

차세대 염기서열 분석법과 항암요법

손 주혁 | 연세대학교 의과대학 내과학교실 중앙내과

Next generation sequencing and anti-cancer therapy

Joohyuk Sohn, MD

Division of Medical Oncology, Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Over the last two decades, the systemic treatment of cancer has evolved from cytotoxic chemotherapy to targeted therapy and now immunotherapy. Next-generation sequencing (NGS) is entering clinical applications for cancer treatment through the help of more powerful computational analyses. The increasing number of targeted therapies approved by regulatory authorities (RAs) with or without biomarkers necessitates the screening of multiple biomarkers using NGS, which is now approved and reimbursed by Korean RAs for some types of malignancies. However, the clinical utility of NGS remains to be established as a prerequisite for its routine incorporation into clinical practice. Currently, the best scenario of NGS use in clinics is to enroll patients into clinical trials based on the detection of biomarkers, but this is only possible in the hospitals conducting the specific trial. The other scenario is the off-label use of a targeted drug, but this requires social consensus for future implementation. The clinical applications of NGS are expanding in terms of its platforms, from targeted sequencing to whole exome and RNA sequencing, and in terms of systemic therapy, from targeted therapy to immunotherapy. Research into tumor mutational burden and neoantigens is shedding new light on the clinical use of NGS in immunotherapy.

Key Words: Next generation sequencing; Cancer; Targeted therapy; Immunotherapy

서론

Next generation sequencing (NGS)은 전통적인 Sanger sequencing을 대체하여 암을 비롯한 다양한 분야에서 유전체 수준에서의 검사결과를 토대로 임상에 응용되고 있거나 혹은 응용되기 위한 연구에 사용되고 있다. 국내에서는 2017년 3월부터 NGS가 암, 희귀질환자에게 보험이 허용되어 임상에서 사용되고 있다. 이는 NGS의 몇 가지 종류 중

서 targeted sequencing (TS)이 허용된 것으로 수십 개에서 수백 개의 특정 유전자를 말 그대로 짧은 시간 내에 적은 비용으로 염기서열을 분석해서 얻은 돌연변이 결과를 임상에서 사용하기 위함이다. 하지만, 이러한 NGS가 임상에서 사용되기에는 시기상조라는 의견이 지속적으로 제기되고 있다. 본 종설에서는 NGS 기본 개념 및 종류, 암의 진단 및 치료에서의 NGS 이용 그리고 암연구에서의 NGS의 역할 및 NGS의 미래에 대해 살펴보고자 하겠다.

Received: February 8, 2019 **Accepted:** February 10, 2019

Corresponding author: Joohyuk Sohn
E-mail: oncosohn@yuhs.ac

© Korean Medical Association

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

NGS란?

DNA 염기서열 분석법은 1977년 Sanger chain termination method가 도입되면서 가능하게 되었다[1]. Sanger

방법을 이용해서 인간의 유전체 염기서열을 분석한 연구 결과인 Human Genome Project 가 *Science, Nature*에 15년에 걸친 연구 끝에 2001년 출판되었다[2]. 2000년대 중반 도입된 차세대 염기서열 분석법인 NGS는 기본적으로 유전체를 short read로 자른 후 massively parallel sequencing technique으로서 Sanger 방법과는 접근법이 근본적으로 다른 DNA 염기서열 분석법이다. Sanger 방법으로 한 사람의 유전체를 15년에 걸쳐서 거의 3조 원의 비용으로 분석했는데 지금은 NGS로 45명의 유전체를 각각 약 100만 원의 비용으로 하루만에 분석할 수 있는 시대가 되었다.

NGS는 기본 원리가 DNA polymerase라는 효소를 이용하여 fluorescently labeled deoxyribonucleotide triphosphate를 DNA template strand에 결합시키고 이때 형광 발색을 낸다는 측면에서는 Sanger 방법과 크게 다르지 않다. 근본적인 차이는 Sanger 방법은 DNA single strand를 시퀀싱하지만, NGS는 하나의 긴 DNA strand를 수백만 개 가닥으로 자른 후 유전자 증폭을 하고 이를 한꺼번에 시퀀싱한다는 것이다. 이러한 NGS는 기본적으로 4단계로 구성되어 있다. 첫째, library preparation 단계로 DNA를 추출 후 무작위로 수백만 조각으로 낸 후 추후 PCR을 위해서 DNA 5'와 3'에 adapter를 붙인다. 둘째, cluster generation 단계로 DNA fragment 수백만 개 각각을 PCR을 통해 증폭시켜 DNA fragment의 clonal cluster를 만든다. 셋째, sequencing 단계로 DNA polymerase에 의해 DNA strand cluster에 상보적인 염기서열이 생성되면서 형광을 발현하게 되면 nucleotide 종류를 확인하게 된다. 넷째, 데이터 분석 단계로 생성된 수백만 개의 short read의 염기서열 데이터는 reference genome을 이용해서 앞뒤 순서를 배치하게 된다. 그후 bio-informatics를 통해서 염기서열 분석 결과를 얻게 된다.

