

## Molecular Diagnosis in Lung Cancer

The advent of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) such as gefitinib and erlotinib has opened a new horizon for the therapeutic options for patients with advanced lung cancer. Treatment paradigms are shifting from cytotoxic chemotherapies to molecular-based targeted therapies. The discovery of somatic mutations in the exons 18 to 21 of the tyrosine kinase (TK) domain of EGFR has revolutionized the understanding of EGFR in lung carcinogenesis and this has opened a new era for the importance of predictive biomarkers to select the treatment of choice and for personalized therapy for lung cancer. Three important EGFR assays are used and these include mutational analysis, fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. EGFR mutation study seems to be the most important biomarker to predict the response to EGFR-TKI, yet technical standardization for analyzing the status of EGFR mutation is the key factor. Therefore, it is important to standardize the approach and decide which assays are best to predict a patient's response to targeted therapies. It is also essential to determine the most cost-effective way to integrate EGFR molecular assays into clinical practice. This review will address the practical aspects of each of the currently proposed assays that have focused on EGFR mutational analysis and also the other important molecular markers such as k-ras mutation, the EML4-ALK fusion oncogene, ERCC1 and RRM1. (**J Lung Cancer 2010;9(1):9-14**)

**Key Words:** Molecular diagnosis, Lung neoplasms, EGFR genes

**Kye Young Lee, M.D., Ph.D.**

Department of Internal Medicine,  
Konkuk University School of Medicine,  
Seoul, Korea

**Received:** June 8, 2010  
**Accepted:** June 24, 2010

**Address for correspondence**

Kye Young Lee, M.D., Ph.D.  
Department of Internal Medicine,  
Konkuk University School of Medicine,  
4-12, Hwayang-dong, Gwangjin-gu,  
Seoul 143-729, Korea  
Tel: 82-2-2030-7521  
Fax: 82-2-2030-7748  
E-mail: kyleemd@kuh.ac.kr

### 서 론

Epidermal growth factor receptor (EGFR)을 억제하는 small-molecule inhibitor인 gefitinib (Iressa<sup>®</sup>)와 erlotinib (Tarceva<sup>®</sup>)와 같은 EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs)가 임상에 도입되면서 폐암, 특히 비소세포폐암에서 분자생물학적 표지자(biomarker)의 중요성이 대두되기 시작하였고 이는 활발한 중개연구(translational research)를 촉진시키는 계기가 되었다. 초기에는 EGFR-TKI의 정확한 표적을 모르는 상태에서 여성, 비흡연자, 선암, 동양인 등과 같은 임상적 요소를 가지고 EGFR-TKI를 선택하다가, EGFR 유전자 exon 18~21의 tyrosine kinase domain에 돌연변이가 규명되면서 큰 전기를 맞게 되는데, 이후 여러 대단위 3상 연구를 통하여 EGFR 돌연변이가 EGFR-TKI의 임상효과를 예측할 수 있는 가장 중요한 인자임이 밝혀졌으며 EGFR 돌연변이 양성 환자에서는 1차요법으로 기존의 항암화학

요법치료보다 gefitinib를 선택하는 치료 원칙의 패러다임의 변화가 이루어지고 있는 실정이다(1-4). 또한 EGFR 돌연변이는 exon 19 del이나 exon 21 L858R과 같은 민감성 돌연변이 이외에 T790M과 같은 내성 돌연변이가 존재함이 알려지면서 향후 EGFR 돌연변이 검사는 비소세포폐암의 임상에 있어서 필수적인 검사 방법으로 자리할 것으로 예상되고 있다.

