

Komplexní genová analýza a vyšetřování klíčových řídicích mutací v pneumoonkologii

Pavel Dundr

Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze



Prediktivní testování v ČR

- 11 laboratoří
 - univerzitní nemocnice (7)
 - privátní laboratoře (4)
- Ne každá laboratoř vyšetřuje celé spektrum prediktorů
 - BRCA (5 laboratoří)
 - EGFR (10 laboratoří)
 - ALK (10 laboratoří)
 - ROS1 (10 laboratoří)

Bioptická laboratoř, Plzeň (HER2, RAS, EGFR, ALK, BRAF, BRCA1/2)

Fingerlandův ústav patologie, Hradec Králové (HER2, RAS, EGFR, ALK, BRAF, BRCA1/2)

Referenční laboratoř LF UP, Olomouc (HER2, RAS, EGFR, ALK, BRAF)

Patologicko-anatomické odd., MOÚ Brno (HER2, RAS, EGFR, ALK, BRAF, BRCA1/2)

Ústav patol. a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha (HER2, RAS, EGFR, ALK, BRAF, BRCA1/2*)

Ústav patologie, 1. LF UK a VFN, Praha (HER2, RAS, EGFR, ALK, BRAF, BRCA1/2)

Odd. patologie, Thomayerova nemocnice, Praha (RAS, EGFR, ALK, BRAF)

AeskuLab Patologie (HER2)

FN Brno (HER2, RAS, EGFR, ALK, BRAF)

Laboratoře Agel, Nový Jičín (HER2, RAS, ALK, EGFR, BRAF, BRCA1/2)

CGB Ostrava (HER2, RAS, ALK, EGFR, BRAF)

Současné doporučení

ASCO/CAP/IASCL/AMP guidelines (2018)

VOLUME 36 · NUMBER 9 · MARCH 20, 2018

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ASCO SPECIAL ARTICLE

Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/ International Association for the Study of Lung Cancer/ Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update

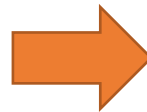
Gregory P. Kalemkerian, Navneet Narula, Erin B. Kennedy, William A. Biermann, Jessica Donington, Natasha B. Leigh, Madelyn Lew, James Pantelas, Suresh S. Ramalingam, Martin Reck, Anjali Saqi, Michael Simoff, Navneet Singh, and Baskaran Sundaram

SPECIAL ARTICLE

Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors

Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology

Neal I. Lindeman, MD,^{a,*} Philip T. Cagle, MD,^d Dara L. Aisner, MD, PhD,^e Maria E. Arcila, MD,^f Mary Beth Beasley, MD,^h Eric H. Bernicker, MD,^c Carol Colasacco, MLIS, SCT(ASCP),^l Sanja Dacic, MD, PhD,^j Fred R. Hirsch, MD, PhD,^k Keith Kerr, MB, ChB,^l David J. Kwiatkowski, MD, PhD,^b Marc Ladanyi, MD,^g Jan A. Nowak, MD, PhD,^m Lynette Sholl, MD,ⁿ Robyn Temple-Smolkin, PhD,ⁿ Benjamin Solomon, MBBS, PhD,^o Lesley H. Souter, PhD,^p Erik Thunnissen, MD, PhD,^q Ming S. Tsao, MD,^r Christina B. Ventura, MPH, MT(ASCP),ⁱ Murry W. Wynes, PhD,^s Yasushi Yatabe, MD, PhD^t



**Adenoarcinom (či jeho komponenta)
Neskvamózní, NSCLC
Jakýkoliv NSCLC s klinickými rysy susp. z driver mutace**

EGFR, ALK, ROS1, BRAF

Větší panely (či negativita EGFR, ALK, ROS1, BRAF): RET, HER2, KRAS, MET

Současná situace v ČR

■ EGFR

- bioptické vzorky – reflexní testování
- resekáty – na vyžádání

■ ALK

- reflexní testování

■ PD-L1

- reflexní testování v době diagnózy
- na vyžádání kdykoliv (chystané frekvenční omezení 4 x ročně)

■ ROS1

- reflexní testování (od 12/2019)

■ Liquid biopsy – možná (je úhrada) pokud:

- není možné testování ze tkáně
- resistance na léčbu EGFR TKI (T790M)
- ctDNA (ne CTC!)
- 2018 - provedeno 171 testů

■ Liquid biopsy – není možná (není úhrada)

- CTC
- časný relaps
- monitorování odpovědi na léčbu
- minimální reziduální choroba

Není úhrada pro BRAF, KRAS, MET, RET, HER2 testování (!)

Současná situace v ČR – úhrada testování

- ALK IHC (1525 CZK / 56 €)
- ALK FISH (8955 CZK / 344 €)

- ROS1 IHC (491 CZK / 19 €)
- ROS1 FISH (8955 CZK / 344 €)

- PD-L1 IHC (1993 CZK / 77 €)

- Úhrada prediktivního testování
 - pro hospitalizované pacienty jako součást DRG
 - u ambulantních pacientů paušální úhrada spolu s dalšími ambulantními procedurami
- Probíhá diskuse s plátcí o vyjmutí z DRG / paušálů

- **Molekulární testování jednoho genu (EGFR)**
 - úhrada není vázaná na metodu, ale na výsledek
 - 5288 CZK (203 €)
- **NGS**
 - 24848 CZK (955 €)
 - Pouze až bude 5 nebo více molekulárních markerů
 - v současné době nelze vykazovat pro prediktivní testování
 - od října 2019 lze ve vybraných centrech (8 center) použít u solidních nádorů pro diagnostické účely v indikaci patologem či onkologem (MDT)