NGS 종류 및 임상적용

암 분야에서 흔히 사용되는 NGS로는 genomics를 보기

위해 whole-genome sequencing (WGS), whole exome sequencing (WES) 그리고 TS가 있고 transcriptomics를 보기위한 RNA sequencing (RS)이 있다. WGS를 시행하게 되면 전체 유전체의 염기서열을 시퀀싱하게 되는데 low read depth로 시퀀싱을 하게된다. 따라서, 어떤 특이 유전자의 반복적으로 발견되고 암에서 의미 있는 돌연변이 같은 정보를 TS에 비교해서 정확히 얻기가 어렵다. 하지만, 이렇게 WGS를 하면 시퀀싱된 일부 유전체의 copy number variation 정보를 얻을 수 있는데 최근 연구에 이용되고 있다. WES은 실제 유전자 정보를 지니고 있는 exon 전체를 의미하는 exome을 선택적으로 시퀀싱하는 검사법으로 이는 약 180,000개의 exon을 의미하며 전체 유전체의 1% 정도이다. WES는 전체 유전체의 1%만 시퀀싱하기 때문에 WGS보다 저렴하고 또 실제 단백질을 생성하는 exon을 시퀀싱하기 때문에 병을 일으키는 유전자의 돌연변이를 확인할 수 있다. 이러한 WGS, WES은 유전자 변형전체를 확인할 수 있다는 장점이 있지만 일반적으로 TS에 비해 NGS 결과를 얻을 때까지의 시간(turn around time, TAT)이 길고 비용이 높으며 더 복잡한 bioinformatics가 요구되기 때문에 임상에서 사용하기에 현실성이 떨어진다. 그럼에도 불구하고 WGS, WES는 TS에 비해 훨씬 더 많은 돌연변이를 확인할 수 있고 mutation signature 및 종양특이적 신생항원 연구에 이용되고 있다. 하지만 대부분 추가적으로 발견되는 돌연변이들의 임상적 의미는 아직 알 수 없다.

TS는 연구자나 임상외과가 특별히 관심있는 유전자만 시퀀싱하는 것으로 원하는 유전자들의 primer를 이용해서 제작할 수 있고 상용화되어 있는 경우도 많다. 적은 부분을 시퀀싱하므로 read depth가 높고 결국 민감도, 특이도가 높은 검사법으로서 현재 국내에서 보험허가가 난 검사법이다. Genomic DNA에서 관심있는 부분을 선택하는데 있어서 기술적으로 두 가지 방법, amplicon capture와 hybridization capture가 있다. Amplicon capture 방법은 PCR을 이용한 multiplexed amplification으로 관심있는 유전자 부분을 풍부하게 하는 방법으로 forward primer와 reverse primer가 결합하는 위치 사이의 공간이 증폭되게 된다. 유전자의 수가 늘어날수록 primer 디자인이 쉽지 않고 primer 사이

의 dimer 형성 및 방해 등이 문제가 될 수 있다. 하지만 적은 양의 DNA로 deep-coverage 시퀀싱이 가능하고 가격이 저렴하며 TAT가 짧고 제한된 숫자의 돌연변이 유전자 소위 “hotspot mutation”을 확인하는데는 매우 민감한 방법이다 [3]. Hybridization capture 방식은 상보적인 DNA probe의 annealing을 통해 genomic DNA fragment에 결합하고 이 혼성체는 Biotin-Avidin 방식으로 magnetic bead에 채집된다. 디자인이 잘 되면 capture가 균일하게 이루어진다. 이 방법은 검사하는 유전자의 범위가 확대가 가능해서 크게는 whole exome까지 가능해진다. 이런 hybridization capture 방식은 mutation뿐 아니라 copy number alteration과 알려진 structural rearrangement까지 확인 가능한 장점이 있으나 amplicon capture 방법에 비해서 더 많은 양의 DNA가 필요하고 TAT가 길다는 단점이 있다[4-7]. 어떤 방법을 사용할지는 결국 각각의 상황에 맞게 앞에서 언급한 모든 점을 고려하여 결정하여야 할 것이다.

마지막으로, RS는 전에 microarray 등을 이용해서 진행했던, 유전자발현 정도를 보는 검사법으로 현재는 RS가 거의 microarray를 대체하는 수준으로 발전되어 연구에 많이 이용되고 있다. 또한 알려진 gene fusion을 확인하는데도 도움이 되는데 DNA를 이용하는 NGS 경우 가끔 gene partner breakpoints가 다른 intron에 있는 경우 확인하는데 어려움이 있지만 RS의 경우 intron의 breakpoint 위치에 상관없이 확인할 수 있기 때문에 유리하다. 현시점에서는 NGS 여러 종류 중에서 TS만 실제 임상에서 주로 적용되고 있다.

NGS를 위한 샘플

암조직은 암세포 외에도 정상세포들(면역세포, 기질세포, 혈관세포 등)을 많이 포함한다. 이는 결국 somatic mutation을 희석시키는 역할을 해서 NGS 민감도를 떨어트리게 된다. 또한 fresh frozen tumor sample이 가장 양질의 DNA를 제공할 수 있지만 임상에서는 대부분 암조직이 formalin-fixed, paraffin embedded (FFPE) 종양

블록으로 보관되어있다. FFPE는 DNA fragmentation과 chemical modification을 일으켜 sequence coverage depth에 영향을 줄 수 있고 위양성을 초래할 수 있다[8]. 하지만, 최근 기술발전을 통해 FFPE 조직을 이용해서도 Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)의 인증을 받을 수 있을 정도로 양질의 DNA를 얻을 수 있고 이를 이용해서 정확한 NGS 데이터를 얻을 수 있을 정도가 되어서 현재 대부분의 임상에서는 FFPE를 NGS에 사용하고 있다. NGS를 위한 조직을 얻는 두 가지 시나리오가 있을 수 있다. 첫째는 전이성 암환자에서 재발하기 전의 암조직을 이용하던지 전이암 조직검사를 새로해서 얻은 암조직을 NGS를 진행할 수 있다. 이런 경우 TAT가 길면 환자가 치료를 못하고 기다려야하는 상황이 있을 수는 있지만, 전이성 암조직은 현재 암의 상태를 반영해서 가장 좋은 조직일 수 있고 또 NGS 결과를 갖고 치료옵션을 찾아볼 수 있어서 임상적 유효성 측면에서는 좋다고 할 수 있다. 두 번째는 재발되기 전에 원발성 암환자에서 미리 NGS를 진행하고 향후 재발되면 NGS결과를 이용하는 경우인데 TAT 관점에서는 여유가 있지만 재발률이 매우 높은 환자가 아니면 추후 NGS 결과를 사용하지 않을 경우도 많아서 임상적 유효성 측면에서는 권유되지 않는다.

