



IV Ежегодный Конгресс Российского общества онкопатологов г. Москва, ул. Лесная, д. 15, отель «Холидей Инн Лесная» 19-20 апреля 2019 года

*Круглый стол – Оптимальные алгоритмы тестирования при раке легкого и роль NGS (секвенирование следующего поколения)*

## Алгоритм тестирования рака легкого. Быть или не быть NGS.

Филипенко М. Л.

Лаб. фармакогеномики, ИХБФМ СО РАН

ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ  
БИОЛОГИИ И  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ



**Плюсы NGS тестирования образцов ткани НМРЛ**

**Какие мишени (гены, участки генов или их мРНК) необходимо тестировать?**

**Немного о нашей локальной NGS панели для НМРЛ**

**Проблемные точки NGS тестирования в РФ**

## Плюсы NGS тестирования образцов ткани НМРЛ

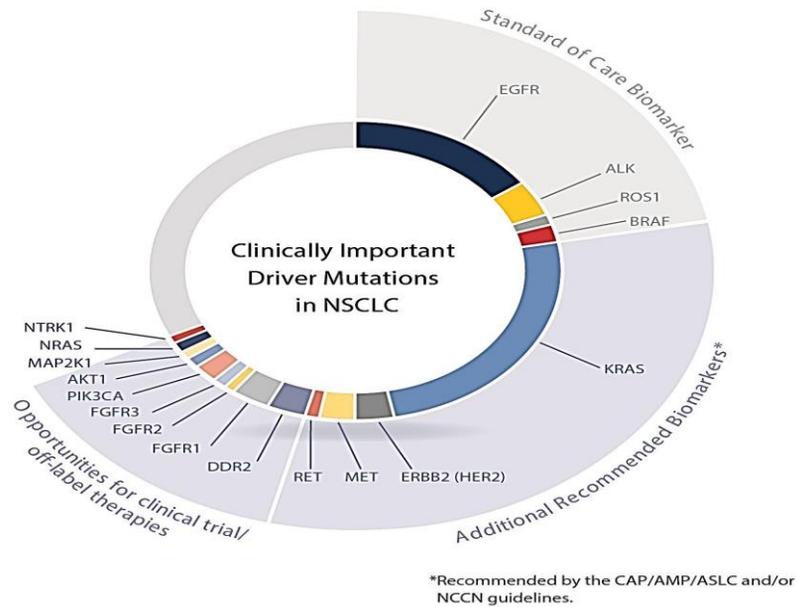
- ✓ Дает возможность оценить статус большей части необходимых маркеров одновременно на минимальном количестве материала.  
*Особенно актуально для рака легкого, при котором существенную часть случаев получения клеточного материала опухоли составляют **малые биопсии**.*
- ✓ Один методический подход для разных типов мутаций, в который относительно просто добавить дополнительные маркеры.
- ✓ При увеличении потока (количества образцов одновременно тестируемых) себестоимость анализа уменьшается.
- ✓ Позволяет выявлять не стандартные неожиданные мутации.

## Использование NGS анализа для колоректального рака

<b>CRC</b>		<b>135</b>
<b>typical</b>		55
KRAS	61 codon	6
KRAS	146 codon	4
NRAS	61 codon	4
<b>non typical</b>		<b>7</b>
KRAS	<b>G13C</b>	3
	63 codon	2
	59 codon	1
NRAS	59 codon	1

**NGS анализ увеличивает чувствительность выявления клинически значимых мутаций!**

## Какие мишени (гены, участки генов или их мРНК) необходимо тестировать?



## Молекулярные маркеры и таргетные препараты для лечения аденокарциномы немелкоклеточного рака легкого

### Мутации в гене EGFR

Гефитиниб  
Эрлотиниб  
Афатиниб  
Осимертиниб

### Перестройки гена ALK

Кризотиниб  
Алектиниб  
Церитиниб

### Перестройки генов NTRK

Ларотректиниб

### Мутация V600E в гене BRAF

Дабрафениб/Траметиниб

### Перестройки гена ROS1

Кризотиниб  
Алектиниб  
Церитиниб

### Экспрессия PD-L1

Пембролизумаб  
Ниволумаб  
Атезолизумаб

#### EMERGING BIOMARKERS TO IDENTIFY NOVEL THERAPIES FOR PATIENTS WITH METASTATIC NSCLC

Genetic Alteration (ie, Driver event)	Available Targeted Agents with Activity Against Driver Event in Lung Cancer
High-level <i>MET</i> amplification or <i>MET</i> exon 14 skipping mutation	Crizotinib <sup>1-5</sup>
<i>RET</i> rearrangements	Cabozantinib <sup>6,7</sup> Vandetanib <sup>8</sup>
<i>ERBB2</i> ( <i>HER2</i> ) mutations	Ado-trastuzumab emtansine <sup>9</sup>
Tumor mutational burden (TMB)*	Nivolumab + ipilimumab <sup>10</sup> Nivolumab <sup>11</sup>

