

AZ ÚJGENERÁCIÓS SZEKVENÁLÁS SZEREPE A KLINIKAI ONKOLÓGIÁBAN

THE ROLE OF NEXT-GENERATION SEQUENCING IN CLINICAL ONCOLOGY

Kotmayer Lili^{1,2}, Bödör Csaba^{1,2}

1, HCEMM-SE Molekuláris Onkohematológia Kutatócsoport, Budapest

2, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest,

1, HCEMM-SU Molecular Oncohematology Research Group, Budapest

2, 1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest

Rövid cím: *NGS a klinikai onkológiában*

Levelező szerző: Dr. Bödör Csaba, I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Üllői út 26, 1085 Budapest, Tel: +36-1-215-7300/54462, Fax: +36-1-266-1641, e-mail: bodor.csaba1@med.semmelweis-univ.hu

ABSZTRAKT

Az újgenerációs szekvenálás megjelenése az elmúlt évtizedben az onkológiai entitások molekuláris hátterének részletes megismeréséhez vezetett. A technológiai fejlődéssel párhuzamosan új célzott terápiás lehetőségek váltak elérhetővé az onkológiai betegek számára. A folyamat eredményeképpen a molekuláris diagnosztikai vizsgálatok a prediktív biomarkerek vizsgálatának köszönhetően mára a precíziós medicina alappillérvé váltak. A klasszikus monogénes vizsgálatok mellett az elmúlt években előtérbe kerültek a célzott terápia tervezést támogató, újgenerációs szekvenáláson alapuló multigénes genetikai vizsgálatok. Összefoglaló közleményünkben a multigénes újgenerációs szekvenálás alkalmazása és az eredmények interpretációja kapcsán felmerülő legfontosabb szakmai szempontokat tekintjük át.

Kulcsszavak: precíziós medicina, újgenerációs szekvenálás, molekuláris diagnosztika, célzott terápiák

ABSTRACT

Over the past decade next-generation sequencing has led to the in-depth understanding of the molecular background and driving mechanisms in most types of cancer. Parallel to the technological advances, novel targeted therapies have become available for oncology patients. As a result of this process, molecular diagnostics is now one of the main cornerstones of precision medicine with predictive biomarkers aiding patient care in oncology. In addition to standard monogenic testings, recently multigene testing methods based on next-generation sequencing came into view, supporting targeted therapeutic decisions and personalized medicine. In this review, we aim to depict the most important professional aspects related to the reasonable application of next-generation sequencing and the interpretation of its results.

Keywords: precision medicine, next-generation sequencing, molecular diagnostics, targeted therapies

Bevezetés

A molekuláris genetikai vizsgálatok az elmúlt időszakban robbanásszerű fejlődésen mentek keresztül, melynek legújabb mérföldköve az újgenerációs szekvenálás (NGS: next generation sequencing) megjelenése volt. Az NGS az elmúlt években a precíziós medicina alappilléreként forradalmasította a modern molekuláris patológia működését, alkalmazása pedig jelentősen átrajzolta az onkológiai kórképek genetikai hátteréről alkotott képünket. Az egyes onkológiai entitások genomjának megismerését célzó, nemzetközi konzorciumok részvételével megvalósuló NGS vizsgálatoknak köszönhetően számos új prognosztikai, prediktív és terápiás relevanciával bíró biomarker került leírásra, melyek rövid időn belül a mindennapi diagnosztika részévé váltak.[1] A diagnosztikában már rutinszerűen alkalmazott monogén vizsgálatok mellett az NGS megteremtette a tumorok multigén és komprehenzív genetikai profilozásának technikai alapjait is, amelyek a pontosabb diagnosztikai besorolások és rizikóbecslő algoritmusok létrehozása mellett az optimális terápiás stratégia megválasztásában is egyre nagyobb szerepet játszanak.

Az újonnan megjelenő technológia azonban egyúttal kihívás elé állítja az onkológiai betegellátásban dolgozó szakembereket, hiszen egyértelmű szakmai útmutatások és standardok hiányában az alkalmazásával azonosítható genetikai eltérések jelentőségének interpretációja és az eredmények klinikai gyakorlatban történő hasznosítása kapcsán számos nyitott kérdéssel szembesülünk. Ez a jelenleg is zajló folyamat, amely során az egyre költséghatékonyabbá váló multigén vizsgálatok térnyerése figyelhető meg, egyike a modern molekuláris patológia/onkológia forrongó területeinek.

Az NGS klinikai alkalmazásának lehetőségeivel és felmerülő kérdéseivel kapcsolatban az Európai Klinikai Onkológiai Társaság (ESMO: European Society for Clinical Oncology) 2020 nyarán időszerűnek érezte egy ajánlás megfogalmazását, amely az eredmények klinikai hasznosíthatóságát helyezi a középpontba.[2] A kiadott ajánlás, amely az első szakmai állásfoglalás az NGS onkológiában történő alkalmazásáról, az egyes szolid tumoros megbetegedések mindennapi diagnosztikája során indokolt NGS vizsgálatokat és vizsgálandó eltéréseket is tartalmazza. A továbbiakban az NGS technikai hátterének rövid ismertetése és az eredmények interpretációja mellett az ESMO ajánlás áttekintésével a technológia alkalmazásának előnyeit és jelenlegi dilemmáit is bemutatjuk.

Az NGS vizsgálatok alapfogalmai

Az NGS a jelenleg elérhető legkorszerűbb szekvenálási metodika, mellyel egyszerre számos genomi lókuszt vizsgálható nagy érzékenységgel. Az eljárás során az egyes cél régiók nukleotidsorrendjét a szekvenálási read-ek referencialókuszhoz történő illesztésével határozzuk meg, melynek kiértékeléséhez komplex bioinformatikai háttérre van szükség. Fontos kiemelni, hogy az NGS elnevezés számos eltérő eljárást foglal magába. Az NGS nagy áteresztőképességű és érzékeny molekuláris vizsgálati eszközként akár a teljes exom, illetve genom vizsgálatára is alkalmas. *Teljes genom szekvenálás* (WGS: whole genome sequencing) során a humán sejtek DNS-ének teljes szekvenciája kerül meghatározásra, míg *teljes exom szekvenálás* esetén (WES: whole exome sequencing) a DNS kódoló régiói, a gének nukleotidsorrendjét határozzuk meg masszív párhuzamos szekvenálással.[3] A WGS és WES jelenleg még csak az onkológiai kutatások és a klinikai genetika eszköztárába tartozó eljárások, rutinszerű alkalmazásuk az onkológiai diagnosztikában napjainkban nem indokolt.