암 이외의 조직에서의 NGS

암환자에게서 암 이외의 조직에서의 NGS는 크게 두 가지 목적으로 진행된다. 주로 혈액 내의 혈액세포를 이용하는데 우선 암조직의 NGS 데이터와의 비교분석을 위해서이다. 혈액세포의 NGS는 germline variation의 결과를 얻을 수 있어서 암조직의 NGS 데이터와의 비교분석을 통해 somatic mutation을 구별해내는데 도움이 될 수 있다[9,10]. 또 하나의 목적은 최근 유방암/난소암 치료에 poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor가 미국 식품의약국(Food and Drug Administration, FDA)의 승인이 되었는데 본 치료제의 biomarker인 germline BRCA1/2 mutation을 확인하는데도 도움이 된다[11,12].

암치료에서의 NGS의 임상적 유용성

이렇게 시퀀싱된 raw data는 bioinformatics라는 과정을 거쳐서 문제가 있는 유전자를 보고하게 된다. 이러한 NGS는 결국 환자에게 도움이 되는 정보를 임상에게 제공하고 임상이는 이 유전체 정보를 이용해서 환자에게 도움이 되는 치료를 하기 위함이다. 앞으로는 암치료에서 NGS가 어떻게 이용되는지 또 해결되어야 할 문제는 무엇인지에 대해 기술하고자 한다.

암치료는 수술, 방사선치료, 약물치료 등이 있다. 이중 약물치료는 수술전후에 완치율 향상을 목적으로 진행하는 항암보조요법이 있고 전이나 재발된 환자들에게 진행하는 생존기간을 늘리고 증상완화를 통해 삶의 질의 향상을 도모하는 완화적 목적의 약물치료가 있다. 암의 약물치료는 1950년대 nitrogen mustard 발견 이후 1990년대까지 세포독성 항암제만 임상에서 사용했으므로 특히 유전자의 돌연변이 등이 예측인자 혹은 biomarker로 사용되지 않았다. 2000년대 들어서 표적치료제가 개발되면서 표적 즉, 치료효과 예측인자 혹은 biomarker로서 유전자 변형을 확인하게 되었다. 예를 들면, 유방암에서의 허셉틴(trastuzumab)의 사용유무를 결정하기 위해 HER2 gene amplification을 확인하기 위한 fluorescence in situ hybridization 검사법을 시행한다. 폐암에서는 이레사(Iressa)같은 tyrosine kinase inhibitor를 사용하기 위해 epidermal growth factor receptor (EGFR) 돌연변이를 보기 위한 digital droplet PCR 등을 진행한다. 즉, 세포독성항암치료와는 달리 표적치료시대에서는 표적을 확인하고 치료하는 경우가 상당수이다. 지금까지 개발된 표적치료와 해당되는 질병 그리고 그 표적을 진단하기 위한 검사법을 Appendix 1에 정리하였다.

이렇게 우리가 임상에서 표적치료를 이용할 때 NGS 특히 TS를 이용할 이유가 있을까? 예를 들면 폐암에서는 표적이 EGFR mutation, ROS1 rearrangement, ALK fusion 등이 알려져있는데 이들 각각의 유전자 변형을 PCR, FISH를 진행해서 확인하는 것보다 TS를 한번해서 확인할 수 있으면 임상적 유용성이 있을 것이다[13-15]. 하지만 현실은 EGFR mutation, ROS1 & ALK fusion을 확인하는데 있어서 TS만

사용한다기보다는 PCR, IHC, FISH와 혼재되어 사용하는 경우가 많다. 즉, 어떠한 이유든 TS가 아직은 다른 검사법에 비해 임상적 유용성이 우월하지 않음을 의미한다. 저자가 속해있는 병원에서도 TS보다는 다른 검사법이 사용되고 있다. 가장 표적이 많고, 표적치료제가 많다고 알려진 폐암이 이정도이니 실제 고형암에서 multi-gene NGS를 통한 임상적 사용은 현재 그 임상적 유용성 측면에서 많은 도전에 직면해 있다고 할 수 있겠다. 하지만, 필자는 TS의 임상적 유용성은 시간이 지날수록 커져서 결국 다양한 검사법을 TS이 대체할 수 있을 것으로 생각한다. 첨언하자면, 현재는 hotspot mutation을 확인하기 위해 amplicon capture 방식의 TS가 사용되기도 하지만 점점 FGFR2, BRAF, NTRK1/2/3 등의 fusion이 oncogenic driver로서 발견되고 있고 이에 대한 표적치료제들이 개발되어서 항수 hybridization capture 방식의 TS가 점점 더 임상적 유용성이 있어 많이 사용될 것으로 판단된다[16-18].

또 다른 암치료에서의 NGS 이용은 임상적으로 증명이 되지 않은 표적을 확인하고자 함이고 이를 치료로 연결하는 것이다. 이러한 목적이 현재 가장 많이 연구되고 있고 임상적 유용성이 있을 수 있을 것이다. 실제 많은 종류의 암종에서 진행된 genomics 연구결과, malignant melanoma의 중요한 돌연변이라고 알려진 BRAF mutation은 NSCLC, colon cancer, thyroid cancer, multiple myeloma, glioma, pancreatic cancer에서도 발견되고 있고, 유방암에서 유명한 HER2 amplification은 위암, 방광암, 자궁내막암에서도 발견되고 있다. 최근, NTRK fusion은 12개 이상의 다른 암종에서 발견되고 있다[19]. 하지만 표적이 있다고 해서 표적치료에 반드시 효과가 있다고 얘기할 수는 없다. 예를 들면 HER2 mutation이 있는 환자에서 irreversible panHER inhibitor인 neratinib을 사용한 연구가 발표되었다. 본 연구는 neratinib을 한개의 질병에 사용한 연구가 아니고 질병에 상관없이 유전자 분석을 해서 HER2 mutation이 있을 경우 neratinib을 사용해서 그 효능을 보고하였다. 이렇게 특정한 암이 아닌 유전자변형이 있는 환자를 모아서 진행하는 임상시험을 바꾸니 임상시험이라고 한다. 본 연구에서는 유방암에서 가장 효과가 좋았고, 자궁경부암, 담도암에서는 반