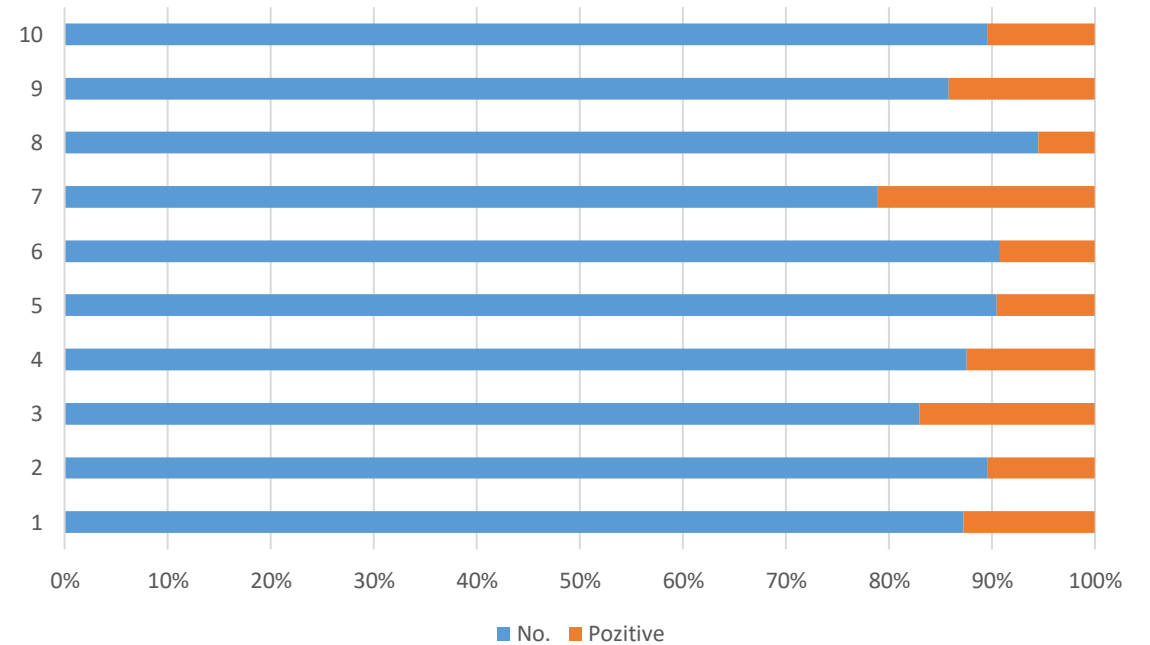
Současné mutace EGFR a ALK

- Přesná data chybí
- Největší soubor: reanalýza 421 EGFR+ NSCLC
 - 10 ALK+ (2.4 %)
 - 3 ROS1+ (0.7 %)
- Každý pacient u definovaných typů NSCLC při bioptickém vyšetření malého vzorku současné vyšetření:
 - EGFR
 - ALK
 - PD-L1
 - ROS1

Mutace EGFR a aberace ALK nejsou vzájemně se vylučující!

ČR – výsledky testování EGFR

Year	Total No.	Positive (No.)	Positive (%)	Insufficient
2014	1712	178	10,40%	117
2015	1714	172	10,04%	93
2016	1872	220	11,75%	52
2017	1950	260	13,33%	66
2018	1839	236	12,83%	66
Summary	9087	1066	11,73%	394 (4,1%)



Biopsy samples (2018)					Liquid biopsy (2018)		
No.	Positive	%	Insuffic.	Total	No.	Positive	%
137	20	14,60%	3	140	8	2	25,00%
242	28	11,57%	4	246	11	6	54,55%
204	42	20,59%	17	221	49	16	32,65%
183	26	14,21%	13	196	19	3	15,79%
114	12	10,53%	2	116	19	8	42,11%
335	34	10,15%	2	337	35	12	34,29%
82	22	26,83%	6	88	4	0	0,00%
292	17	5,82%	9	301	9	4	44,44%
121	20	16,53%	2	123	7	6	85,71%
129	15	11,63%	8	137	10	5	50,00%
1839	236	12,83%	66	1905	171	62	36,26%

Výsledky testování - PD-L1

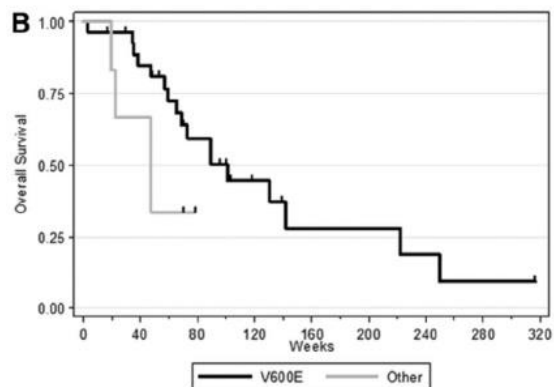
	Study/project	No. of patients	Antibody	<1% (%)	1-49% (%)	≥ 50% (%)
Herbst RS	KEYNOTE-010	2222	22C3	33,6	37,9	28,5
Garon EB	KEYNOTE-001	824	22C3	39,2	37,6	23,2
Mok TSK	KEYNOTE-042	3019	22C3	34,5	35	30,5
Gandhi L	KEYNOTE-189	387	22C3	32,8	33,1	34,1
Paz-Ares L	KEYNOTE-407	271	22C3	35	38	27
Ready N	CheckMate 568	252	28-8	45,2	27,8	27
Hellmann MD	CeckMate 227	1739	28-8	31,6	35,1	33,3
Kerr KM	ETOP study	2008	28-8	56,6	26,8	16,6
Humphries MP		813	22C3, SP263	48	23	29
Hong L (ASCO2019)		1398	22C3	41,6	37,5	20,1
Rizivi L (ASCO2019)		1586	E1L3N	66,7	17,9	15,4
Skov BG		791	22C3	37	32,7	30,3
Dietel M	EXPRESS study	2368	22C3	48	30	22
Ye L	Western Australia	241	22C3	27	41	32
Průměr		17919		41,2	32,4	26,4
Naše pracoviště	2018-19	264	22C3	43,2	28,4	28,4
ČR - souhrn	1-6/2019*	1075	22C3, 28-8	50,6	27,4	22

*Souhrnná data z 9/10 laboratoří testujících PD-L1

Nové geny (1)

BRAF

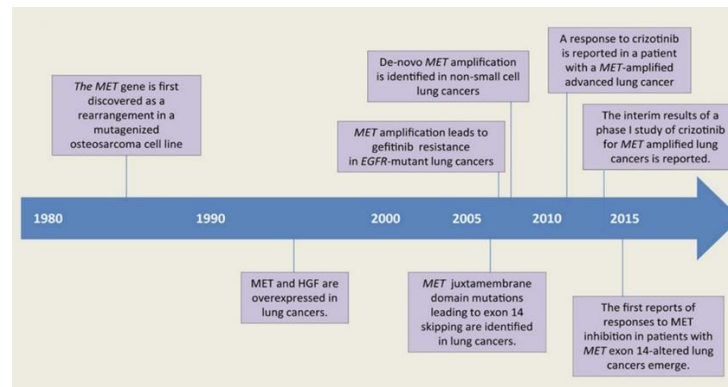
- Podle ASCO guideline (2018) by mělo být testování provedeno u všech pokročilých adenokarcinomů
- Somatické mutace ve 2-4% NSCLC (10% adenoca dle TCGA)
- Nejběžnější V600E (asi 1–2% adenokarcinomů)
- Častější u kuřáků
- Dabrafenib / trametinib



Gautschi O, et al. J Thorac Oncol. 2015;10(10):1451-7
Halliday PR, et al. Curr Oncol Rep. 2019;21(3):21.

