

Onkolojik ilaç geliştirilmesinde yeni nesil dizileme teknolojisine dayalı farmasötik uygulamalar

Pharmaceutical applications based on next generation sequencing technology in oncologic drug development

Sevcan YANGIN¹, Ümmügülüm TANMAN¹, Demet CANSARAN-DUMAN¹

ÖZET

Kanser hastalığının tedavisine etkin çözüm bulmak için uluslararası işbirlikli birçok araştırma yapılmaktadır ve bu devam eden çalışmalardan birçok umut veren sonuçlar elde edilmiştir. Kanser hastalığının tedavisine henüz etkin bir çözüm bulunamamıştır ancak araştırmacıların yeni yöntemler geliştirme çabası devam etmektedir ve elde edilen araştırma sonuçlarına ait bulguları içeren çalışmalar yayımlanmaya devam etmektedir. Bu kapsamda kanser hastalığının tedavisi üzerine odaklanan çalışmalarda, ileri teknolojilerin kullanımı sonrası elde edilen bulgular kişiselleştirilmiş, tıp alanında ve klinik uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde genom dizilemeleri ile genoma dair bilgilerin elde edilmesini sağlayan yeni nesil dizileme teknolojileri, kanser araştırmalarında kullanılan en gelişmiş teknolojilerden biridir. Yeni nesil dizileme teknolojisi hem genleri inceler hem de bazı mutasyonların tespit edilmesini sağlar. Yeni nesil dizileme teknolojisi bilinmeyen dizi varyasyonlarının kısa zamanda ve daha kolaylıkla belirlenmesini sağlar, böylece klinisyenlerin kanser oluşumu, ilerleme ve metastaz mekanizmalarını daha iyi anlamalarını mümkün kılar. Bu derlemede tümör belirteci belirlenmesi, farmakogenomik, hedefe yönelik tedavi, hassas tıp, aşı ile tedavi, biyofarmasötikler,

ABSTRACT

In order to find an effective solution to the treatment of cancer disease, many international collaborative researches have been carried out and many promising results have been obtained from these on going studies. An effective solution has not yet been found for cancer disease but studies on the development of new treatment methods and the findings of the research results continue to be published. In this context, in the studies focusing on the treatment of cancer, the findings obtained after the use of advanced technologies have been used in personalized medicine and clinical applications. Nowadays, next-generation sequencing technologies, which provide information on genomes with genome sequencing, are one of the most advanced technologies used in cancer research. Next-generation sequencing technology examines both genes and identifies some mutations. This technique enables the identification of unknown sequence variations in a short time and more easily, thus enabling clinicians to better understand the mechanisms of cancer. In this review, we aimed to provide information about the availability of next generation sequencing technology in pharmaceutical applications including areas such as tumor marker

¹Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Tandoğan, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Demet CANSARAN-DUMAN

Ankara University, Biotechnology Institute, Tandoğan 06100 Ankara - Türkiye

Tel : +90 533 344 47 44 E-posta / E-mail : dcansaran@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 10.01.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 31.03.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.33576

Yangin S, Tanman Ü, Cansaran-Duman D. Onkolojik ilaç geliştirilmesinde yeni nesil dizileme teknolojisine dayalı farmasötik uygulamalar
Turk Hij Den Biyol Derg, 2019; 76(4): 473-486

polifarmakoloji, toksigonostik ve farmakoepidemioloji gibi alanları da içeren farmasötik uygulamalarda, yeni nesil dizileme teknolojisinin kullanılabilirliği hakkında bilgi verilmeye çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Farmasötik uygulamalar, kanser, yeni nesil dizileme teknolojisi

determination to pharmacogenomics, targeted therapy, precision medicine, vaccine treatment, biopharmaceutics, polypharmacology, toxgonostics and pharmacoepidemiology.

Key Words: Pharmaceutical applications, cancer, next generation sequencing

GİRİŞ

Vücutun her bir hücresinde bulunan genler DNA'da bulunur ve DNA; Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin (AGCT dizisi) olmak üzere dört adet nükleik asit içerir. Genel inancın aksine, tüm bireylerin bu dört adet nükleik asitten oluşan DNA dizileri % 99.9 benzerdir ve sadece % 0.1 benzersizdir (1). DNA, bazı spesifik proteinleri kullanarak hücre büyümesi, bölünmesi ve ölümü gibi farklı yollarla önemli hücre yolak süreçlerini kontrol eder. Bu nedenle, her bir genin, sürekli olarak proteinlerin düzgün bir şekilde yapılmasına izin veren, spesifik bir kodlama dizisine sahip olması oldukça önemlidir (1).

Genetik varyasyonlar ise sıklıkla oluşur, ancak tüm genetik varyasyonlar hastalığa neden olmaz. Genetik varyasyonlar basitçe DNA dizisindeki farklılıklardır ve DNA'daki her bir genetik seviyede; genlerde, kromozomlarda, proteinlerde ve fonksiyonlarında gözlemlenebilirler. Bu nedenle, bir DNA dizisindeki varyasyonlar tartışılırken, genel olarak bir popülasyonda % 1'den daha az bir seviyede mevcut olan mutasyonlara değinilmektedir (1).

Genel olarak, tüm varyasyon tiplerini iki tip genetik mutasyon olayı oluşturur;

- 1- Tek baz mutasyonları (tek nükleotid polimorfizmleri veya SNPs) veya
- 2- Bir veya daha fazla nükleotidin eklenmesi veya

silinmesi.

Bir bireyde SNP'ler, yapısal varyasyonlar, kopya sayısı varyasyonları (CNV'ler), somatik kopya sayısı anomalileri (CNA'lar), eklemeler, silinmeler, ifadesi farklılaşan genler, ifadesi farklılaşan izoformlar, translokasyonlar, ifade edilen varyasyonlar, öngörülen gen füzyonları gibi bir mutasyon varsa; bu mutasyonların varlığı transkripsiyonu etkileyecek ve protein yapısı ve işlevini değiştirecektir ve de böylece kanser gibi karmaşık hastalıklara yol açacaktır (1).

Birçok faktöre dayanarak oluşan tüm kanser türlerinin başlangıcı; hiç protein içermeyen veya değişmiş fonksiyonlarla veya anormal proteinler oluşturan mutant hücrelerle başlar. Bu da zamanla başlangıç, gelişme, ilerleme ve metastaz dönemlerini içeren karsinogenik süreci başlatır (2).