응이 있는 환자들이 있었으나 대장암, 난소암 등의 암에서는 HER2 mutation이 있어도 반응이 없었다. 즉, 같은 유전자의 돌연변이가 있어도 암종에 따라서 효과도 다를 수 있음을 시사하는 연구라고 할 수 있다[20]. 이렇게 암종에 상관없이 유전자를 중심으로 진행하는 연구중 대표적인 것이 미국 국립암센터에서 진행하는 Molecular Analysis for Therapy Choice (NCI MATCH) 연구로서 미국에서 약 40개의 2상연구를 동시에 진행하는데 각 치료군마다 35명의 환자를 등록하고, 각 치료군마다 각각 다른 유전자 변형이 있는 환자들을 등록하여 각 유전자 변형에 대한 표적치료제를 암종에 상관없이 투여하는 연구이다[21]. 이러한 바구니 임상시험 혹은 한 암종에서 몇개의 유전자변이 각각에 대한 2상연구를 진행하는 umbrella trial을 진행하는 이유는 NGS에 의해 확인되는 유전자변이의 빈도가 일반적으로 낮기 때문이다. 즉, 유전자변이의 빈도수가 높았던 유방암에서의 HER2 변이나 폐암에서의 EGFR과는 달리 다른 대부분의 유전자들은 변이 빈도가 낮아서 한가지 유전자 변이만을 확인후 해당하는 표적치료로 2상임상연구를 진행하기에는 screen failure가 너무 많아서 임상시험 자체가 실현가능하지 않고 이렇게 되면 약제개발자체가 어렵기 때문이다. 결국, NGS를 통한 이러한 바구니 임상시험 혹은 umbrella 연구가 향후 새로운 약제 개발에 있어서 어쩔수 없이 진행해야 할 임상연구의 방향일 것이다. NCI MATCH 연구를 비롯한 몇가지의 바구니 임상시험 혹은 umbrella 연구결과들이 나오면 향후 현재의 질병 중심의 임상시험에서 유전자 중심의 임상시험의 가능성을 확인할 수 있는 모멘텀이 될 수 있을 것이며 암환자에서의 진정한 맞춤치료를 구현할 수 있는지를 확인할 수 있는 중요한 연구라고 판단된다. 따라서 이러한 연구결과가 나오기 전에 유전자변형을 근거로 표적치료제를 사용하는 것은 쉽지 않은 일이다.

그렇다면 이러한 바구니 임상시험 혹은 umbrella trial 결과가 나오기전에는 어떻게 해야할 것인가? 국내에서 TS가 보험도 되었는데 NGS 결과를 임상에 이용할 수 있는 방법은 없을까? 두 가지 방법이 있는데, 우선은 임상시험이다. 유전자 변형이 발견될 때 그 유전자 변형이 있을 경우 등록가능한 임상시험에의 참여이다. 하지만, 이는 이러한 임상시험

이 진행되는 병원에서만 가능할 것이다. 환자입장에서는 가장 이상적으로 NGS를 적용할 수 있는 방법으로 판단된다. 또 다른 방법은 기존에 특이질병에서 승인된 약을 승인되지 않는 다른 암종에서 같은 유전자 변이가 발견될때 off label (unapproved use of approved drugs)로 사용하는 것이다. 하지만 이러한 사용은 현실적으로 역시 약효가 실제 증명된 바가 없는데 사용하는 것이며, 따라서 실질적으로는 각 병원의 다학제위원회의 허가 후 비급여로 사용되어야 하는 점이라는 점을 상기시키고 싶다.

암연구에서의 NGS 및 미래의 NGS

암연구에서의 genomics는 이제 돌이킬 수 없는 길이라는 판단이다. 시간이 흐를수록 새로운 표적과 치료제의 개발이 될 것이고 각 암종마다 많은 표적 및 치료제들이 있게 될 것이다. 이러한 표적을 확인하는데 있어서 NGS의 필요성은 더욱 확대될 것이다. 또한, 최근에는 각각의 특이적 유전자변이뿐 아니라, 전체적인 유전자변이의 특징을 biomarker로 이용하려는 움직임이 있어서 소개하고자 한다. 대표적인 것이 tumor mutational burden (TMB)인데 TMB가 높을수록 면역치료의 반응이 있을 가능성이 높다는, 즉 TMB가 면역치료의 biomarker가 될 수 있다는 연구들이 보고되어 왔다 [22-24]. 최근에는 암의 종류와 상관없이 가장 TMB가 높을 수 있는 상황인, tumor에서 microsatellite instability가 존재할 때 immune-checkpoint inhibitor인 pembrolizumab을 사용하면 암종에 상관없이 효과있다는 임상시험결과를 근거로 이 약제는 FDA 승인을 받았다. 이는 특이 암종이 아닌 genomic biomarker를 근거로 FDA가 승인한 최초의 항암제이다[25,26].

면역치료는 항암치료에 있어서 앞서 언급한 세포독성 항암제, 표적치료제에 이은 제 3의 물결이라고 할 수 있다. 대표적으로 면역관문억제제인데 기본적으로는 T림프구의 PD1 (programmed cell death protein 1)과 암세포의 PD-L1 (programmed cell death protein ligand 1) 사이의 결합을 막는 항체인 pembrolizumab, atezolizumab, avelumab,

durvalumab 등의 약제들이다. Antigen presenting cell이 세포독성 T림프구를 활성화시키는 기전을 억제하는 CTLA4 inhibitor인 ipilimumab, tremelimumab 등도 역시 일부 암종에서 승인받아 사용되고 있다. 이러한 면역관문억제제는 이미 다양한 암종에서 FDA 승인을 받아 사용되고 있지만 일부 암종에서 PD-L1 expression을 IHC를 통해 biomarker로 사용하는 것을 제외하곤 아직 biomarker가 많이 사용되고 있지 않다.

