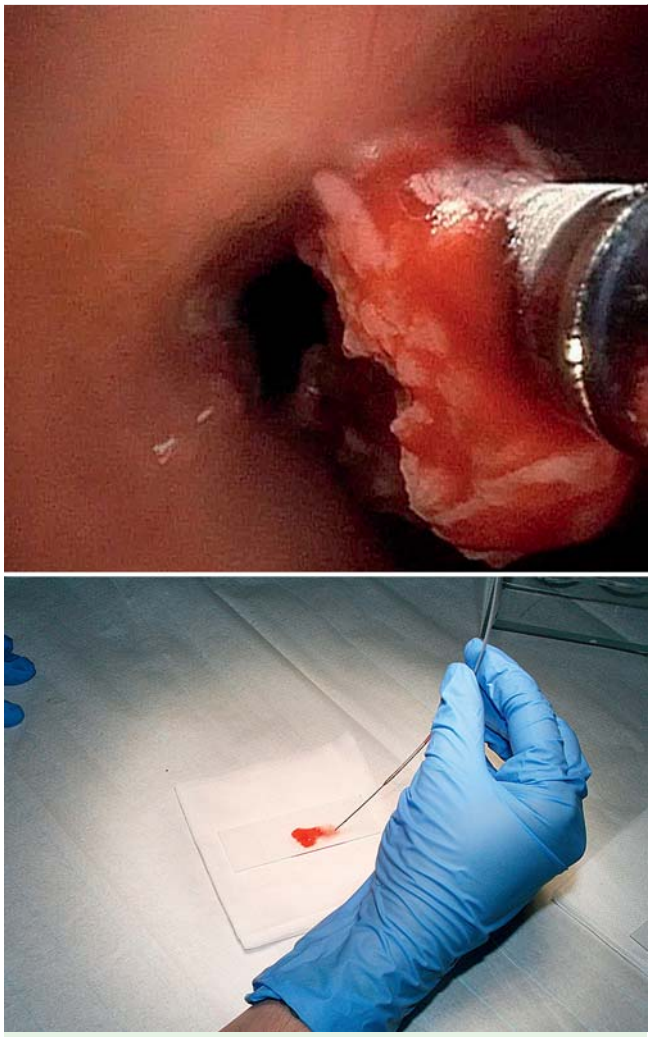

Abb. 4 Die Kryosonde (oben) erlaubt die Gewinnung größerer Tumorproben, sodass eine umfassende immunhistochemische und molekulargenetische Diagnostik ermöglicht wird. Auch Material, welches mittels EBUS-TBNA (unten) gewonnen wird, ist für viele Untersuchungen ausreichend.

einer höheren Wahrscheinlichkeit möglich, den zuführenden Bronchus zu identifizieren, der zur Probenentnahme aus dem Tumor notwendig ist. Bei der EMN wird das Bronchoskop im elektromagnetischen Feld mit Hilfe einer virtuellen Bronchoskopie gesteuert, die an Hand eines CT-Datensatzes erstellt wird. Hierdurch können zwei von drei Rundherden definitiv diagnostiziert werden [14].

Die radiale Ultraschallsonde kann durch den Arbeitskanal eines Bronchoskopes bis in die Lungenperipherie vorgeschoben werden und ermöglicht die endosonografische Visualisierung von Rundherden. Hiermit können etwa 73 % der peripheren Lungenkarzinome und 46 % aller Herde < 2 cm diagnostiziert werden [15–16].

Epigenetische Marker

Tabakrauch enthält zahlreiche Karzinogene, welche einen synergistischen Tumor-induzierenden Effekt auf alle betroffenen Schleimhäute haben, was als Feldkanzerisation bezeichnet wird. Nach der Theorie der Feldkanzerisierung entstehen parallel an zahlreichen Schleimhaut-„Hotspots“ (multifokales „Feld“) genetische und epigenetische Veränderungen, die über die Vorstufe der Dysplasie zum invasiven Lungenkarzinom führen können [17]. Das Konzept der Feldkanzerisierung eröffnet die Perspektive einer Vorsorge-Untersuchung im Sinne einer Suche nach „onkogenen Vorgängen“ in einer umgebenden Tumorvorstufe.