MET

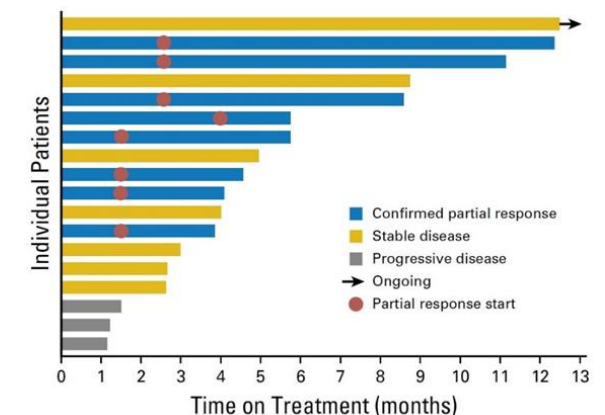
- Aberace u 13% adenokarcinomů (TCGA)
 - amplifikace (1-5% NSCLC)
 - „skipping“ mutace exonu 14 (3% NSCLC)
- řídící mutace
- Mechanismus rezistence na léčbu EGFR TKI
- studie Vize (tepotinib)



Dylon A, et al. J Thorac Oncol. 2017;12(1):15-26.
Pike P, et al. ASCO 2019, IL, Chicago

HER2

- Mutace (2-4 % adenokarcinomů)
- Nejčastěji inzerce v exonu 20
- druhý nejčastější mechanismus rezistence na léčbu EGFR TKI)
- Amplifikace 2-20%
- Overexprese 6-30%
- řídící mutace



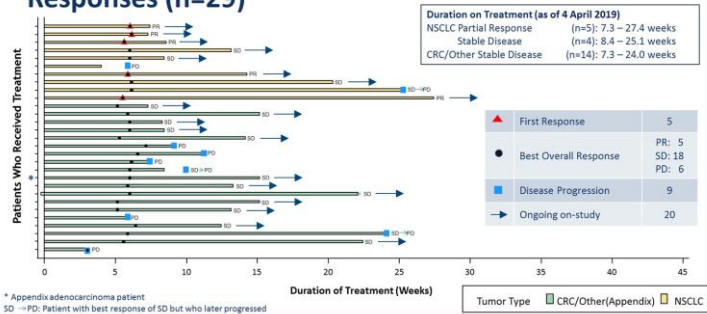
Li BT, et al. J Clin Oncol. 2018; 36(24):2532-2537.

Nové geny (2)

KRAS

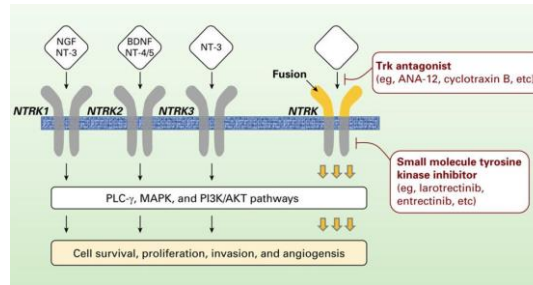
- Somatické mutace KRAS
 - asi 25-30% adenokarcinomů
 - asi 3% SCC *
- Mutace KRAS G12C v přibližně 13% NSCLC**
- AMG 510 (klinické studie fáze I)

Duration of Treatment by Tumor Types and Responses (n=29)



NTRK

- Fúze of NTRK (1, 2, 3)
 - entrectinib
 - larotrectinib
- < 1 % NSCLC

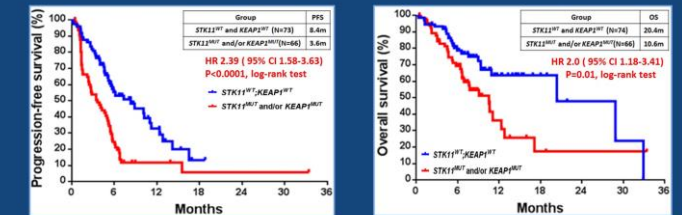


	MGH	MSKCC	Total	Frequency, % (95% CI)
NSCLC screened	1804	3068	4872	
<i>NTRK1</i> fusion	2	4	6	0.12 (0.05–0.27)
<i>NTRK2</i> fusion	0	1	1	0.02 (0.005–0.11)
<i>NTRK3</i> fusion	2	2	4	0.08 (0.02–0.21)
All <i>NTRK</i> fusions	4	7	11	0.23 (0.11–0.40)

STK11

- 17% adenokarcinomů (TCGA)
- Asi 12% pacientů s mutací KRAS
- Prognosticky nepříznivé
- Predikuje špatnou odpověď na imunoterapii (spolu s mutacemi KEAP1)

Integration of *STK11/LKB1* and *KEAP1* onco-genotypes identifies a subgroup of non-squamous NSCLC with poor clinical outcomes with PCP chemo-immunotherapy



Nové geny (3)

PIK3CA

- Mutace u přibližně 7% adenokarcinomů (TCGA)
- Pravděpodobně prognosticky nepříznivý faktor
- Probíhají klinické zkoušky



Home Participating Centers Clinical Trials Publications Donate

PIK3CA

Identifier: NCT01297491 - ClinicalTrials.gov Study Information

This clinical trial is designed for patients whose tumors have a genetic change, or mutation, in the PIK3CA gene, which inappropriately allows cells to continue to grow and divide in an uncontrolled fashion.

Title
Safety and Efficacy of BKM120 in Patients With Metastatic Non-small Cell Lung Cancer

Eligibility
Patients with non-small cell lung cancer who have been previously treated with one or more therapies, and have a PIK3CA mutation in their tumor, are eligible for this study.

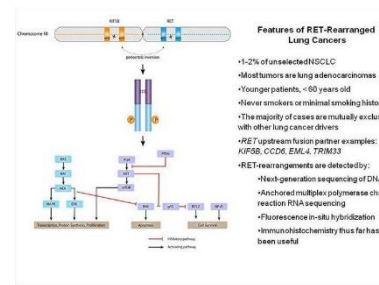
Treatment
The trial is in 2 parts. In the 1st part of the trial, all study participants will receive BKM120. In the 2nd part of the study, participants will be randomly assigned by a computer into one of two groups. One group will receive BKM120, the other will receive chemotherapy. There will be twice as many people in the BKM120 group as in the chemotherapy group. If you receive chemotherapy, you will receive docetaxel if you have squamous cancer, and either pemetrexed (Alimta®) or docetaxel if you have adenocarcinoma or large cell cancer.

About BKM120
BKM120 is an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K). There are multiple PI3 kinases involved in telling cells when to grow and divide. BKM120 prevents PI3K proteins from using the cell's energy stores for fuel. This causes a "block" to the activity of PI3K proteins, which are inappropriately "turned on" when certain genes, like PIK3CA, are mutated.

Zhao J, et al. Oncol Lett. 2019;17(3):3233-3240.

RET

- Alterace u 1-2 % of NSCLC
 - přestavby
 - mutace
- LIBRETTO-001
- LOXO-292



Cancer Discov. 2019 Sep 25. doi: 10.1158/2159-8290.CD-NB2019-112. [Epub ahead of print]

First RET Inhibitor on Path to FDA Approval.

[No authors listed]

Abstract

Investigators in the LIBRETTO-001 phase I/II trial presented new data on the experimental RET inhibitor selipercatinib at the 2019 World Conference on Lung Cancer. The agent produced robust responses in patients with *RET*-altered non-small cell lung cancer who had already received multiple therapies, raising hopes that it will soon receive FDA approval.

