

# **Жидкостная биопсия как полноценная альтернатива гистологическому исследованию – возможно ли это?**

Демидова И.А.  
Лаборатория молекулярной биологии  
ГБУЗ «МГОБ 62 ДЗМ»

## **Современные рекомендации по диагностике НМРЛ**

### **Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors**

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

Neal I. Lindeman, MD; Philip T. Cagle, MD; Mary Beth Beasley, MD; Dhananjay Arun Chitale, MD; Sanja Dacic, MD, PhD;  
Giuseppe Giaccone, MD, PhD; Robert Brian Jenkins, MD, PhD; David J. Kwiatkowski, MD, PhD; Juan-Sebastian Saldivar, MD;  
Jeremy Squire, PhD; Erik Thunnissen, MD, PhD; Marc Ladanyi, MD

### **Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer**

K. M. Kerr<sup>1</sup>\*, L. Bubendorf<sup>2</sup>, M. J. Edelman<sup>3</sup>, A. Marchetti<sup>4</sup>, T. Mok<sup>5</sup>, S. Novello<sup>6</sup>, K. O'Byrne<sup>7,8</sup>,  
R. Stahe<sup>9</sup>, S. Peters<sup>10</sup>, E. Felip<sup>11</sup> & Panel Members<sup>\*,†</sup>

### **Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens From Patients With Non-Small Cell Carcinoma of the Lung**

Philip T. Cagle, MD; Lynette M. Sholl, MD; Neal I. Lindeman, MD; Randa Alkabej, MD; Dimitrios X. C. Dvaris, MB, ChB;  
Philip Foulis, MD, MPh; Gemma Lee, BSc, MPh; Joel W. Neal, MD, PhD; Jin A. Nowak, PhD, MD; Peter P. Yu, MD; for the  
Members of the Cancer Biomarker Reporting Workgroup, College of American Pathologists

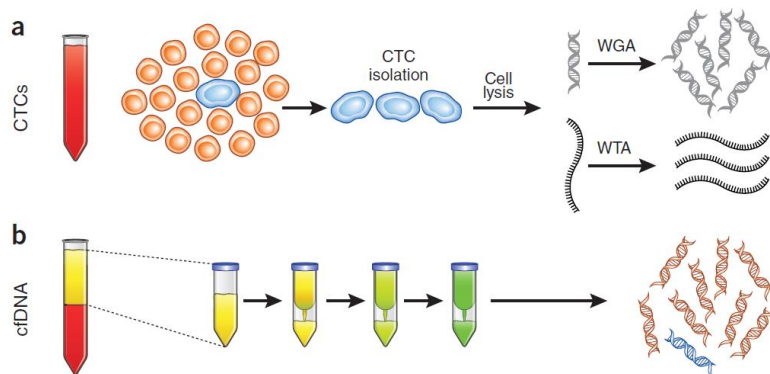
**Общепринятый  
валидированный  
стандарт -  
тканевая биопсия**

Lindeman NI et al JTO 2013  
Kerr KM et al Ann Oncol 2014  
Cagle PT et al Arch Pathol Lab Med 2014

## *Но будем справедливы: достоинства жидкостной биопсии неоспоримы*

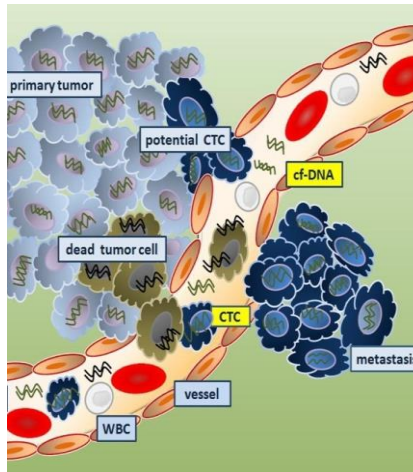
- Легкость и безопасность получения материала
- Безопасное повторение процедуры – возможность мониторинга
- Большая сохранность ДНК, не подвергнутой «формалиновому шоку»

## Что такое «жидкие биопсии»?



Speicher M R, Pantel K. Tumor signatures in the blood. Nature biotechnology, 2014, 32(5): 441-443.