Başka bir deyişle, normal hücresel ölçekte, büyüme promotörleri ve inhibitörleri arasında bir denge vardır, ancak kanserleşme sürecinde bu denge kaybolur ve sıralı hücresel farklılaşma süreçlerinin oluşumuna ve tümörleşme sürecinin fenotipik karakterizasyonuna yol açar. Hücre çoğalması arttıkça, hücresel farklılaşmalar hücrelerin ölümsüzleşmesine ve normal apoptoza karşı direncin artmasına yol açar. İnsan vücudu normalde bu mutasyonların çoğunu düzeltme yeteneğine sahiptir, fakat kanserde mutasyonlar hayati genlerde oluşmaya başladığından

ve ana hücrel yolaklarda dönüşüme sebep olduğundan durum farklılaşır. Mutasyon oranında daha fazla artış olduğu zaman kanserleşme artar (1).

Bazı kanser türleri normal dokulardan veya özelleşmiş hücre tiplerinden ortaya çıkabilir (3). Mutant bir genden oluşan bilgi normal genden oluşan bilgiden farklıdır. Tüm bu sebeplerden dolayı, DNA dizilerini okumak ve mutasyonları tespit etmek, bu mutasyonları daha iyi anlamak ve elde edilen sonuçlara göre en iyi kişiselleştirmiş tedaviyi belirlemek için ileri teknolojiye dayalı tekniklerin kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Kanser hastalığının karmaşık yapısından dolayı, günümüzde hastalarda kanser hücrelerini yok edebilecek nitelikte ilaç henüz bulunmamaktadır. Birçok kanser hastalığını tedavi etmek amaçlı uygulanan yöntemler kombinasyon halinde ve farklı döngülerde hastaya verilir ve çoğunluğu toksiktir, sınırlı bir terapötik indekse ve morbiditeye neden olur (4). İlk nesil kanser hastalığı tedavileri 1950'lerde başlamıştır bu tedaviler çoğunlukla sitotoksik ve kanser hastalarında çeşitli yan etkilere neden oldukları gözlemlenmiştir (4).

Kanser hastalığının tedavisinde, erken evrelerde kanserli dokunun saptanması ve teşhis edilmesi oldukça önemlidir. Kanser hastalığının erken tespiti, tedavi oranında önemli bir artışa yol açar. Ancak, kanser hastalığının birçoğu geç evrelerinde tespit edildiğinde, tedavi olanaklarının sınırlı olduğu ve düşük oranda sağkalım ile sonuçlandığı tespit edilmiştir (5).

Tedavide normal hücrelere zarar vermeden sadece kanser hücrelerini hedeflemeye yönelik yeni kanser tedavi yaklaşımları kullanmaya ihtiyaç vardır. Günümüzde kanser hastalığı ile mücadelede ve tedavi için kullanılan cerrahi, ışın ya da kemoterapi gibi genel tedavi yaklaşımları kanser hücrelerini tahrip eder veya tamamıyla yok eder. Bu tedavi seçeneklerinin kombinasyonu, bir kanser hastasının yaşam kalitesini iyileştirerek hayatta kalma oranlarını arttırır. Ancak tedavide rutin olarak kullanılmalarının avantajları

olduğu gibi birçok dezavantajı da bulunmaktadır.

Kanser hastalığının tedavisinde rutin tedavide kullanılan tıbbi yöntemlerin yanı sıra alternatif tedavi yöntemleri arayışları da hızla devam etmektedir. Özellikle son yıllarda araştırmacılar ilaç adayı molekülün normal hücreye zarar vermeden sadece kanser hücrelerine odaklanan ve kanserli hücre çoğalmasını durduran etkisi olanlar üzerine odaklanmıştır. Bu kapsamda sentetik kaynaklı ilaç adayı moleküllerin yanı sıra biyolojik kaynaklı birçok ilaç adayı molekülün etkinliğini belirlemeye yönelik çalışmalar her geçen gün artmaktadır (6,7,8). Son yıllarda gerçekleşen bu çalışmalarda yeni ilaç adayı molekülün moleküler karakterizasyonu veya rutinde kullanılan ilaç kombinasyonlarının etkinliğini yine moleküler boyut da belirlenebilmesi için yenilikçi ve etkin bir teknik olan Yeni Nesil Dizileme Teknolojisine (NGS) dayalı birçok çalışmalar hızla devam etmektedir.

Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi (NGS)

Genomik teknolojiler alanındaki son gelişmelerden biri, yüksek verimli dizileme platformlarının geliştirilmesidir. Bu teknolojiler kanser araştırmalarında güçlü bir araç haline gelmiştir (1).

NGS teknolojisi üç ana basamağa dayanmaktadır:

- DNA örneklerini sabitlemek için katı bir yüzey kullanmak,
- Döngüsel dizileme reaksiyonları için otomatik cihazlar kullanmak,
- Moleküler boyutta sonuçları tespit etmek için görüntüleme kullanmak (9).

Birinci nesil dizileme (Sanger dizileme), dizileme çalışmaları için altın standart olarak kabul edilir. Geçmişte genomik analiz için güçlü bir araç olarak kullanılmış olan bu teknik hala yüksek verimli dizi analizinde doğrulama amaçlı kullanılmaktadır. Yüksek verimli dizileme için Illumina (Solexa) dizileme, Roche 454 Dizileme, SOLiD ve Ion Torrent dahil çok sayıda dizileme teknolojisi örnek olarak verilebilir (10).

NGS teknolojisi; diğer teknolojiler ve ek çalışmalar ile birleştirilebildiği için etkin bir testdir. Örneğin Forshew ve ark.'nın geliştirdiği bir yöntem olan TAm-seq, primer tasarımı ve NGS'yi birleştirerek TP53 mutasyonlarını belirleme yeteneğine sahiptir (11). NGS'nin Sanger dizilemesine göre birçok avantajı vardır. Numune hazırlama sırasında, dizi kütüphanelerinin hazırlanması için daha az miktarda DNA gereklidir. Örneğin, Sanger dizileme kullanarak *BRCA1* ve *BRCA2* genlerini dizilemek için 3 µg DNA gerekli olmasına rağmen kromatin immun çöktürme yöntemine dayanan NGS teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen dizileme çalışmaları için sadece 500 ng DNA miktarı yeterli olmuştur (12).

NGS, genomik dizileme hakkında bilgi sağlama nedeniyle, kanserleşme sürecinde genetik profili anlamada anahtar görevi görür. NGS, belirli bir klinik durumda beklenen mutasyonları tespit etme ve beklenmedik dizi varyasyonlarını belirlemeye yarayan bir tekniktir ve bu nedenle NGS teknolojisi tedavide ve diğer terapötik amaçlı tedavilerde önemli bir rol oynamaktadır (13).

NGS teknolojisi kullanılarak kanserli hastaya ait genom dizilemesi ile tümör profilleri, tümörün sınıflandırılması ve alt tiplerinin tanımlanması, kişinin genetik profiline uygun olan hedefe yönelik tedavi gerçekleştirilebilir. Ayrıca tüm ekzom dizileme, tüm genomun dizilemesi, transkriptom dizileme, epigenetik dizileme ve hedefe yönelik dizileme ile klinik uygulamalarda NGS teknolojisi ile belirlenebilmektedir (1).