\*TMB is an evolving biomarker that may be helpful in selecting patients for immunotherapy. There is no consensus on how to measure TMB.

[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/nscl.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf)

**МАЛЕНЬКИЕ ТАРГЕТНЫЕ ПАНЕЛИ**, выявляющие маркеры, имеющие однозначную клиническую интерпретацию.

**ЭКЗОМ** (или редуцированный онкологический экзом)  
Выявляет маркеры из клинических рекомендаций, позволяет оценить MSI, опухолевую нагрузку и выявить иммуно-активные нео-антигены.

**Индекс дифференциальной аффинности неопитопа - differential agretopicity index (DAI) (Ghorani et al., 2018), лучше предсказывает эффективность неоантигена и ответ на иммунотерапию**

## Немного о нашей локальной NGS панели для HMPЛ

### DNA-NGS панель для аденокарциномы легкого

<b>BRAF</b>	V600E
<b>EGFR</b>	G719C, G719S, G719A
	ex19del
	ex20ins (c.2290–c.2322)
	T790M
	C797S
	S768I
	L858R, L861

<b>KRAS</b>	12-13 codons
	59-63 codons
	117-146 codons
<b>MET</b>	ex14 – сайты сплайсинга
	S310F
<b>HER2</b>	V777L
	V842I
	D769Y/H
	P780_Y781insGSP и G778_S779insLPS
	R896C

<b>NRAS</b>	12-13 codons
	59-63 codons
	117-146 codons

<b>MET</b>	амплификация
<b>HER2</b>	
<b>CONTR</b>	

<b>ALK</b>	Мутации тирозинкиназного домена
------------	---------------------------------