이러한 면역치료의 반응에는 결국 tumor에 존재하는 non-self 즉, neoantigen이 중요하다는 것이 증명되고 있다. Neoantigen은 DNA mutation 중 일부가 aminoacid sequence 즉, peptide 변형을 초래하게 되는데 이는 환자의 면역체계에서 non-self로 인지하게 되어 면역반응을 촉발하게된다. 현재 종양의 NGS 및 computational work을 통해 neoantigen을 prediction할 수 있음이 보고되었다[27]. 같은 non-synonymous mutation이라도 환자에 따라 neoantigen으로서 역할을 할 수도 아닐 수도 있는데 이는 이 peptide와 결합하는 HLA가 환자마다 다르기 때문이고 이는 결국 NGS를 통해 genomic sequencing을 하더라도 neoantigen은 결국 환자마다 다를 것이다. 또한, TMB가 많다고 알려진 NSCLC, melanoma에서 WES를 하면 상당히 많은 DNA mutation이 나오는데 이를 RS를 할 경우 상당수의 DNA mutation이 RNA로 발현되지 않음을 확인할 수 있었다[28-31]. 따라서, 이러한 neoantigen prediction 하는데는 WES뿐 아니라 RS도 이용되고 있다. 이러한 neoantigen prediction은 향후 TMB보다 더욱 정확하게 면역치료에 대한 반응을 예측을 할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 또한 이러한 neoantigen prediction은 향후 personalized therapeutic cancer vaccine (DNA, RNA, peptide) 혹은 세포치료(dendritic cell, T cell)에도 이용될수 있어서 NGS는 이러한 연구에있어서 필수 불가결한 플랫폼이라고 할 수 있다. 마지막으로, 미래에는 암조직에서의 분석뿐 아니라 혈액내 암과 관련된 유전자(ctDNA)를 유전체 차원에서 분석하는 것이 실용화될 것으로 기대된다[32-34]. 이미 액체생검에 대한 연구는 매우 활발하게 진행되고 있지만 cell free DNA 내의 circulating DNA가 1% 미만일 때

NGS를 시행하면서 생기는 “DNA sequence error”와 “true mutation”과의 구별이 필요하고 이점을 비롯한 몇 가지 난제들이 극복되어야할 것이다.

결론

항암치료에 있어서 NGS는 표적치료, 면역치료, 액체생검 등 암을 극복하는 가장 중요한 치료제 혹은 진단법 연구에 있어서 필수불가결한 플랫폼으로 자리잡고 있다. 필자로선 이러한 플랫폼이 증명되고 임상적 유용성을 갖기까지 시간이 걸리겠지만 암치료 및 암연구에 있어서 돌이킬 수 없는 플랫폼이라고 판단된다. 이런 의미에서 필자 개인적으로는 국내에서 필요한것은 NGS 기반 연구 및 임상적용에 대한 단발적 연구비 지원이나 보험급여화가 아니라, 이런 NGS플랫폼과 항암요법을 연결시키는 지속적이고 총체적며 혁신적인 국가적 프로젝트라고 생각한다.

찾아보기말: 차세대 염기서열; 종양; 표적치료; 면역치료

ORCID

Joohyuk Sohn, <https://orcid.org/0000-0002-2303-2764>

REFERENCES

1. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:5463-5467.
2. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science* 2003;300:286-290.
3. Singh RR, Patel KP, Routbort MJ, Reddy NG, Barkoh BA, Handal B, Kanagal-Shamanna R, Greaves WO, Medeiros LJ, Aldape KD, Luthra R. Clinical validation of a next-generation sequencing screen for mutational hotspots in 46 cancer-related genes. *J Mol Diagn* 2013;15:607-622.
4. Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, Rogov P, LeProust EM, Brockman W, Fennell T, Giannoukos G, Fisher S, Russ C, Gabriel S, Jaffe DB, Lander ES, Nusbaum C. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat Biotechnol* 2009;27:182-189.