Farmasötik Uygulamalarda NGS Teknolojisi

1. NGS Teknolojisinin tümör belirteci belirleme amaçlı kullanımı

Kanser hastalığının yayılmasının ileri evrelerinde değil, doğru yöntemlerle erken tanı konulur ve tedavi edilirse kanser vakalarının önemli bir kısmı önenebilir (14). Kanser tedavisini bu denli zorlaştıran şey, kanserleşme sürecinin çoğunun sinsice yani hiçbir belirti vermeksizin ilerlemesidir.

Bu durum da, displazi, hiperplazi ve pleomorfizm gibi normal hücrelerde kanser hücrelerine dönüşümü sırasında meydana gelen tüm değişikliklerin belirti olmaksızın oluşması anlamına gelmektedir (15). Bu şartlar altında güvenilir bir teşhis testi gereklidir. Bu nedenle, şüphelenilen kanserli bölgenin bir parçasının cerrahi olarak çıkarılmasını gerektiren biyopsi uygulaması yapılır (15). Günümüzde, bilim insanlarının ve araştırmacıların yeni odak noktası, genom tabanlı kan testlerinin geliştirilmesidir. Bu hedefe dayalı gelişmiş testlerin başlıca faydalarından biri, tümör tarafından salgılanan materyaller olan tümör belirteçlerinin belirlenmesidir. Tüm genom dizilemesi kullanılarak kanser için kişiselleştirilmiş kan testlerinin geliştirilmesi, birçok çalışmanın odak noktası olmuştur (1).

Tümör belirteçlerinin gelişim öyküsü, 1960'larda enzimler, hormonlar ve serum proteinlerinin tedavi amaçlı tümör belirteçleri olarak kullanılması ile başlamıştır (16). 1970'lerin sonlarında, tümör belirteçleri ve işlevsel mekanizmalarının özellikleri hakkında daha fazla bilgi elde edilerek kanserle mücadelede yeni umut sağlanmıştır ve karsinoembriyonik antijen (CEA) veya karsinoembriyonik protein (17) içeren ilk tümör belirteci belirlenmiştir. Buna ilaveten, bu elde edilen bulgu ile, özellikle kanser hastasının tedavi sürecinde bu bilginin klinik pratiğe nasıl dönüştürüleceğine dair bilgiler sağlamıştır (1).

Tümör belirteçleri, popülasyonda en sık meydana gelen mutasyonlar olan SNP'lerin saptanmasıyla keşfedilebilir. Örneğin, ATG CAA'dan ACG CAA'ya, T nükleotidinden C nükleotidine doğru eğer tek bir yer değiştirme gerçekleşirse, tüm nükleotit dizisi hastalığı taşıyacaktır, çünkü dizideki değişim veya mutasyon oluştuğunda anormal bir protein üretecektir. Bu nedenle, bu SNP bu hastalık için bir belirteç olacaktır. Bir sonraki adım, bireysel genetik profilleri kullanarak kişiye özgü tümör belirteçlerinin kullanımı ve keşfi için stratejilerin geliştirilmesidir. Günümüze kadar, NGS teknolojisi ile kişiselleştirilmiş

tümör belirteçleri, erken kanser tespiti, tarama, tanı, farklı alanlarında birçok başarılı sonuç elde edilmiştir (1) (Tablo 1).
prognoz, hedefe yönelik tedavi, terapötik cevap, izleme ve tekrarlama dahil olmak üzere onkolojinin

Tablo 1. Farklı kanser türlerinde tümör belirteçlerinin kritik rolleri (1).

Kanser tipi	Tümör markörü	Klinik bulgular
Mesane kanseri	ICAM-1/VCAM-1	Tüm kanser hastalarında kontrollere göre daha yüksektir.
	sFas ligand	Daha yüksek sFasL seviyeleri Ta mesane karsinomunda erken nüksü öngörmektedir.
Beyin kanseri	bFGF	Tümör varlığını gösterir.
	VEGF	Tümör varlığını gösterir.
Rahim ağzı kanseri	IL-2R	Skuamöz hücreli karsinomlu hastaların %50'sinde daha yüksek seviyelerdedir.
	SCC	Skuamöz hücreli karsinomlu hastaların %67.5'inde daha yüksek seviyelerdedir.
Kolon kanseri	Angiogenin	Yüksek seviyesi kanser ilerlemesi ile ilişkilidir.
	E-selectin	Kolon ve meme kanseri hastalarında artmıştır.
Endometriyal kanser	P53	Ameliyat öncesi jinekolojik kanserler için yardımcı testdir.
	IL-2R	Endometriyal hastaların % 51.4'ünde daha yüksek seviyelerdedir.
Yemek borusu kanseri	IL-2R	Yemek borusu kanseri hastalarda belirgin olarak artmıştır.
	P53 AB	Yemek borusu kanseri hastalarının % 43'ünde saptanmıştır.
Mide kanseri	c-erbB-2	Aşırı ifade de HER-2 / neu dokusu ile ilişkilidir.
	COX-2	Aşırı ifade seviyesi, yüksek seviyelerde prostaglandin E2 biyosentezi ve biyogenez ile ilişkilidir.
Meme kanseri	TGF-β	Primer meme tümörlerinde yüksek oranda ifade edilir.
	ICAM-1	Meme kanserli hastalarda sICAM-1'in % 96'sındaki yüksek seviyelerdedir.
Lösemi	TNF-α	Hastalık varlığının göstergesidir.
	IL-2R	Sadece relaps hastalarında, interferon tedavisine yanıt tahmini olarak belirlenir.
Akciğer kanseri	SVCAM-1 ve diğer CAMs	SCLC'de anormal seviyeleri tespit etmektedir.
	TNF-α, TGF-β	Pozitif akciğer kanserleri için uygun prognoz göstermektedir.
Pankreas kanseri	CgA	Endokrin pankreas tümörü, çoklu endokrin neoplazi 1 sendromunda artmış %99 karsinoid tümörde yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir.
	P53 mutant protein	Hastaların % 50'sinde tespit edilmiştir.

2. Farmakogenomik (PG)

Farmakogenomik (PG) farmakoloji ve genomik biliminin birleşimi ile oluşan bilim alanıdır. Bu alan, kişinin farklı genomik dizisi nedeniyle ilaç kullanımının insandan insana nasıl farklı tepki verdiği (18) ve kişiselleştirilmiş tıpta genotip-fenotip bilgisinin nasıl kullanılabileceğine odaklanmaktadır.