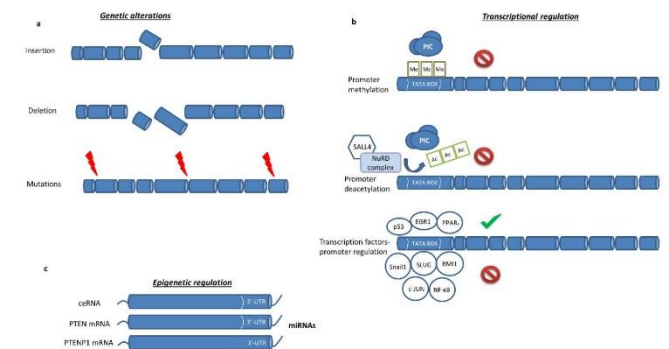
©2019 American Association for Cancer Research.

PMID: 31554640 DOI: 10.1158/2159-8290.CD-NB2019-112

Sabari JK, et al. Oncoscience. 2017;4(3-4):23-24.

PTEN

- Mutace v přibližně 15% SCC a 3% adenokarcinomů
- Ztráta exprese PTEN (> 40% NSCLC)
- Epigenetické modifikace
- Odolnost proti TKI a imunoterapii
- Potenciální terapeutický význam - reaktivace PTEN



Gkoutakos A, et al. Cancers (Basel). 2019;11(8).

NGS – naše pracoviště

AKT1	CDK4	FGFR2	IDH1	MITF	PIK3R1
AKT3	CDKN2A	FH	IDH2	MLH1	PMS2
ARID1A	CTNNB1	FOXL2	JAK1	MLH3	POLE
ARID2	CYP19A1	GNA11	JAK2	MRE11A	POLQ
ATM	DDR2	GNAQ	KDR	MSH2	POT1
B2M	EGFR	GNAS	KIT	MSH6	PPM1D
BAP1	ELK1	GRB2	KRAS	mTOR	PPP6C
BARD1	ERBB2	H3F3A	MAP2K1	MYC	PTEN
BRAF	ERBB3	H3F3B	MAP2K2	NBN	RB1
BRCA1	ERBB4	H3F3C	MAP2K4	NF1	SF3B1
BRCA2	ERCC3	HDAC2	MAPK1	NOTCH1	SMAD4
BRIP1	ESR1	HIST1H3B	MAPK3	NRAS	SMARCA4
CCND2	ESR2	HNF1A	MDM2	PALB2	SMARCB1
CCND3	FAM175A	HNF1B	MDM4	PDGFRA	TP53
CDH1	FBXW7	HRAS	MET	PIK3CA	

AKT1	BRCA2	ESR1	MAP2K1	POLE
ARID1A	DDR2	FOXL2	MET	PTEN
BRAF	EGFR	HRAS	NRAS	SMAD4
BRCA1	ERBB2	KRAS	PIK3CA	TP53

- **Používané knihovny („in-house“):**
- „Výzkumná“ knihovna 1
 - 89 genů (**hotspoty**)
 - 257 kbp
 - 12 vzorků v běhu (MiSeq)
 - pokrytí ~300x
- „Diagnostická“ knihovna
 - 20 genů (**hotspoty**)
 - 56 kbp
 - 12-16 vzorků v běhu (MiSeq)
 - pokrytí 500-1000x

NGS – naše pracoviště

ABL1	EMSY	EML4	FGFR2	CHEK1	MAP3K1	NPM1	RAD50	SUFU
ABL2	CCDC6	EPHA3	FGFR3	CHEK2	MAPK1	NRAS	RAD51	SYK
AKT1	CCND1	EPHA5	FGFR4	IDH1	MAPK3	NTRK1	RAF1	TAF1
AKT2	CCND2	EPHA7	FH	IDH2	MCL1	NTRK2	RARA	TBX3
AKT3	CCND3	EPHB1	FOXL2	IGF1R	MDM2	NTRK3	RB1	TERT p.
ALK	CCNE1	ERBB2	FOXP1	IGF2	MDM4	PAK3	RET	TET2
APC	PDL1	ERBB3	GATA1	IKZF1	MED12	PALB2	RICTOR	TGFBR2
AR	CD79A	ERBB4	GATA2	IRF2	MEN1	PAX5	RIT1	TOP1
ARAF	CD79B	ERCC3	GATA3	IRF4	MET	PDGFRA	ROS1	TOP2A
ARID1A	CDH1	ERG	GATA4	IRS2	MITF	PDGFRB	RUNX1	TP53
ARID1B	CDK12	ESR1	GATA6	JAK1	MLH1	PDK1	RUNX1T1	TPM3
ARID2	CDK4	ESR2	GNA11	JAK2	MLH3	PIK3C2B	SDHA	TSC1
ATM	CDK6	EZH2	GNA13	JAK3	MPL	PIK3CA	SDHB	TSC2
ATR	CDK8	FAM175A	GNAQ	JUN	MRE11A	PIK3CB	SDHC	U2AF1
ATRX	CDKN1A	FAM46C	GNAS	KAT6A	MSH2	PIK3CG	SDHD	UGT1A1
AURKA	CDKN1B	FANCA	GRB2	KDM5A	MSH6	PIK3R1	SF3B1	VEGFA
AURKB	CDKN2A	FANCC	GRIN2A	KDM5C	mTOR	PIK3R2	SMAD2	VHL
B2M	CDKN2B	FANCD2	GRM3	KDM6A	MUTYH	PMS2	SMAD3	WISP3
BAP1	CDKN2C	FANCE	GSK3B	KDR	MYC	POLD1	SMAD4	WT1
BARD1	CLTC	FANCF	H3F3A	KEAP1	MYCL1	POLE	SMARCA4	XPO1
BCL2	CREBBP	FANCG	H3F3B	KIF5B	MYCN	POLQ	SMARCB1	ZBTB2
BCL2L1	CTNNA1	FANCL	H3F3C	KIT	NACC2	POT1	SMO	ZNF217
BCL2L2	CTNNB1	FBXW7	HDAC2	KMT2A	NBN	PPM1D	SOX10	ZNF703
BCL6	CYP19A1	FGF10	HGF	KMT2C	NCOA4	PPP2R1A	SOX2	
BLM	DAXX	FGF14	HIST1H3B	KMT2D	NF1	PPP6C	SOX9	
BRAF	DDR2	FGF19	HMGA2	KRAS	NF2	PRKAR1A	SPEN	
BRCA1	DICER1	FGF23	HNF1A	LYN	NFKBIA	PRKCI	SPTA1	
BRCA2	DNMT3A	FGF3	HNF1B	LZTR1	NKX2-1	PRKDC	SRC	
BRD4	DPYD	FGF4	HRAS	MAP2K1	NOTCH1	PTEN	STAT3	
BRIP1	EGFR	FGF6	CHD2	MAP2K2	NOTCH2	PTCH1	STAT4	
BTK	ELK1	FGFR1	CHD4	MAP2K4	NOTCH3	QKI	STK11	

- **Používané knihovny („in-house“):**
- „Výzkumná“ knihovna 2
 - 271 genů
 - 1016 kbp
 - 12 vzorků v běhu (NextSeq Mid-Output kit; 2x75bp)
 - pokrytí ~300x
- Mutační load (TMB)
- MSI
- Přestavby genů (z DNA)