EGFR 돌연변이만큼은 아니지만 k-ras 돌연변이 역시 중요한 분자적 검사 항목으로 대두되고 있다. 폐선암 특히 흡연성 선암의 약 20~30%에서 발견된다고 알려진 k-ras 돌연변이는 불량한 예후를 예측할 수 있는 인자로 알려져 있을 뿐 아니라 EGFR-TKI에 대한 음성 예측인자로 밝혀져 있어서 k-ras 돌연변이가 양성인 경우 EGFR-TKI에 대한 치료 효과가 없는 것으로 알려져 있다(5). 다만 k-ras 돌연변이는 서양에서와는 달리 우리나라에서는 약 6~7%의 빈도를 그 발생 빈도가 낮은 편이다. 이 외에 최근 EML4-ALK와 같은 fusion oncogene이 비흡연성 젊은 폐암환자에서 발견되고

특이적인 ALK 억제제에 대한 치료 반응이 높다고 알려져 이에 대한 검사가 향후 보편화 될 것으로 예상되고 있으며 (6), 수술적 절제 후 보조항암화학요법을 시행하는데 있어서 excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1)과 ribonucleotide reductase messenger 1 (RRM1)과 같은 DNA 복원 유전자의 발현이 cisplatin을 기반으로 하는 항암화학요법치료에 유의한 영향을 미친다는 연구 결과에 의거하여 ERCC1과 RRM1의 발현을 검사하여 이를 기반으로 항암약제를 선택하려는 시도들이 시작되었다(7). 반면 폐암에서 EGFR-TKI 외에 임상 효과가 입증된 표적치료제로서 anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) monoclonal antibody인 bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>)이 있는데 이에 대해서는 아직 임상적으로 입증된 분자생물학적 표지자가 없는 실정이다(8).