5. Albert TJ, Molla MN, Muzny DM, Nazareth L, Wheeler D, Song X, Richmond TA, Middle CM, Rodesch MJ, Packard CJ, Weinstock GM, Gibbs RA. Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. *Nat Methods* 2007;4:903-905.
6. Hodges E, Xuan Z, Balija V, Kramer M, Molla MN, Smith SW, Middle CM, Rodesch MJ, Albert TJ, Hannon GJ, McCombie WR. Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing. *Nat Genet* 2007;39:1522-1527.
7. Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, Wang K, Downing SR, He J, Schnall-Levin M, White J, Sanford EM, An P, Sun J, Juhn F, Brennan K, Iwanik K, Maillet A, Buell J, White E, Zhao M, Balasubramanian S, Terzic S, Richards T, Banning V, Garcia L, Mahoney K, Zwicko Z, Donahue A, Beltran H, Mosquera JM, Rubin MA, Dogan S, Hedvat CV, Berger MF, Puzstai L, Lechner M, Boshoff C, Jarosz M, Vietz C, Parker A, Miller VA, Ross JS, Curran J, Cronin MT, Stephens PJ, Lipson D, Yelensky R. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2013;31:1023-1031.
8. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem* 2015;61:64-71.
9. Garofalo A, Sholl L, Reardon B, Taylor-Weiner A, Amin-Mansour A, Miao D, Liu D, Oliver N, MacConaill L, Ducar M, Rojas-Rudilla V, Giannakis M, Ghazani A, Gray S, Janne P, Garber J, Joffe S, Lindeman N, Wagle N, Garraway LA, Van Allen EM. The impact of tumor profiling approaches and genomic data strategies for cancer precision medicine. *Genome Med* 2016;8:79.
10. Jones S, Anagnostou V, Lytle K, Parpart-Li S, Nesselbush M, Riley DR, Shukla M, Chesnick B, Kadan M, Papp E, Galens KG, Murphy D, Zhang T, Kann L, Sausen M, Angiuoli SV, Diaz LA Jr, Velculescu VE. Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation. *Sci Transl Med* 2015;7:283ra53.
11. Schrader KA, Cheng DT, Joseph V, Prasad M, Walsh M, Zehir A, Ni A, Thomas T, Benayed R, Ashraf A, Lincoln A, Arcila M, Stadler Z, Solit D, Hyman DM, Zhang L, Klimstra D, Ladanyi M, Offit K, Berger M, Robson M. Germline variants in targeted tumor sequencing using matched normal DNA. *JAMA Oncol* 2016;2:104-111.
12. Zhang J, Walsh MF, Wu G, Edmonson MN, Gruber TA, Easton J, Hedges D, Ma X, Zhou X, Yergeau DA, Wilkinson MR, Vadodaria B, Chen X, McGee RB, Hines-Dowell S, Nuccio R, Quinn E, Shurtleff SA, Rusch M, Patel A, Becksfort JB, Wang S, Weaver MS, Ding L, Mardis ER, Wilson RK, Gajjar A, Ellison DW, Pappo AS, Pui CH, Nichols KE, Downing JR. Germline mutations in predisposition genes in pediatric cancer. *N Engl J Med* 2015;373:2336-2346.
13. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-957.
14. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Janne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1693-1703.
15. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB, Doebele RC, Le LP, Zheng Z, Tan W, Stephenson P, Shreeve SM, Tye LM, Christensen JG, Wilner KD, Clark JW, Iafrate AJ. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371:1963-1971.
16. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, Srinivasan P, Gao J, Chakravarty D, Devlin SM, Hellmann MD, Barron DA, Schram AM, Hameed M, Dogan S, Ross DS, Hechtman JF, DeLair DF, Yao J, Mandelker DL, Cheng DT, Chandramohan R, Mohanty AS, Ptashkin RN, Jayakumar G, Prasad M, Syed MH, Rema AB, Liu ZY, Nafa K, Borsu L, Sadowska J, Casanova J, Bacares R, Kiecka IJ, Razumova A, Son JB, Stewart L, Baldi T, Mullaney KA, Al-Ahmadie H, Vakiani E, Abeshouse AA, Penson AV, Jonsson P, Camacho N, Chang MT, Won HH, Gross BE, Kundra R, Heins ZJ, Chen HW, Phillips S, Zhang H, Wang J, Ochoa A, Wills J, Eubank M, Thomas SB, Gardos SM, Reales DN, Galle J, Durany R, Cambria R, Abida W, Cercek A, Feldman DR, Gounder MM, Hakimi AA, Harding JJ, Iyer G, Janjigian YY, Jordan EJ, Kelly CM, Lowery MA, Morris LGT, Omuro AM, Raj N, Razavi P, Shoushtari AN, Shukla N, Soumerai TE, Varghese AM, Yaeger R, Coleman J, Bochner B, Riely GJ, Saltz LB, Scher HI, Sabbatini PJ, Robson ME, Klimstra DS, Taylor BS, Baselga J, Schultz N, Hyman DM, Arcila ME, Solit DB, Ladanyi M, Berger MF. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 2017;23:703-713.
17. Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun* 2014;5:4846.
18. Ross JS, Wang K, Chmielecki J, Gay L, Johnson A, Chudnovsky J, Yelensky R, Lipson D, Ali SM, Elvin JA, Vergilio JA, Roels S, Miller VA, Nakamura BN, Gray A, Wong MK, Stephens PJ. The distribution of BRAF gene fusions in solid tumors and response to targeted therapy. *Int J Cancer* 2016;138:881-890.
19. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open* 2016;1(2):e000023.
20. Hyman DM, Piha-Paul SA, Won H, Rodon J, Saura C, Shapiro GI, Juric D, Quinn DI, Moreno V, Doger B, Mayer IA, Boni V, Calvo E, Loi S, Lockhart AC, Erinjeri JP, Scaltriti M, Ulaner GA, Patel J, Tang J, Beer H, Selcuklu SD, Hanrahan AJ, Bouvier N, Melcer M, Murali R, Schram AM, Smyth LM, Jhaveri K, Li BT, Drilon A, Harding JJ, Iyer G, Taylor BS, Berger MF, Cutler RE Jr, Xu F, Butturini A, Eli LD, Mann G, Farrell C, Lalani AS, Bryce RP, Arteaga CL, Meric-Bernstam F, Baselga J, Solit DB. HER kinase inhibition in patients with HER2- and HER3-mutant cancers. *Nature* 2018;554:189-194.
21. Abrams J, Conley B, Mooney M, Zwiebel J, Chen A, Welch JJ, Takebe N, Malik S, McShane L, Korn E, Williams M, Staudt L,

- Doroshov J. National Cancer Institute's Precision Medicine Initiatives for the new National Clinical Trials Network. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2014;71-76.
22. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, Walsh LA, Postow MA, Wong P, Ho TS, Hollmann TJ, Bruggeman C, Kannan K, Li Y, Elipenahli C, Liu C, Harbison CT, Wang L, Ribas A, Wolchok JD, Chan TA. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 2014;371:2189-2199.
 23. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhtman N, Moreira AL, Ibrahim F, Bruggeman C, Gasmfi B, Zappasodi R, Maeda Y, Sander C, Garon EB, Merghoub T, Wolchok JD, Schumacher TN, Chan TA. Cancer immunology: mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015;348:124-128.
 24. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, Sucker A, Hillen U, Foppen MHG, Goldinger SM, Utikal J, Hassel JC, Weide B, Kaehler KC, Loquai C, Mohr P, Gutzmer R, Dummer R, Gabriel S, Wu CJ, Schadendorf D, Garraway LA. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* 2015;350:207-211.
 25. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhajee F, Huebner T, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LA Jr. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015;372:2509-2520.
 26. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, Lu S, Kemberling H, Wilt C, Luber BS, Wong F, Azad NS, Rucki AA, Laheru D, Donehower R, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Greten TF, Duffy AG, Ciombor KK, Eyring AD, Lam BH, Joe A, Kang SP, Holdhoff M, Danilova L, Cope L, Meyer C, Zhou S, Goldberg RM, Armstrong DK, Bever KM, Fader AN, Taube J, Housseau F, Spetzler D, Xiao N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Eshleman JR, Vogelstein B, Anders RA, Diaz LA Jr. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 2017;357:409-413.
 27. Segal NH, Parsons DW, Peggs KS, Velculescu V, Kinzler KW, Vogelstein B, Allison JP. Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res* 2008;68:889-892.
 28. Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T, Peters B, Sette A, Justesen S, Buus S, Lund O. Quantitative predictions of peptide binding to any HLA-DR molecule of known sequence: NetMHCIIpan. *PLoS Comput Biol* 2008;4:e1000107.
 29. Rasmussen M, Fenoy E, Harndahl M, Kristensen AB, Nielsen IK, Nielsen M, Buus S. Pan-specific prediction of peptide-MHC class I complex stability, a correlate of T cell immunogenicity. *J Immunol* 2016;197:1517-1524.
 30. Shukla SA, Rooney MS, Rajasagi M, Tiao G, Dixon PM, Lawrence MS, Stevens J, Lane WJ, Dellagatta JL, Steelman S, Sougnez C, Cibulskis K, Kiezun A, Hacohen N, Brusic V, Wu CJ, Getz G. Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. *Nat Biotechnol* 2015; 33:1152-1158.
 31. Szolek A, Schubert B, Mohr C, Sturm M, Feldhahn M, Kohlbacher O. OptiType: precision HLA typing from next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 2014;30:3310-3316.
 32. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA Jr. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008;14:985-990.
 33. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov* 2016;6:479-491.
 34. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11:426-437.