ABL1	CCND3	EML4	FOXO1	INPP4A	MSH2	PHOX2B	RFC4	TEK
ABL2	CCNE1	EP300	FOXP1	INPP4B	MSH3	PIK3C2B	RHBDP2	TELO2
ABRAXAS2	CD22	EPCAM	FRS2	INSR	MSH5	PIK3C2G	RHEB	TERF2
ACVR1	CD274 (PD-L1)	EPHA3	FUBP1	IRF2	MSH6	PIK3C3	RHOA	TERT
ACVR1B	CD276	EPHA5	FYN	IRF4	MSR1	PIK3CA	RICTOR	TERT p.
ACVR2A	CD70	EPHA7	GABRA6	IRS1	MST1	PIK3CB	RIT1	TET1
ADGRA2	CD74	EPHB1	GADD45A	IRS2	MST1R	PIK3CD	RNF146	TET2
AIP	CD79A	EPHB4	GATA1	JAK1	MTAP	PIK3CG	RNF168	TFE3
AJUBA	CD79B	EPHB6	GATA2	JAK2	MTDH	PIK3R1	RNF43	TFRC
AKT1	CD73	EPHX1	GATA3	JAK3	mTOR	PIK3R2	RNF8	TGFBF1
AKT2	CDH1	EPPK1	GATA4	JAM2	MUS81	PIK3R3	ROS1	TGFBF2
AKT3	CDK12	ERBB2	GATA6	JAM3	MUTYH	PIM1	RPA1	TIPARP
ALK	CDK4	ERBB3	GEN1	JUN	MYB	PLA2G2A	RPL22	TJP1
ALOX12B	CDK6	ERBB4	GID4	KAT5	MYC	PLCG2	RPL5	TLR2
AMER1	CDK8	ERCC1	GLI1	KAT6A	MYCL	PLK2	RPS6KA4	TLR4
ANKRD11	CDKN1A	ERCC2	GNA11	KCNJ5	MYCN	PMAIP1	RPS6KB1	TMEM127
ANKRD26	CDKN1B	ERCC3	GNA13	KDM5A	MYD88	PMS1	RPS6KB2	TMPRSS2
APC	CDKN1C	ERCC4	GNAQ	KDM5C	MYO10	PMS2	RPTOR	TNFAIP3
APEX1	CDKN2A	ERCC5	GNA5	KDM6A	NAB2	PNRC1	RUNX1	TNFRSF14
AR	CDKN2B	ERCC6	GPC3	KDR	NACC2	POLB	RUNX1T1	TOP1
ARAF	CDKN2C	ERG	GPS2	KEAP1	NAT1	POLD1	RYBP	TOP2A
ARFRP1	CEBPA	ERF1	GRB2	KEL	NAV3	POLE	SDHA	TOPBP1
ARHGAP35	CENPA	ESR1	GRB7	KIF5B	NBN	POLQ	SDHAF2	TP53
ARID1A	CEP57	ESR2	GREM1	KIT	NCAM1	POT1	SDHB	TP53BP1
ARID1B	CFTF	ETS1	GRIN2A	KLF4	NCOA3	PPARA	SDHC	TP63
ARID2	CIC	ETV1	GRM3	KLHL6	NCOA4	PPARD	SDHD	TPM3
ARID5B	CLSPN	ETV4	GSK3B	KMT2A	NCOR1	PPARG	SETBP1	TRAF2
ASXL1	CLTC	ETV5	H3F3A	KMT2B	NEGR1	PPM1D	SETD2	TRAF7
ASXL2	COP1	ETV6	H3F3B	KMT2C	NELFB	PPP2R1A	SETX	TRRAP
ATM	CREBBP	EWSR1	H3F3C	KMT2D	NF1	PPP2R2A	SF3B1	TSC1
ATMIN	CRIPAK	EXO1	HDAC1	KRAS	PPP6C	NF2	SGK1	TSC2
ATR	CRKL	EXT1	HDAC2	LAMP1	NFE2L2	PRDM1	SH2B3	TSHR
ATRIP	CRLF2	EXT2	HELOQ	LATS1	NFE2L3	PREX2	SH2D1A	TSHZ2
ATRX	CSF1R	EYA2	HGF	LATS2	NFKBIA	PRF1	SHPRH	TSHZ3
AURKA	CSF3R	EZH2	HIST1H1C	LIFR	NFKBIZ	PRKAR1A	SHQ1	TSZH1
AURKB	CSNK1A1	F1R1	HIST1H2BD	LIG1	NHEJ1	PRKCI	SIN3A	TWIST1
AXIN1	CSNK1D	FAAP24	HIST1H3A	LIG3	NKX2-1	PRKDC	SLIT2	TWIST2
AXIN2	CSNK1E	FAM175A	HIST1H3B	LIG4	NKX3-1	PRKN	SLX4	TYRO3
AXL	CTCF	FAM46C	HIST1H3C	LMO1	NOTCH1	PRSS8	SMAD2	U2AF1
B2M	CTLA4	FAN1	HIST1H3D	LRI1	NOTCH2	PRX	SMAD3	U2AF1 p.
B4GALT3	CTNNA1	FANCA	HIST1H3E	LRP1B	NOTCH3	PTEN	SMAD4	UBE2A
BABAM1	CTNNA1	FANCB	HIST1H3F	LRKK2	NOTCH4	PTCH1	SMARCA4	UBE2B
BABAM2	CUL3	FANCC	HIST1H3G	LTK	NPM1	PTPN11	SMARCB1	UBE2I
BAP1	CUL4A	FANCD2	HIST1H3H	LYN	NRAS	PTPRD	SMARCD1	UBE2V2
BARD1	CUX1	FANCE	HIST1H3I	LZTR1	NRG1	PTPRO	SMARCE1	UBE4B
BB3	CWF19L2	FANCF	HIST1H3J	MAF	NSD1	PTPRS	SMC1A	UGT1A1
BCL10	CXCR4	FANCG	HIST2H3A	MAGI2	NSD2	PTPRT	SMC2	UIMC1
BCL2	CYLD	FANCI	HIST2H3C	MALT1	NSD3	PTTG2	SMO	USP9X
BCL2L1	CYP17A1	FANCL	HIST2H3D	MAP2K1	NTSC2	QKI	SNAI1	VEGFA
BCL2L11	CYP19A1	FANCM	HIST3H3	MAP2K2	NTRK1	RAB35	SNAI2	VEZF1
BCL2L2	DAXX	FAS	HLA-A	MAP2K4	NTRK2	RAC1	SNAI3	VHL
BCL6	DCLRE1C	FAT1	HLA-B	MAP3K1	NTRK3	RAD1	SNCAP	VTCN1
BCOR	DCUN1D1	FBXW7	HLA-C	MAP3K13	NUP93	RAD17	SOC1	WISP3
BCORL1	DDDB2	FGF1	HMG2A	MAP3K14	NUTM1	RAD18	SOX10	WRN
BCR	DDR1	FGF10	HNF1A	MAP3K4	OGG1	RAD21	SOX17	WT1
BIRC3	DDR2	FGF12	HNF1B	MAPK1	P2RY8	RAD23B	SOX2	XIAP
BIRC5	DDX41	FGF14	HNRNPK	MAPK3	PAK1	RADS0	SOX9	XPA
BIRC5 p.	DHFR	FGF19	HOXB13	MAPK8IP1	PAK3	RADS1	SPEN	XPC
BLM	DHX15	FGF2	HRAS	MAX	PAK7	RADS1AP1	SPOP	XPO1
BMPR1A	DICER1	FGF23	HSD3B1	MCL1	PALB2	RADS1B	SPTA1	XRCC1
BRAF	DIS3	FGF3	HSP90AA1	MCPH1	PARD3	RADS1C	SRC	XRCC2
BRAP	DMC1	FGF4	HUS1	MDC1	PARP1	RADS1D	SRSF2	XRCC3
BRCA1	DNAJB1	FGF5	CHD2	MDM2	PARP2	RADS2	STAG1	XRCC4
BRCA2	DNAJC21	FGF6	CHD4	MDM4	PARP3	RADS4B	STAG2	XRCC5
BRCC3	DNMT1	FGF7	CHEK1	MECOM	PAX3	RADS4L	STAT3	XRCC6
BRD4	DNMT3A	FGF8	CHEK2	MED12	PAX5	RAD9A	STAT4	YAP1
BRIP1	DNMT3B	FGF9	ICOSLG	MEF2B	PAX7	RAF1	STAT5A	YES1
BTG1	DOT1L	FGFR1	ID3	MEN1	PAX8	RANBP2	STAT5B	ZBTB2
BTG2	DPYD	FGFR2	IDH1	MERTK	PBRM1	RARA	STK11	ZBTB7A
BTK	E2F3	FGFR3	IDH2	MET	PCBP1	RASA1	STK40	ZEB1
BUB1B	EED	FGFR4	IFNGR1	MGA	PCNA	RB1	SUFU	ZEB2
C11orf30	EGFL7	FH	IGF1	MGMT	PD-1	RBBP8	SUZ12	ZFXH3
CALR	EGFR	FLCN	IGF1R	MITF	PD-L2	RBM10	SYK	ZNF217
CARD11	EGR3	FLI1	IGF2	MKNN1	PDGFRA	RECQL	TAF1	ZNF350
CASP8	EIF1AX	FLT1	IKBKE	MLH1	PDGFRB	RECQL4	TAZ	ZNF365
CBFB	EIF4A2	FLT3	IKZF1	MLH3	PDK1	RECQL5	TBL1XR1	ZNF703
CBL	EIF4E	FLT4	IL10	MLLT3	PDPK1	REL	TBX3	ZRSR2
CCDC6	ELF3	FOXA1	IL7R	MMP8	PGR	RET	TCF3	
CCND1	ELK1	FOXA2	INH4	MPL	PHB	RFC1	TCF7L2	
CCND2	ELOC	FOXL2	INHBA	MRE11A	PHF6	RFC2	TCL1A	