Eine der bekannten epigenetischen Alterationen ist die vermehrte DNA-Methylierung, z. B. an sogenannten CpG-Inseln im Bereich der Gen-Promotoren. Verschiedene Genprodukte wie RASSF und p16 sind beim Lungenkrebs betroffen. Diese Hypermethylierung innerhalb Tumor-spezifischer DNA kann mit einer methylierungsspezifischen PCR detektiert werden. Diese Methode hat potenziell eine hohe diagnostische Wertigkeit, da solche PCR-Reaktionen auch in zytologischen Flüssigkeiten wie Bronchiallavage, Bronchialsekret, Sputum oder Pleuraergüssen durchgeführt werden können sowie im peripheren Blut. Da durch die Tumornekrose DNA freigesetzt wird, sind auch zellfreie Flüssigkeiten geeignet, und für eine erfolgreiche PCR genügen Volumina von nur 100 Mikroliter durchaus.

Basierend auf einem Tissue Microarray (TMA) von NSCLC Operationspräparaten konnten wir zeigen, dass die DNA-Methylierung der Homeobox Gene *PITX2* und *SHOX2* ein unabhängiger prognostischer Biomarker ist für die Krankheitsprogression des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms [18]. Durch die Kombination von histopathologischer Beurteilung der EBUS-TBNA und *SHOX2*-Methylierung kann eine bessere Aussage über den lokalen Lymphknoten-Status erzielt werden. Es wurden einerseits zusätzliche Tumorherde identifiziert und andererseits gutartige Lymphknoten-Vergrößerungen bestätigt. Dies reduzierte weitergehende diagnostische Untersuchungen [19].

mRNA und microRNA

Als wichtige neue Genregulatoren sind in den letzten Jahren microRNAs (miRNAs) identifiziert worden. Sie kontrollieren die Genexpression von weit mehr als der Hälfte des menschlichen Genoms. miRNAs sind zelluläre RNA-Fragmente mit einer Länge von wenigen Nukleotiden, die keine Protein-kodierende Funktion, dafür aber eine Kontrollfunktion besitzen: Die einzelsträngigen miRNAs binden an die komplementäre mRNA eines Zielgenes und bewirken dadurch eine Destabilisierung der mRNA oder eine Blockade der Translation der mRNA zu einem Protein. miRNAs wirken somit mehrheitlich als „genesilencers“ – über die Hemmung von endogenen Inhibitoren durch miRNAs kann allerdings ein bestimmter Signalweg im Sinne des mathematischen „minus x minus = plus“ auch verstärkt aktiviert werden. Bisher sind mehr als 2500 miRNAs beschrieben worden, wobei eine bestimmte miRNA mehrere Gene regulieren und umgekehrt die Expression eines Gens durch verschiedene miRNAs verändert werden kann.

Bei Lungentumoren spielen miRNAs bei drei verschiedenen Prozessen eine zunehmend wichtige Rolle: 1. bei der Pathogenese, 2. im Rahmen der Diagnostik bzw. der Festlegung des therapeutischen Prozedere und 3. als prognostische Marker [20]. Exemplarisch wird in der Folge jeweils eine arbiträr ausgewählte miRNA erwähnt. In der Karzinogenese von Lungentumoren sind miRNAs als pathogenetische Faktoren für die Dysregulation von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen verantwortlich. Die miR-150 hemmt zum Beispiel die Expression des pro-apoptotischen Faktors p53, sodass Lungenkarzinomzellen vermehrt wachsen [21]. Verschiedene Studien haben den diagnostischen