Peer Reviewers' Commentary

이 논문은 암 환자의 진단, 치료 및 연구에 있어서 차세대 염기서열법 (next generation sequencing, NGS) 기술의 역할을 소개하고 있다. 불특정 암 환자에게 투여되는 세포독성 항암화학요법과 달리, 표적치료와 면역요법의 발전과 함께 NGS는 개별 환자의 유전체 정보를 분자 수준에서 종합 분석함으로써 환자별 정밀의료를 제공한다는 장점이 있다. 이 논문에서는 특히 염기서열법의 역사와 NGS의 기술 및 종류, 그리고 각각의 기술이 가지는 장점과 단점을 현재의 항암치료에 사용되는 실례와 함께 보여주고 있다. 또한 Targeted sequencing (TS)를 이용한 다중유전자 검사 기법과, 최근 활발히 실시되고 있는 임상시험에서의 역할을 소개해 주고 있다. 또한 면역항암요법 등 향후 주목해야 할 다양한 치료법에서의 활용방안도 제시해 주고 있어, NGS를 이용한 정밀항암치료의 구현을 시작하려는 임상 및 연구자들에게 많은 도움이 될 것으로 판단된다.

[정리: 편집위원회]

Appendix 1. Targeted and immunotherapeutic drugs, targets, indications, and biomarker detection tests

Agent	Target	FDA-approved indication	Test
Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla)	HER2 (ERBB2/neu)	Breast cancer (HER2+)	IHC or ISH
Afatinib (Gilotrif)	EGFR	Non-small cell lung cancer (with <i>EGFR</i> exon 19 deletions or exon 21 substitution (L858R) mutations)	Real-time PCR, Sanger sequencing or NGS
Alectinib (Alecensa)	ALK	Non-small cell lung cancer (with <i>ALK</i> fusion)	FISH break-apart probe (first choice), IHC as screening, FDA-approved IHC (ALK [D5F3] CDx assay) as a stand-alone test, not requiring confirmation by FISH (although secondary confirmation is encouraged), NGS
Atezolizumab (Tecentriq)	PD-L1	Urothelial carcinoma Non-small cell lung cancer	No tests needed (PD-L1 IHC Ventana as complementary diagnostic)
Avelumab (Bavencio)	PD-L1	Merkel cell carcinoma Urothelial cancer	No tests needed
Axitinib (Inlyta)	KIT, PDGFR β , VEGFR1/2/3	Renal cell carcinoma (category 1 in clear cell histology; sunitinib is preferred in non-clear cell histology, but axitinib still can be used.)	IHC
Bevacizumab (Avastin)	VEGF ligand	Cervical cancer Colorectal cancer Fallopian tube cancer Glioblastoma Non-small cell lung cancer Ovarian cancer Peritoneal cancer Renal cell carcinoma	No tests needed
Brigatinib (Alunbrig)	ALK	Non-small cell lung cancer (ALK+)	FISH break-apart probe (first choice), IHC as screening, FDA-approved IHC (ALK [D5F3] CDx assay) as a stand-alone test, not requiring confirmation by FISH (although secondary confirmation is encouraged), NGS
Cabozantinib (Cabometyx [tablet], Cometriq [capsule])	FLT3, KIT, MET, RET, VEGFR2	Medullary thyroid cancer Renal cell carcinoma	No tests needed
Ceritinib (Zykadia)	ALK	Non-small cell lung cancer (with <i>ALK</i> fusion)	FISH break-apart probe (first choice), IHC as screening, FDA-approved IHC (ALK [D5F3] CDx assay) as a stand-alone test, not requiring confirmation by FISH (although secondary confirmation is encouraged), NGS
Cetuximab (Erbixub)	EGFR (HER1/ERBB1)	Colorectal cancer (<i>KRAS</i> wild type) Squamous cell cancer of the head and neck	CRC: In the NCCN guideline, no explicit method was assigned (PCR, pyrosequencing, real-time PCR, restriction fragment length polymorphisms [RFLP], etc.). H&N: no biomarker
Cobimetinib (Cotellic)	MEK	Melanoma (with <i>BRAFV600E</i> or <i>V600K</i> mutation)	Real-time PCR, Sanger sequencing, or NGS
Crizotinib (Xalkori)	ALK, MET, ROS1	Non-small cell lung cancer (with <i>ALK</i> fusion or ROS1 gene alteration)	Same as in alectinib for ALK FISH, IHC, or NGS for ROS1
Dabrafenib (Tafinlar)	BRAF	Melanoma (with <i>BRAFV600</i> mutation) Non-small cell lung cancer (with <i>BRAFV600E</i> mutation)	Real-time PCR, Sanger sequencing, or NGS
Durvalumab (Imfinzi)	PD-L1	Urothelial carcinoma Non-small cell lung cancer	VENTANA PD-L1 (SP273) assay as a complementary diagnostic
Erlotinib (Tarceva)	EGFR (HER1/ERBB1)	Non-small cell lung cancer (with <i>EGFR</i> exon 19 deletions or exon 21 substitution (L858R) mutations) Pancreatic cancer	Real-time PCR, Sanger sequencing or NGS
Everolimus (Afinitor)	mTOR	Pancreatic, gastrointestinal, or lung origin neuroendocrine tumor Renal cell carcinoma Nonresectable subependymal giant cell astrocytoma associated with tuberous sclerosis Breast cancer (HR+, HER2-)	No tests needed for other cancer types Breast cancer: IHC for ER & PR IHC or ISH for HER2