### EGFR Assays

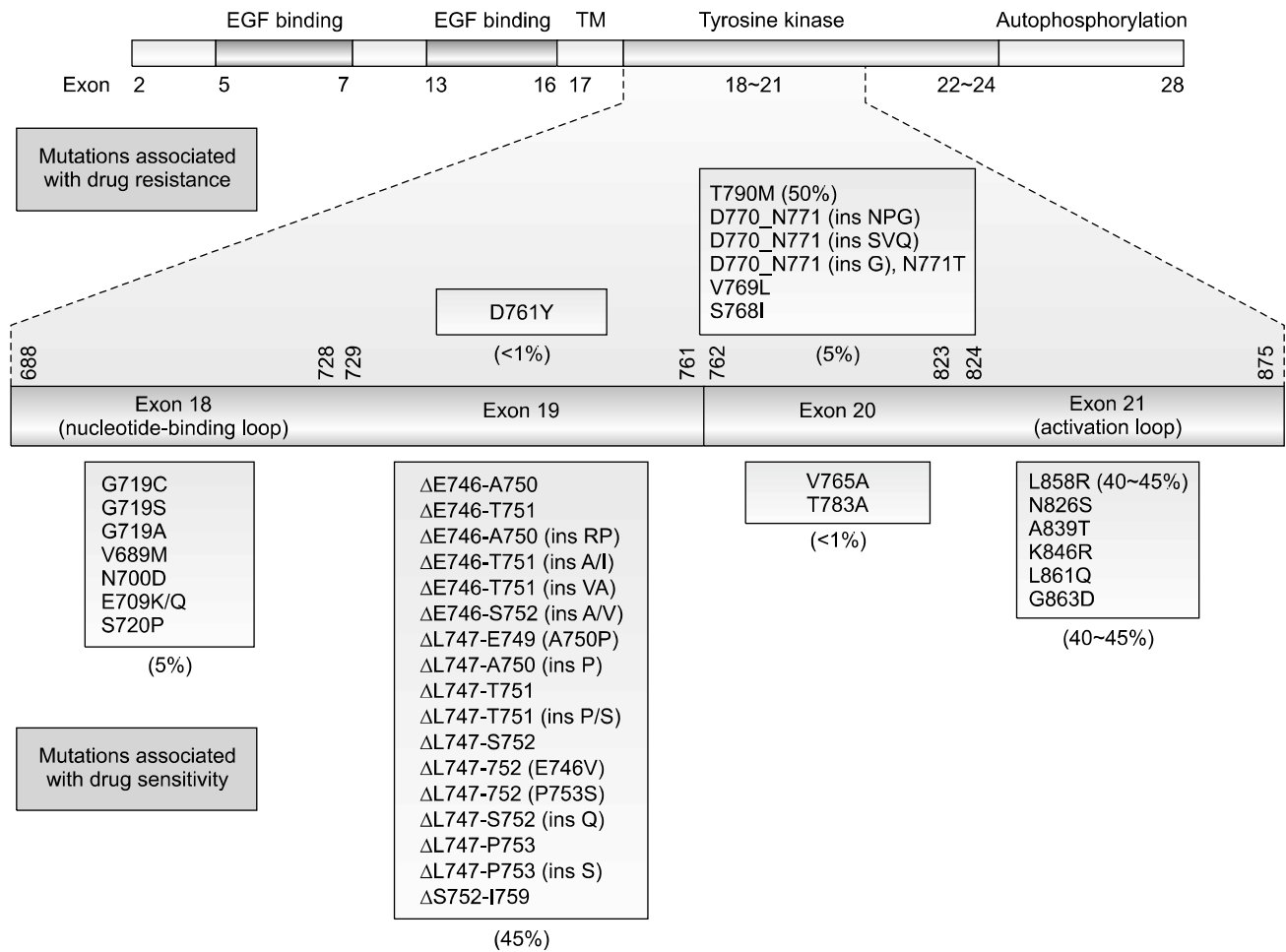
EGFR은 폐암에 있어서 가장 중요한 성장인자로서 1) EGFR 유전자의 과발현, 2) EGFR 유전자의 증폭(amplification; gene copy number increase), 3) EGFR 유전자 돌연변이 등 3가지 기전에 의해 암유전자의 기능을 수행하는 것으로 알려져 있으며 이들은 각각 면역조직화학법(immunohistochemistry), fluorescence *in situ* hybridization (FISH), PCR을 이용한 돌연변이 분석 등에 의해 assay할 수 있다(9). 이러한 EGFR assay 중에서 가장 중요한 것은 EGFR 돌연변이 분석으로서, 최근 IPASS study 등과 같은 여러 연구 결과에서 EGFR 돌연변이가 EGFR-TKI에 대한 반응률을 예측할 수 있는 가장 중요한 예측인자이며 1차요법 치료제로서 항암화학요법치료제보다 progression free survival (PFS)을 유의하게 증가시킬 수 있다고 알려지고 있다(10). 따라서 일부 국가에서는 EGFR 돌연변이 양성 환자에서 gefitinib를 인정해주기 시작하였으며 우리나라에서도 올해 안에 EGFR 돌연변이 양성 환자에서는 1차요법 치료제로 gefitinib를 사용할 수 있을 것으로 예상하고 있다. 이러한 배경에서 현재 EGFR 돌연변이에 대한 검사방법의 문제가 대두되고 있는데 민감도가 높고, 신속하며, 저비용의 장점을 갖는 EGFR 돌연변이 분석 방법론의 표준화를 위해 많은 노력이 기울여지고 있는 실정이다.

#### 1) EGFR mutations

EGFR 돌연변이는 EGFR 유전자의 TK domain (exon 18~21)에 예외 없이 존재하는데 현재까지 250여 가지 이상의 돌연변이가 보고되고 있지만 이 중에서 임상적 중요성이

알려진 돌연변이는 10개를 넘지 않고 있다(Fig. 1) (11-13). EGFR 돌연변이는 민감성(sensitizing) 돌연변이와 내성(resistant) 돌연변이로 대별되는데 exon 19의 deletion과 exon 21의 L858R point mutation이 가장 중요한 민감성 돌연변이로서 약 85~90%를 차지하고 있고 exon 19 del 돌연변이가 TKI에 대한 민감성이 더 좋은 것으로 알려져 있다(14). 반면 exon 20의 T790M 점 돌연변이는 가장 중요한 내성 돌연변이로서 획득 내성 환자의 50% 이상에서 발견되는 것으로 알려져 있으나(15), 내성 환자에서의 재조직검사(rebiopsy)가 어려운 이유로 이에 대해서는 충분한 임상 자료가 필요한 실정이다.