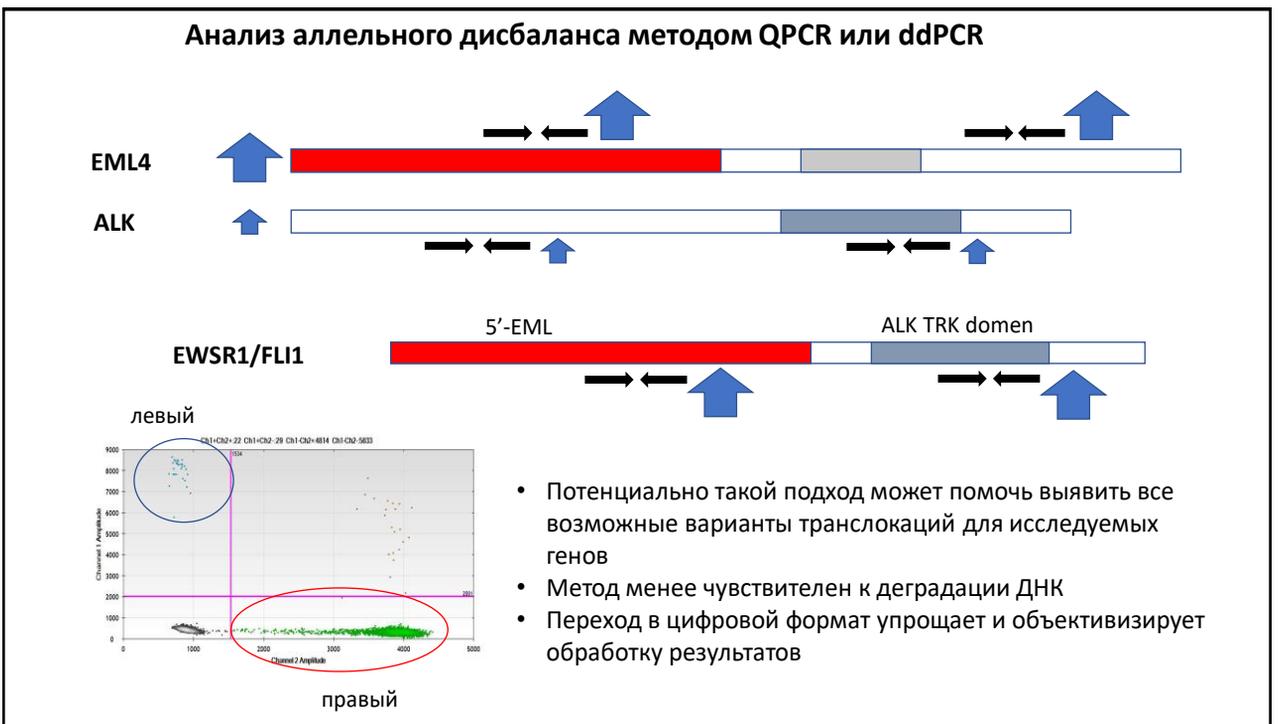
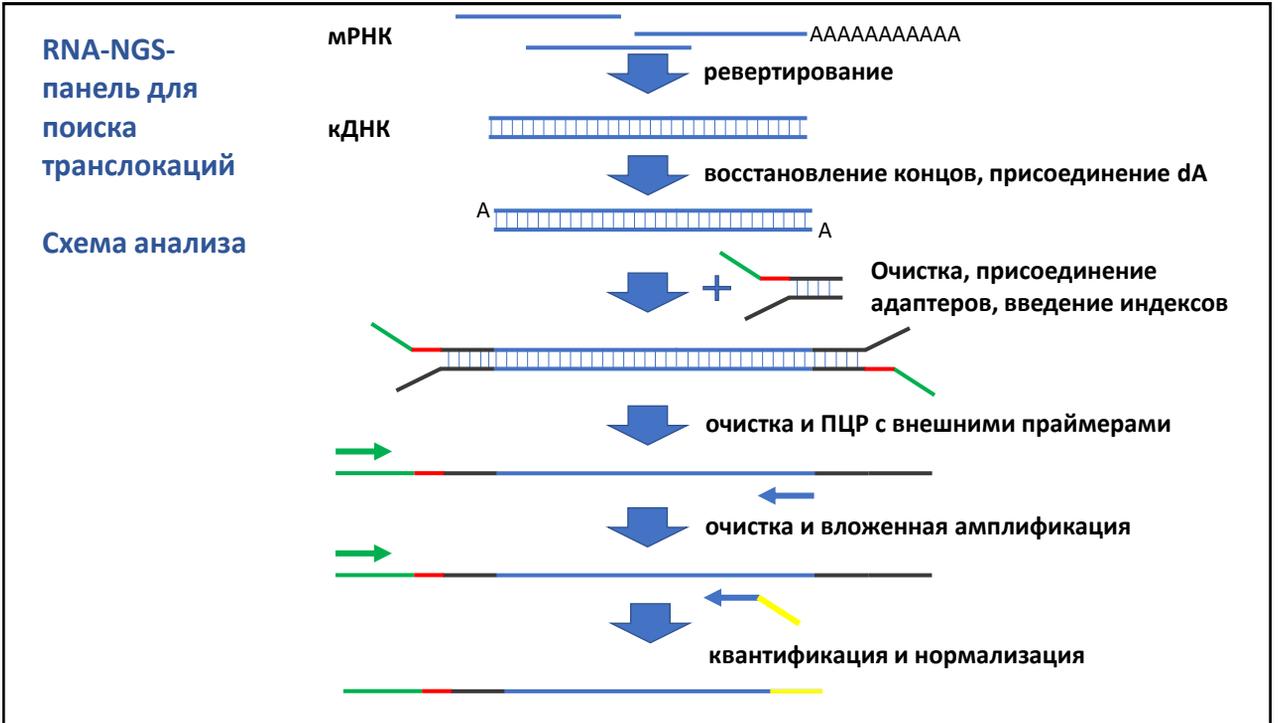
<b>PIK3CA</b>	1, 5, 9, 20 экзоны
---------------	--------------------

Суммарная длина читаемых областей ~4500 п.н.

