



GENOMIKA W MEDYCYNIE

Redaktorzy: W. Gregory Feero, MD, PhD, Alan E. Guttmacher, MD

Genomika a ciągłość leczenia z powodu nowotworu

Ulan McDermott, MB, BS, PhD, James R. Downing, MD, Michael R. Stratton, MD, PhD

N Engl J Med 2011, 364: 340-350.

Dr McDermott,
Wellcome Trust Sanger Institute,
Hinxton, Cambridge i Institute
of Cancer Research,
Sutton, Surrey,
Wielka Brytania.

Dr Downing,
St. Jude Children's Research
Hospital, Memphis, TN,
Stany Zjednoczone.

Dr Stratton,
Wellcome Trust Sanger Institute,
Hinxton, Cambridge i Institute
of Cancer Research,
Sutton, Surrey,
Wielka Brytania.

Adres do korespondencji:
Dr Stratton,
Wellcome Trust Sanger Institute,
Hinxton CB10 1SA,
United Kingdom;
e-mail: mrs@sanger.ac.uk.

Grafika interaktywna
przedstawiająca monitorowanie
nowotworu jest dostępna na stronie
NEJM.org

Poznanie sekwencji ludzkiego genomu w 2001 r.¹ wyznaczyło kilka nowych kierunków badań nad nowotworami. Identyfikacja praktycznie pełnego zestawu genów kodujących białka, w połączeniu z odkryciem wcześniej nieznanymi innymi elementami genomu ulegającym transkrypcji, takich jak mikroRNA (patrz słowniczek), dała kompleksowy wgląd w aktywność transkrypcyjną ludzkiego genomu. Kolejnym krokiem milowym było zapoczątkowanie badań wykorzystujących techniki oparte na mikromacierzach, które pozwoliły na kompleksową charakteryzację aktywności poszczególnych genów w większości rodzajów nowotworów (tzw. profile ekspresji genów). Równolegle prowadzone badania wielkoskalowe identyfikujące spektrum mutacji somatycznych dostarczyły wyczerpującego obrazu zmian molekularnych w genomach komórek nowotworowych, m.in. zmian liczby kopii fragmentów DNA (delecji i amplifikacji fragmentów chromosomów), rearanżacji chromosomalnych (np. translokacji lub inwersji) oraz zmian punktowych (insercji, delecji oraz punktowych substytucji).² Ostatnio prace te uwiaryliły zsekwencjonowanie pełnych genomów nowotworów ludzkich, dzięki czemu stworzono obszerne katalogi mutacji somatycznych.^{3,4} Badania te pozwoliły na opisanie zestawów genów biorących udział w transformacji nowotworowej.² Jednocześnie ustalenie charakteru zmienności dziedzicznej w poszczególnych populacjach zapoczątkowało falę badań poświęconych podatności na wystąpienie nowotworu, skupiając się przede wszystkim na wariantach genetycznych występujących częściej w poszczególnych populacjach i nieznacznie zwiększających ryzyko zachorowania na nowotwory. Opracowano też zestawy czynników biologicznych o udokumentowanym wpływie na aktywność większości genów, wśród których najczęściej wykorzystywanym mechanizmem jest interakcja transkryptów genów (mRNA) z krótkimi cząsteczkami RNA (short interfering RNA, siRNA) wpływającymi na ekspresję genów poprzez usuwanie związanego mRNA. Obecnie mechanizm siRNA pozwala na opracowanie nieznanego wcześniej podejścia do wyłączenia aktywności genów *in vivo*, co jest wykorzystywane m.in. do badań systematycznych identyfikujących geny niezbędne dla przeżycia komórek nowotworowych oraz geny wpływające na podatność na działanie leków.

Wyniki powyższych badań, poza walorem poznawczym i zastosowaniem w badaniach podstawowych, znalazły już dziś zastosowanie w onkologii klinicznej. W niniejszym artykule przeanalizowano wpływ badań genomowych na klasyfikację nowotworów, markery rokownicze prognostyczne i predykcyjne, rozwój nowych metod leczenia farmakologicznego, strategie monitorowania przebiegu choroby oraz postępowanie z osobami, u których ryzyko podatności na zachorowanie na nowotwory jest większe.

KLASYFIKACJA BIOLOGICZNA

Ustalenie rozpoznania i klasyfikacja wielu nowotworów nadal opierają się na wynikach badań histopatologicznych barwionych przekrojów tkankowych lub badań cytologicznych. Od kilkudziesięciu lat w klasyfikacji histopatologicznej niektórych nowotworów (np. raka piersi i nowotworów układu krwiotwórczego) uwzględnia się markery molekularne. Wprowadzenie metod określających profile ekspresji genów na podstawie mikromacierzy, pozwalających na pomiar nasilenia ekspresji tysięcy mRNA w pojedynczym doświadczeniu, znacznie zwiększyło dokładność klasyfikacji molekularnych podtypów nowotworów. Prawdopodobnie najbardziej znanym przykładem zastosowania profilowania ekspresji genów jest klasyfikacja nowotworów piersi.⁴ Chociaż patomorfologowie od dawna wiedzieli o heterogenności tej choroby, dopiero dzięki wielkoskalowym badaniom ekspresji genów na poziomie całego genomu opracowano klasyfikację uwzględniającą jej główne podtypy molekularne, czyli podstawny (bazalny), z ekspresją receptora 2 naskórkowego czynnika wzrostu (human epidermal growth factor receptor 2, HER2), rak o utkaniu podobnym do prawidłowej tkanki piersi oraz podtypy luminalny A i B. Klasyfikacja ta ulegała dalszym modyfikacjom, ale powszechnie przyjęto ją w onkologii klinicznej jako podstawę pozwalającą wyodrębnić podtypy choroby o wyróżniających cechach klinicznych i biologicznych, m.in. odmiennym przeżyciu chorych.^{6,7} Klasyfikacja wykorzystywana w rutynowej praktyce klinicznej opiera się jednak na klasycznej ocenie histopatologicznej połączonej z oznaczeniem immunohistochemicznym ekspresji receptora estrogenowego (estrogen receptor, ER), receptora progesteronowego (progesterone receptor, PR) i HER2. Łączne wyniki takiej oceny pozwalają na odtworzenie większości podklas określanych na podstawie ekspresji mRNA.

Jak jeszcze można wykorzystać te osiągnięcia poza udoskonaleniem klasyfikacji nowotworu? Przykładem problemu związanego ze standardową klasyfikacją kliniczną jest niemożność określenia pochodzenia pierwotnego nowotworu na podstawie konwencjonalnego badania histopatologicznego tkanki pobranej z ogniska przerzutowego. Sygnatury ekspresji genów mogą informować o cechach nowotworu niedostrzegalnych pod mikroskopem, a ponieważ elementy wzorca ekspresji genów tkanki macierzystej często są zachowane w ognisku przerzutowym, analiza profilów ekspresji, zwłaszcza ekspresji mikroRNA, ukazuje dodatkowe dane mogące wspomagać klasyfikację. Metody te nie są jednak wykorzystywane w rutynowej praktyce klinicznej.