Farmakogenomik'in başlıca avantajları şunlardır:

1. Tedavi edici etkisinin en üst düzeye çıkarılmış ilaçların geliştirilmesi.
2. Vücut ağırlığı ve yaşı gibi geleneksel ölçümlerin kullanması yerine kişinin genetik profilini temel alan daha kesin dozaj yöntemleri tasarlama becerisi (18).
3. Farklı ilaçlar için yanıt veren/yanıt vermeyenleri tanımlama ve bu ilaç için risk faktörlerini belirleme yetisi.

Farmakogenomik'e dayalı çalışmaların sağladığı avantajları gerçek hayatta uygulamak için, çalışmalarda biri hastalıklı olan grup ve diğeri hastalık içermeyen kontrol grubu olmak üzere iki grup arasındaki DNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmelidir. Sonuçlar değerlendirildiğinde bir grupta SNP varlığını diğerlerine göre daha sık rastlanıyorsa, sonuçlar muhtemelen hastalık ile ilişkilendirilir (1).

Farklı ilaçların farklı popülasyonlarda değişik etkisi vardır. Gerçekleştirilen klinik çalışmaların sonucunda farklı hastaların aynı semptomlara, aynı bulgulara ve aynı hastalığa sahip olabileceğini ve aynı ilacı aynı dozda alsalar da, farklı etkiler ve reaksiyonlar sergilediklerini gösterir. Farklı kişiler aynı ilaca farklı şekilde tepki verirler; bu yüzden bu oluşan kişisel varyasyonlar nedeniyle ilaca karşı oluşan farklı yanıt verme, yanıt vermeme veya toksik yanıt verme olarak sınıflandırılırlar (1). Hastaların büyük çoğunluğu otoriteler tarafından onaylanmış ilaçları kullanmaktadırlar, ancak ilaçların bir kısmı klinik çalışmalarda başarısız olmaktadır ve daha da önemlisi, onaylanmış birçok ilaç ciddi yan etkileri

nedeniyle piyasadan geri çekilmiştir. Bu bireysel varyasyonların bazı olası nedenleri etnik köken, yaş, çevre, cinsiyet ve genetik çeşitlilik olabilir. İlaç uygulamaları alanında, belirli ilaçların metabolize edilmesinden ve ilaçların vücut içinde taşınmasından veya hedeflenmesinden sorumlu olan önemli genlerde bulunan genetik varyasyonlar, bir ilacın aktivitesini etkileyebilmektedir (1). Örneğin, hız sınırlayıcı bir metabolize edici enzim olan Dihidroirimidin Dehidrogenaz (DPYD) kullanımında, DPYD*2A'da bir mutasyon oluştuğunda, 5-FU toksisitesine yol açarak kısmi DPYD eksikliğine neden olacaktır (19). Bu nedenle, hastanın durumuna bağlı olarak ilacın değiştirilmesi veya dozunun değiştirilmesi gibi başka alternatifler de düşünülmelidir. FDA uyarı bölümünde bu bilgiyi ilaç etiketi üzerinde belirtir. Theraguide 5-FU kan testi, kişiselleştirilmiş tedaviye izin vermek ve hastanın 5-FU ile ilişkili kemoterapiye olumsuz bir tepki verme riskini en aza indirmek için kullanılmaya başlanmıştır (19).

İlaç alanında farmakogenomik uygulamaları, hedefin tanımlanması ve ortaya çıkarılması ile başlar. Ardından bir bileşiğin optimizasyonu klinik çalışmaları ile devam eder ve son olarak bir ürünün piyasaya sürümü yapılır. Halen, kişiselleştirilmiş tıpta büyük katkılarından dolayı NGS teknolojisi her bireyin genetik profiline dayanan yeni terapötik stratejilerin tasarlanmasında kritik bir rol oynamaktadır (1).

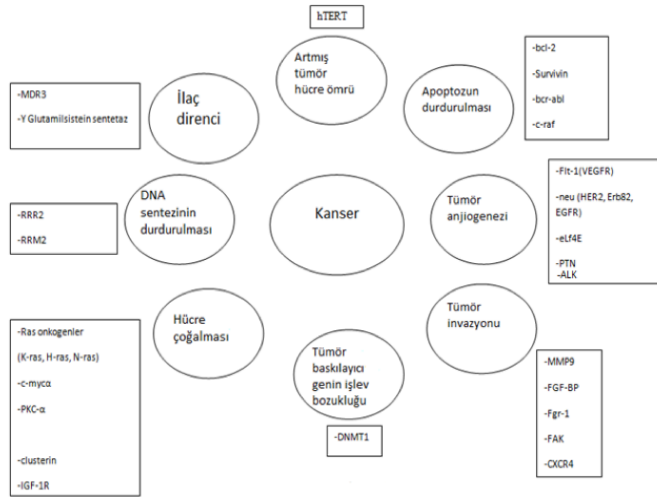
Kanser hastalığının genetiğe bağlı olarak değişken bir oluşum olması nedeniyle, hastalığın tedavisinde kişiselleştirilmiş tedavi yöntemlerinin kullanması daha uygun olacaktır. Yeni terapötik stratejiler tasarlama kavramını daha iyi anlamak için, NGS teknolojisi kullanılarak DNA dizilerindeki mutasyonlar belirlenecektir, böylece bu mutasyonları spesifik hedefleyen ilaçların dizaynı yapılabilecektir. Bu ilaçlar da gen hedefli nükleik asitlere dayanarak işlev görebilecektir.

Kanser hastalığı oluşum nedenleri olarak apoptozun durdurulması, kontrolsüz hücre çoğalması, tümör anjiogenezi, tümör invazyonu, tümör baskılayıcı

genin işlev bozukluğu, artmış tümör hücre ömrü, DNA sentezinin durdurulması ve hastanın tedavi süreci boyunca ilaca direnci gösterilebilir. Tüm bu durumlar kanserojenik etkiye nedendir, bu kanserojenik etkilerin başlıca nedeni de mutasyonların oluşmasıdır. Bu nedenle, mutant genlerin NGS teknolojisi ile tespit edilmesi tedavinin sonucunu etkileyecektir (1) (Şekil 1).

Örneğin hücre çoğalması ile ilgili bir hedef gen örneği Ras onkogen ailesidir (K-ras, H-ras, N-ras) (Şekil 1). Ras ailesi, hücreler içindeki sinyalleri tirozin kinaz reseptörlerinden hücre çekirdeğine iletmekte görevli

proteinlerdir ve çok çeşitli süreçlerde görev alırlar (20). Bu genlerde bir mutasyon oluştuğunda hücrenin defosforilasyon yeteneğinin kaybına neden olur, bu da hücre çoğalmasının artmasına ve kanser hücrelerinin çoğalmasına yol açar (1,21,22) Meme kanserinde, dizilenmiş gen sayısı (36 gen) ile mutasyonların sayısının (111 mutasyon) karşılaştırılması sonucunda elde edilen veriler mutasyonların tümünün belirlenmesi ve tanı ve tedavide en iyi araçları ve yöntemleri bulmak için verilen bilgileri kullanmanın mutlak bir ihtiyaç olduğunu göstermektedir (Tablo 2).