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Wert der miR-205 hervorgehoben, welche die histologischen Subtypen von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen identifizieren soll. Eine Überexpression von miR-205 spricht dabei für das Vorliegen eines Plattenepithelkarzinoms [22]. Die miR-30 und die miR-221/222 sind mit der Aktivität des EGFR-Signalweges assoziiert worden und könnten somit das individuelle Ansprechen auf eine Tyrosinkinase-Therapie antizipieren [23]. Bezüglich Prognose schließlich könnte aufgrund der miR-375 eine Aussage gemacht werden: Patienten, welche die miR-375 im Gewebe oder Blut vermindert exprimieren, zeigen ein deutlich schlechteres Überleben im Vergleich zu Patienten mit vermehrtem Nachweis dieser miRNA [24]. Boeri et al. zeigten zudem kürzlich anhand von zwei randomisierten CT-Screening-Studien, dass Panels von 13 miRNAs in der Lage sind, die Tumorentwicklung vorherzusagen und eine Prognose zu ermöglichen [25]. Es konnte zudem grundsätzlich gezeigt werden, dass die Bestimmung von miRNAs an Hand von EBUS-TBNA Proben möglich ist [26].

Das „miRNA-Profiling" steckt sicherlich noch in seinen Anfängen. Die Bestimmung einer individuellen miRNA-Signatur wird aber in Zukunft dazu beitragen, die Entstehung von Lungentumoren besser zu verstehen, das biologische Verhalten eines Tumors abzuschätzen und eine individualisierte Therapie anbieten zu können.

Biomarker im Serum („liquid based-biopsy")

Zurzeit existiert kein Blutbiomarker, welcher mit ausreichender Spezifität und Sensitivität auf ein Lungenkarzinom hinweist, da die meisten dieser Marker auch bei anderen Krebsarten oder niedertitrig bei gutartigen Erkrankungen (z. B. COPD) gemessen werden können [27]. Die bis dahin in Bezug auf nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC) am besten untersuchten Biomarker sind CYFRA 21–1, CEA und CA-125, welche allesamt den Proteinbiomarkern zuzuordnen sind. In fortgeschrittenen Stadien des NSCLC konnte immerhin in mehreren Studien gezeigt werden, dass erhöhte Werte von CYFRA 21–1 und CEA sowie auch von deren Kombination in Form des Tumormarker-Index (TMI) mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sind [28]. Zudem gibt es Hinweise, dass einige Biomarker (CYFRA 21–1, NSE) mögliche Prädiktoren für das Ansprechen einer Chemotherapie bei NSCLC und SCLC sind [29]. Allerdings ist die Evidenzlage zum Einsatz dieser Biomarker bei operablen NSCLC-Stadien widersprüchlich [30–33]. Insbesondere in der prospektiv angelegten Studie von Blankenburg et al. waren bei 240 Patienten mit Stadium I NSCLC präoperativ erhöht gemessene Werte von CEA, CYFRA 21–1 und TMI nicht signifikant mit einem verkürzten Überleben assoziiert [32]. Möglicherweise sind aber nicht präoperativ erhöhte Werte ausschlaggebend für die Prognose, sondern der fehlende postoperative Abfall [33].

Die aktuelle Evidenzlage muss jedoch insgesamt als zu schwach beurteilt werden, um eine allgemeine Empfehlung für den Einsatz von Blutbiomarkern bei NSCLC abgeben zu können. Dementsprechend wird der Einsatz von Biomarkern bei NSCLC in den amerikanischen Richtlinien (ACCP) zurzeit nur innerhalb von klinischen Studien empfohlen [34]. Demgegenüber ist bei neuroendokrinen Tumoren der Lunge (Karzinoidtumoren) die Bestimmung des Chromogranin A als postoperativer Verlaufsparameter wahrscheinlich sinnvoll, wobei sich die Europäischen (ESMO) und ACCP-Empfehlungen diesbezüglich uneinig sind [34–35]. Es bleibt abzuwarten, ob sich andere im Blut messbare (epigenetische oder miRNA) Biomarker in Zukunft für diagnostische und prognostische Zwecke einsetzen lassen. Immerhin sind die ROC-Analysen (AUC, „Area Under Curve") für Marker-Kandidaten (*SHOX-2*: 0,78 [0,74–0,84]; miRNA: 0,90 [0,83–0,97]) vielversprechend [36–37].

Volatile Biomarker in der Ausatemluft

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Hunde in der Ausatemluft eines Menschen mit hoher Sicherheit riechen können, ob dieser ein Lungenkarzinom hat [38].