NGS – naše pracoviště

- Používané knihovny („in-house“):
- „Výzkumná“ knihovna 3
 - 714 genů
 - 2,235 Mbp
 - 16 vzorků v běhu (NextSeq High- Output Kit; 2x75bp)
 - pokrytí ~500x
- Mutační load (TMB)
- MSI
- Přestavby genů (z DNA)

NGS – naše pracoviště (komerční panely)

■ FusionPlex Lung (RNA)

- 14 genů
- EGFR, ALK, BRAF, ROS1
- KRAS, MET, RET
- NTRK1, NTRK2, NTRK3
- FGFR1, FGFR2, FGFR3, NRG3

■ chybí HER2

FusionPlex Lung



ALK	BRAF	EGFR
FGFR1	FGFR2	FGFR3
KRAS	MET	NRG1
NTRK1	NTRK2	NTRK3
RET	ROS1	

● SNV/indel
● Fusion, splicing or exon-skipping

- Key fusion detection - excellent small panel for focused interrogation of oncogenic fusion targets
- Detect splice variants and relevant mutations - captures expressed EGFR vIII and MET exon 14 skipping events, as well as prominent mutations in ALK, BRAF, EGFR, KRAS, RET, and ROS1
- Sample versatility - wide sample type compatibility, including FFPE
- Streamlined, lyophilized workflow - minimize hands-on time and replication error

Specifications & Performance

Gene target	14
Number of GSP2s	163
Input requirement*	≥10ng
Recommended # of reads	500K
Unique molecular # on-target %	>97%
Hands-on time	2.5 hours
Total time	9 hours

*Input recommendations for FFPE samples vary depending on Archer Preseq® RNA QC score; 50ng input recommended in absence of PreSeq screening

For research use only. Not for use in diagnostic procedures

■ AVENIO expanded kit (DNA)

- 77 genů
- STK11, KEAP1, PIK3CA, PTEN
- chybí HER2, NTRK2, NTRK3

Specifications

Panel size	192 kb
Sample size	4 mL of plasma
cDNA input	10 – 50 ng

Assay targets

Gene	Seq Target	SNV	Indel	Fusion	CNV
ABL1	Selected Regions	*			
AKT1	Selected Regions	*			
AKT2	Selected Regions	*			
ALK	Selected Regions	*	*	*	
APC	Selected Regions	*			
AR	All Coding Regions	*			
ARAF	Selected Regions	*			
BRAF	Selected Regions	*	*		
BRCA1	All Coding Regions	*			
BRCA2	All Coding Regions	*			
CCND1	All Coding Regions	*			
CCND2	All Coding Regions	*			
CCND3	All Coding Regions	*			
CD274	All Coding Regions	*			
CDK4	All Coding Regions	*			
CDK6	Selected Regions	*			
CDKN2A	All Coding Regions	*			
CSF1R1	Selected Regions	*	*		
CTNNB1	Selected Regions	*	*		
DOR2	Selected Regions	*			
DPYD	Selected Regions	*			
EGFR	All Coding Regions	*	*	*	
ERBB2	All Coding Regions	*	*	*	
ESR1	All Coding Regions	*	*	*	
EZH2	Selected Regions	*			
FBW7	All Coding Regions	*			
FGFR1	Selected Regions	*			
FGFR2	Selected Regions	*	*		
FGFR3	Selected Regions	*	*	*	
FLT1	Selected Regions	*			
FLT3	Selected Regions	*			
FLT4	Selected Regions	*			
GATA3	Selected Regions	*			
GNAI1	Selected Regions	*			
GNAQ	Selected Regions	*			
GNAS	Selected Regions	*			
IDH1	Selected Regions	*			
IDH2	Selected Regions	*			
JAK2	Selected Regions	*			