Az onkológiai betegellátáshoz kapcsolódó molekuláris diagnosztikában az NGS vizsgálatok előre kiválasztott, individuális gének (például *BRCA1/2* gének) vagy genomi régiók/géncsoportok szekvenciájának meghatározását, ún. célzott szekvenálást (mindennapi szóhasználatban: „panelszekvenálás”) jelentenek, melyek segítségével az egyes kórképek hátterében álló, tumorigenezisben résztvevő driver eltérések és potenciális gyógyszer-célpontok azonosíthatók.[4] A változó méretű génpanelek átfogó képet nyújthatnak az onkológiai entitások genetikai hátteréről; a kisebb panelek elsősorban az egyedi célzott terápiás célpontok és rezisztenciamutációk azonosítására alkalmasak, míg a nagyobb, (akár több száz gént tartalmazó) panelekkel további biomarkerek, többek között például a tumoragnosztikus terápiák indikációját képező tumor mutációs terhelés (TMB: tumor mutation burden) és mikroszatellita instabilitás (MSI: microsatellite instability) is vizsgálható.

Az onkológiai kórképek genetikai hátterének vizsgálata során napjainkban már alapvető elvárás a szomatikus és csírasejtes (germline) pontmutációk kimutatása mellett a különböző génfúziók és a hagyományosan fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) vizsgált kópiaszám-eltérések (CNV: copy number variations) közé tartozó deléciók és amplifikációk (duplikációk) azonosítása. A DNS alapú NGS eljárások mellett az elmúlt évek fejlesztéseként az RNS-ből kiinduló NGS vizsgálatok is megjelentek az onkológiai diagnosztikában, melyekkel fúziós transzkriptumok (többek között az *ALK*, *ROS1*, *NTRK* gének és fúziós partnereik) és a sejtek génexpressziós profilja vizsgálható szimultán módon. Mindemellett egyre nagyobb

klinikai igény mutatkozik a TMB és MSI NGS-alapú meghatározására is. A biomarkerek ilyen széles körét szimultán módon, több száz (jellemzően 300-600) gén nukleotidsorrendjének meghatározásával azonosítani képes NGS-alapú eljárást a mindennapi gyakorlatban komprehenzív genomikai profilozásnak (CGP: comprehensive genomic profiling) nevezzük. [5-7]

Új tumoragnosztikus prediktív biomarkerek: TMB és MSI

A TMB, amely a megabázisonként (Mb) elhelyezkedő non-szinonim mutációk számával definiálható, a különböző onkológiai kórképekben nagyfokú heterogenitást mutat.[8] A magas mutációs terheléssel jellemezhető daganatok esetében (például melanoma, tüdőrák) először funkcionális vizsgálatokkal igazolták, hogy ezen esetek fokozott érzékenységet mutatnak az immunterápiák alkalmazásával szemben, amely a neoantigénként viselkedő, mutációk hatására létrejövő károsodott fehérjék nagy számával magyarázható.[9] Az első eredményeket követően számos klinikai vizsgálat is jobb válaszarányról számolt be a magas TMB-vel bíró betegcsoportokban a kontrollcsoportokhoz képest.[10, 11] Ennek hatására az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügynökség (FDA: Food and Drug Administration) 2017-ben szövettani típustól függetlenül, tumoragnosztikus indikációban engedélyezte az első immunchekpoint-gátló, PD-L1 inhibitor pembrolizumabot magas TMB-vel rendelkező (>10 mutáció/Mb) malignitások többedvonalbeli kezeléseként.

A legfrissebb eredmények alapján a jelenleg elfogadott univerzális TMB „cut off” értéke több malignitásban (elsősorban egyes nőgyógyászati tumorokban, prostatadaganatokban és gliomákban) nem rendelkezik kellő predikciós erővel, ezért az egyes onkológiai kórképekben eltérő határértékek meghatározására van szükség.[12] Míg ezen daganatspecifikus értékek definiálása jelenleg is folyamatban van, számos további entitás, például pajzsmirigydaganatok, vagy ismeretlen kiindulású daganat (CUP: cancer of unknown primary) esetében a TMB prediktív szerepe egyértelmű, vizsgálata pedig az elérhető tumoragnosztikus terápiák miatt ajánlott. [2]

A TMB meghatározás „gold standardja” a WES, melynek alkalmazása azonban a mindennapi onkológiai diagnosztikában nem életszerű, ezért a TMB széleskörű vizsgálata jelenleg nagy (több száz génes) génpanelek alkalmazásával történik. A multigén NGS a TMB megbízható vizsgálati eszköze, a használatával nyert eredmények több tanulmány adatai alapján kiválóan korrelálnak a WES mérésekkel.[13, 14]

A TMB-hez hasonló terápiás indikációval bíró MSI a DNS hibajavító mechanizmusainak károsodása révén alakul ki és szintén fokozott érzékenységet jelent az immunterápiák alkalmazásával szemben. A magas TMB prediktív hatását igazoló KEYNOTE vizsgálatban, valamint további klinikai tanulmányokban a mikroszatellita instabil (MSI-H: microsatellite instability high) betegcsoportban is hasonlóan jó válaszarány volt megfigyelhető, melynek köszönhetően az FDA már a TMB-t megelőzően, MSI-H státusz esetén is engedélyezte a pembrolizumab alkalmazását, tumoragnosztikus indikációban.[15-17] Az MSI meghatározása, melyet a mindennapi molekuláris diagnosztikában immunhisztokémiai módszerekkel és PCR-alapú fragmenthossz-analízissel végeznek, a TMB-hez hasonlóan NGS vizsgálattal is kivitelezhető, amely a komprehenzív genomikai profilozás (CPG) keretében további genetikai eltérések vizsgálatával együtt történik.

Az NGS eredmények interpretációja

A szekvenálási reakciót követő, bioinformatikai algoritmusok segítségével végzett kiértékelés eredményeként a multigén NGS vizsgálatok során gyakran több száz variáns kerül azonosításra, melyek klinikai relevanciájának meghatározása a vizsgálatot végző és értékelő szakemberek alapvető feladata. Fontos kiemelni, hogy ez a folyamat multidiszciplináris megközelítést igényel, amelyben a molekuláris patológus, molekuláris diagnosztika és bioinformatikus is szerepet vállal. Az eredmények klinikai értelmezése a klinikai onkológussal, a beteg kezelőorvosával való szoros konzultációt igényel. A nemzetközi útmutatások és jógyakorlatok is az ilyen összetételű, ún. molekuláris tumor board-ok szerepére hívják fel a figyelmet az NGS adatok kiértékelése és klinikai értelmezése során. A folyamatban számos adatbázis, szoftver és nemzetközi ajánlás nyújthat támpontot, melyek a pontos (nukleotidra és aminosavra kiterjedő) lokalizáció mellett az egyes mutációk variáns allélfrekvencia (VAF) értékeit és patogénitását is meghatározzák (annotáció).