Şekil 1. Karsinogenez oluşumları ve hedef genler (1).

Tablo 2. Meme kanser türlerindeki mutasyonların yerlerine ve farklı antikanser ilaçların etkilerine bakarak mutasyonların etkisi (1).

Kanser Türü	Mutasyon	Tür / Yer Mutasyonu	Hedefli Terapötikler için Etkiler			
			Androjen reseptör modülatörleri ve antagonistleri	Östrojen reseptör agonistleri-antagonistleri	Aromataz İnhibitörleri	
Meme Kanseri	AR İfadesi		Androjen reseptör modülatörleri ve antagonistleri		Östrojen reseptör agonistleri-antagonistleri	Aromataz İnhibitörleri
		Hassasiyeti artırır	Şu anda bilinmeyen		Şu anda bilinmeyen	
	ER İfadesi		Hassasiyeti artırır		Hassasiyeti artırır	Şu anda bilinmeyen
	HER2 [ERBB2] Amplifikasyonu		Trastuzumab	Ado-Trastuzumab Emtansine	Pertuzumab	Lapatinib
	Hassasiyeti artırır		Hassasiyeti artırır	Hassasiyeti artırır	Hassasiyeti artırır	

3. Hedefe Yönelik Kanser Tedavisi

Kanser araştırmalarında karsinogenez hedefli ilaçların geliştirilmesi, hedefe yönelik kanser tedavisi veya rasyonel ilaç tasarımı olarak adlandırılmaktadır. Bu hedefe yönelik geliştirilmiş ilaçların birincil amacı, normal hücrelere herhangi bir zarar vermeksizin kansere neden olan spesifik moleküllere müdahale etmektir. Kişiye özel hedeflenen ilaçlar, hassas tıbbın temel taşı ve kanser oluşumunun önlenmesine yönelik tedavilerin ortaya çıkarılması ve geliştirilmesi için odak noktasıdır (23).

Rutin uygulanan kemoterapi, kanser veya normal hücre ayırımı olmaksızın tüm hızlı bölünen hücreler üzerinde etkili olduğu için seçici olmayan bir şekilde çalışır ancak hedefe yönelik kanser terapi yöntemleri, hedeflerine ulaşmak ve sadece hedeflerine tepki vermek üzere tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bu nedenle, kanserle ilişkili spesifik moleküler hedefler üzerinde etkilidirler. Sitogenetikte, hedefe yönelik tedaviler sitostatiktir (tümör hücresi çoğalmasını bloke ederler), oysa rutin kemoterapi ajanları sitotoksiktir (tümör hücrelerini öldürürler) (23).

Genetik tıpta son gelişmeler ve insan genomunun dizilenmesi ile yeni yaklaşımlar bulmak her zaman mümkündür (24, 25, 26). Bu yeni yaklaşımlardan biri ise, kanser hücrelerinde bulunan proteinlerin miktarının, normal hücrelerde bulunan protein miktarı ile karşılaştırılmasına dayanır. Bazı kanser hücrelerinde yüksek seviyelerde ifade olan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 proteini (HER-2) farklı şekilde ifade edilen hedefin bir örneğidir. Trastuzumab (Herceptin) (23) dahil olmak üzere birçok hedefe yönelik tedavi HER-2'ye karşı yönlendirilmiştir. Buna ilaveten, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dizisi, EGFR tirozin kinaz inhibitörü duyarlılık direncinin varlığını göstermiş olup, bu da terapötik amaçlar için rutin olarak EGFR dizisinin kullanılmasına yol açmıştır (27). Mir-34'de kansere karşı tedavi amaçlı yeni bir silah olarak kullanımını tartışan bir çalışma gerçekleştirilmiştir (28). Başka bir yaklaşım, kanser hücrelerinin, kanser ilerlemesini

yönlendiren mutant (değiştirilmiş) proteinleri üretilmediğini belirlemektir. Örneğin, bir hücre büyümesi sinyal proteini olan BRAF'ın, birçok melanomda değiştirilmiş bir formda (BRAF V600E) mevcut olduğu bulunmuştur. Mevcut onaylanmış ilaç vemurafenib (Zelboraf)'dir, vemurafenib bu tip kanserli hastaları tedavi etmek için BRAF proteininin mutant formunu hedeflemektedir (23).

Sinyal transdüksiyon inhibitörleri olarak bilinen yeni bir antikanser grubu olan kinaz inhibitörleri, sinyal transdüksiyonunun hücresel mekanizmalarını hedef alır ve bu mekanizmalarda rol oynayan veya bu mekanizmalara katılan moleküllerin aktivitesini bloke eder. Bu gruptaki ilk ajanlardan biri olan ve bir BCR-ABL kinaz inhibitörü olarak çalışan İmatinib; bir multikinaz inhibitörü olan Dasatinib; bir mTOR inhibitörü olan Everolimus; ve bir EGFR tirozin kinaz inhibitörü olan Gefitinib (29) örnek olarak verilebilir (1).

Tümör hücrelerinde ifade edilen proteinleri hedeflemek için tasarlanan monoklonal antikolar, kanser hücrelerini bağışıklık sisteminde daha görünür kılar. Örneğin CD20'yi hedefleyen Rituximab, büyüme sinyallerini bloke eder; EGFR'yi hedefleyen Cetuximab, yeni kan damarlarının oluşmasını engeller; VEGFR'yi hedefleyen Bevacizumab, kanser hücrelerine radyasyon salınımı yapar ve İtriyum 90 ile işaretlenen İbritumomabtiuxetan CD20'yi engeller (29) (1).

4. Hassas Tıp

Kişiselleştirilmiş tıp, genomik tıp, hedef spesifik tıp, genomun analizi ile bireysel biyolojik profilin karakterize edilmesi ve en iyi sağlık tedavisi sağlanmış hastalardan elde edilen medikal sonuçlar üzerine odaklanmayı hedef edinmiş çalışmalar bütünüdür. Hassas tıp genellikle hastalığa neden olan moleküler yolları kesin olarak hedefleyerek doğru hastaya doğru zamanda doğru ilacı sağlanması olarak tanımlanır. Hassas tıp, her bireyin çok faktörlü karakteristiği ile bağlantılıdır. Hassas tıbbın eşsiz bir özelliği, sadece

genomik tıbbıya bağlı olmamasının yanı sıra ayrıca bir hastanın yaşam tarzını, genomik olmayan biyolojik bilgileri, çevresel parametreleri ve diğer ilişkili verileri de içermesidir (2).