Reactions per kit	16
Turnaround time	5 days from extraction to results

Gene	Seq Target	SNV	Indel	Fusion	CNV
JAK3	Selected Regions	*			
KDR	Selected Regions	*			
KEAP1	All Coding Regions	*			
KIT	Selected Regions	*	*		
KRAS	All Coding Regions	*			
MAP2K1	Selected Regions	*			
MAP2K2	Selected Regions	*			
MET	All Coding Regions	*	*	*	
MLH1	All Coding Regions	*			
MSH2	All Coding Regions	*			
MSH6	All Coding Regions	*			
MTOR	Selected Regions	*			
NF2	All Coding Regions	*			
NFE2L2	Selected Regions	*			
NRAS	Selected Regions	*	*	*	
NTRK1	Selected Regions	*			
PDCD1LG2	All Coding Regions	*			
PDGFRA	Selected Regions	*	*	*	
PDGFRB	Selected Regions	*	*	*	
PIK3CA	Selected Regions	*	*	*	
PIK3R1	Selected Regions	*	*	*	
PMS2	All Coding Regions	*	*	*	
PICH1	Selected Regions	*	*	*	
PTEN	All Coding Regions	*	*	*	
RAF1	Selected Regions	*	*	*	
RB1	All Coding Regions	*	*	*	
RET	Selected Regions	*	*	*	
RNF43	Selected Regions	*	*	*	
ROS1	Selected Regions	*	*	*	
SMAD4	All Coding Regions	*	*	*	
SMO	All Coding Regions	*	*	*	
STK11	All Coding Regions	*	*	*	
TBR3	All Coding Regions	*	*	*	
TERT	Selected Regions	*	*	*	
TERT Promoter	Selected Regions	*	*	*	
TSC1	Selected Regions	*	*	*	
TSC2	Selected Regions	*	*	*	
UGT1A1*	Selected Regions	*	*	*	
VHL	All Coding Regions	*	*	*	

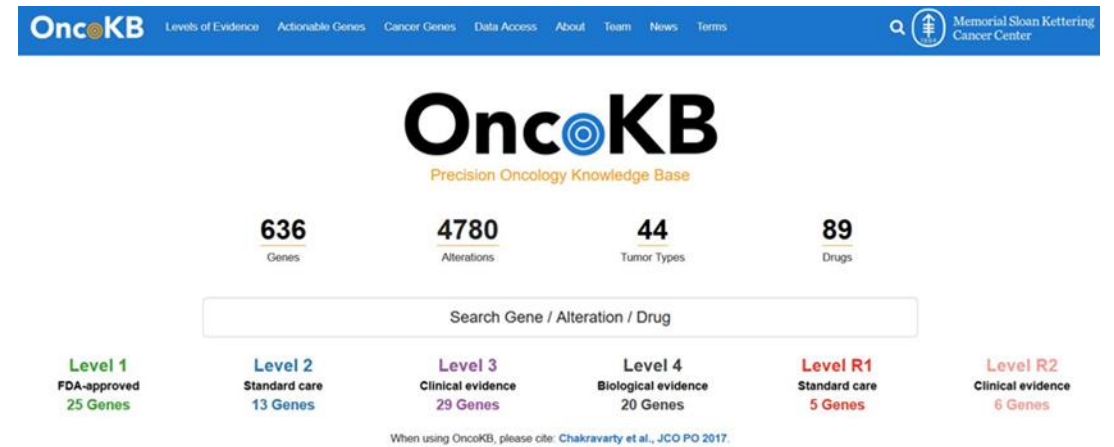
Implementace komplexního molekulárního profilování do klinické praxe (?)

- Molekulární „screening“ u pacientů s pokročilými nádory
- Vyhodnocení významu nalezených mutací
 - interpretace
 - praktický význam
- Snaha o klasifikování genetických alterací (LOE – levels of evidence)

- Nalezení terapeuticky ovlivnitelné aberace ne vždy splní očekávané (nedostatečná odpověď na léčbu)
- Nutný konsenzus odborných společností a návaznost testování na léčbu

Další potenciálně terapeuticky ovlivnitelné aberace

- Snaha o klasifikování genetických alterací (LOE – levels of evidence)
 - OncoKB <http://oncokb.org/>
 - <https://smart-cancer-navigator.github.io/home>
 - ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT)



ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT)

Třída I	dostupná léčba na základě klinických studií
IA	prospektivní, randomizované, survival endpoint
IB	prospektivní, jednoramenné, specifický nádorový typ, klinický benefit (ESMO MCBS1.1)
IC	prospektivní, vícečetné histologické typy, klinický benefit (ESMO MCBS1.1)
Třída II	dostupná léčba, avšak nejsou prospektivní data o klinickém benefitu
IIA	retrospektivní analýzy prospektivních studií
IIB	prospektivní studie, prokázaná odpověď (OR), bez jednoznačných dat na outcome
Třída III	dostupná léčba pro stejnou aberaci u jiného typu nádoru či aberace genu z třídy I
IIIA	jiný typ nádoru
IIIB	aberrace genu ve třídě I
Třída IV	preklinická data
IVA	preklinická data in vivo a in vitro modely
IVB	preklinická data in silico analýzy
Třída X	alterace u kterých klinická data svědčí pro neúčinnost léčby

- Klasifikace do 5 tříd
- Vyhodnocení klinického významu



Level 1 FDA-approved 8 Genes
Level 2 Standard care 0 Genes
Level 3 Clinical evidence 0 Genes
Level 4 Biological evidence 0 Genes
Level R1 Standard care 0 Genes
Level R2 Clinical evidence 0 Genes

Showing 24 biomarker-drug associations (8 genes, 2 tumor types, 1 level of evidence) [Associations](#) [Reset filters](#)

Level	Gene	Alterations	Tumor Type	Drugs
1	ALK	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Crizotinib
1	ALK	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Ceritinib
1	ALK	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Alectinib
1	ALK	Oncogenic Mutations	Non-Small Cell Lung Cancer	Lorlatinib
1	ALK	Oncogenic Mutations	Non-Small Cell Lung Cancer	Brigatinib
1	BRAF	V600E	Non-Small Cell Lung Cancer	Trametinib + Dabrafenib
1	EGFR	Exon 19 deletion, L858R	Non-Small Cell Lung Cancer	Gefitinib
1	EGFR	Exon 19 deletion, L858R	Non-Small Cell Lung Cancer	Afatinib
1	EGFR	Exon 19 deletion, L858R	Non-Small Cell Lung Cancer	Osimertinib
1	EGFR	Exon 19 deletion, L858R	Non-Small Cell Lung Cancer	Dacomitinib
1	EGFR	S768I	Non-Small Cell Lung Cancer	Afatinib
1	EGFR	G719	Non-Small Cell Lung Cancer	Afatinib
1	EGFR	L861Q	Non-Small Cell Lung Cancer	Afatinib
1	EGFR	T790M	Non-Small Cell Lung Cancer	Osimertinib
1	EGFR	Exon 19 deletion, L858R	Non-Small Cell Lung Cancer	Erlotinib
1	NTRK1	Fusions	All Solid Tumors	Larotrectinib
1	NTRK1	Fusions	All Solid Tumors	Entrectinib
1	NTRK2	Fusions	All Solid Tumors	Larotrectinib
1	NTRK2	Fusions	All Solid Tumors	Entrectinib
1	NTRK3	Fusions	All Solid Tumors	Larotrectinib
1	NTRK3	Fusions	All Solid Tumors	Entrectinib
1	Other Biomarkers	Microsatellite Instability-High	All Solid Tumors	Pembrolizumab
1	ROS1	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Crizotinib
1	ROS1	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Entrectinib