Az azonosított eltérések annotációja során együttesen alkalmazott adatbázisok (dbSNP, ClinVar, COSMIC) a szakirodalomban korábban leírt mutációk áttekintése mellett fehérje predikciók (SIFT, PolyPhen) és génfúziók detektálására (STAR-Fusion, Fusion Catcher) képes szoftverek eredményeit is integrálják.[18-23] Az ezek alapján felállítható „klasszikus” evidenciaszintek szerint a genetikai eltérések öt csoportja különíthető el: *patogén, feltehetőleg patogén, benignus, feltehetőleg benignus és ismeretlen jelentőségű variánsok (VUS: variant of unknown significance)*. [24] Az variánsok annotációja mellett az eredmények

kiértékelése során további adatbázisok alkalmazásával a genetikai eltérések jelenlétében alkalmazható kezelések és elérhető klinikai vizsgálatok is azonosíthatók.

Bár a mutációk klasszikus evidenciaszintekbe történő besorolása széleskörben – és általában egyértelműen – alkalmazható osztályozás, a különböző kiértékelési algoritmusok miatt az egyes molekuláris laboratóriumok által kiadott leletekben az eltérésekhez kapcsolódó terápiás javaslatok jelentősen eltérhetnek egymástól. Ezen javaslatok és a leletalkotás egységesítésére az Amerikai Molekuláris Patológiai Társaság (AMP: Association for Molecular Pathology) 2016-ban második alkalommal tett közzé egy ajánlást, melyben a genetikai eltérések klasszifikációja a patogenitás mellett a közvetlen terápiás relevancián alapul.[25] Az AMP által az *I. csoportba („Tier”)* sorolt eltérések jelentős klinikai relevanciával bírnak, melyek közül a legmagasabb, *IA* evidenciaszintű mutációk az Amerikai Gyógyszer- és Élelmiszerügyi Hatóság (FDA: Food and Drug Administration) által jóváhagyott és klinikai irányelvekben is ajánlott célzott terápiás szerek célpontjai. A *Tier IB*-be tartozó eltérések a hivatalos ajánlásokban nem szereplő, de több nemzetközi tanulmány és szakértő által ajánlott célzott terápiák közvetlen indikációi. A *Tier II*-be tartoznak azon eltérések, melyek potenciális klinikai relevanciával rendelkeznek; a *IIC* evidenciaszintű mutációk a több tanulmány eredményei alapján elfogadott, FDA-engedéllyel rendelkező, de más entitás kezelésére jóváhagyott off-label szerek célpontjai, míg a *IID* alcsoportba sorolt eltérések pedig a specifikus célzott terápiás szerek esettanulmányokban leírt, szakmai konszenzussal nem rendelkező indikációit jelentik. A *Tier III*-ba tartoznak az ismeretlen jelentőségű VUS eltérések, míg a benignus vagy feltehetőleg benignus mutációk a legalacsonyabb szintű, *Tier IV*-be sorolandók. (1. ábra)

Az AMP patogenitáson és célozhatóságon alapuló klasszifikációjához hasonlóan az ESMO precíziós medicina munkacsoportja is kidolgozott egy ajánlást, amely az NGS-sel azonosítható genetikai eltérések osztályozása során az egyes mutációkhoz kapcsolódó célzott terápiák validáltságát helyezi középpontba és amely elsősorban a NGS/CPG vizsgálatok eredményeinek interpretációja során alkalmazható.[26, 27] A hat ESCAT (ESMO Scale of Clinical Actionability for molecular Targets) csoportba sorolható eltérések közül az *ESCAT I* mutációkhoz validált, a mindennapi onkológiai betegellátásban használt célzott terápia rendelhető (például *EGFR* exon 19 deléció tüdő adenocarcinómában). Az *ESCAT II* csoport eltéréseihez retrospektív vagy fázis I/II klinikai vizsgálatokban igazoltan hatékony célzott terápia kapcsolódik (például a tumoragnosztikus immunchekpoint-gátlók szerek indikációját

jelentő TMB). Az *ESCAT III* mutációk jelentősége a kezelendő entitásban még nem ismert, azonban más kórképben jóváhagyott terápia rendelhető hozzá (off-label indikáció). Az *ESCAT IV*-es csoportba azon eltérések sorolhatók, melyek célozhatóságát preklinikai adatok támasztják alá, míg az *ESCAT V* csoport mutációi önmagukban nem jelentenek terápiás indikációt, azonban feltehetőleg más eltérésekkel együtt alkalmasak lehetnek célzott terápiára. Az *ESCAT VI* eltérések célozhatóságáról jelenleg még nem áll rendelkezésünkre kellő mennyiségű adat. (1. táblázat)

A molekuláris diagnosztikai leletben az azonosított eltérések típusa és klinikai relevanciája mellett minden esetben szerepelnie kell a mutációk variáns allélfrekvencia (VAF) értékének, amely azok „mennyiségéről” ad információt. A VAF befolyásolhatja az optimális kezelési stratégia megválasztását, hiszen célzott terápia alkalmazása során elsősorban azon eltérések gátlásától várható a legjobb eredmény, amelyek a tumorsejtekben magas VAF-fal detektálhatók (a tumorsejtek nagy részében jelenlévő driver eltérések). Bár a terápiás indikációt jelentő határérték meghatározásában jelenleg még nincs nemzetközileg elfogadott konszenzus, az 5% alatti VAF-fal rendelkező eltérések feltehetőleg csekély biológiai hatással rendelkeznek.[28]

Gyakorlati megfontolások az NGS klinikai alkalmazásával kapcsolatban

Az NGS megjelenése egyértelműen új távlatokat nyitott a molekuláris diagnosztikában, azonban a multigén vizsgálatok alkalmazásának pontos indikációja, a választandó génpanel mérete, valamint az eredmények interpretációja számos – jelenleg még megválaszolásra váró – kérdést felvet. A fentebb említett első ESMO NGS ajánlás mindezek figyelembevételével visszafogott álláspontot képvisel a multigén panelek alkalmazásával kapcsolatban, amely elsősorban a nagyobb génpanelek által nyújtott klinikai haszonra és terápiás következményeire fókuszál.

Klinikai relevancia és az NGS indikációi

Az ESMO a multigén szekvenálás klinikai indokoltságát az egyes tumortípusokban a várható genetikai eltérések korábban ismerttetett *ESCAT*-osztályozásától teszi függővé, melynek alapján három szintet különít el: *i)* az *ESCAT I* mutációk vizsgálatát a mindennapi betegellátásban; *ii)* az akadémiai vagy egyetemi centrumokban végzett multigén panelszekvenálásokat és végül *iii)* a személyre szabott, individuális esetek NGS vizsgálatát.[2]

Az első csoportba tartozó entitások, például nem-kissejtes tüdőrákok (NSCLC: non-small cell lung cancer) esetében a multigén vizsgálatok elsődleges célja az ESCAT I eltérések azonosítása (például *EGFR* 19-es exon deléció tüdő adenocarcinomában), míg a második csoportba sorolt kórképekben (például pancreas- és emlőtumorokban) a TMB meghatározás és a kisebb panelekkel nem azonosítható, de alacsonyabb (II-IV) ESCAT szintű eltérések detektálása indokolja a multigén panel, illetve CGP alkalmazását.