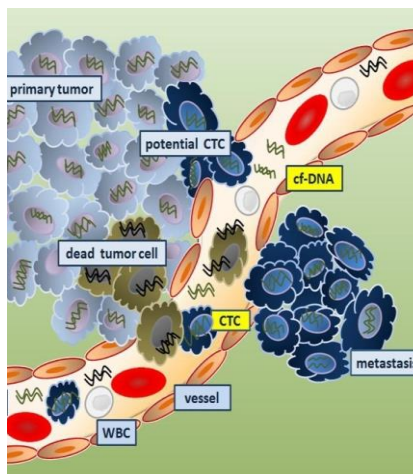
## Циркулирующие опухолевые клетки и внеклеточная циркулирующая опухолевая ДНК (ctDNA)



- Циркулирующие опухолевые клетки попадают в кровотоки как из первичной опухоли, так и из метастазов, однако факторы, определяющие их способность к проникновению и метастатический потенциал до конца не известны
- Срок жизни их очень короток – у радикально оперированных пациентов они исчезают из кровотока в течение 24 часов
- У больных с метастатической формой болезни определяется до 10 клеток/мл (для сравнения – лейкоцитов –  $10^6$ /мл)
- Методики выделения дороги и трудоемки, арсенал генетических исследований – практически любой

Haber et Velculescu, Cancer Discovery 2014, Elshimali Y et al *Int. J. Mol. Sci.* 2013

## Циркулирующие опухолевые клетки и внеклеточная циркулирующая опухолевая ДНК (ctDNA)

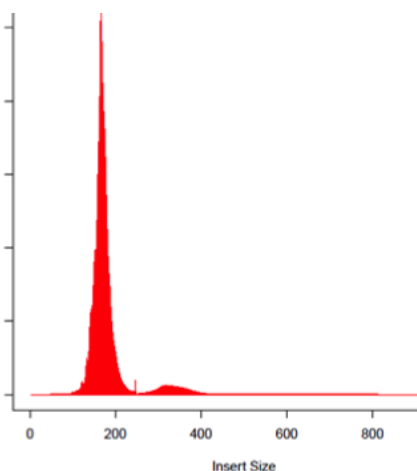


- Количество внеклеточной циркулирующей ДНК у онкологических пациентов в среднем в 3 раза превышает количество таковой у здоровых людей (0,5-1600 ng/ml), причем до 10% она представлена циркулирующей опухолевой ДНК, возможно происходящей как из первичной опухоли, так и из метастазов или циркулирующих опухолевых клеток.
- Срок жизни ctDNA невелик, не до конца понятны закономерности увеличения/снижения ее концентрации

Diehl F et al *Nat Med* 2008, Elshimali Y et al *Int. J. Mol. Sci.* 2013

Циркулирующие опухолевые клетки vs циркулирующая опухолевая ДНК		
	Преимущества	недостатки
<b>ЦОК</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Возможность морфологической идентификации опухолевых клеток</li> <li>• Позволяет выполнять исследования <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>, в том числе – получать ксенографты</li> <li>• Возможно проведение всех молекулярных исследований</li> <li>• Возможно любое иммунное окрашивание</li> <li>• Так же как и ctDNA коррелируют с метастазированием и ответом на терапию</li> <li>• Может использоваться для навигации терапии</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Крайняя немногочисленность и хрупкость</li> <li>• Требуется весьма чувствительных и дорогостоящих методик выделения</li> <li>• Ложно негативная (за счет эпителиально-мезенхимальной транзиции) и ложно позитивная селекция</li> <li>• Гетерогенность популяции</li> <li>• Предпочтительный метод выделения не определен</li> </ul>
<b>цоДНК</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Более чувствительна в определении опухолевой массы</li> <li>• Так же как и ЦОК коррелируют с метастазированием и ответом на терапию</li> <li>• Потенциально может служить субстратом для определения маркеров резистентности к терапии</li> <li>• Может использоваться для навигации</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ложно позитивные и ложно негативные результаты (крайне малое количество именно цоДНК, обнаружение мутаций в здоровых тканях пожилых людей или тканях доброкачественных опухолей)</li> <li>• Функциональные методы невозможны</li> <li>• Невозможна стандартизация преаналитической фазы (степень контаминации ДНК здоровых</li> </ul>

## Феномен циркулирующей внеклеточной ДНК( cfDNA)



- Хорошо известен
- Характерен для > чем 90% здоровых индивидуумов (около 25 ng/ml cfDNA – от 10 до 1500ng)
- Представляет из себя значительно фрагментированную клеточную ДНК ( размер 160-180 п.н.), соответствующую апоптотической ДНК, циркулирующей в виде нуклеосом
- Количество существенно возрастает при воспалении, повреждении тканей, физической нагрузке, беременности и т.д.