EGFR 돌연변이를 검사할 수 있는 분석 방법으로는 direct sequencing이 표준 방법으로 알려져 있고 현재 대다수의 문헌 자료들은 이 방법에 의한 결과들이다. 그러나 direct sequencing 방법은 민감도가 떨어져서 mutant DNA가 최소 20% 이상의 농도를 유지해야 검출되므로 정상 DNA에 의한 희석효과를 감소시키기 위하여 조직에서 종양세포의 세포비율(cellularity)이 40% 이상은 되어야 하며 정확한 분석을 위해서 암세포조직에 대한 laser capturer가 필요하다(16). 현재 건국대병원을 포함한 몇몇 병원에서는 direct sequencing 방법의 예민도를 보완하기 위하여 pyrosequencing 방법을 이용한 EGFR mutation 분석을 시행하고 있는데 임상적으로 EGFR-TKI와의 상응도가 높고 EGFR 검출률의 예민도가 높은 결과를 보이고 있어 이에 대한 자료를 분석 중에 있다(data not shown). IPASS study에서는 scorpion 방법을 이용하였는데 그 예민도가 매우 높아 1%의 mutant DNA만 있어도 양성 반응을 보이는 것으로 알려져 있으나 안정성 측면에 있어서 문제점을 보이고 있다(9,17). 최근 peptide nucleic acid (PNA)를 이용한 방법, 즉 PNA-directed PCR clamping이란 방법이 개발되어 주목 받고 있으며 이 방법을 이용한 연구결과가 이미 보고된 바 있다(18,19). PNA 대량 생산에 대한 기술적 원천 특허권을 국내 기업인 (주) PANAGENE이 가지고 있어서 최근 개발된 PNA-mediated PCR clamping for EGFR detection kit를 이용한 검증 작업을 분자폐암연구회를 중심으로 진행 중이어서 조만간 그 결과를 발표할 수 있을 것으로 생각된다. 이들 방법들의 장단점을 비교해 본다면 direct sequencing은 표준방법이지만 민감도가 떨어지고 시간이 좀 걸린다는 점에서 문제가 있는 반면, pyrosequencing이 민감도 측면과 비용적 측면에서 우수한 것으로 판단된다. Scorpion 방법이 예민성이 부각되었지만 안정성(stability) 측면에서 구조적으로 문제를 가지고 있고 고비용의 문제가 있어서 PNA-mediated PCR clamping 방법이 유망할 것으로 예상되므로 이에 대한 대대적 임상 연구가 필



**Fig. 1.** Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs)-sensitizing mutations in non small cell lung cancer. Adapted from Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer (Adapted from Sharma SV, et al. Nat Rev Cancer 2007;7:169-181) (11).

**Table 1.** Technical Comparisons among the Methods to Analyze Epidermal Growth Factor Receptor Mutations

Technology	PNAClamp	Scorpion	Sequencing
Detection limit	<1%	<1%	25~30%
Sensitivity	100%	100%	70~75%
Amplicon size	~150 bp	~100 bp	200 bp
Procedure time	<3 h	<3 h	11 h
Complexity	Low	Low	High
Stability	High	Low	—

요하다고 생각된다(Table 1).

이 외에 향후 EGFR 돌연변이와 관련되어 임상적으로 그 중요성이 부각될 분야는 획득 내성의 문제라고 생각된다. T790M 점돌연변이와 같은 2차 돌연변이가 가장 중요한 것으로 알려져 있고 C-MET amplification, 그리고 epithelial to mesenchymal transition (EMT) 등이 주요 내성 기전으로 밝