Míg az ESCAT I mutációkhoz közvetlen terápiás relevancia, validált és a mindennapi betegellátásban alkalmazott célzott terápia kapcsolódik, a második csoportba tartozó esetekben a vizsgálatot végző klinikai központnak az egyes eltérések interpretációjakor az új (rendszerint off-label indikációban hozzáférhető) gyógyszerek alkalmazását és az elérhető klinikai tanulmányok jelentőségét/lehetőségét kell mérlegelnie. A harmadik csoportba tartozó esetekben, melyekben a multigén NGS egyébként nem indokolt, a bizonytalan relevanciájú, jellemzően ESCAT III-IV eltérések azonosítása során további aspektusok, így az egészségügyi rendszer terhelése és a vizsgálat költségessége is jobban előtérbe kerülnek. Mindemellett az ESMO az utolsó csoportba sorolt esetekben felmerülő etikai dilemmákra is felhívja a figyelmet, melyek a későbbiekben részletesen is bemutatásra kerülnek.

Ezen kritériumrendszer mentén az ESMO jelenleg mindösszesen négy onkológiai entitás (NSCLC, cholangiocarcinoma, prostata- és ovariumdaganatok) esetében javasolja a multigén NGS rutinszerű elvégzését, melyet további öt kórkép (jól és közepesen differenciált neuroendokrin tumorok, cervixcarcinoma, nyálmirigy-, pajzsmirigy- és vulvadaganatok) esetében a TMB meghatározása miatt tart indokoltnak. (2. táblázat) [2] Az ESMO az NTRK fúziók NGS-alapú vizsgálatát, melyek a TMB-hez hasonlóan tumoragnosztikus terápia (TRK inhibitor entrectinib és larotrectinib) indikációját képezik, alacsony incidenciájuk miatt csak azokban az esetekben ajánlja, ahol a multigén NGS a további genetikai eltérések vizsgálata miatt elengedhetetlen. A szigorú, konzervatív megközelítésnek köszönhetően az ajánlásban leírt szűk indikációs körben az NGS az elérhető legnagyobb klinikai haszonnal bír, hiszen ezekben az entitásokban az ESCAT I eltérések mellett off-label és tumoragnosztikus terápiás indikációt jelentő mutációk azonosítása várható.

Az ESMO által képviselt visszafogott hozzáállással szemben több szervezet és klinikai vizsgálat szélesebb körű alkalmazást javasol, így például a National Comprehensive Cancer Network (NCCN) legfrissebb ajánlásaiban az ESMO ajánlásban szereplő kórképek mellett az uterus sarcoma, endometriumcarcinoma, csonttumorok és CUP esetében is javasolja a

multigénese tesztelést, döntően a TMB célzott szekvenálással történő meghatározásának céljából.[29-31]

Logikusnak felvetésnek tűnik, hogy a genetikai háttér széleskörű feltérképezésével nagyobb valószínűséggel azonosíthatók olyan potenciális gyógyszer-célpontok, melyek gátlása sikeres lehet, ezért az Amerikai Klinikai Onkológiai Társaság (ASCO: American Society of Clinical Oncology) 2017-es közleménye és több, azóta megjelent tanulmány ezt az elvet követve szövettani típustól függetlenül ajánlja a multigénese NGS elvégzését azokban az esetekben, melyekben előzetesen kimerítették a standard terápiás lehetőségeket.[32-34] A gyakori onkológiai kórképek (például NSCLC) mellett hasonló megközelítés alkalmazható a ritka tumorok (epeúti daganatok, sarcoma, mesothelioma, CUP) molekuláris vizsgálata során is, melyekben a kis betegszám miatt a terápia refrakter/recidíváló esetek másodvonalbeli kezelésében nincs elfogadott konszenzus és amelyek közül néhány kórkép már az ESMO ajánlásban is vizsgálandó entitásként szerepel.[2, 33]

Az ESMO ajánlásnál megengedőbb nemzetközi irányelvek és a klinikusok oldaláról tapasztalható megnövekedett igény hatására napjainkban az NGS minden eddiginél szélesebb körben történő alkalmazása figyelhető meg, és bár a vizsgálatból profitáló betegek aránya jelenleg még elmarad a várttól, az elmúlt években ezen téren is jelentős előrelépések történtek. A célzott terápiás gyógyszerek számának emelkedésével 2006 óta a molekuláris profilozással azonosított, közvetlen terápiás célpontként vagy annak prediktív biomarkereként szolgáló genetikai eltérést hordozó betegek aránya az összes vizsgált eset 0,4%-áról 12 év alatt, 2018-ra 8-9%-ra emelkedett, a közlemény írásának időpontjában pedig már a 30%-ot is meghaladja.[5, 35-38] Mindezek ellenére rendkívül fontos kiemelni, hogy az elméletileg célozható genetikai eltérések hordozása nem minden esetben jelent reálisan alkalmazható célzott terápiás indikációt, valamint elérhető és finanszírozott terápiás lehetőséget.

A multigénese panelekkel végzett molekuláris profilozás által vezérelt, off-label terápiaválasztás hatékonyságát számos közlemény, valamint több lezárt (SHIVA, I-PREDICT, MOSCATO) és jelenleg is folyó (TAPUR, NCI-MATCH, WINTHER, DRUP) klinikai tanulmány is vizsgálta.[39-46] A jellemzően nagy betegszámú, „basket” és precíziós onkológiai vizsgálatok, melyekbe a betegek tumortípustól függetlenül, a genetikai eltérések figyelembevételével kerülnek beválasztásra, változó, de összességében ígéretes eredményekről számoltak be (teljes válaszadási arány: 10-30%, összességében azonban szerény túlélési előny), melyek

alapján az alacsonyabb evidenciaszintű mutációk és az ESMO ajánlásban rutinszerűen nem vizsgálendő tumortípusok esetében is megfontolandó a multigénese panelek alkalmazása. [28, 33, 34, 47] Fontos kiemelni ugyanakkor, hogy az ilyen helyzetben indikált NGS vizsgálatok elvégzése csak megfelelő gyógyszerhozzáférési program elérhetősége esetén racionális és etikus.