■ Level 1 (FDA approved)

- 8 genů

- 15 léků



Level 1 FDA-approved 0 Genes | **Level 2 Standard care 4 Genes** | Level 3 Clinical evidence 0 Genes | Level 4 Biological evidence 0 Genes | Level R1 Standard care 0 Genes | Level R2 Clinical evidence 0 Genes

4 actionable genes | Non-Small Cell Lung Cancer | 7 drugs

Showing 6 biomarker-drug associations (4 genes, 1 tumor type, 1 level of evidence)

Associations

Reset filters

Level	Gene	Alterations	Tumor Type	Drugs
2	EGFR	A763_Y764insFQEA	Non-Small Cell Lung Cancer	Erlotinib, Afatinib, Gefitinib
2	ERBB2	Oncogenic Mutations	Non-Small Cell Lung Cancer	Ado-Trastuzumab Emtansine
2	MET	Amplification	Non-Small Cell Lung Cancer	Crizotinib
2	MET	D1010mut, Exon 14 Deletion, Exon 14 splice mutation, Y1003mut	Non-Small Cell Lung Cancer	Crizotinib
2	RET	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Cabozantinib
2	RET	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Vandetanib

■ Level 2 (standard care)

- 4 geny
- 7 léků



Level 1 FDA-approved 0 Genes | Level 2 Standard care 0 Genes | **Level 3 Clinical evidence 7 Genes** | Level 4 Biological evidence 0 Genes | Level R1 Standard care 0 Genes | Level R2 Clinical evidence 0 Genes

7 actionable genes | Non-Small Cell Lung Cancer | 13 drugs

Showing 15 biomarker-drug associations (7 genes, 1 tumor type, 1 level of evidence) [Associations](#) [Reset filters](#)

Level	Gene	Alterations	Tumor Type	Drugs
3	ARAF	Oncogenic Mutations	Non-Small Cell Lung Cancer	Sorafenib
3	EGFR	E709_T710delinsD	Non-Small Cell Lung Cancer	Gefitinib, Afatinib, Erlotinib
3	EGFR	E709K	Non-Small Cell Lung Cancer	Afatinib, Gefitinib, Erlotinib
3	EGFR	L833V	Non-Small Cell Lung Cancer	Gefitinib, Afatinib, Erlotinib
3	EGFR	L861R	Non-Small Cell Lung Cancer	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib
3	EGFR	Kinase Domain Duplication	Non-Small Cell Lung Cancer	Afatinib, Erlotinib, Gefitinib
3	EGFR	Exon 20 insertion	Non-Small Cell Lung Cancer	Pozotinib
3	EGFR	Exon 19 insertion	Non-Small Cell Lung Cancer	Erlotinib, Gefitinib, Afatinib
3	ERBB2	Oncogenic Mutations	Non-Small Cell Lung Cancer	Neratinib
3	KRAS	G12C	Non-Small Cell Lung Cancer	AMG-510
3	MAP2K1	Oncogenic Mutations	Non-Small Cell Lung Cancer	Cobimetinib, Trametinib
3	MET	D1010mut, Exon 14 Deletion, Exon 14 splice mutation, Y1003mut	Non-Small Cell Lung Cancer	Capmatinib
3	MET	D1010mut, Exon 14 Deletion, Exon 14 splice mutation, Y1003mut	Non-Small Cell Lung Cancer	Cabozantinib
3	RET	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	LOXO-292
3	RET	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	BLU-667

Level 3 (clinical evidence)

- 7 genů
- 13 léků



Level 1 FDA-approved 0 Genes | Level 2 Standard care 0 Genes | Level 3 Clinical evidence 0 Genes | **Level 4 Biological evidence 13 Genes** | Level R1 Standard care 0 Genes | Level R2 Clinical evidence 0 Genes

13 actionable genes | Non-Small Cell Lung Cancer | 24 drugs

Showing 17 biomarker-drug associations (13 genes, 2 tumor types, 1 level of evidence)

Associations

Reset filters

Level	Gene	Alterations	Tumor Type	Drugs
4	ATM	Oncogenic Mutations	All Solid Tumors	Olaparib
4	BRAF	L597	All Solid Tumors	PLX8394
4	BRAF	K601	All Solid Tumors	PLX8394
4	BRAF	G464, G469A, G469R, G469V	All Solid Tumors	PLX8394
4	CDK12	Truncating Mutations	All Solid Tumors	Pembrolizumab, Cemiplimab, Nivolumab
4	CDKN2A	Oncogenic Mutations	All Solid Tumors	Palbociclib, Abemaciclib, Ribociclib
4	EGFR	D761Y	Non-Small Cell Lung Cancer	Osimertinib
4	EGFR	A750P	Non-Small Cell Lung Cancer	Gefitinib, Erlotinib, Afatinib
4	EGFR	L747P	Non-Small Cell Lung Cancer	Erlotinib, Gefitinib, Afatinib
4	FGFR1	Oncogenic Mutations	All Solid Tumors	BGJ398, Debio1347, AZD4547, Erdafitinib
4	FGFR2	Oncogenic Mutations	All Solid Tumors	AZD4547, BGJ398, Debio1347, Erdafitinib
4	FGFR3	Oncogenic Mutations	All Solid Tumors	Erdafitinib, Debio1347, BGJ398, AZD4547
4	KRAS	Oncogenic Mutations	All Solid Tumors	Trametinib, Binimetinib, Cobimetinib
4	MET	Fusions	All Solid Tumors	Crizotinib
4	MTOR	Oncogenic Mutations	All Solid Tumors	Temsirolimus, Everolimus
4	NF1	Oncogenic Mutations	All Solid Tumors	Cobimetinib, Trametinib
4	PTEN	Oncogenic Mutations	All Solid Tumors	GSK2636771, AZD8186

■ Level 4 (biological evidence)

- 13 genů
- 24 léků

Závěr

- Rozšířené molekulární testování u NSCLC je žádoucí a opodstatněné
- Nejlepší přístup - testování NGS
- Sporné body:
 - testování DNA vs. RNA
 - cena (komerční kity)
 - úhrady
 - dostatek tkáně pro testování



- Extenzivní testování (stovky genů):
 - klasifikace molekulárních aberací (LOE – levels of evidence)
 - klinický význam může být obtížně hodnotitelný
 - ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT)
- TMB
 - nadále nedořešené problémy (včetně cut-offs, velikosti panelů, nádorové heterogenity, bioinformatické algoritmy atd.)
 - v současné době se nejedná o prediktivní marker vhodný (možný) ke klinickému využití