혀져 있지만 EGFR-TKI와 관련지어서는 T790M 2차 돌연변이의 검출 문제가 가장 중요할 것으로 예상되고 있다(20,21). 이는 또한 현재 활발히 임상연구가 진행 중인 2세대 EGFR-TKI인 BIBW2992와 같은 irreversible dual EGFR and HER2 inhibitor에 임상 적용에 있어서도 중요한 이슈로 등장할 것으로 예상하고 있다(22). 원칙적으로 T790M 검출에 대해서는 재조직검사가 필요하지만 현실적으로 재조직 검사에 대한 어려움이 너무 크므로 혈장 DNA에서 돌연변이를 검색할 수 있는 방법들에 대한 많은 연구가 진행 중이어서 조만간 이에 대해서도 그 임상적 유용성에 대한 결론이 내려질 것으로 생각된다(23).

## 2) EGFR gene copy number

EGFR 유전자 증폭은 FISH에 의해서 확인할 수 있는데 기술적으로 난점이 있는 방법이며 형광물질을 이용하여야

하고 고비용 방법이며 HER2와는 달리 EGFR 유전자가 7번 염색체에 존재하는 관계로 이곳에는 폐암의 염색체 이상이 종종 발견되는 곳이어서 noise 문제가 판독에 지장을 줄 수 있다(24). EGFR 돌연변이와 마찬가지로 EGFR FISH 결과도 EGFR-TKI에 대한 반응 예측 인자로 좋다는 보고들이 여럿 있지만 그 power는 EGFR 돌연변이에 비하여 떨어지는 것으로 알려져 있으며 EGFR 돌연변이와 FISH 결과 사이에는 상당한 환자에서 중첩된다는 보고도 있다. 서양에서 상대적 EGFR 돌연변이 빈도가 낮기 때문에 EGFR FISH를 이용한 데이터가 다수 보고되고 있지만 EGFR 돌연변이의 빈도가 상대적으로 높은 동양권에서는 EGFR FISH에 대한 데이터가 많지 않은 실정이며 아직까지 국내에서 EGFR FISH를 이용한 데이터는 없는 것 같다(9,24,25). 최근 형광물질 대신 발색반응을 이용한 chromogenic *in situ* hybridization (CISH) 이나 quantitative PCR을 이용한 gene copy number 결정법이 거의 같은 결과를 보인다는 문헌도 보고되고 있다(26).

### 3) EGFR protein

EGFR 단백질 발현은 면역조직화학법으로 확인할 수 있는데 면역조직화학법이 갖는 방법론적 제한점이다가 EGFR-TKI 초기 연구에서 EGFR 단백질 발현 정도와 TKI 반응을 사이에는 상관관계가 없다고 밝혀지면서 EGFR 단백질 발현은 임상에서 중요한 요소가 되지 않고 있다(27). 흥미로운 사실은 역설적으로 EGFR 단백질 발현이 편평상피암에서 선암보다 상대적으로 높은 것으로 알려져 있다. 다만 EGFR 단백질 발현이 없으면 EGFR-TKI의 효과가 없다는 negative predictive role은 있는 것으로 알려져 있다. EGFR-TKI는 아니지만 anti-EGFR MoAb를 이용한 연구(FLEX)에서는 EGFR 단백질 발현 치료효과와 관련이 있다고 보고되고 있으나 여기에서 k-ras의 negative predictive effect는 또 없는 것으로 보고되고 있어서 EGFR biology에서 약 10%의 환자는 그 작용 기전을 모르는 것으로 되어 있고 여기에는 off-target effect가 관여할 가능성이 제시되고 있다(28). 반면 최근 EGFR exon 19 del과 exon 21 L858R 점돌연변이에 특이적인 단백질에 대한 항체를 이용한 면역조직화학법이 돌연변이 분석자료와 민감도나 특이도가 매우 높은 결과를 보인다는 문헌이 보고되면서 주목받고 있다(29).