WSKAŹNIKI ROKOWNICZE

Wykorzystanie sygnatur ekspresji genów udoskonaliło rozpoznawanie podklas rokowniczych nowotworów. Na przykład na podstawie profilów ekspresji genów określono ryzyko nawrotu raka piersi we wczesnym stopniu zaawansowania. W ocenie rokowania okazały się przydatne trzy profile: 70-genowy profil MammaPrint zarejestrowany przez Food and Drug Administration (FDA), 21-genowy profil wykorzystywany do oceny ryzyka nawrotu (Oncotype DX) oraz 76-genowa sygnatura rotterdamaska (wskaźnik predykcyjny).⁹⁻¹¹ Profile te, opracowane na podstawie mRNA wyizolowanego z guza i analizowanego za pomocą mikromacierzy DNA lub ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkryptazą (reverse-transcriptase polymerase-chain-reaction, RT-PCR), służą ocenie rokowania ryzyka nawrotu choroby, mają zatem wpływ na wybór metody leczenia. Test Oncotype DX włączono

SŁOWNICZEK

Genom nowotworu: pełen zestaw unikalnych cech sekwencji DNA swoistych dla danego nowotworu.

Głębokie sekwencjonowanie: sekwencjonowanie materiału genetycznego części genomu wystarczające, by wskazać rzadko występującą mutację.

Epigenomiczny: odnoszący się do zmian w regulacji ekspresji genów bez zmian w ich strukturze genetycznej.

Badanie asocjacyjne całego genomu: metoda stosowana w badaniach genetycznych w poszukiwaniu związków między wieloma (na ogół setkami lub tysiącami) swoistymi wariantami genetycznymi (najczęściej polimorfizmami pojedynczych nukleotydów) a określonymi chorobami.

Mutacje inaktywujące: zmiana w sekwencji DNA danego genu prowadząca do utraty biologicznej funkcji jego produktu.

Wyciszenie genu: techniki, dzięki którym ekspresja jednego lub więcej genów organizmu zostaje zredukowana przez leczenie swoistymi sekwencjami RNA o działaniu ukierunkowanym przeciw swoistym genomom.

RNA matrycowe (mRNA): RNA służący jako matryca do syntezy białka.

Profilowanie aktywności genów z użyciem mikromacierzy: zastosowanie sygnatur ekspresji genów w próbkach nowotworu w celu określenia niektórych wyników leczenia (np. odsetka nawrotów i odpowiedzi na leki).

MikroRNA: krótka regulatorowa forma RNA wiążąca się do RNA będącego punktem uchwytu działania i zwykle hamująca jego translację przez rybosomy.

Seqwencjonowanie nowej generacji: sekwencjonowanie DNA wykorzystujące postępy w technologii miniaturyzacji do jednoczesnego, szybkiego i taniego sekwencjonowania wielu regionów genomu.

Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą (RT-PCR): technika laboratoryjna oparta na reakcji łańcuchowej polimerazy, umożliwiająca zarówno wykrywanie, jak i ilościową ocenę ekspresji genów.

Drobnocząsteczkowe RNA interferencyjne: krótkie, dwuniciowe cząsteczki regulatorowego RNA wiążące się z RNA i zapoczątkowujące degradację jego cząsteczek będących punktami uchwytu działania.

Transkryptomowy: odnoszący się do badań transkryptomu zestaw wszystkich cząsteczek RNA w dowolnej populacji komórek, a także ocena stopnia ekspresji mRNA na ogół prowadzona bez wykorzystania platform mikromacierzy DNA.

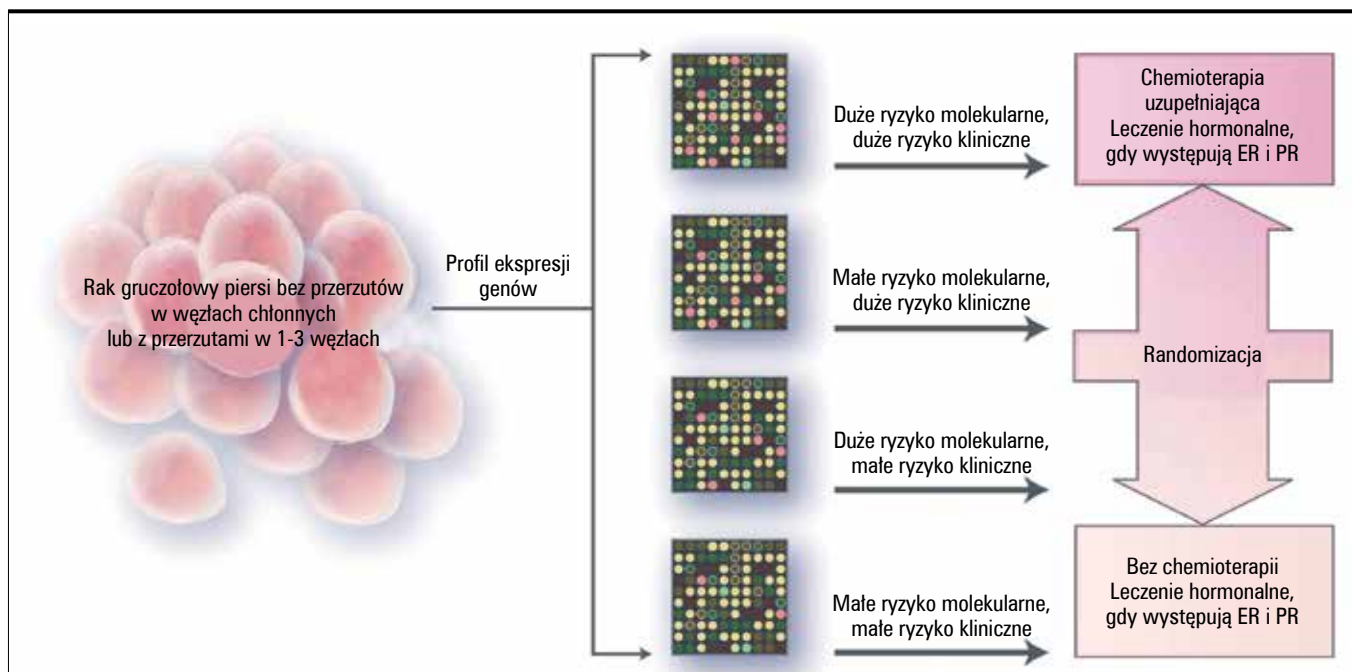
do wydanych w 2007 r. zaleceń American Society of Clinical Oncology. Powinien on być wykorzystywany w ocenie chorych na raka piersi bez przerzutów do węzłów chłonnych i z ekspresją ER w celu wskazania, które z nich nie wymagają chemioterapii uzupełniającej. W przeprowadzonym niedawno badaniu wielośrodkowym wykazano, że na podstawie wyników tego badania u niemal jednej trzeciej chorych zmieniono sposób leczenia pooperacyjnego.¹²

Podobnie opracowano sygnaturę ekspresji 12 genów w raku jelita grubego. Jest to niezależny czynnik pozwalający przewidzieć nawrót u chorych na nowotwór w II stopniu zaawansowania i ułatwiający dokładniejsze ustalenie, którym chorym chemioterapia uzupełniająca nie przyniesie korzyści.¹³ W nowotworach układu krwiotwórczego za pomocą profilowania ekspresji genów wyodrębniono 133-genową sygnaturę występującą u dorosłych chorych na ostrą białaczkę szpikową o prawidłowym kariotypie. Dostarcza ona informacji rokowniczych niezależnie od innych znanych wyznaczników klinicznych.¹⁴ Na podstawie analizy ekspresji genów wyłoniono cechujący się odmiennym

rokowaniem nowy podtyp rozlanego chłoniaka olbrzymiokomórkowego z komórek B (diffuse large-B-cell lymphoma, DLBCL). Ułatwiło to różnicowanie między chłoniakiem Burkitta a DLBCL.^{14,15}