Az NGS vizsgálatok költséghatékonysága

Az ESMO az ajánlás megfogalmazásakor a közvetlen terápiás relevancia mellett az NGS alkalmazásának további aspektusait is meghatározta, melyek közül hangsúlyos szerepet kap a vizsgálat egészségügyi ellátórendszerre gyakorolt hatása. Bár a nagy áteresztőképességű NGS vizsgálatok, így a multigénese panelekkel végzett szekvenálás költsége is nagyságrendekkel csökkent a módszer megjelenése óta, ezen eljárások jelenleg még drágábbak a hagyományos, szekvenciálisan végzett monogénese tesztelésnél, melyhez az NGS eredmények kiértékeléséhez szükséges bioinformatikai háttér biztosítása is hozzájárul.[48-50] Az NGS és az eredmények alapján alkalmazott célzott/tumoragnosztikus terápiás szerek költségeit szem előtt tartva az ESMO az alacsonyabb evidenciaszintű mutációk vizsgálatát nem tartja indokoltnak a mindennapi onkológiai betegellátás során, mérsékelve ezzel az onkológia egészségügyi ellátórendszerre jelentő terhet. A guideline alapján a multigénese NGS panelek alkalmazása a klinikai kutatóközpontokban javasolt, ahol a célozható eltérést hordozó betegek számára a finanszírozás mellett az eredmények pontos interpretációja, az új, potenciálisan alkalmazható gyógyszerek és a klinikai tanulmányokban való részvétel is biztosítható.[2]

Mindezek ellenére az akadémiai/egyetemi centrumokban végzett fejlesztéseknek és az egyedi NGS panelek megjelenésének köszönhetően az ASCO és több klinikai tanulmány is hangsúlyozza, hogy a multigénese panelek észszerű alkalmazásával olyan mértékben optimalizálható a vizsgálat költsége, amely végsősoron a szekvenciálisan végzett monogénese tesztelésnél olcsóbbá teheti az NGS használatát.[32, 34, 51] Bár a téma jelentőségéhez mérten viszonylag kis számú tanulmány vizsgálta eddig az NGS klinikai alkalmazásának pontos költségeit, eredményeik alapján a módszer költséghatékonysága már napjainkban is megkérdőjelezhetetlen azokban az onkológiai kórképekben, melyekben a vizsgálendő célrégiók (célozható eltérések és rezisztenciamutációk) nagy száma miatt több eltérő monogénese teszt együttes vizsgálatára van szükség.[33, 38, 52-54]

A paradigmaváltást, amely feltehetőleg a szekvenciális monogén vizsgálatokról a multigén NGS panelekre való áttéréshez vezet majd a közeljövőben, legjobban az NSCLC modern molekuláris diagnosztikájának fejlődése mutatja be. Az NSCLC genetikai hátterének feltérképezése során ajánlott nagy számú vizsgálandó biomarker együttes analízise szekvenciális monogén teszteléssel rendkívül idő-, minta- és költségigényes, így az NGS (20-50 gént tartalmazó panelek) a nagyszámú vizsgálat egyértelműen költséghatékonyabb alternatívájaként jelenleg már egyre szélesebb körben válik az NSCLC mindennapi diagnosztikájának alapvető eszközévé. (3. táblázat) (Mindemellett a közeljövőben a TMB várhatóan ebben az entitásban is nagyobb szerephez jut majd, így ezen prediktív biomarker vizsgálata szükségessé teheti az átfogó, minimum 300 gént felölelő multigén panelek alkalmazását is.) A nagyszámú ESCAT I-II szintű eltérés miatt az ESMO ajánlás alapján is jelenleg már indokolt a multigén panelek alkalmazása az NSCLC molekuláris diagnosztikai algoritmusában. A folyamat, melynek során a kórképben az egyes eltérések monogén vizsgálatát felváltotta a multigén molekuláris profilozás, szép példája a precíziós medicina térnyerésének és egyúttal előre vetítheti az NGS központi szerepét más onkológiai kórképek vizsgálatában is.[2, 32, 34]

Korábbi eredmények alapján a multigén panel alapú genetikai profilozás a hagyományos molekuláris és citogenetikai módszerekkel vizsgált „negatív” NSCLC esetek több mint felében azonosított célozható eltérést, amely szám az újonnan leírt prediktív biomarkerek és célzott/tumoragnosztikus terápiás szerek megjelenésével azóta feltehetőleg tovább emelkedett, alátámasztva ezzel az NGS klinikai hasznosságát.[55]

Nagy előrelépést jelenthet a multigén szekvenálás azokban a kórképekben, ahol a sok különálló vizsgálat elvégzéséhez relatíve kevés mennyiségű minta elérhető (például vékonytű aspirációs biopszia esetén), hiszen ezen entitásokban az eltérések szimultán vizsgálata során a költségek mellett a mintaigény jelentősen nagyobb lehet, mint a multigén panelszekvenálások során. Mindemellett azonban a minta megfelelő minőségére és ideálisan magas tumorsejtarányára már a vizsgálat tervezésekor érdemes figyelmet fordítani.[32] Megjegyezzük, hogy bár technológiailag a multigén NGS vizsgálatok ma már likvid biopsziás mintákból is elvégezhetőek, a mindennapi diagnosztikai gyakorlatban továbbra is a szövetminták genetikai profilozása ajánlott elsősorban.

Az NGS által jelentett anyagi teher a megfelelő vizsgálati modalitás megválasztása mellett a klinikailag indokolt esetek azonosításával tovább csökkenthető. Bármilyen

molekuláris és citogenetikai eljárás alkalmazása azokban az esetekben szükségszerű, ahol a vizsgálatok eredményei közvetlenül befolyásolják az onkológiai betegellátást. Mindezek figyelembevételével a diagnóziskor korai stádiumban lévő, definitív terápiában részesülő, valamint a gyorsan progrediáló, rossz teljesítménystátuszú betegeknél a multigénes NGS csekély klinikai haszonnal bír, így alkalmazása nem indokolt.[33] (2. ábra) Ennek megítélése a klinikusok és a patológusok együttes feladata, amiben nagy segítséget nyújthatnak a multidiszciplináris jellegű oncoteam megbeszélések.

Az NGS alkalmazásának etikai aspektusai

Az NGS egyre szélesebb körű elterjedésével alkalmazásának etikai szempontjai is egyre inkább előtérbe kerültek. A felmerülő kérdésekre reagálva az ESMO az ajánlásában röviden ismerteti az NGS alkalmazásával kapcsolatos etikai szempontokat és dilemmákat, melyek elsősorban a személyre szabott, egyéni megítélés alapján (döntően a klasszikus vizsgálati modalitások kimerítését követően és/vagy a standard terápiák hiányában) végzett multigénes szekvenálások során kerülhetnek előtérbe.[2]

A multigénes panelek alkalmazásával minden eddignél nagyobb számú gén és genomi lókuszt vizsgálható párhuzamosan, azonban ennek köszönhetően a tumortípustól függetlenül alkalmazható és kereskedelmi forgalomban elérhető NGS panelek és a CGP olyan régiókat is tartalmazhatnak, melyek eltéréseinek klinikai relevanciája jelenleg még nem ismert. A korábban bemutatott VUS mutációk és CNV-k, valamint a nem kódoló régió eltéréseinek interpretációja a vizsgálatot értékelő molekuláris patológust/diagnosztát és a klinikust egyaránt kihívások elé állíthatja, hiszen az eltérések jelentősége sokszor a rendelkezésre álló szakirodalmi adatok és predikciós szoftverek eredményei alapján sem határozható meg egyértelműen. További etikai kérdéseket vethet fel a vizsgálat során azonosított, a kórképtől feltehetőleg független („incidental finding”) csírarsejtes mutációk véleményezése, melyek relevanciájának megítélésében a hereditár megbetegedések fokozott kockázata miatt klinikai genetikai szaktanácsadás javasolt és melyek hordozása a beteg családtagjaira is kihathat.[56]