Die Ausatemluft beinhaltet Hunderte verschiedener volatiler Substanzen, hierzu zählen ein- und dann wieder ausgeatmete Stoffe, über die Haut aufgenommene Stoffe, wie auch Substanzen, die bei endogenen metabolischen Prozessen entstehen [39].

Volatile Substanzen können mittels Gaschromatografie/Massenspektrometrie sowie anhand von Ionenmobilitätspektrometrie in der Ausatemluft nachgewiesen werden. Zudem ist die Untersuchung der Ausatemluft mit der „elektronischen Nase" möglich. Im Gegensatz zu den erst genannten Methoden wird hierbei das Verfahren der Mustererkennung angewendet, die Erkennung von Einzelsubstanzen ist nicht möglich [40].

Welche volatilen Substanzen von Hunden gerochen werden, ist bisher nicht bekannt [40]. Jedoch gibt es erhöhte Konzentrationen volatiler Substanzen in der Umgebungsluft von Tumorgewebeproben [41]. Massenspektrometrisch ließen sich bei 97 Patienten mit gesichertem Lungenkarzinom signifikant erhöhte Konzentrationen von 2-Butanon, 2-Hydroxyacetaldehyd, 3-Hydroxy-2-Butanon und 4-Hydroxyhexenal in der Ausatemluft im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe nachweisen [42]. Auch bei der seitengetrennten Messung über das Bronchoskop zeigten sich bei Tumorpatienten unterschiedliche Zusammensetzungen der Ausatemluft [43]. Diese Forschungsansätze sind vielversprechend. Untersuchungen an größeren Patientenzahlen mit Lungenkarzinomen unterschiedlicher Entitäten sind allerdings erforderlich.

Prädiktive Biomarker für eine Therapie mit EGFR- oder ALK-Therapeutika

Entsprechend den aktuellen Richtlinien der International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) oder der European Society of Medical Oncology (ESMO) sollen Epidermal Growth Factor-Receptor (EGFR)-Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) wie z. B. Afatinib, Erlotinib oder Gefitinib als Erstlinientherapie bei Patienten eingesetzt werden, die an einem Adenokarzinom der Lunge oder einem Karzinom mit drüsiger Partialdifferenzierung erkrankt sind und deren Tumoren Mutationen im EGFR-Gen aufweisen [44].

Deshalb sollte bei allen Patienten mit diesen histologischen Subtypen das Vorliegen einer EGFR-Genmutation in den Exonen 19 und 21 per Sequenzanalyse getestet werden, da mehr als 90% aller EGFR-Mutationen in diesen beiden Exonen zu finden sind [45].

Wird allerdings ein EGFR-Wildtypstatus vorgefunden, so können die Patienten den größten therapeutischen Nutzen von einer konventionellen Chemotherapie erwarten, die in diesem Fall den EGFR-TKI überlegen ist. Das Vorliegen anderer, zu einer Aktivierung des Signalwegs führenden Genmutationen (beispielsweise KRAS- oder BRAF-Genmutationen, MET-Genamplifikationen) wird in der Regel nicht überprüft, da bisher keine gegen

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

diese Zielstrukturen gerichteten Therapeutika zugelassen sind. Bei diesen molekularen Abnormalitäten handelt es sich aber auch um prädiktive Biomarker, obwohl es an prospektiven Validierungen mangelt [46].

Im Regelfall profitieren Patienten mit *EGFR*-Genmutationen von einer zielgerichteten Therapie mit EGFR-TKI. Wenn jedoch während der Erstlinientherapie kein Ansprechen beobachtet werden kann (primäre Resistenz) oder nach einem initialen Ansprechen eine Progredienz der Tumorerkrankung vorliegt (erworbene Resistenz), können Genmutationen in den Exonen 18 und 20 vorliegen, auf die dann getestet werden sollte. Eine Überprüfung auf das Vorliegen dieser eher seltenen Mutation wird bei der Erstdiagnose nicht empfohlen, da diese Genmutationen und die damit einhergehenden Resistenzen häufig erst während oder nach der Therapie mit konventionellen Zytostatika oder TKI auftreten [47].