Pewne obawy budzi jednak włączenie oceny sygnatur ekspresji genów do rutynowej praktyki klinicznej przed potwierdzeniem skuteczności tej metody w randomizowanych badaniach z grupą kontrolną, obdarzonych wystarczającą mocą. Dlatego podjęto duże badania oceniające skuteczność testów MammaPrint i Oncotype DX w przewidywaniu skuteczności chemioterapii adjuwantowej u chorych na raka piersi bez przerzutów do węzłów chłonnych. MammaPrint oceniano w Microarray in Node Negative and 1 to 3 Positive Lymph Node Disease May Avoid Chemotherapy Trial (MINDACT) (badanie zarejestrowane w serwisie ClinicalTrials.gov pod numerem NCT00433589), a Oncotype DX w Trial Assisting Individualized Options for Treatment (TAILORx) (badanie NCT00310180) (ryc. 1). Choć oba badania wyraźnie wpłyną na oparte na dowodach decyzje o leczeniu chorych na wczesnego raka piersi,

RYCINA 1



Wykorzystanie profilu ekspresji genów w określaniu ryzyka nawrotu raka piersi we wczesnym stopniu zaawansowania.

Trwa badanie MINDACT (Microarray in Node Negative and 1 to 3 Positive Lymph Node Disease May Avoid Chemotherapy Trial) porównujące sygnaturę ekspresji 70 genów (Mamma Print) z powszechnie przyjętymi klinicznymi i patomorfologicznymi kryteriami doboru chorych na raka piersi bez przerzutów do węzłów chłonnych lub z przerzutami do 1-3 węzłów do grupy chemioterapii uzupełniającej. Jeśli ryzyko określone na podstawie cech klinicznych i patomorfologicznych było niezgodne z ryzykiem określonym na podstawie sygnatury 70 genów, chore przydzielano losowo do jednej z grup leczenia opierając się na innych kryteriach. Uzyskane wyniki wskazują, jak można uwzględnić sygnatury ekspresji genów w podejmowaniu decyzji o leczeniu w projektach badań klinicznych, oceniających przydatność leczenia adjuwantowego po usunięciu pierwotnego ogniska nowotworu. ER – receptor estrogenowy, PR – receptor progesteronowy.

każde z nich wymaga uczestnictwa wielu tysięcy chorych, by osiągnąć odpowiednią moc statystyczną i ostatecznie odpowiedzieć na przedstawione wyżej pytania. Zasadnicze znaczenie ma fakt, że weryfikacja efektywności testów molekularnych wymaga przyjęcia takich samych rygorystycznych kryteriów oceny, jak podczas badań nad nowymi strategiami leczniczymi. W prospektywnych randomizowanych badaniach klinicznych należy też ocenić przydatność nowych sygnatur służących określaniu ryzyka nawrotu choroby, jak opisano to dla raka jelita grubego w stopniu II.¹⁶ Chociaż przeprowadzenie takich badań wymaga oceny wielu próbek, niekiedy staje się to możliwe dzięki osiągnięciom technologicznym, m.in. technikom analizy sygnatur ekspresji genów w materiale uzyskanym z tkanek utrwalonych w formalinie.

OPTIMALNE WYKORZYSTANIE LEKÓW

W praktyce onkologicznej często obserwuje się, że pewna metoda leczenia przynosi korzyść jedynie części chorych na dany typ nowotworu. Różnice w odpowiedzi na leczenie taką samą metodą nie dziwią, jeśli uwzględnia się wyraźną zmienność molekularną nowotworu. Niektóre z tych różnic odgrywają ważną rolę w określaniu prawdopodobieństwa uzyskania odpowiedzi klinicznej na leczenie. Zmiany zachodzące w genie kodującym określone białko komórkowe mogą warunkować odpowiedź zwłaszcza wówczas, gdy punktem uchwytu działania leku jest właśnie to białko. Na przykład nadekspresja białka oraz amplifikacja genu *HER2* w raku piersi silnie przemawiają za korzystnym wpływem leczenia trastuzumabem, przeciwciałem ukierunkowanym na *HER2*.¹⁷ Opierając się na tych danych, FDA zarejestrowała w 1998 r. trastuzumab do leczenia chorych na raka piersi z przerzutami, u których stwierdzono amplifikację *HER2*.

W ślad za tym i innymi przykładami zakładano wpływ wielu nowych leków, ocenianych w ostatnim dziesięcioleciu w badaniach klinicznych, interferujących ze szlakami sygnalizacyjnymi lub metabolicznymi kluczowymi dla podziałów lub przeżycia komórek nowotworu. Geny uczestniczące w tych szlakach przemian często akumulują mutacje somatyczne, które funkcjonują jako tzw. mutacje wiodące (takie jak mutacje punktowe, delecje, powielenia lub translokacje) bezpośrednio odpowiedzialne za nieprawidłowy wzrost komórki nowotworu. Zatem występowanie lub brak mutacji wiodących może znacząco wpływać na odpowiedź na leczenie ukierunkowane na swoisty punkt uchwytu.

Na przykład drobnocząsteczkowe inhibitory domeny kinazowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor, EGFR)

opracowano wstępnie w celu leczenia chorych na nowotwory o różnych lokalizacjach narządowych, z uwagi na powszechną rolę EGFR w aktywacji podziału komórek oraz nadekspresję genu *EGFR* w wielu nowotworach. Następnie na podstawie odkrycia aktywujących mutacji somatycznych w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca wyłoniono podgrupę chorych szczególnie dobrze odpowiadających na leczenie inhibitorami EGFR.^{18,19} W dużym prospektywnym badaniu wykazano, że wśród chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca, u których nowotwór cechował się mutacją aktywującą *EGFR*, odsetek odpowiedzi na ukierunkowane leczenie inhibitorami EGFR wyniósł 71%, w porównaniu z 1% przy braku tej mutacji.²⁰ Skutkiem tego i innych podobnych badań było wprowadzenie w niektórych ośrodkach rutynowego badania diagnostycznego materiału uzyskanego drogą biopsji, polegającego na poszukiwaniu kluczowych mutacji w genach związanych z nowotworzeniem. Celem tego postępowania jest określanie, jak profil mutacji wpływa na wrażliwość na leki o działaniu ukierunkowanym.

Niekiedy lek i zmutowany gen wykazują wpływ synergistyczny, nawet jeśli bezpośrednio punktem uchwytu działania leku nie jest białko kodowane przez zmutowany gen. Na przykład inhibitory polimerazy poli(adenozynodwufosforanu rybozy) (poly[adenosine diphosphate {ADP}-ribose] polymerase, PARP), hamujące jeden z mechanizmów naprawy DNA, wydają się szczególnie skuteczne w leczeniu chorych na nowotwory z zaburzeniami naprawy pęknięć w podwójnej nici DNA ze względu na inaktywujące mutacje w *BRCA1* lub *BRCA2*.²¹ Taka synergia, często określana mianem syntetycznej letalności,²² prawdopodobnie jest skutkiem nagromadzenia nadmiernej liczby nienaprawionych uszkodzeń DNA w komórkach guza w wyniku zahamowania obu procesów naprawy DNA.