## RNA-NGS панель для аденокарциномы легкого

<b>HPRT</b>	contr
<b>EPCAM</b>	contr
<b>GAPDH</b>	contr
<b>MET</b>	ex13-15
<b>RNA-I</b>	contr

<b>ALK</b>	fusion
<b>ROS1</b>	fusion
<b>RET</b>	fusion
<b>MET</b>	fusion
<b>NTRK1</b>	fusion
<b>NTRK2</b>	fusion
<b>NTRK3</b>	fusion
<b>NRG1</b>	fusion



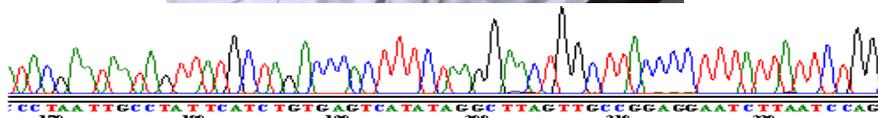
## Проблемные точки NGS тестирования в РФ

НЕ всегда удовлетворительное качество блоков для выделения, прежде всего, тотальной РНК.

Не всегда достаточная потоковость пациентов для достижения адекватной себестоимости анализа (по нашим оценкам все, что более 46 анализов в месяц позволяет избежать этой проблемы)

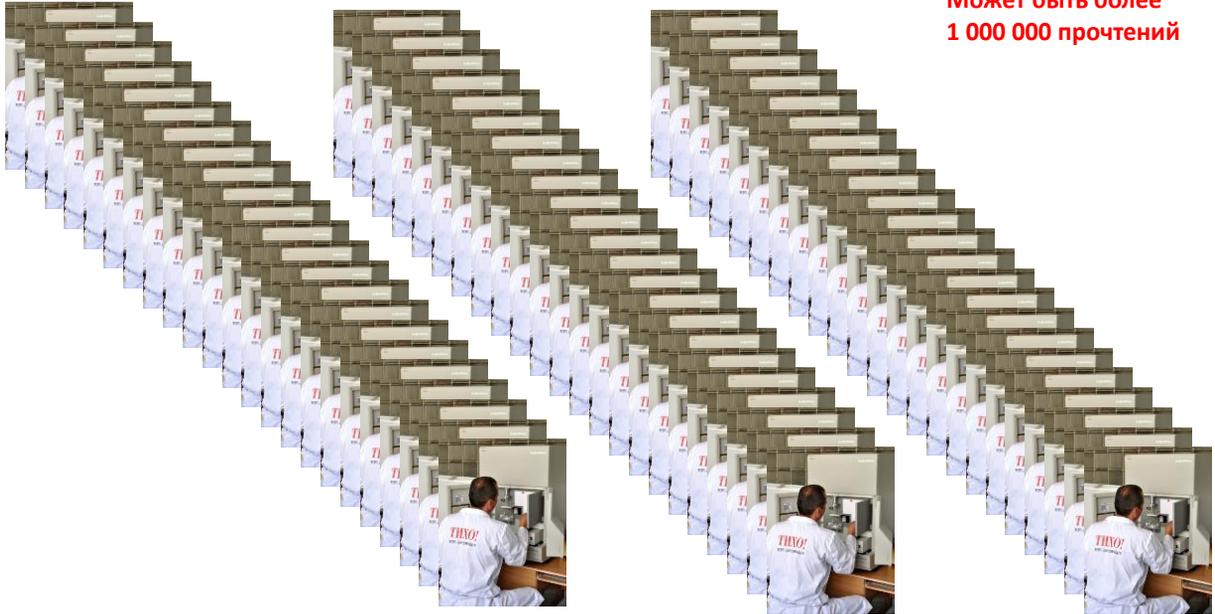
Биоинформационный анализ и его тонкая настройка и стандартизация

### Классическое секвенирование по Сенгеру – один запуск 1-96 фрагментов ДНК



## Next generation sequencing - NGS

Может быть более  
1 000 000 прочтений



Patient_ Num	Position	Ref	Alt	Qual	Gene	Transcript_ID	CDS_HG VS	Protein HGVS	Cov_ Ref	Cov_ Alt	Strand_Bias_p-value	Median_Qual
patient_18	7578212	G	A	2	TP53	NM_000546.5	c.637C>T	p.Arg213*	40	4	1	44
patient_19	7578212	G	A	77	TP53	NM_000546.5	c.637C>T	p.Arg213*	128	45	1	48
patient_20	7578212	G	A	3	TP53	NM_000546.5	c.637C>T	p.Arg213*	238	26	1	48
patient_22	7578212	G	A	100	TP53	NM_000546.5	c.637C>T	p.Arg213*	897	1018	1	48



**Протоколы биоинформационной обработки должны быть кастомизированы в зависимости от типов реагентов и типов образцов. Требуется постоянный контроль качества и серийный анализ «нормальных» образцов ДНК (РНК).**

## Важно!

Большинство протоколов для выявления вариаций пришли из фундаментальных исследований. Их цель - максимальная специфичность в ущерб чувствительности (проценту выявления реально существующих мутаций).