A bizonytalan jelentőségű eltérések mellett az onkológiai irányelvek a klinikai relevanciával rendelkező, célozható, de alacsony evidenciaszintű variánsok esetében is hiányosak, amely különösen az egyedi megítélés alapján végzett szekvenálás esetében szembetűnő. Bár a beteg és a klinikus együttes döntése alapján az ismertetett indikációkon kívül is végezhető multigénes NGS, az ajánlásban nem szereplő entitások vizsgálata során a

várható eltérések többségében alacsonyabb evidenciaszintű (Tier 2C-D, ESCAT III-IV) eltérések. Ezekben az esetekben a beteget előzetesen tájékoztatni kell arról, hogy a reális terápiás célpont azonosítására nagyon kicsi az esély, valamint arról, hogy az eltérés jelenlétében indikált gyógyszerek (rendszerint off-label) alkalmazása a korlátozott hozzáférés és költségességük miatt is nehézségekbe ütközhet.[2] A célzott/tumoragnosztikus szerek magas költsége a magasabb szintű (ESCAT II) variánsok esetében is komoly limitáló tényező lehet.[35, 48, 57]

További nehézséget jelenthet azon NGS eredmények klinikai felhasználása, melyekben az eltérés alapján indikált gyógyszer nem széleskörben elérhető és elterjedt. A preklinikai (és fázis I) tanulmányok, valamint a precíziós onkológiai esettanulmányok napjainkban egyre több esetben számolnak be ígéretes in vivo/in vitro eredményekről és alacsony evidenciaszintű mutáció alapján alkalmazott sikeres terápiákról, azonban ezek hatása nem összemérhető a nagy betegszámú klinikai vizsgálatokkal, melyekben a hatékonyság mellett a célzott terápiás szerek alkalmazása során esetlegesen fellépő toxicitás és mellékhatásprofil is meghatározásra kerül.[48] Mindezek figyelembe vételével az elméletileg célozható, de jelenleg alacsony evidenciaszinttel bíró eltérést (jellemzően ESCAT III-V) hordozó esetekben a betegellátásban résztvevő szakembereknek a szubjektív, vágyvezérelt gondolkodás („wishful thinking”) kerülésével kell megítélniük, hogy melyik az a reálisan elérhető terápia, amely a beteg számára a legnagyobb klinikai haszonnal bír. A preklinikai eredményekkel kapcsolatos etikai dilemmák feloldásában az onkológiai irányelvek részletes kidolgozása mellett várhatóan a szekvenálási eredmények kiértékelése során alkalmazott szoftverek fejlesztése is nagy előrelépést jelenthet majd, melyek a preklinikai eredmények és esettanulmányok megfelelő súlyozásával, valamint a Tier és ESCAT besorolások használatával segíthetik a reálisan elérhető terápiás opciók azonosítását.

Az NGS vizsgálat észszerű alkalmazása, az eredmények etikus interpretációja és a betegek megfelelő tájékoztatása a reálisan várható terápiás haszonról kiemelt jelentőséggel bír az ún. „direct to customer” szolgáltatások esetében is, ahol a kereskedelmi forgalomban elérhető, NGS alapú vizsgálatok eredményei közvetlenül a beteg tulajdonába kerülhetnek. Az NGS vizsgálatot és interpretációt végző magán és állami szolgáltatók megfelelő működése elsősorban a vizsgálatot végző molekuláris centrumok akkreditációjával és szigorú minőségbiztosítási rendszerek kialakításával garantálható.

Hazai gyakorlat az NGS klinikai alkalmazásában

Míg korábban a multigén NGS vizsgálatok Magyarországon jellemzően csak magánszolgáltatók által voltak elérhetőek a klinikai onkológiai centrumok és a betegek számára, az elmúlt évek fejlesztéseinek köszönhetően a hazai molekuláris patológiai laboratóriumok nagy része felkészült a multigén (jellemzően 30-50 génes) NGS vizsgálatok széleskörű alkalmazására az onkológiai kórképek vizsgálata során.

Az elmúlt néhány évben a Magyar Onkogenom Nemzeti Kiválósági és Versenyképességi Program (NVKP16), valamint további fejlesztési források bevonásával a Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika laboratóriumában egy korszerű, akár WES vizsgálatok kivitelezésére is alkalmas NGS laboratóriumi és bioinformatikai infrastruktúrát állítottunk a mindennapi betegellátás szolgálatába. A fejlesztés keretén belül a tavalyi évben kidolgoztunk egy CPG eljárást, amely a rendelkezésre álló legkorszerűbb szekvenálási technológiákon (NextSeq2000, Illumina), valamint bioinformatikai értékelő és klinikai interpretáló rendszereken (Clinical Insight, Qiagen; PierianDx) alapul. A TruSight Oncology 500 génpanel (ún. „TSO500 panel”) alkalmazásával egyidejűleg 523 gént érintő pontmutációk, CNV-k és génfúziók vizsgálhatók. A módszer alkalmas továbbá a TMB és MSI értékek meghatározására is. (3. ábra) A kiértékelés során alkalmazott szoftverek a nagyszámú variáns annotációja mellett a meghatározott genetikai eltérések alapján engedélyezett terápiák és valamennyi klinikai tanulmány azonosítására is képesek. A TSO500 vizsgálat jelenleg egyedi méltányossági finanszírozás keretében érhető el Intézetünkben.

A közlemény írásának időpontjában már közel 160 beteg, köztük 40 gyermek és 119 felnőtt esetében végeztük el sikerrel az átfogó genetikai vizsgálatot, a legkülönbözőbb tumortípusokban. Bár a szekvenálási eredmények részletes bemutatása meghaladja jelen közlemény kereteit, kiemelendő, hogy az eljárással számos beteg esetében detektáltunk magas evidenciaszintű, célozható genetikai eltéréseket. A monogén eljárással rutinszerűen vizsgált gének (*ALK* és *ROS1* fúziók, *EGFR*, *BRAF*, *BRCA1/2* mutációk és CNV-k) eltérései mellett több esetben azonosítottunk tumoragnosztikus terápiás indikációt jelentő *NTRK1-3* fúziókat és magas TMB értékeket (4. ábra), *RET* mutációkat, a homológ rekombinációs „repair” rendszer komponenseinek (*ATM*, *CHEK2*, *FANCL*, *PALB2*) eltéréseit, *PIK3CA* hotspot mutációkat, *IDH1/2* mutációkat, valamint *EZH2*, *SMARCB1* és *SMARCA4* mutációkat, melyek az új hiszton metiltranszferázokkal célozható eltérések.