Oczekuje się, że wiele nowych leków, będących na razie przedmiotem badań, znajdzie zastosowanie w praktyce klinicznej wraz z udowodnieniem możliwości przewidywania odpowiedzi na leczenie na podstawie swoistych zaburzeń genetycznych (tabela). Wówczas każdy chory na nowotwór będzie poddawany szeregowi określonych testów molekularnych, by uzyskać jak największą skuteczność leczenia. Przeprowadzona niedawno analiza sekwencji materiału genetycznego nowotworów litych ujawniła, że w przypadku wielu takich kluczowych genów związanych z nowotworzeniem mutację stwierdza się w niespełna 10% nowotworów danego typu. Jeśli zatem leczenie o działaniu ukierunkowanym ma być skuteczne, należy opracować szeroki repertuar substancji aktywnych (i powiązanych z nimi badań diagnostycznych), by optymalnie leczyć większość chorych, kierując najbardziej optymalne leczenie na konkretny podtyp molekularny nowotworu.²³

TABELA

Leczenie przeciwnowotworowe o ukierunkowanym działaniu*			
Gen	Zmiana genetyczna	Typ nowotworu	Lek
Receptorowa kinaza tyrozynowa			
<i>EGFR</i>	Mutacja, powielenie	Rak płuca, glejak	Gefitynib, erlotynib
<i>ERBB2</i>	Powielenie	Rak piersi	Lapatynib
<i>FGFR1</i>	Translokacja	Przewlekła białaczka szpikowa	PKC412, BIBF-1120
<i>FGFR2</i>	Powielenie, mutacja	Rak żołądka, piersi, trzonu macicy	PKC412, BIBF-1120
<i>FGFR3</i>	Translokacja, mutacja	Szpiczak mnogi	PKC412, BIBF-1120
<i>PDGFRA</i>	Mutacja	Glejak, guz podścieliskowy przewodu pokarmowego	Sunitynib, sorafenib, imatynib
<i>PDGFRB</i>	Translokacja	Przewlekła białaczka mielomonocytoza	Sunitynib, sorafenib, imatynib
<i>ALK</i>	Mutacja lub powielenie	Rak płuca, nerwiak zarodkowy, anaplastyczny chłoniak olbrzymiomórkowy	Cryzotynib
<i>c-MET</i>	Powielenie	Niedrobnokomórkowy rak płuca oporny na gefitynib, rak żołądka	Cryzotynib, XL184, SU11274
<i>IGF1R</i>	Aktywacja ligandem II insulinopodobnego czynnika wzrostu	Rak jelita grubego, rak trzustki	CP-751,871, AMG479
<i>c-KIT</i>	Mutacja	Guz podścieliskowy przewodu pokarmowego	Sunitynib, imatynib
<i>FLT3</i>	Wewnętrzna duplikacja tandemowa	Ostra białaczka szpikowa	Lestaurtynib, XL999
<i>RET</i>	Mutacja, translokacja	Rak rdzeniasty tarczycy	XL184
Niereceptorowa kinaza tyrozynowa			
<i>ABL</i>	Translokacja (BCR-ABL)	Przewlekła białaczka szpikowa	Imatynib
<i>JAK2</i>	Mutacja (V617F), translokacja	Przewlekła białaczka szpikowa, zaburzenia mieloproliferacyjne	Lestaurtynib, INCB018424
<i>SRC</i>	Nadmierna ekspresja	Niedrobnokomórkowy rak płuca, rak jajnika, rak piersi, mięsak	KX2-391, dazatynib, AZD0530
Kinaza seryna-treonina-lipidy			
<i>BRAF</i>	Mutacja (V600E)	Czerniak, rak jelita grubego, tarczycy	SB-590885, PLX-4032, RAF265, XL281
Kinazy Aurora A i B	Nadmierna ekspresja	Rak piersi, jelita grubego, białaczka	MK-5108 (VX-689)
Kinazy Polo-podobne	Zwiększona ekspresja	Rak piersi, płuca, jelita grubego, chłoniak	BI2536, GSK461364
<i>MTOR</i>	Nadmierna aktywacja	Rak nerkowokomórkowy	Temsirolimus (CCI-779), BEZ235
<i>PI3K</i>	Mutacje PIK3CA	Rak jelita grubego i odbytnicy, piersi, żołądka, glejak	BEZ235
Uszkodzenia lub naprawa DNA			
<i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	Mutacja (efekt syntetycznej letalności)	Rak piersi, jajnika	Olaparib, MK-4827 (inhibitory PARP)

* PARP – polimeraza poli(adenozynodwufosforanu rybozy).

OPRACOWYWANIE NOWYCH LEKÓW

Jak wykazano na licznych przykładach, mutacje genów onkogennych mogą definiować dobre cele terapeutyczne i być podstawą do tworzenia nowych leków. Najlepszym przykładem jest imatynib (Gleevec), silny inhibitor kinazy Abelsona (ABL) u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową (chronic myeloid leukemia, CML). W 1960 r. odkryto chromosom Filadelfia, którego występowanie wykazano u większości chorych na CML. Dokonano wówczas wielu odkryć, które zrewolucjonizowały leczenie chorych na

ten nowotwór.²⁴ Owe zmiany w genomie powodują wzajemną translokację między dwoma genami położonymi na długich ramionach chromosomu 22 (znajduje się tam gen *BCR*) i chromosomu 9 (znajduje się tam *ABL*). Powstaje w ten sposób chimeryczne onkogenne białko fuzyjne (BCR-ABL) z aktywowaną kinazą ABL. Badania kliniczne oceniające imatynib w leczeniu chorych na CML wykazały jego znaczną przewagę nad chemioterapią konwencjonalną. W Stanach Zjednoczonych FDA zarejestrowała go do leczenia pierwszej linii chorych na CML w 2001 r.²⁵ Podczas badania przeprowadzonego w 2006 r. całkowity odsetek 5-let-

niego przeżycia chorych na nowo rozpoznaną CML w fazie przewlekłej wyniósł po leczeniu imatynibem 89%.²⁶