Hassas tıpta kullanılan yöntemlerden biri olan NGS, onkoloji alanında her bireyin kapsamlı genomik profilinin sunulmasını olanak veren başarılı bir tekniktir. Bu teknik, kanser hastaları için birçok avantaj sağlar. Örneğin, hastaya hedefe yönelik tedavi, genom bazlı kan testleri, biyobelirteçler ve diğer klinik uygulamalar gibi hastanın kişisel özelliğine dayanan spesifik tümör verilerinin belirlenmesini mümkün kılar. Gerçekleştirilen bir çalışmada, biri melanoma ve diğeri kolorektal kanserli olmak üzere iki hasta alınmıştır ve her ikisinin de tedavisinin başarısızlıkla sonuçlandığı gözlemlenmiştir. Kişilerin dizileme sonuçları belirlendikten ve genetik profillerini derinlemesine inceledikten sonra, melanom hastasının bir CDKN2C yapısal geninde yeniden düzenlemesi oluşan HRAS gen değişimine neden olduğu gösterilmiştir. Tümörün sahip olduğu dizi (STB), hasta için bir tedavi olarak PI3K ve MEK inhibitörleri kullanılmasını önermiştir. Kolorektal kanser hastasında dizileme sonuçları, gelecekte bir terapötik hedef olarak kullanılacak bir NRAS varyasyonu olan CDK8'i saptamıştır (30). Elde edilen sonuçlar gen ifadesi değişikliklerini, yapısal yeniden düzenlemeler, nokta mutasyonları ve kopya sayısı değişimleri gibi birçok mutasyon kategoriyi tespit etmiştir. Bulgular, klinik onkoloji, kanser genetiği, biyoinformatik, klinik patoloji, sosyal ve davranış bilimleri ve biyoetik alanlarında uzmanlar tarafından tartışılmıştır (31). Ek olarak, klinik uygulamada NGS kullanımının en başarılı uygulamalarından biri Washington Üniversitesi'nde gerçekleştirilmiştir ve akut yetişkin lenfoblastik lösemi (ALL) hastalığına odaklanan ekibin araştırmasında transkriptom dizileme ve tüm genom dizilemesi yapılarak umut veren sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, FLT3 geninin lösemi hücrelerinde oldukça aktif olduğunu göstermiştir (1). Gastrointestinal stomal tümörleri, renal hücre karsinomu ve pankreatik kanseri tedavi

etmek için antikanser ilaç Sunitinib geliştirilmesine katkı sağlamış ve FDA tarafından onaylanan bu ilacın, FLT3'ü inhibe ettiği belirlenmiştir. Sunitinib kullanımı sonrasında ise hastanın kanının normale döndüğü gözlemlenmiştir (32, 33).

5. Biyofarmasötikler

Antikanser ajanların en önde gelen sınıflarından biri, bir hedefe bağlanan ve konağın bağışıklık mekanizmalarını aktive eden ve kanser hücrelerinin ya tamamen lizis aracılığıyla ya da öldürücü hücreler yoluyla öldürülmesine yol açan monoklonal antikordur. Monoklonal antikordur, kanser hücresi üzerinde inaktif büyüme faktörü reseptörüne bağlanabilir, böylece hayatta kalma yollarını inhibe edebilir ve apoptozisi uyurabilir. Cetuximab, EGFR hedefli bir monoklonal antikordur, Erbitux iyi bilinen bir anti-EGFR antikordur, Rituximab, CD20'yi oluşturan kalsiyum kanalına bağlanarak B lenfositlerinin lizisine yol açar ve Trastuzumab HER2'ye bağlanmaktadır (1). Bu alanda NGS teknolojisi antikör kütüphanesinin üretilmesini mümkün kılar, çünkü NGS teknolojisi verileri antikör kütüphanesinde daha kesin bir analizi sağlayabilir (34). Ayrıca, NGS teknolojisi çok işlevli enzimlerle protein etkileşimlerini saptamak için kullanılabilir (35), böylece protein-protein etkileşimlerini ve antikör-antijen bağlanmasını çalışmak için yeni potansiyel yöntemler sağlar (34).

6. Polifarmakoloji

İlaç tasarım çalışmaları, bir ilacın tek bir hedef yerine, bir ilacın birçok hedefine dönüştürülmesi fikrini kapsar (36, 37). Polifarmakoloji'nin ilaç geliştirmede hala bazı sorunları mevcuttur. Bu teknik, spesifik bir hastalık yolağında birçok hedefi etkileyebilen veya birçok hastalık yolağına bağlı birden fazla hedefi etkileyen tek bir ilacı kullanabilmeyi içerir (38). Polifarmakoloji, mevcut ilaçların tanımlanamayan hedeflerini araştırmayı amaçlamaktadır (39, 40). NGS teknolojisinin önemi, spesifik hedefleme yaklaşımı kullanarak, ilacın etkinliğini arttırmak ve toksisitesini en aza indirmektir. Bunlara ilaveten, NGS, hedef

olarak kullanılabilir mutasyonları tespit edebilir ve polifarmakoloji birçok hedefi bulmayı amaçlar; bu nedenle de NGS ve polifarmakoloji birbirlerini tamamlarlar. NGS teknolojisi ligand bazlı ihtimaller, hedefe dayalı yaklaşımlar ve fenotip tabanlı ihtimaller dahil transkriptomik temelli yöntemler, proteomik tabanlı yaklaşımlar ve ilaç hedef tanımlaması için kullanılabilir (41).

7. Toksikogenetik

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların birçoğu toksiktir. Örneğin nefrotoksisite ve ototoksisiteye neden olan cisplatin; genotoksisiteye, fetotoksisiteye ve teratojeniteye neden olan temozolomid; ve doza bağımlı olan ve hepatotoksisiteye neden olan 6-merkaptopurin ciddi yan etkilere sebebiyet verir. Oluşan bu yan etkilerin araştırılması kanser tıbbi odaklı uygulamalarda toksikogenetik alanına yol açmıştır. Genellikle sistemik bir çalışma olarak tanımlanan toksikogenetikler, kanser önleyicilerin neden ve ilişkili olduğu genetik toksisite belirleyicileri üzerine çalışmalara odaklanmıştır (42).

NGS teknolojisi ile kanser önleyicilerin toksisitesini belirleme, toksisite nedenlerini belirleme ve toksikogenetik varyantları tespit etmeye olanak vermiştir. Ayrıca NGS teknolojisi ile her hastadaki genetik profile ve spesifik bir ilaca cevap verebilen insan sayısına göre toksisite düzeyini tahmin edilebilir. Toksikogenetikler, plazma ilaç konsantrasyonu profili ile toksisite seviyesi arasındaki ilişkiyi bulmayı ve tedavi için seçilmiş ilaç için etkin doz ayarlamasını her hasta için kişiselleştirilmiş bir tedavi planı oluşturarak yapmayı amaçlamaktadır (42).