KRAS-Genmutationen, die neben der *EGFR*-Genmutation nahezu exklusiv vorliegen, sind anscheinend nicht mit dem Krankheitsverlauf bei einer Therapie mit Cetuximab assoziiert, obwohl *KRAS*-Genmutationen typischerweise zu einem Therapieversagen bei einer zielgerichteten Therapie mit EGFR-TKI führen [48].

HER2-Mutationen, die beim NSCLC eher selten vorgefunden werden, können auch primäre oder erworbene Resistenzen gegenüber EFGR-TKI verursachen. Damit handelt es sich bei den *HER2*-Mutationen nicht nur um eine neue Zielstruktur für die nächste Generation der EGFR-TKI, sondern auch um einen prädiktiven Biomarker [49].

Des Weiteren können in ungefähr 5 % der pulmonalen Adenokarzinome *ALK-EML4*-Translokationen nachgewiesen werden. In diesen Fällen erwies sich die Therapie mit dem dualen ALK- und MET-TKI Crizotinib gegenüber einer Kombinationschemotherapie als deutlich überlegen. Standard in der ALK-Diagnostik ist die FISH-Untersuchung, welche sich allerdings recht aufwendig gestaltet und ein hohes Maß an Expertise verlangt. Einfacher erscheint daher ein vorheriges Screening mittels ALK-Immunhistochemie. Der ALK-Antikörper erfasst eine Überexpression des ALK-Fusionsproteins und zeigt eine hohe Übereinstimmung mit der FISH-Untersuchung. In einer Studie mit 186 FISH-positiven Fällen zeigten nur drei Fälle immunhistochemisch ein negatives Ergebnis [50].

Daher sollten Patienten mit Adenokarzinomen bezüglich einer *ALK-EML4*-Translokation zunächst mittels IHC auf eine ALK-Expression untersucht werden.

Prädiktive Biomarker für eine Therapie mit konventionellen Zytostatika

▼

Für die Chemotherapie mit konventionellen Zytostatika wie Antifolaten oder Platinderivaten gibt es bisher keine validierten prädiktiven Biomarker.

Die Expression der Thymidylat-Synthase (TS) scheint ein prädiktiver Biomarker für eine Chemotherapie mit Pemetrexed zu sein. Einerseits scheint eine niedrigere Expression auf dem mRNA- und/oder dem Proteinlevel mit einem guten objektiven Ansprechen und andererseits einem längeren progressionsfreien Überleben sowie einem verlängerten Gesamtüberleben zu korrelieren [51].

Wegen des Fehlens prospektiver Studien wird die prädiktive Funktion dieses Biomarkers immer noch kontrovers diskutiert, wenn auch erste Ergebnisse aus prospektiven Studien den Zusammenhang zwischen der mittels IHC bestimmten Proteinexpression und dem Gesamtüberleben zu bestätigen scheinen [52].

Es ist bekannt, dass die Expression des *Excision Repair Cross-Complementation Group 1 (ERCC1)*-Gens ein prädiktiver Biomarker für eine Therapie mit Platinderivaten bei verschiedenen Tumoren ist. In einer Metaanalyse verschiedener pro- und retrospektiver Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Expression des DNA-Reparatur-Enzyms ERCC1 mit einem verkürzten Überleben und einem schlechteren Ansprechen der NSCLC-Patienten auf eine platinhaltige Chemotherapie assoziiert ist [53].

Ähnlich wie für ERCC1 wird auch für das Enzym Ribonukleotid-Reduktase M1 (RRM1) eine prädiktive Funktion für eine Chemotherapie mit Gemcitabin diskutiert [54].

Trotz der guten prädiktiven Eigenschaften der ERCC1 – und RRM1-Expression in verschiedenen retrospektiven Studien, bei denen immunhistochemische und/oder molekularpathologische Techniken eingesetzt wurden, verlief eine prospektive klinische Phase III-Studie, bei der die Patienten der Biomarker-Expression in ihren Tumoren entsprechend verschiedene Zytostatika-Kombinationen erhielten, negativ, d. h. die Biomarker-adaptierte Chemotherapie führte zu keinem verbesserten PFS oder OS [55].