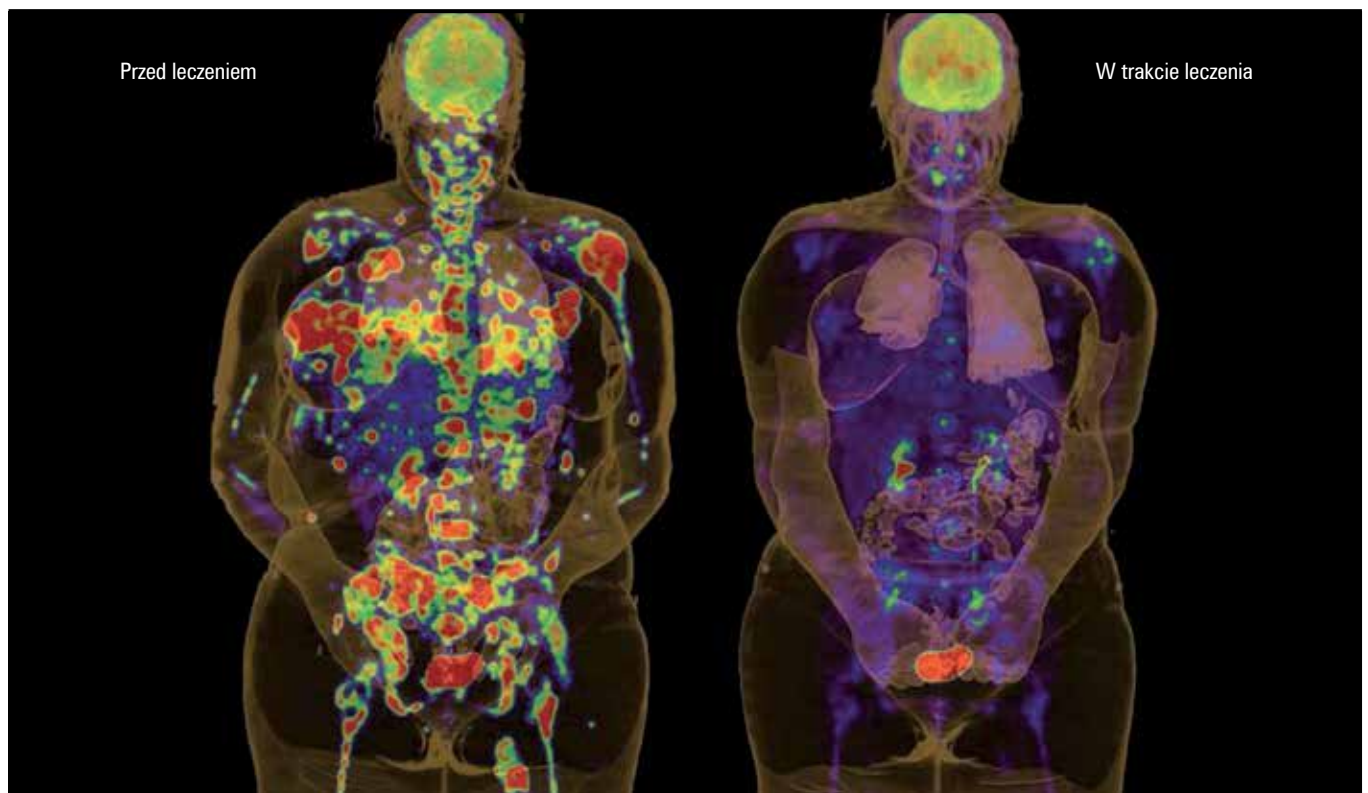
Ponieważ imatynib jest jednocześnie silnym inhibitorem kilku innych kinaz białkowych, w tym c-Kit (KIT), wskazania do stosowania imatynibu rozszerzono wkrótce na chorych na nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (gastrointestinal stromal tumors, GIST), u których w większości występuje mutacja tej receptorowej kinazy tyrozynowej.²⁷ Obiektywną odpowiedź uzyskano u ponad 50% z nich,²⁸ w porównaniu z niespełną 5% odpowiedzi wśród chorych otrzymujących chemioterapię konwencjonalną.²⁹

Są to ważne przykłady ukierunkowanego działania leków na skutki zmian genetycznych zachodzących w nowotworach, ale o wpływie zmutowanych genów na powstawanie nowotworów wiedzano już wcześniej, przed określeniem sekwencji ludzkiego genomu.

W ostatnich latach coraz częściej jednak sekwencjonowanie genomów nowotworów pozwoliło ujawnić kilka nowych zmutowanych genów nowotworowych. Niektóre z nich wskazują na kodowane przez siebie białka jako potencjalne punkty uchwytu działania nowych leków. Są to przede wszystkim geny kodujące enzymy takie jak kinazy, których mutacje powodują konstytutywną aktywację. Przykładami są kinazy BRAF, PIK3CA, FGFR2, JAK2, AKT1 i IDH1.^{19,30-34} Trwają poszukiwania inhibitorów białek kodowanych przez wiele z tych zmutowanych genów.

Znakomitym przykładem białka aktywowanego w nowotworze w wyniku mutacji somatycznej jest kinaza serynowo-treoninowa BRAF. Mutacje aktywujące BRAF wykryto podczas systematycznych poszukiwań genów mogących uczestniczyć w powstawaniu wielu różnych nowotworów. Mutację BRAF wykazano w około dwóch trzecich czerniaków złośliwych.³⁴ Z uwagi na ograniczone możliwości leczenia chorych

RYCINA 2



Leczenie ukierunkowane chorej na czerniaka związanego ze swoistym wariantem genu.

Trójwymiarowy obraz metabolizmu glukozy uzyskany podczas badania PET z ¹⁸F-fluorodezoksyglukozą (FDG) wykonanego przed leczeniem i po 2 tygodniach od jego rozpoczęcia u chorej na czerniaka będącej nosicielką mutacji V600E genu BRAF. Chorą leczono inhibitorem BRAF, PLX4032. Nasilony metabolizm wstrzykniętej glukozy radioaktywnej, oznaczony sygnałami w kolorach czerwonym, zielonym i żółtym, odzwierciedla intensywne podziały komórek nowotworu, a także prawidłowy sygnał ukazujący metabolizm mózgu i metabolizm lub wydalanie pęcherza moczowego. (Zdjęcie uzyskano dzięki uprzejmości Granta McArthura, Jasona Callahana i Roda Hicksa z Peter MacCallum Cancer Centre).

na czerniaka złośliwego z przerzutami odkrycie mutacji *BRAF* zapoczątkowało wiele programów poświęconych opracowaniu nowych leków, podejmowanych przez ośrodki akademickie i producentów leków. Wyniki wstępne badań klinicznych I fazy ujawniły nadzwyczajną aktywność leków opracowanych dzięki tym programom,³⁵ a kolejne badania trwają (ryc. 2). Od odkrycia mutacji *BRAF* do opracowania leku o działaniu ukierunkowanym, stosowanego u chorych na czerniaka, minęło niespełna 10 lat. Świadczy to o niezwykłym tempie, osiągniętym dzięki połączenia prac nad lekami z genomiką i biologią.

Niestety, wiele zmutowanych genów uczestniczących w nowotworzeniu nie jest odpowiednim punktem uchwytu dla działania leku. Dlatego uzasadnione wydaje się opracowanie leków ujawniających syntetyczną letalność w połączeniu ze zmutowanymi genami nowotworowymi. Na przykład członkowie rodziny genów *RAS* ulegają mutacji i aktywacji w 10-20% ludzkich nowotworów. Próby zmierzające do opracowania leków bezpośrednio hamujących onkogenne białko *RAS* zakończyły się niepowodzeniem. Natomiast wprowadzenie zbiorów siRNA, z których każdy hamuje *in vitro* ekspresję jednego z tysięcy genów w komórkach nowotworowych, pozwoliło na ujawnienie interakcji między zmutowanym *KRAS* a parą kinaz białkowych, *STK33* i *TBK1*.^{36,37} Przeżycie niektórych komórek z mutacjami *KRAS* wymaga ekspresji *STK33* i *TBK1*, w przeciwieństwie do komórek z prawidłowym *KRAS*. Ponieważ te kinazy będą prawdopodobnie lepszymi punktami uchwytu działania leków niż sam *KRAS*, stworzenie inhibitorów *STK33* i *TBK1* obrazuje strategię, która może znaleźć szerokie zastosowanie w leczeniu chorych na wiele nowotworów.