8. Aşılma ile tedavi

NGS teknolojisi, bir aşılmanın verimliliğini ve güvenilirliğini değerlendirmek için kullanılabilir (43). NGS teknolojisi ile gerçekleştirilen çalışmaların sonuçlarının kesin sonuç vermesi ve her bir bireyde dizi varyantlarını saptama yeteneği nedeniyle oldukça etkin kullanım olanağı sağlamaktadır. NGS teknolojisi,

kişilerin aşılma ile tedavi sonrası oluşabilen yan etkileri belirlemek ve anlamak için daha fazla çözüm sağlayabilmektedir (34).

9. Farmakoepidemioloji

Farmakoepidemioloji ilaç tedavisinin popülasyonlar ve klinik uygulamalarda etkilerini ve farklılaşmalarını belirlemek amaçlı iş görür (44). NGS teknolojisi ilaç keşfinin yolunu açması nedeniyle başarıyla uygulanmaktadır (44). Epigenetiklerin iki önemli mekanizması DNA metilasyonu ve histon modifikasyonun belirlenmesinde NGS teknolojisi kullanılmıştır (45, 46, 47).

İnsan Genom Projesinin Haziran 2000'de tamamlanması ve gelecek nesil omik teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte, yeni bir tıp dönemi başlamıştır. Özellikle, NGS teknolojisinin kullanımı ile tümörlerin moleküler profillemesinin belirlenmesi ve hızlı olarak büyüyen bir alan olan hassas kanser ilacı (PCM) olarak adlandırılan kişiselleştirilmiş tedavilerin geliştirilmesinde etkili olmuştur (48). Ayrıca son yıllarda NGS teknolojisi ile yapılan birçok çalışma literatürde yer almaktadır. Neesveve ark. (2019)'da gerçekleştirdiği çalışmada, diğer tümörlerin mevcudiyetinde spesifik pankreas duktal adenokarsinomuna yönelik tedavi için kullanılabilir farklı moleküler alt tiplerin belirlenmesini amaçlayan tam genom dizileme çalışması ve transkripsiyonel profil analizi çalışması yapılmıştır (49). Elde edilen sonuçlarda KRAS, TP53, CDKN2A ve SMAD4 gibi bilinen mutasyonların yanı sıra, çekirdek sinyal yollarında ve hücresel işlemlerde birleşen, tekrarlayan mutasyona uğramış veya farklı transkripsiyona uğramış çok sayıda gen belirlenmiştir. Ayrıca, genom çapında transpozon taraması ve kantitatif karakter lokus (QTL) dizilemesi, diğer yöntemlerle ortaya çıkarılması zor olan kanserlerin belirlenmesi için güçlü ve yeni bir araç haline gelmiştir. Yine, bu çalışmalar PDA'nın farklı moleküler yapıya sahip çok sayıda alt gruptan oluşan oldukça heterojen ve genetik olarak çeşitli bir hastalık olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, 73 örnekten ekzom dizisi tanımlanmış, Mismatch-

repair (MMR) eksikliği olan örneklerde çok önemli bir fark olarak tümör başına 1782 somatik mutasyon keşfedilmiştir. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), histotipine bakılmaksızın, kararsız veya metastatik mikrosatellit dengesizliği yüksek ve MMR eksikliği olan katı tümörlere sahip hastalar için ikinci basamak bir ajan olarak anti-PD-L1 ilaç pembrolizumab'a hızlandırılmış olarak onay vermiştir (49).

Galanina et al. (2018) eşleşmiş hedefe yönelik tedavinin birçok hematolojik malignitede de etkili olduğunu gösteren bir çalışma gerçekleştirmişlerdir (50). Örneğin, kronik miyelojenöz lösemi (CML), eşleşmiş hedefli terapi ile dönüştürülen bir hastalığın göstergesi olduğunu belirlemişlerdir. CML'nin belirleyici özelliği olan aberrant BCR-ABL1 kinazın enzimatik aktivitesini inhibe eden imatinib mesilat, normal yaşam süresine yakın bir şekilde genel hayatta kalma süresini uzatmış olduğu tespit edilmiştir (50). Tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI) CML'deki kesin etkinliğine rağmen, uygulamada değişiklik gösteren,

rasyonel olarak geliştirilen, hedeflenen ajanlar bu tür birçok lenfoid ve miyeloid kanserin tedavisinde yaygın olarak uygulanmamıştır. Hematolojik malignitelerin genomik düzeyde aydınlatılması, temel moleküler değişiklikleri açıklığa kavuşturmaya yardımcı olabileceği ve potansiyel olarak tedavi seçimini sağlayabileceğini belirlemiştir (50).

SONUÇ

Yeni nesil dizilemenin ileri ilaç araştırmaların temel taşı olduğu yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. NGS teknolojisi ile test sonuçlarının kısa zamanda ve doğruluk oranını artırılarak, yeni terapötik stratejilerin dizaynı kanser tedavisi sonucu oluşan profili daha iyiye taşımak, sonuçlarını iyileştirmek ve mümkün olduğunca daha çok hayat kurtarmak için kullanılabilirliği sağlamayı mümkün kılan bir teknoloji olarak, kanser tedavisinde önemli bir yer almaya başlamıştır.