### K-RAS Mutations

K-Ras 돌연변이는 hot spot이 codons 12, 13, 61으로서 서양에서는 선암과 대세포암에서 빈도가 높아 20~30%에서 발견된다고 알려져 있고 불량예후인자로서 흡연성 폐암과

의 연관성이 높다고 알려져 있다(30). 반면 선암에서 EGFR 돌연변이의 빈도가 상대적으로 높은 우리나라에서는 k-ras 돌연변이 빈도가 예상보다는 매우 낮아서 국내를 대표할만한 자료는 아니지만 건국대학교병원 자료에 의하면 6~7%의 낮은 빈도를 보이고 있다. K-ras 돌연변이는 EGFR 돌연변이와 상호배타적으로 발생하는 것으로 알려져 있고 EGFR-TKI에 대한 중요한 음성예측인자로 알려져 있어서 EGFR 돌연변이와 함께 set로 검사하는 것이 필요하다고 생각되나 이에 대해서는 추가 연구가 필요하다고 생각된다. K-ras 돌연변이는 대장암에서는 항 EGFR 단일항체 치료에 대한 중요한 음성예측인자로 알려져 있으나 비소세포폐암을 대상으로 한 항 EGFR 단일항체 치료에 대한 임상연구(FLEX)에서는 그렇지 않은 결과를 보여 k-ras 돌연변이의 EGFR-TKI와 MoAb 치료에 대한 상반된 결과를 볼 때 k-ras 돌연변이의 표적치료제에 대한 예측표지자로서의 역할에 대해서는 추가 연구가 필요하리라고 생각한다(28).

### EML4-ALK Fusion Oncogene

최근 EGFR 돌연변이에 이어서 폐암 분야에 있어서 이룩된 중요한 분자생물학적 업적을 든다면 일본의 Hiroyuki Mano 박사의 EML4-ALK fusion oncogene의 발견을 꼽을 수 있다(6,31). 염색체의 translocation은 주로 혈액암종에서 발생하는 발암과정인데 고형암인 폐암에서 이를 밝혀냈다는 사실은 과히 획기적이라 할 수 있으며, 임상적으로 더욱 중요한 사실은 이러한 특징적인 EML4-ALK fusion oncogenic protein 발견되는 환자가 특이적인 MET/ALK 억제제인 PF-1066에 대한 약제 반응이 매우 유망하다는 사실이다(32). EML4-ALK는 염색체 2p 내에서 small inversion에 의해 발생하는 fusion oncogene으로 EGFR-TKI는 효과가 없는 것으로 알려져 있으며 젊은 남자, 비흡연자 선암 환자에서 주로 발견되는 것으로 알려져 있고, 특히 항체를 이용한 면역조직화학법과 FISH를 이용하여 진단할 수 있는 것으로 알려져 있다(33).

### ERCC1 and RRM1

ERCC1은 cisplatin-유도성 DNA 손상을 복원하는 과정에 관여하는 rate-limiting enzyme으로서 초기 폐암 환자를 대상으로 한 수술 후 보조항암요법 임상연구들을 살펴보면 ERCC1 발현 음성이 환자에서 보조항암치료를 한 경우 생존기간이 향상된 반면 양성인 경우는 보조항암치료의 효과를 전혀 보지 않은 것으로 밝혀져 platinum-근간의 항암치료

를 하는데 중요한 표지자로 알려져 있다(7,34). RRM1은 ribonucleotide reductase의 조절인자로서 ribonucleotides에서 deoxyribonucleotides를 생성하고 DNA 합성과 복원이 작용하는 기능을 담당하고 있어서 ERCC1과 유사한 기능을 가지면서 gemcitabine 효과와 관련되어 있는 유전자로 알려져 있다. 최근 ERCC1의 발현이 높으면 cisplatin을 배제한 docetaxel/gemcitabine과 같은 regimen을 선택하고 RRM1이 높으면 gemcitabine을 배제하는 regimen을 사용하는 맞춤형 암치료에 대한 임상 시도가 이루어지고 있다(35).