W zakrojonych na szeroką skalę badaniach genomu, takich jak International Cancer Genome Consortium i Cancer Genome Atlas, już dziś wykorzystuje się technologie sekwencjonowania nowej generacji podczas analizowania materiału pochodzącego z 50 różnych nowotworów. Umożliwi to poznanie ponad 25 000 genomów nowotworowych na poziomach genomu, epigenomu i transkryptomu i stworzenie pełnego katalogu mutacji onkogennych, z których część może się okazać nowymi punktami uchwytu dla działania leków.³⁸ Co ciekawe, w dwóch niedawnych badaniach zasugerowano ewolucję genomów w miarę progresji nowotworu. Wysokowydajne sekwencjonowanie dwóch pierwotnych raków piersi i ich przerzutów ujawniło występowanie w przerzutach nowych mutacji lub pojawienie się mutacji rzadko spotykanych w guzie pierwotnym. Możliwe zatem, że analiza tkanki pochodzącej z przerzutów niektórych nowotworów wykaże dodatkowe mutacje, które staną się ważnymi punktami uchwytu dla nowych leków.^{39,40}

NABYTA OPORNOŚĆ NA LECZENIE

Racjonalne wykorzystanie leków o działaniu ukierunkowanym przeciw produktom zmutowanych genów okazało się bardzo skuteczne. U wielu chorych nowotwór w trakcie leczenia staje się jednak oporny na nie.⁴¹ Taką oporność zapoczątkowują zwykle zmiany molekularne, występujące wcześniej w niewielkich subpopulacjach komórek nowotworowych. Skala tych zmian jest bardzo różna i waha się od dodatkowej mutacji punktowej w genie kodującym białko będące punktem uchwytu działania leku, np. mutacje *ABL* w CML i mutacje *EGFR* w niedrobnokomórkowym raku płuca,⁴²⁻⁴⁵ do amplifikacji fragmentu chromosomu zawierającego inny gen powiązany z nowotworzeniem, którego nadmiernie aktywny produkt przejmuje aktywność zahamowanego białka (np. *MET* w niedrobnokomórkowym raku płuca).⁴⁶

Wybór metody leczenia drugiej linii zależy od charakteru mechanizmów nabywania oporności. Metody te polegają na wykorzystaniu inhibitorów drugiej generacji aktywnych wobec mutacji wtórnych wywołujących oporność na leczenie, jak ma to miejsce w CML i niedrobnokomórkowym raku płuca, lub skojarzonych strategii ukierunkowanych na produkty białek zmutowanych genów – pierwotnych i dodatkowych.

Jeśli odporne klony rzadko występują w guzie pierwotnym, staje się ważne, czy można je wykryć wcześniej, co mogłoby wpłynąć na wybór leczenia pierwszej linii. Wysokowydajne sekwencjonowanie DNA izolowanego z fragmentu nowotworu pozwala na ujawnienie niewielkiej liczby komórek opornych, dzięki czemu byłoby możliwe wcześniejsze wdrożenie leczenia skojarzonego. Zminimalizowałoby to ryzyko rozwoju klonów opornych, który mógłby zdominować populację komórek nowotworu.

MONITOROWANIE CHOROBY I WCZESNE WYKRYWANIE NAWROTU

W monitorowaniu przebiegu większości nowotworów litych wykorzystuje się różne metody obrazowania narządów, a w niektórych nowotworach również pomiar stężeń swoistych markerów tkankowych (np. swoistego antygenu sterczowego w raku gruczołu krokowego). Wykrywanie materiału genetycznego swoiście występującego w niektórych nowotworach może służyć ocenie miana komórek nowotworowych definiując tzw. remisję molekularną, ale także dzięki dużej czułości może być wykorzystywane we wczesnym wykrywaniu nawrotu. Strategia ta jest szczególnie przydatna u chorych na nowotwory układu krwiotwórczego, o leczeniu których rutynowo

decyduje się na podstawie nasilenia pewnych zaburzeń genetycznych. Jej skuteczność zależy od powtarzających się rearanżacji genów rozpoznawanych w wielu nowotworach układu krwiotwórczego. Z uwagi na możliwość zaprojektowania primerów do PCR swoiście powielających nieprawidłowo połączone segmenty genomu, takie rearanżacje stały się idealnymi substratami dla prostych testów cechujących się dużą czułością i swoistością. Na przykład u chorych na CML, u których po leczeniu następuje 100-krotne zmniejszenie liczby transkryptów BCR-ABL, uzyskuje się zwykle trwałą odpowiedź,⁴⁷ natomiast zwiększenie poziomu transkryptów BCR-ABL świadczy o przyspieszonym rozroście klonów komórek nowotworowych, które stały się odporne na działanie imatynibu i chorzy mogą wymagać leczenia inną metodą.

Niestety, strategii tej nie można stosować rutynowo u chorych na większość nowotworów litych, głównie dlatego, że nie poznano translokacji ani rearanżacji genetycznych odpowiadających za powstanie nawrotu nowotworu. Ponieważ jednak umierające komórki wielu tych nowotworów uwalniają DNA do krążenia, monitorowanie choroby można teoretycznie prowadzić, oznaczając miana komórek nowotworowych we krwi obwodowej, podobnie jak u chorych na nowotwory układu krwiotwórczego. Ponadto we krwi obwodowej chorych na nowotwory lite wykryto swoiste dla danego nowotworu mutacje punktowe.⁴⁸ Ich wykrywanie wykorzystuje się w rozpoznawaniu nawrotu raków jelita grubego, a także wtórnych mutacji powodujących oporność niedrobnokomórkowego raka płuca na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej ukierunkowanymi na EGFR.^{49,50} Powszechne wykorzystanie tej strategii w praktyce klinicznej utrudniają problemy techniczne w wykrywaniu niewielkich subpopulacji fragmentów DNA przenoszących taką mutację punktową. W większości nowotworów litych występują jednak rearanżacje genetyczne swoiste dla poszczególnych chorych. W przeprowadzonych niedawno badaniach wykazano, że rearanżacje ujawnione w nowotworach pierwotnych za pomocą wysoko-wydajnego sekwencjonowania, można wykorzystać w celu wykrywania DNA nowotworu w krążeniu, którego stężenie koreluje z ilością tkanki nowotworowej.^{51,52} Pozwala to na monitorowanie niemal wszystkich chorych na nowotwory lite podobnie do chorych na nowotwory układu krwiotwórczego (ryc. 3 i grafika interaktywna dostępna wraz z pełnym tekstem artykułu na stronie NEJM.org).

Obecnie wczesne rozpoznanie nawrotu większości nowotworów nie przyczynia się do poprawy przeżycia chorych, brakuje bowiem skuteczniejszych metod leczenia. Można się spodziewać opracowania takich metod dzięki utworzeniu katalogów mutacji somatycznych po-

wodujących nawroty najczęstszych nowotworów. Obecnie ważne jest wczesne wykrywanie nawrotów takich nowotworów (np. raka jelita grubego), których wczesne usunięcie chirurgiczne wyraźnie poprawia przeżycie. Przydatność tej strategii wymaga dokładnej oceny w badaniach klinicznych.