Ausblick

▼

Prätherapeutische Biomarker haben ein großes Potenzial, die Behandlung des Lungenkarzinoms zu verbessern. Es haben aber bisher nur wenige prädiktive Biomarker ihren Weg in die klinische Praxis geschafft. Enorme Anstrengungen werden unternommen, um weitere Substanzen zu etablieren, welche die Therapie und damit die Prognose von Patienten mit Lungenkarzinom verbessern können. Fortgeschrittene Tumorstadien werden heutzutage minimalinvasiv bronchoskopisch diagnostiziert, sodass meist nur wenig Probenmaterial zusätzlich zur histologischen Diagnosestellung zur Verfügung steht. Von besonderer Bedeutung ist daher ein optimal abgestimmter Prozess von der bronchoskopischen Probenentnahme über die Probenbehandlung bis zur Probenanalyse unter Einbeziehung aller betroffenen Berufsgruppen.

Interessenkonflikt

▼

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Institute

[1] Abteilung für interventionelle Pneumologie, Ruhrlandklinik, Westdeutsches Lungenzentrum am Universitätsklinikum Essen
[2] Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Essen
[3] Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IPA), Institut der Ruhr-Universität Bochum
[4] Institut für klinische Pathologie, UniversitätsSpital Zürich, Schweiz
[5] Klinik für Pneumologie, UniversitätsSpital Zürich, Schweiz
[6] Innere Klinik (Tumorforschung), Westdeutsches Tumorzentrum Essen, Universitätsklinikum Essen