(Continued 1)

(Continued 1)

Agent	Target	FDA-approved indication	Test
Gefitinib (Iressa)	EGFR (HER1/ERBB1)	Non-small cell lung cancer (with <i>EGFR</i> exon 19 deletions or exon 21 substitution (L858R) mutations)	Real-time PCR, Sanger sequencing or NGS
Imatinib (Gleevec)	KIT, PDGFR, ABL	GI stromal tumor (KIT+) Dermatofibrosarcoma protuberans Multiple hematologic malignancies including Philadelphia chromosome-positive ALL and CML	GIST: IHC, real-time PCR Dermatofibrosarcoma protuberans: no tests needed ALL, CLL: karyotype, FISH, or PCR
Ipilimumab (Yervoy)	CTLA-4	Melanoma Renal cell carcinoma	No tests needed
Lapatinib (Tykerb)	HER2 (ERBB2/neu), EGFR(HER1/ERBB1)	Breast cancer (HER2+)	IHC or ISH
Lenvatinib (Lenvima)	VEGFR2	Renal cell carcinoma Thyroid cancer	No tests needed
Neratinib (Nerlynx)	HER2 (ERBB2/neu)	Breast cancer (HER2 overexpressed/amplified)	IHC or ISH
Niraparib (Zejula)	PARP	Ovarian cancer Fallopian tube cancer Peritoneal cancer	Patients who are in complete or partial response to platinum-based chemotherapy (no BRCA tests needed)
Nivolumab (Opdivo)	PD-1	Colorectal cancer (dMMR and MSI-H) Head and neck squamous cell carcinoma Hepatocellular carcinoma Hodgkin lymphoma Melanoma Non-small cell lung cancer Renal cell carcinoma Urothelial carcinoma	CRC: PCR for MSI-H; IHC for dMMR
Olaparib (Lynparza)	PARP	Ovarian cancer (with <i>BRCA</i> mutation)	Sanger sequencing, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), or NGS
Olaratumab (Lartruvo)	PDGFR α	Soft tissue sarcoma	No tests needed
Osimertinib (Tagrisso)	EGFR	Non-small cell lung cancer (with <i>EGFR</i> T790M mutation)	Real-time PCR, Sanger sequencing or NGS
Palbociclib (Ibrance)	CDK4, CDK6	Breast cancer (HR+, HER2-)	IHC for ER & PR IHC or ISH for HER2
Panitumumab (Vectibix)	EGFR (HER1/ERBB1)	Colorectal cancer (<i>KRAS</i> wild type)	In the NCCN guidelines, no explicit method was assigned
Pazopanib (Votrient)	VEGFR, PDGFR, KIT	Renal cell carcinoma	No tests needed
Pembrolizumab (Keytruda)	PD-1	Classical Hodgkin lymphoma Colorectal cancer (MSI-H/dMMR) Gastric cancer Melanoma Non-small cell lung cancer (PD-L1+) Head and neck squamous cell carcinoma Urothelial cancer Solid tumors (MSI-H/dMMR)	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako); PCR for MSI-H; IHC for dMMR
Pertuzumab (Perjeta)	HER2 (ERBB2/neu)	Breast cancer (HER2+)	IHC or ISH
Ramucirumab (Cyramza)	VEGFR2	Colorectal cancer Gastric cancer or Gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma Non-small cell lung cancer	No tests needed
Regorafenib (Stivarga)	KIT, PDGFR β , RAF, RET, VEGFR1/2/3	Colorectal cancer Gastrointestinal stromal tumors Hepatocellular carcinoma	No tests needed
Ribociclib (Kisqali)	CDK4, CDK6	Breast cancer (HR+, HER2-)	IHC for ER & PR IHC or ISH for HER2

(Continued 2)

(Continued 2)

Agent	Target	FDA-approved indication	Test
Rucaparib (Rubraca)	PARP	Ovarian cancer (with <i>BRCA</i> mutation)	Sanger sequencing, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), or NGS
Sorafenib (Nexavar)	VEGFR, PDGFR, KIT, RAF	Hepatocellular carcinoma Renal cell carcinoma Thyroid carcinoma	No tests needed
Temsirolimus (Torisel)	mTOR	Renal cell carcinoma	No tests needed
Trametinib (Mekinist)	MEK	Melanoma (with <i>BRAFV600</i> mutation) Non-small cell lung cancer (with <i>BRAFV600E</i> mutation)	Melanoma: THxID BRAF test as companion diagnostic NSCLC: Real-time PCR, Sanger sequencing, or NGS
Trastuzumab (Herceptin)	HER2 (ERBB2/neu)	Breast cancer (HER2+) Gastric cancer (HER2+)	IHC or ISH
Vandetanib (Caprelsa)	EGFR (HER1/ERBB1), RET, VEGFR2	Medullary thyroid cancer	No tests needed
Vemurafenib (Zelboraf)	BRAF	Melanoma (with <i>BRAFV600</i> mutation)	Real-time PCR, Sanger sequencing, or NGS
Ziv-aflibercept (Zaltrap)	PIGF, VEGFA/B	Colorectal cancer	No tests needed

FDA, Food and Drug Administration; IHC, immunohistochemistry; ISH, *in situ* hybridization.