KAYNAKLAR

1. Nawab DH. The Pharmaceutical Applications of Next Generation Sequencing in Oncology Drug Designing and Development. *J Next Generat Seq Applic*, 2015; 2:1.
2. Servant N, Roméjon J, Gestraud P, La Rosa P, Lucotte G, et al. Bioinformatics for precision medicine in oncology: principles and application to the SHIVA clinical trial. *Front Genet*, 2014; 5: 152.
3. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. 2nd ed. New York: Garland Science, 2013.
4. Neidle S. *Cancer Drug Design and Discovery*. 2nd ed. London: Elsevier Inc, 2013.
5. Wu W, Choudhry H. *Next Generation Sequencing in Cancer Research*. 1nd ed. New York: Springer, 2013.
6. Yamamoto T, Kanaya N, Somlo G, Chen S. Synergistic anti-cancer activity of CDK4/6 inhibitor palbociclib and dual mTOR kinase inhibitor MLN0128 in pRb-expressing ER-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2019 Jan 3. doi: 10.1007/s10549-018-05104-9.
7. Roshanravan N, Asgharian P, Dariushnejad H, MesriAlamdari N, Mansoori B, Mohammadi A, et al. Eryngium Billardieri Induces Apoptosis via Bax Gene Expression in Pancreatic Cancer Cells. *Adv Pharm Bull*, 2018 Nov; 8 (4): 667-674.
8. Kilic N, Aras S, Cansaran-Duman D. Determination of Vulpinic Acid Effect on Apoptosis and mRNA Expression Levels in Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018 Sep 2. doi: 10.2174/1871520618666180903101803.
9. Ezpeleta NR, Hackenberg M, Aransay AM. *Bioinformatics for High Throughput Sequencing*. 1 ed. New York: Springer, 2012.
10. Tanman-Zıplar Ü, Duman DC, Türkteş M. Genomic and Transcriptomic Sequencing and Analysis Approaches. *MBSJHS*, 2018; 4(1): 34-42
11. Ozretia L, Heukamp LC, Odenthal M, Buettner R. The role of molecular diagnostics in cancer diagnosis and treatment. *Onkologie*, 2012; 35 (1): 8-12.
12. Guan YF, Li GR, Wang RJ, Yi YT, Yang L, et al. Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chin J Cancer*, 2012; 31: 463-70.
13. Cronin M, Ross JS. Comprehensive next-generation cancer genome sequencing in the era of targeted therapy and personalized oncology. *Biomark Med*, 2011; 5: 293-305.
14. <http://www.cancer.org/treatment/understandingyourdiagnosis/examsandtestdescriptions/tumormarkers/#>.
15. Gates RA, Regina MF. *Oncology Nursing Secrets*. 3rd ed. Elsevier Science, 2008.
16. Wu JT. *Circulating Tumor Markers of the New Millennium: Target Therapy, Early Detection, and Prognosis*, Clinical chemistry. 1st ed. Washington: Amer Assn for Clinical Chemistry, 2002.
17. Wu JT. Review of circulating tumor markers: from enzyme, carcinoembryonic protein to oncogene and suppressor gene. *Ann Clin Lab Sci*, 1999; 29: 106-111.
18. Nishant T, Bindu HK, Kumar SD, Kumar AR. Pharmacogenomics-Personalized Treatment of Cancer, Diabetes and Cardiovascular Diseases. *J Pharmacogenom Pharmacoproteomics*, 2012; 3: 107.
19. Lee A, Ezzeldin H, Fourie J, Diasio R. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: impact of pharmacogenetics on 5-fluorouracil therapy. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2004; 2: 527-32.
20. Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem*, 1987; 56: 779-827.

21. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, 1998; 17: 1395-1413.
22. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, et al. Cancer genome landscapes. *Science*, 2013; 339: 1546-58.
23. <http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>.
24. Patel MN, Halling-Brown MD, Tym JE, Workman P, Al-Lazikani B. Objective assessment of cancer genes for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2013; 12: 35-50.
25. Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov*, 2002; 1: 727-30.
26. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, 2006; 5: 993-96.
27. McLeod HL. Cancer pharmacogenomics: early promise, but concerted effort needed. *Science*, 2013; 339: 1563-6.
28. Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, Farooqi AA, Lombardi A, et al. Mir34: a new weapon against cancer? *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014; 3: 194.
29. Cohen V. *Basic Concepts in Pharmacology: What You Need to Know for Each Drug Class*, 4th ed. *Ann Pharmacother*, 2012.
30. Roychowdhury S, Iyer MK, Robinson DR, Lonigro RJ, Wu YM, et al. Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: a pilot study. *Sci Transl Med*, 2011; 3: 111-121.
31. Corless CL. *Medicine. Personalized cancer diagnostics*. *Science*, 2011; 334: 1217-1218.
32. Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, Deribe YL, Lawrence MS, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature*, 2012; 485: 502-6.
33. Beltran H, Yelensky R, Frampton GM, Park K, Downing SR, et al. Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity. *Eur Urol*, 2013; 63: 920-6.
34. Woollard PM, Mehta NA, Vamathevan JJ, Van Horn S, Bonde BK, et al. The application of next-generation sequencing technologies to drug discovery and development. *Drug Discov Today*, 2011; 16: 512-9.
35. Di Niro R, Sulic AM, Mignone F, D'Angelo S, Bordoni R, et al. Rapid interactome profiling by massive sequencing. *Nucleic Acids Res*, 2010; 38: 110.
36. Simon Z, Peragovics A, Vigh-Smeller M, Csukly G, Tombor L, et al. Drug effect prediction by polypharmacology-based interaction profiling. *J Chem Inf Model*, 2012; 52: 134-45.
37. Brianso F, Carrascosa MC, Oprea TI, Mestres J. Cross-pharmacology analysis of G protein-coupled receptors. *Curr Top Med Chem*, 2011; 11: 1956-63.
38. Reddy AS, Zhang S. Polypharmacology: drug discovery for the future. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2013; 6: 41-7.
39. Oprea TI, Mestres J. Drug repurposing: far beyond new targets for old drugs. *AAPS J*, 2012; 14: 759-63.
40. Oprea TI, Nielsen SK, Ursu O, Yang JJ, Taboureau O, et al. Associating Drugs, Targets and Clinical Outcomes into an Integrated Network Affords a New Platform for Computer-Aided Drug Repurposing. *Mol Inform*, 2011; 30: 100-111.
41. Tang J, Aittokallio T. Network pharmacology strategies toward multitarget anticancer therapies: from computational models to experimental design principles. *Curr Pharm Des*, 2014; 20: 23-36.
42. Church D, Kerr R, Domingo E, Rosmarin D, Palles C, et al. 'Toxgnostics': an unmet need in cancer medicine. *Nat Rev Cancer*, 2014; 14: 440-5.

43. Victoria JG, Wang C, Jones MS, Jaing C, McLoughlin K, et al. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J Virol*, 2010; 84: 6033-60.
44. Freedman AN, Sansbury LB, Figg WD, Potosky AL, Weiss Smith SR, et al. Cancer pharmacogenomics and pharmacoepidemiology: setting a research agenda to accelerate translation. *J Natl Cancer Inst*, 2010; 102: 1698-1705.
45. Grützmann R, Molnar B, Pilarsky C, Habermann JK, Schlag PM, et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS One*, 2008; 3: 3759.
46. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*, 2011; 146: 904-917.
47. Kaiser J. Epigenetic drugs take on cancer. *Science*, 2010; 330: 576-8.
48. Dammacco F, Silvestris F. Chapter 1 - From the Double Helix to Oncogenomics and Precision Cancer Medicine: An Evolving Story. *Oncogenomics*, 2019; 3-16.
49. Neesse A, C.A.B., Öhlund D, Lauth M, Buchholz M, Michl P, Tuveson DA, Gress TM. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: ready for clinical translation? *BMJ Journals*, 2019; 68 (1): 159-171.
50. Galanina N et al. Comprehensive Genomic Profiling Reveals Diverse but Actionable Molecular Portfolios across Hematologic Malignancies: Implications for Next Generation Clinical Trials. *Cancers (Basel)*, 2018; 11(1).