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

Literatur

1 *Aberle DR* et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. N Engl J Med 2011; 365: 395 – 409
2 *Horeweg N* et al. Characteristics of lung cancers detected by computer tomography screening in the randomized NELSON trial. Am J Respir Crit Care Med 2013; 187: 848 – 854
3 *Patz EF Jr* et al. Overdiagnosis in low-dose computed tomography screening for lung cancer. JAMA Intern Med 2014; 174: 269 – 274
4 *Hensing TA*, *Salgia R*. Molecular biomarkers for future screening of lung cancer. J Surg Oncol 2013; 108: 327 – 333
5 *Ludwig JA*, *Weinstein JN*. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. Nat Rev Cancer 2005; 5: 845 – 856
6 *Miekisch W*, *Herbig J*, *Schubert JK*. Data interpretation in breath biomarker research: pitfalls and directions. J Breath Res 2012; 6: 036007
7 *Kinsey CM*, *Arenberg DA*. EBUS-TBNA for Non-Small Cell Lung Cancer Staging. Am J Respir Crit Care Med 2014 [Epub ahead of print]
8 *Lee HS*, *Lee GK*, *Lee HS* et al. Real-time endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in mediastinal staging of non-small cell lung cancer: how many aspirations per target lymph node station? Chest 2008; 134: 368 – 374
9 *Nakajima T* et al. Treatment of lung cancer with an ALK inhibitor after EML4-ALK fusion gene detection using endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. J Thorac Oncol 2010; 5: 2041 – 2043
10 *Nakajima T* et al. Assessment of epidermal growth factor receptor mutation by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. Chest 2007; 132: 597 – 602
11 *Lim EH* et al. Using whole genome amplification (WGA) of low-volume biopsies to assess the prognostic role of EGFR, KRAS, p53, and CMET mutations in advanced-stage non-small cell lung cancer (NSCLC). J Thorac Oncol 2009; 4: 12 – 21
12 *Awad MM* et al. Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. N Engl J Med 2013; 368: 2395 – 2401
13 *Hetzel J*, *Eberhardt R*, *Herth FJ* et al. Cryobiopsy increases the diagnostic yield of endobronchial biopsy: a multicentre trial. The European respiratory journal 2012; 39: 685 – 690
14 *Gex G*, *Pralong JA*, *Combescure C* et al. Diagnostic Yield and Safety of Electromagnetic Navigation Bronchoscopy for Lung Nodules: A Systematic Review and Meta-Analysis. Respiration 2014; 87: 165 – 176
15 *Steinfort DP*, *Khor YH*, *Manser RL* et al. Radial probe endobronchial ultrasound for the diagnosis of peripheral lung cancer: systematic review and meta-analysis. Eur Respir J 2011; 37: 902 – 910
16 *Eberhardt R*, *Ernst A*, *Herth FJF*. Ultrasound-guided transbronchial biopsy of solitary pulmonary nodules less than 20 mm. Eur Respir J 2009; 34: 1284 – 1287
17 *Hecht SS*. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. Nat Rev Cancer 2003; 3: 733 – 744
18 *Dietrich D*, *Hasinger O*, *Liebenberg V* et al. DNA methylation of the homeobox genes PITX2 and SHOX2 predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients. Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology, part B 2012; 21: 93 – 104
19 *Darwiche K*, *Zarogoulidis P*, *Baehner K* et al. Assessment of SHOX2 methylation in EBUS-TBNA specimen improves accuracy in lung cancer staging. Ann Oncol 2013; 24: 2866 – 2870
20 *Vannini I*, *Fanini F*, *Fabbri M*. MicroRNAs as lung cancer biomarkers and key players in lung carcinogenesis. Clinical Biochemistry. The Canadian Society of Clinical Chemists 2013; 46: 918 – 925
21 *Zhang N*, *Wei X*, *Xu L*. miR-150 promotes the proliferation of lung cancer cells by targeting P53. FEBS Letters. Federation of European Biochemical Societies 2013; 587: 2346 – 2351
22 *Lebanony D*, *Benjamin H*, *Gilad S* et al. Diagnostic Assay Based on hsa-miR-205 Expression Distinguishes Squamous From Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Carcinoma. Journal of Clinical Oncology 2009; 27: 2030 – 2037
23 *Garofalo M*, *Romano G*, *Di Leva G* et al. EGFR and MET receptor tyrosine kinase–altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers. Nat Med 2011; 18: 74 – 82
24 *Yu H*, *Jiang L*, *Sun C* et al. Decreased circulating miR-375: A potential biomarker for patients with non-small-cell lung cancer. Gene. Elsevier B.V 2014; 534: 60 – 65
25 *Boeri M*, *Verri C*, *Conte D* et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. Proc Natl Acad Sci U S A108: 3713 – 3718
26 *Plönes T*, *Elze M*, *Kayser G* et al. mRNA and miRNA analyses in cytologically positive endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration: Implications for molecular staging in lung cancer patients. Cancer Cytopathol 2014; 122: 292 – 298. DOI 10.1002/cncy.21398 [Epub 2014 Feb 26]
27 *Tufman A*, *Huber RA*. Biological markers in lung cancer: A clinician's perspective 2009/2010. Cancer Biomarkers 6: 123 – 135
28 *Cedrés S*, *Nuñez I*, *Longo M* et al. Serum tumor markers CEA, CYFRA21-1, and CA-125 are associated with worse prognosis in advanced non–small-cell lung cancer (NSCLC). Clinical Lung Cancer 2011; 12: 172 – 179
29 *Holdenrieder S*, *von Pawel J*, *Dankelmann E* et al. Nucleosomes and CYFRA 21-1 indicate tumor response after one cycle of chemotherapy in recurrent non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2009; 63: 128 – 135
30 *Tomita M*, *Shimizu T*, *Ayabe T* et al. Prognostic significance of tumour marker index based on preoperative CEA and CYFRA 21-1 in non-small cell lung cancer. Anticancer Res 2010; 30: 3099 – 3102
31 *Muley T*, *Fetz TH*, *Dienemann H* et al. Tumor volume and tumor marker index based on CYFRA 21-1 and CEA are strong prognostic factors in operated early stage NSCLC. Lung Cancer 2008; 60: 408 – 415
32 *Blankenburg F*, *Hatz R*, *Nagel D* et al. Preoperative CYFRA 21-1 and CEA as prognostic factors in patients with stage I non-small cell lung cancer: external validation of a prognostic score. Tumour Biol 2008; 29: 272 – 277
33 *Kozu Y*, *Maniwa T*, *Takahashi S* et al. Prognostic significance of postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with completely resected pathological-stage I non-small cell lung cancer. J Cardiothorac Surg 2013; 8: 106
34 *Colt HG*, *Murgu SD*, *Korst RJ* et al. Follow-up and surveillance of the patient with lung cancer after curative-intent therapy: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. Chest 2013; 143: e437S – 454S
35 *Oberg K*, *Hellman P*, *Kwekkeboom D* et al. Neuroendocrine bronchial and thymic tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2010; 21: v220 – v222
36 *Kneip C*, *Schmidt B*, *Seegebarth A* et al. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma. J Thorac Oncol 2011; 6: 1632 – 1638
37 *Mozzoni P*, *Banda I*, *Goldoni M* et al. Plasma and EBC microRNAs as early biomarkers of non-small-cell lung cancer. Biomarkers 2013; 18: 679 – 686
38 *McCulloch M*, *Jezierski T*, *Broffman M* et al. Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers. Integr Cancer Ther 2006; 5: 30 – 39
39 *Phillips M*. Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath. Anal Biochem 1997; 247: 272 – 278
40 *Dent AG*, *Sutedia TG*, *Zimmerman PV*. Exhaled breath analysis for lung cancer. J Thorac Dis 2013; 5: 540 – 550
41 *Wang Y*, *Hu Y*, *Wang D* et al. The analysis of volatile organic compounds biomarkers for lung cancer in exhaled breath, tissues and cell lines. Cancer Biomark 2012; 11: 129 – 137
42 *Fu XA*, *Li M*, *Knipp RJ* et al. Noninvasive detection of lung cancer using exhaled breath. Cancer Med 2013: [Epub ahead of print] DOI doi:10.1002/cam4.162
43 *Darwiche K*, *Baumbach JI*, *Sommerwerck U* et al. Bronchoscopically Obtained Volatile Biomarkers in Lung Cancer. Lung 2011; 189: 445 – 452
44 *Peters S*, *Adjei AA*, *Gridelli C* et al. ESMO Guidelines Working Group: Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2012: vii56 – 64
45 *Lindeman NI*, *Cagle PT*, *Beasley MB* et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. J Mol Diagn15: 415 – 453
46 *Hirsch FR*, *Jänne PA*, *Eberhardt WE* et al. Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: status 2012. J Thorac Oncol 2013: 373 – 384
47 *Ying Wang*, *Wenlong Bao*, *Hua Shi* et al. Epidermal Growth Factor Receptor Exon 20 Mutation Increased in Post-Chemotherapy Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Detected with Patients' Blood Samples. Transl Oncol 2013; 6: 504 – 510
48 *Roberts PJ*, *Stinchcombe TE*, *Der CJ* et al. Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