Konklúzió

Az NGS robbanásszerű fejlődésével és az egyedi multigén panellek megjelenésével a metodikai nehézségek jelentős része elhárult, azonban az eredmények interpretációja és klinikai hasznosíthatósága sok esetben bizonytalan, a módszer gyors elterjedése a mindennapi diagnosztikában ugyanis megelőzte az eredmények alkalmazásával kapcsolatos onkológiai irányelvek kidolgozását. Ugyanakkor fontos felhívni a figyelmet arra a koncepcióváltásra, miszerint az NGS vizsgálatokra ma már egyértelműen nem kizárólag a monogén eljárások elvégzését követően alkalmazandó eszközként tekintünk, hanem számos esetben a magas evidenciaszintű prediktív biomarkerek mindennapi kimutatásának is legköltséghatékonyabb módját jelentheti az eljárás. A vizsgálandó biomarkerek, valamint újabb célzott terápiák számának emelkedésével és a vizsgálat ezzel párhuzamosan csökkenő költségeivel a multigén NGS eljárások további térnyerésére lehet számítani a közeljövőben.

Ábra leírások:

1. ábra: Az Amerikai Molekuláris Patológiai Társaság irányelvei a variánsok terápiás célozhatóságán alapuló interpretálásához.

FDA = Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügynökség (Food and Drug Administration)

2. ábra: Az NGS alkalmazásának indikációi az egyes betegcsoportokban Colomer és mtsai. alapján. Az NGS vizsgálat klinikailag indokolt lehet az előrehaladott NSCLC molekuláris diagnosztikája során a szekvenciálisan végzett monogén tesztelés ideális alternatívájaként, valamint egyes ritka tumorok esetében, melyekben a többedvonali terápia megválasztása során bírhat közvetlen klinikai relevanciával (világossárga mezők). A multigén panelek és a CGP *tumortípustól független* alkalmazása a célzott terápiára kiemelkedően jól reagáló betegek („exceptional responders”) [58, 59] azonosítása során, valamint a molekuláris profilozás által vezérelt, off-label terápiaválasztás hatékonyságát vizsgáló klinikai tanulmányokban is nagy előrelépést jelenthet a hagyományos citogenetikai és molekuláris vizsgálati módszerekhez képest (narancssárga mezők). Csekély klinikai haszonnal jár, ezért nem indokolt az NGS alkalmazása azokban az esetekben, ahol a diagnózis időpontjában korai stádiumú tumor definitív terápiája elérhető (kék mező), valamint a gyorsan progrediáló, rövid várható élettartamú betegek esetében (piros mezők).

Colomer et al. (2020) alapján módosítva

NGS = újgenerációs szekvenálás (next-generation sequencing); NSCLC: nem-kissejtes tüdőrák (non-small cell lung cancer)

3. ábra: A Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében kidolgozott komprehenzív genomikus profilozási eljárás személetes ismertetése.

CGP = komprehenzív genomikus profilozás

4. ábra: A Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében a TSO500 523 gént tartalmazó panellel végzett TMB mérések eredményei az egyes onkológiai kórképekben.

TMB = tumor mutációs terhelés; TSO500 = TruSight Oncology 500

1. táblázat: Az Európai Klinikai Onkológiai Társaság precíziós medicina munkacsoportja által a komprehenzív genomikus profilozással azonosítható eltérések osztályozására kidolgozott ESCAT klasszifikáció

ESCAT = ESMO Scale of Clinical Actionability for molecular Targets

2. táblázat: Az Európai Klinikai Onkológiai Társaság (ESMO) ajánlása a multigénes NGS alkalmazása során az egyes onkológiai kórképekben. Az ajánlásban nem szereplő entitások esetében az ESMO csak a kutatást végző akadémiai/egyetemi centrumokban tartja indokoltnak a multigénes panelek alkalmazását.

CUP = ismeretlen kiindulású daganat; ESCAT = ESMO Scale of Clinical Actionability for molecular Targets; ESMO = Európai Klinikai Onkológiai Társaság; NGS = újgenerációs szekvenálás; TMB = tumor mutációs terhelés

3. táblázat: Célozható eltérések és a kapcsolódó célzott terápiás szerek ESCAT besorolása nem-kissejtes tüdőrákban. A szürke háttérrel jelölt géneket érintő eltérések vizsgálata hagyományosan szekvenciális monogénes teszteléssel zajlott, azonban az entitásban az egyidejűleg nagyobb számú vizsgálható célpontnak és költséghatékonyságuknak köszönhetően jelenleg már a multigénes panelek alkalmazása indokolt.

ESCAT = ESMO Scale of Clinical Actionability for molecular Targets

Referenciák:

- [1]. ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature*. 2020; 578: 82-93.
- [2]. Mosele F, Remon J, Mateo J, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2020; 31: 1491-1505.
- [3]. Goodwin S, McPherson JD, and McCombie WR Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016; 17: 333-351.
- [4]. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017; 19: 341-365.
- [5]. Chakravarty D and Solit DB Clinical cancer genomic profiling. *Nat Rev Genet*. 2021.
- [6]. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*. 2017; 9: 34.
- [7]. Campesato LF, Barroso-Sousa R, Jimenez L, et al. Comprehensive cancer-gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice. *Oncotarget*. 2015; 6: 34221-34227.
- [8]. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013; 499: 214-218.
- [9]. Yarchoan M, Hopkins A, and Jaffee EM Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med*. 2017; 377: 2500-2501.
- [10]. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol*. 2020; 21: 1353-1365.
- [11]. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol*. 2019; 30: 44-56.
- [12]. McGrail DJ, Pilie PG, Rashid NU, et al. High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Ann Oncol*. 2021; 32: 661-672.
- [13]. Heydt C, Rehker J, Pappesch R, et al. Analysis of tumor mutational burden: correlation of five large gene panels with whole exome sequencing. *Sci Rep*. 2020; 10: 11387.
- [14]. Merino DM, McShane LM, Fabrizio D, et al. Establishing guidelines to harmonize tumor mutational burden (TMB): in silico assessment of variation in TMB quantification across diagnostic platforms: phase I of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project. *J Immunother Cancer*. 2020; 8.
- [15]. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019; 25: 3753-3758.
- [16]. Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017; 357: 409-413.
- [17]. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol*. 2020; 38: 1-10.