GENOMIKA W PLANOWANYCH BADANIACH KLINICZNYCH

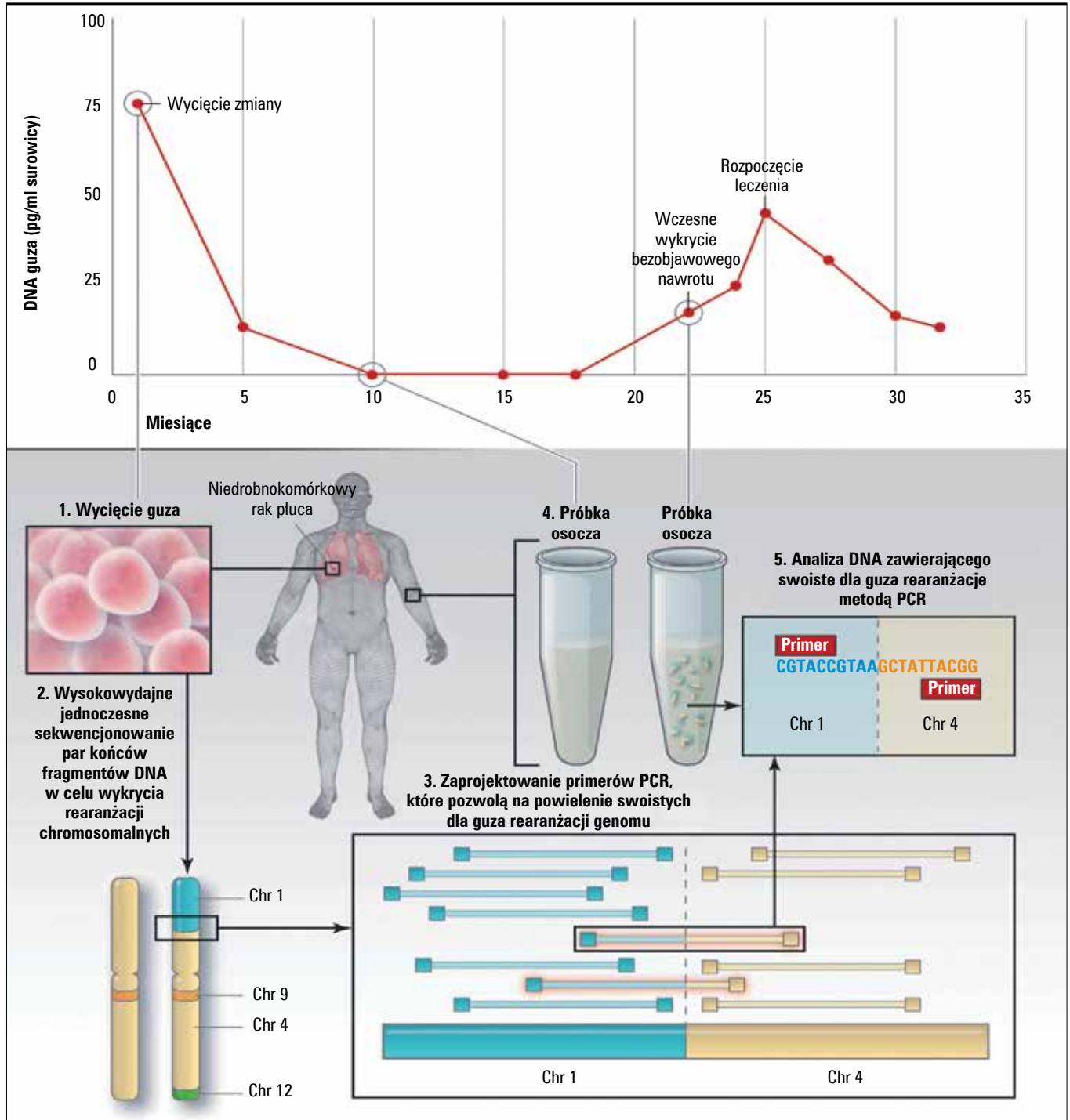
Jak już wspomniano, punktem uchwytu działania wielu nowych leków przeciwnowotworowych są białka kodowane przez geny, w których występują mutacje somatyczne przyczyniające się do rozwoju nowotworu. Wiele z tych leków wykazuje zatem skuteczność jedynie wówczas, gdy w nowotworze występują takie mutacje. Ponieważ dzieje się tak zaledwie w niewielkiej podgrupie chorych na dany nowotwór, można nie dostrzec skuteczności leku, jeśli oceniano go w badaniu z udziałem chorych niepoddanych selekcji na podstawie rozpoznania określonej mutacji. Spostrzeżenie to zmieniło standardowe projektowanie badań klinicznych tak, by w badanych populacjach byli chorzy na nowotwory przenoszące określoną mutację, grupę mutacji lub cechujące się innymi markerami biologicznymi, co zwiększa prawdopodobieństwo odpowiedzi pacjentów na zastosowane leczenie.^{20,21,53}

W genomie każdego nowotworu występują jednak pewne niewykryte dotąd cechy odpowiadające za wrażliwość lub oporność na leczenie. Ponieważ koszty sekwencjonowania genów gwałtownie maleją, w niedalekiej przyszłości można się spodziewać pełnego sekwencjonowania genomów i transkryptomów nowotworowych, które stanie się rutynową praktyką w badaniach klinicznych poświęconych lekom przeciwnowotworowym i pozwoli na ujawnienie takich cech w przyszłości.

PODATNOŚĆ NA ROZWÓJ NOWOTWORU

W ostatnich dekadach ubiegłego wieku wykryto kilka przekazywanych dziedzicznie nieprawidłowych genów znacząco zwiększających ryzyko kolejnego zachorowania na nowotwór w rodzinach, w których występuje on u wielu krewnych. Przykładami są geny *BRCA1* i *BRCA2*, których mutacje zwiększają ryzyko rozwoju raka piersi i raka jajnika, a także geny *MLH1* i *MSH2*, których mutacje sprzyjają powstawaniu raka jelita grubego. Poszukiwanie mutacji tych genów, rzadko spotykanych w większości populacji, stało się obecnie powszechne w praktyce klinicznej. Wyniki tych testów wpływają na zastosowanie badań przesiewowych i innych środków zapobiegawczych.

RYCINA 3



Wykrywanie charakterystycznych dla nowotworu rearanżacji chromosomalnych na podstawie sekwencjonowania genomu komórek nowotworowych.

Wysokowydajne jednoczesne sekwencjonowanie par końców fragmentów DNA wyodrębnionego z wycinka tkanki nowotworowej pobranego podczas biopsji umożliwia wykrycie rearanżacji chromosomalnych, które można wykorzystać w celu monitorowania nawrotu choroby lub odpowiedzi na leczenie na podstawie seryjnego badania próbek krwi chorego.

Dostępność sekwencji ludzkiego genomu pozwoliła na skatalogowanie powszechnie występujących dziedzicznych odmian DNA występujących w populacji zdrowej.⁵⁴ Dzięki temu wyłoniono nową główną klasę odmian związanych z podatnością na rozwój nowotworu. Dla kilku nowotworów przeprowadzono badania asocjacyjne całego genomu, w których porównywano częstość występowania setek tysięcy dziedzicznych odmian między dużą grupą chorych a dużą grupą kontrolną. Umożliwiły one wykrycie wielu nowych odmian DNA związanych z podatnością na kilka nowotworów, w tym raka piersi, gruczołu krokowego, jelita grubego, płuca oraz nowotworów jądra, a także przewlekłej białaczki limfocytowej i innych nowotworów.⁵⁵ Odmiany dziedziczne związane wcześniej z chorobą nie zawsze powodują zmiany czynnościowe, zwykle jednak znajdują się w genomie w pobliżu odmian odpowiedzialnych za takie zmiany.