epidermal growth factor receptor-targeted therapy?. J Clin Oncol 2010; 28: 4769 – 4777
49 *Hirsch FR*, *Jänne PA*, *Eberhardt WE* et al. Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: status 2012. J Thorac Oncol 2013; 8: 373 – 384
50 *Sholl LM*, *Weremowicz S*, *Gray SW* et al. Combined use of ALK immunohistochemistry and FISH for optimal detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. J Thorac Oncol 2013; 8: 322 – 328
51 *Liu Y*, *Yin TJ*, *Zhou R* et al. Expression of thymidylate synthase predicts clinical outcomes of pemetrexed-containing chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systemic review and meta-analysis. Cancer Chemother Pharmacol 2013; 72: 1125 – 1132
52 *Nicolson MC*, *Fennell DA*, *Ferry D* et al. Thymidylate synthase expression and outcome of patients receiving pemetrexed for advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer in a prospective blinded assessment phase II clinical trial. J Thorac Oncol 2013; 8: 930 – 939
53 *Hubner RA*, *Riley RD*, *Billingham LJ* et al. Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) status and lung cancer outcomes: a meta-analysis of published studies and recommendations. PLoS One 2011; 6: 25164
54 *Gong W*, *Zhang X*, *Wu J* et al. RRM1 expression and clinical outcome of gemcitabine-containing chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. Lung Cancer 2012; 75: 374 – 380
55 *Bepler G*, *Williams C*, *Schell MJ* et al. Randomized international phase III trial of ERCC1 and RRM1 expression-based chemotherapy versus gemcitabine/carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2013; 31: 2404 – 2412

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.