- [18]. Sherry ST, Ward M, and Sirotkin K dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Res.* 1999; 9: 677-679.
- [19]. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46: D1062-D1067.
- [20]. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47: D941-D947.
- [21]. Ng PC and Henikoff S SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 3812-3814.
- [22]. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010; 7: 248-249.
- [23]. Haas BJ, Dobin A, Li B, et al. Accuracy assessment of fusion transcript detection via read-mapping and de novo fusion transcript assembly-based methods. *Genome Biol.* 2019; 20: 213.
- [24]. Bedics G and Sebestyén E [Basic concepts of diagnostic application of next-generation sequencing - a practical introduction to precision medicine]. *Orvoscépzés.* 2021; 46: 343-356.
- [25]. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017; 19: 4-23.
- [26]. Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol.* 2018; 29: 1895-1902.
- [27]. Éles K and Tóth E [The role of next-generation sequencing as a diagnostic tool in oncology – ESMO guidelines and practical issues]. *Orvoscépzés.* 2021; 46: 323-328.
- [28]. Petak I [The application of target-based tissue-agnostic therapy in the treatment of lung cancer]. *Magy Onkol.* 2020; 64: 206-215.
- [29]. *National Comprehensive Cancer Network. Uterine Neoplasms (Version 2.2021).* May 19, 2021]; Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/uterine.pdf.
- [30]. *National Comprehensive Cancer Network. Bone Cancer (Version 1.2021).* May 19, 2021]; Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/bone.pdf.
- [31]. *National Comprehensive Cancer Network. Occult Primary (Cancer of Unknown Primary [CUP]) (Version 2.2021).* May 19, 2021]; Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/occult.pdf.
- [32]. Schwartzberg L, Kim ES, Liu D, et al. Precision Oncology: Who, How, What, When, and When Not? *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2017; 37: 160-169.
- [33]. Colomer R, Mondejar R, Romero-Laorden N, et al. When should we order a next generation sequencing test in a patient with cancer? *EClinicalMedicine.* 2020; 25: 100487.
- [34]. McKenzie AJ, H HD, Jones SF, et al. Should next-generation sequencing tests be performed on all cancer patients? *Expert Rev Mol Diagn.* 2019; 19: 89-93.
- [35]. Remon J and Dienstmann R Precision oncology: separating the wheat from the chaff. *ESMO Open.* 2018; 3: e000446.

- [36]. Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med.* 2017; 23: 703-713.
- [37]. Marquart J, Chen EY, and Prasad V Estimation of the Percentage of US Patients With Cancer Who Benefit From Genome-Driven Oncology. *JAMA Oncol.* 2018; 4: 1093-1098.
- [38]. Tan O, Shrestha R, Cunich M, et al. Application of next-generation sequencing to improve cancer management: A review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness. *Clin Genet.* 2018; 93: 533-544.
- [39]. Le Tourneau C, Belin L, Paoletti X, et al. Precision medicine: lessons learned from the SHIVA trial - Authors' reply. *Lancet Oncol.* 2015; 16: e581-582.
- [40]. Carter P, Alifrangis C, Cereser B, et al. Does molecular profiling of tumors using the Caris molecular intelligence platform improve outcomes for cancer patients? *Oncotarget.* 2018; 9: 9456-9467.
- [41]. Sicklick JK, Kato S, Okamura R, et al. Molecular profiling of cancer patients enables personalized combination therapy: the I-PREDICT study. *Nat Med.* 2019; 25: 744-750.
- [42]. Massard C, Michiels S, Ferte C, et al. High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. *Cancer Discov.* 2017; 7: 586-595.
- [43]. Flaherty KT, Gray RJ, Chen AP, et al. Molecular Landscape and Actionable Alterations in a Genomically Guided Cancer Clinical Trial: National Cancer Institute Molecular Analysis for Therapy Choice (NCI-MATCH). *J Clin Oncol.* 2020; 38: 3883-3894.
- [44]. Rodon J, Soria JC, Berger R, et al. Genomic and transcriptomic profiling expands precision cancer medicine: the WINTHER trial. *Nat Med.* 2019; 25: 751-758.
- [45]. van der Velden DL, Hoes LR, van der Wijngaart H, et al. The Drug Rediscovery protocol facilitates the expanded use of existing anticancer drugs. *Nature.* 2019; 574: 127-131.
- [46]. Tsimberidou AM, Iskander NG, Hong DS, et al. Personalized medicine in a phase I clinical trials program: the MD Anderson Cancer Center initiative. *Clin Cancer Res.* 2012; 18: 6373-6383.
- [47]. Priestley P, Baber J, Lolkema MP, et al. Pan-cancer whole-genome analyses of metastatic solid tumours. *Nature.* 2019; 575: 210-216.
- [48]. Tannock IF and Hickman JA Limits to Personalized Cancer Medicine. *N Engl J Med.* 2016; 375: 1289-1294.
- [49]. Sboner A, Mu XJ, Greenbaum D, et al. The real cost of sequencing: higher than you think! *Genome Biol.* 2011; 12: 125.
- [50]. Weymann D, Pataky R, and Reiger DA Economic Evaluations of Next-Generation Precision Oncology: A Critical Review. *JCO Precision Oncology.* 2018; Published online.
- [51]. Veenstra DL, Mandelblatt J, Neumann P, et al. Health Economics Tools and Precision Medicine: Opportunities and Challenges. *Forum Health Econ Policy.* 2020; 23.
- [52]. Steuten L, Goulart B, Meropol NJ, et al. Cost Effectiveness of Multigene Panel Sequencing for Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO Clin Cancer Inform.* 2019; 3: 1-10.
- [53]. Legras A, Barritault M, Tallet A, et al. Validity of Targeted Next-Generation Sequencing in Routine Care for Identifying Clinically Relevant Molecular Profiles in Non-Small-Cell Lung Cancer: Results of a 2-Year Experience on 1343 Samples. *J Mol Diagn.* 2018; 20: 550-564.
- [54]. Pennel NA, Mutebi A, Zhou Z, et al. Economic Impact of Next-Generation Sequencing Versus Single-Gene Testing to Detect Genomic Alterations in Metastatic Non-Small-

- Cell Lung Cancer Using a Decision Analytic Model. JCO Precision Oncology. 2019; Published online.
- [55]. Drilon A, Wang L, Arcila ME, et al. Broad, Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Identifies Actionable Genomic Alterations in Lung Adenocarcinomas Otherwise Negative for Such Alterations by Other Genomic Testing Approaches. Clin Cancer Res. 2015; 21: 3631-3639.
- [56]. Catenacci DV, Amico AL, Nielsen SM, et al. Tumor genome analysis includes germline genome: are we ready for surprises? Int J Cancer. 2015; 136: 1559-1567.
- [57]. Prasad V, De Jesus K, and Mailankody S The high price of anticancer drugs: origins, implications, barriers, solutions. Nat Rev Clin Oncol. 2017; 14: 381-390.
- [58]. Nishikawa G, Luo J, and Prasad V A comprehensive review of exceptional responders to anticancer drugs in the biomedical literature. Eur J Cancer. 2018; 101: 143-151.
- [59]. Wheeler DA, Takebe N, Hinoue T, et al. Molecular Features of Cancers Exhibiting Exceptional Responses to Treatment. Cancer Cell. 2021; 39: 38-53 e37.