Często występujące warianty podatności mogą bardzo nieznacznie zwiększać ryzyko zachorowania, dlatego ich przydatność w praktyce klinicznej jest niewielka. W przyszłości mogą się jednak pojawić metody oceniające jednocześnie kilka wariantów w populacji. Pozwolą one wyłonić osoby obciążone większym ryzykiem, które można byłoby włączyć do programów badań przesiewowych w kierunku danej choroby po dokładniejszym oszacowaniu ryzyka. Może to także posłużyć w przyszłości do ustalenia indywidualnego ryzyka nowotworzenia u poszczególnych pacjentów z rodzinnym nagromadzeniem nowotworów bez ustalonego na podstawie rodowodu i podstawowych badań molekularnych rozpoznania konkretnego zespołu genetycznego powiązane z nowotworzeniem.

Odkrycia dokonane dzięki wykorzystaniu technologii genomicznych oraz poznaniu sekwencji ludzkiego genomu już teraz wpływają na kilka aspektów praktyki onkologicznej i projektowanie badań klinicznych. W najbliższych latach tempo badań nad genomami nowotworów znacznie wzrośnie. Skoordynowane globalne inicjatywy pozwolą na zsekwencjonowanie genomów dziesiątek tysięcy nowotworów, dzięki czemu powstaną kompletne katalogi somatycznych mutacji

występujących w każdym z nich. Badania te ujawnią praktycznie pełen repertuar zmutowanych genów nowotworowych, zbliżając do określenia ogólnego profilu rozwoju nowotworu i ustalenia, ilu i jakich kombinacji zmutowanych genów wymaga rozwój danego nowotworu. Ukaże to trudności pojawiające się w leczeniu chorych na te nowotwory. Biorąc pod uwagę wszystkie te osiągnięcia, bardziej systematyczne funkcjonalne badania przesiewowe w kierunku żywych komórek nowotworowych, pozwalające na poznanie ich czułych punktów biologicznych, bez wątplenia wytyczą nowe kierunki opracowywania nowych leków o ukierunkowanym działaniu.

Technologie wykorzystywane obecnie w badaniach w przyszłości staną się narzędziami diagnostycznymi. Już dziś w praktyce klinicznej stosuje się analizę profilu RNA oraz testy oceniające ograniczone serie genetycznych mutacji somatycznych w nowotworach. Ich celem jest właściwy dobór leczenia ukierunkowanego u poszczególnych chorych. Zastosowanie znajdą również szybko rozwijające się technologie sekwencjonowania nowej generacji. W najbliższych kilku latach stanie się dostępna możliwość poznania pełnej sekwencji ludzkiego genomu za kilkaset dolarów lub nawet mniej. W miarę zwiększania się liczby informacji o zaburzeniach genetycznych u każdego chorego na nowotwór sekwencjonowanie całego genomu może być bardziej opłacalne niż wykonywanie serii wybiórczych testów. Pełna ocena potencjału klinicznego wynikającego z poznania całego genomu wymaga jednak upowszechnienia analizy genomu i transkryptomu w badaniach klinicznych, ujawniających nowe i nieoczekiwane czynniki przepowiadające odpowiedź na leczenie oraz rokowanie.

Formularze dotyczące konfliktu interesów dostarczone przez autorów są dostępne wraz z pełnym tekstem niniejszego artykułu na stronie NEJM.org.

From The New England Journal of Medicine 2011;364:340-350. Translated and reprinted in its entirety with permission of the Massachusetts Medical Society. Copyright © 2011 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

PIŚMIENNICTWO

- Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009;458:719-24.
- Pleasant ED, Stephens PJ, O'Meara S, et al. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature* 2010;463:184-90.
- Pleasant ED, Cheatham RK, Stephens PJ, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 2010;463:191-6.
- Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009;360:790-800.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869-74.
- van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
- Bender RA, Erlander MG. Molecular classification of unknown primary cancer. *Semin Oncol* 2009;36:38-43.
- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.

10. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817-26.
11. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;365:671-9.
12. Lo SS, Mumby PB, Norton J, et al. Prospective multicenter study of the impact of the 21-gene recurrence score assay on medical oncologist and patient adjuvant breast cancer treatment selection. *J Clin Oncol* 2010;28:1671-6.
13. Kerr D, Gray R, Quirke P, et al. A quantitative multigene RT-PCR assay for prediction of recurrence in stage II colon cancer: selection of the genes in four large studies and results of the independent, prospectively designed QUASAR validation study. *J Clin Oncol* 2009;27:Suppl:169s. abstract.
14. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937-47.
15. Dave SS, Fu K, Wright GW, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 2006;354:2431-42.
16. O'Connell MJ, Lavery I, Yothers G, et al. Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. *J Clin Oncol* 2010;28:3937-44.
17. Mass RD, Press MF, Anderson S, et al. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence *in situ* hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Clin Breast Cancer* 2005;6:240-6.
18. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39.
19. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-500.
20. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-57.
21. Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009;361:123-34.
22. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res* 2006;66:8109-15.
23. Wood LD, Parsons DW, Jones S, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007;318:1108-13.
24. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497. abstract.
25. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994-1004.
26. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006;355:2408-17.
27. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577-80.
28. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002;347:472-80.
29. DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* 2000;231:51-8.
30. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004;304:554.
31. Stephens P, Hunter C, Bignell G, et al. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 2004;431:525-6.
32. Dutt A, Salvesen HB, Chen TH, et al. Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8713-7.
33. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7:387-97.
34. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.
35. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:809-19.
36. Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* 2009;462:108-12.
37. Scholl C, Fröhling S, Dunn IF, et al. Synthetic lethal interaction between oncogenic KRAS dependency and STK33 suppression in human cancer cells. *Cell* 2009;137:821-34.
38. Hudson TJ, Anderson W, Artz A, et al. International network of cancer genome projects. *Nature* 2010;464:993-8.
39. Ding L, Ellis MJ, Li S, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* 2010;464:999-1005.
40. Shah SP, Morin RD, Khattri J, et al. Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature* 2009;461:809-13.
41. Engelman JA, Settleman J. Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:73-9.
42. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007;110:2242-9.
43. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2(3):e73.
44. Antonescu CR, Besmer P, Guo T, et al. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res* 2005;11:4182-90.
45. Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:20411-6.
46. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039-43.
47. Press RD, Love Z, Tronnes AA, et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood* 2006;107:4250-6.
48. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer — a survey. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775:181-232.
49. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008;14:985-90.
50. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008;359:366-77.
51. McBride DJ, Orpana AK, Sotiropoulos C, et al. Use of cancer-specific genomic rearrangements to quantify disease burden in plasma from patients with solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:1062-9.
52. Leary RJ, Kinde I, Diehl F, et al. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. *Sci Transl Med* 2010;2:20ra14.
53. Kwak EL, Camidge DR, Clark J, et al. Clinical activity observed in a phase I dose escalation trial of an oral c-met and ALK inhibitor, PF-02341066. *J Clin Oncol* 2009;27:Suppl:148s. abstract.
54. Durbin RM, Abecasis GR, Altshuler DL, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010;467:1061-73.
55. Hindorf LA, Junkins HA, Mehta JP, and Manolio TA. A catalog of published genome-wide association studies. National Human Genome Research Institute (Available at <http://www.genome.gov/gwastudies>.)