### 향후 전망

이상과 같은 분자생물학적 진단에 의한 폐암 환자의 치료는 향후 도래될 새로운 폐암 치료의 패러다임이 될 개별화된 맞춤치료(personalized and customized treatment)로 가는 과정으로 생각된다. 현재 EGFR 돌연변이 검사가 그 중심에 있으며 민감도 있는 검사방법의 개발과 방법의 표준화가 필요하다고 생각된다. 현재는 단일 유전자에 대한 검사 방법이 주종을 이루고 있지만 여러 유전자들을 이용한 치료 algorithm이 개발되고 있으며 궁극적으로는 chip 혹은 microarray를 이용한 포괄적인 유전자 발현 양상에 기반을 둔 치료방법으로 발전할 것으로 예상된다.

### REFERENCES

- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-2139.
- Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-1500.
- Pao W, Miller VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol* 2005;23:2556-2568.
- Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:643-655.
- Zhu CQ, da Cunha Santos G, Ding K, et al. Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol* 2008;26:4268-4275.
- Mano H. Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer Sci* 2008;99:2349-2355.
- Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006;355:983-991.
- Coate LE, John T, Tsao MS, Shepherd FA. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2009;10:1001-1010.
- Dacic S. EGFR assays in lung cancer. *Adv Anat Pathol* 2008;15:241-247.
- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-957.
- Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:169-181.
- Chou TY, Chiu CH, Li LH, et al. Mutation in the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor is a predictive and prognostic factor for gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:3750-3757.
- Cortes-Funes H, Gomez C, Rosell R, et al. Epidermal growth factor receptor activating mutations in Spanish gefitinib-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 2005;16:1081-1086.
- Jackman DM, Yeap BY, Sequist LV, et al. Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res* 2006;12:3908-3914.
- Balak MN, Gong Y, Riely GJ, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2006;12:6494-6501.
- Pao W, Ladanyi M. Epidermal growth factor receptor mutation testing in lung cancer: searching for the ideal method. *Clin Cancer Res* 2007;13:4954-4955.
- Yatabe Y, Hida T, Horio Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. A rapid, sensitive assay to detect EGFR mutation in small biopsy specimens from lung cancer. *J Mol Diagn* 2006;8:335-341.
- Tanaka T, Nagai Y, Miyazawa H, et al. Reliability of the peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based test for epidermal growth factor receptor mutations integrated into the clinical practice for non-small cell lung cancers. *Cancer Sci* 2007;98:246-252.
- Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:121-128.
- Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039-1043.
- Engelman JA, Jänne PA. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:2895-2899.

22. Belani CP. The role of irreversible EGFR inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer: overcoming resistance to reversible EGFR inhibitors. *Cancer Invest* 2010;28:413-423.
23. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008;359:366-377.
24. Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2005;23:6838-6845.
25. Gallegos Ruiz MI, Floor K, Vos W, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number detection in non-small-cell lung cancer: a comparison of fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization. *Histopathology* 2007;51:631-637.
26. Sholl LM, John Iafrate A, Chou YP, et al. Validation of chromogenic in situ hybridization for detection of EGFR copy number amplification in nonsmall cell lung carcinoma. *Mod Pathol* 2007;20:1028-1035.
27. Suzuki S, Dobashi Y, Sakurai H, Nishikawa K, Hanawa M, Ooi A. Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas: an immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Cancer* 2005;103:1265-1273.
28. Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet* 2009;373:1525-1531.
29. Brevet M, Arcila M, Ladanyi M. Assessment of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using antibodies specific to the two major forms of mutant EGFR. *J Mol Diagn* 2010;12:169-176.
30. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 2005;23:5900-5909.
31. Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. *Ann Surg Oncol* 2010;17:889-897.
32. Bang Y, Kwak EL, Shaw DR, et al. Clinical activity of the oral ALK inhibitor PF-02341066 in ALK-positive patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2010;28:A3.
33. Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 2010;16:1561-1571.
34. Zheng Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A, Bepler G. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med* 2007;356:800-808.
35. Simon G, Sharma A, Li X, et al. Feasibility and efficacy of molecular analysis-directed individualized therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:2741-2746.