### Клиника решает обратную задачу!

Нам необходимо максимально выявить существующие мутации. Проверим после!

Это требует адаптации биоинформационных протоколов и их калибровке на реальных массивах данных (имеющих результаты референсного метода – секвенирования по Сенгеру и данных NGS анализа)!!!

<https://www.abmgood.com/Lung-Cancer-RNA-Panel-Sequencing-Service-IT30041.html>

### Lung Cancer RNA Panel Sequencing Service

#### Order Online

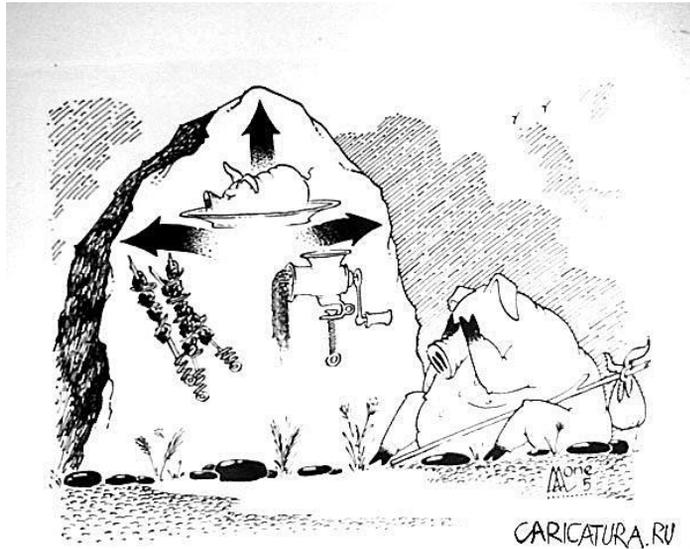
Cat.No.: IT30041  
 Quantity: 6 Samples\*\*\*  
 Price: **\$5,662.50**  
 Price/Sample: **\$943.50**  
 Qty.:  [Add to Cart](#)

#### Order by Contact

Email: [order@abmGood.com](mailto:order@abmGood.com)  
 Phone: 604-247-2416 (Local), 1-866-757-2414 (Toll free)  
 Fax: 604-247-2414  
 Payment:   or Purchase Order Number  
 More info: [Additional Information Regarding Orders](#)

Please visit the [Targeted RNA Cancer Panel Service](#) homepage for more information about Targeted RNA-Seq.

<b>AKT1</b>	<b>ALK</b>	<b>BRAF</b>	<b>CDKN2A</b>	<b>CTNNB1</b>	<b>DDR2</b>
<b>EGFR</b>	<b>ERBB2</b>	<b>ERBB4</b>	<b>FBXW7</b>	<b>FGFR1</b>	<b>FGFR2</b>
<b>FGFR3</b>	<b>HRAS</b>	<b>KEAP1</b>	<b>KIT</b>	<b>KRAS</b>	<b>MAP2K1</b>
<b>MET</b>	<b>MLL2</b>	<b>MLL3</b>	<b>MTOR</b>	<b>NF1</b>	<b>NOTCH</b>
<b>NRAS</b>	<b>PDGFRA</b>	<b>PIK3CA</b>	<b>PTEN</b>	<b>PTGS2</b>	<b>RB1</b>
<b>RET</b>	<b>ROS1</b>	<b>SMAD4</b>	<b>SOX2</b>	<b>STK11</b>	<b>TP53</b>
<b>TP63</b>	<b>ZNF521</b>				



**И все-таки вариантов нет, NGS медленно, но упорно заползает в клиническую практику!**

Высказанное мнение дискуссионное, но...  
В спорах рождается истина ☺



**Спасибо за внимание!**

Контакты: Филипенко Максим Леонидович  
[mfilipenko@gmail.com](mailto:mfilipenko@gmail.com) мт +7 913 9217392