Haber et Velculescu, Cancer Discovery 2014, <http://www.swiftbiosci.com/applications/cfDNA>

## цодНК у больных злокачественными опухолями

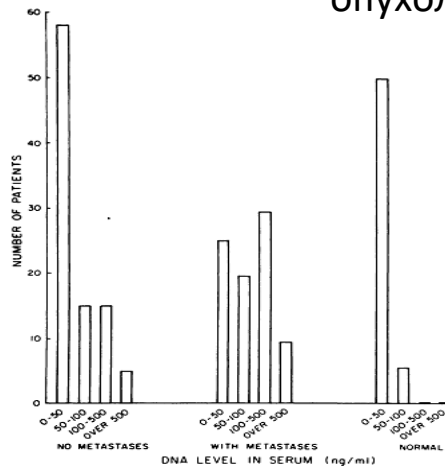
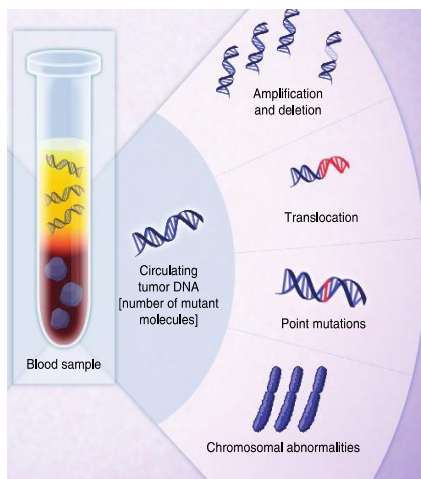


Chart 2. DNA levels in metastatic and nonmetastatic patients, compared to normal controls. The highest concentration in each group ranged between 500 and 5000 ng/ml.

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MI. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res 1977; 37: 646-650

- Почти у 95% здоровых людей цдНК определяется в крайне малых количествах – менее 50 ng/ml
- У больных без метастазов – такие же низкие концентрации определяются в 70% случаев
- При метастатическом процессе - в 70% случаев эти цифры превышают 50 ng/ml, более того - в 50% случаев они находятся в пределах 100-5000ng/ml

## цодDNA – привлекательный источник для исследований в онкологии



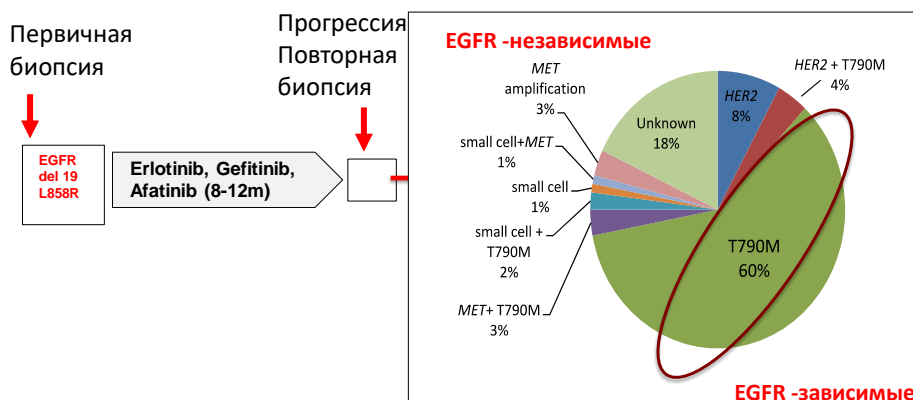
- Неинвазивная методика пригодная для:
- Ранней диагностики
- Определения риска прогрессии у радикально пролеченных пациентов
- Мониторинга эффективности и выбора терапии у пациентов с распространенным заболеванием
- Определения механизмов резистентности и поиска способов их преодоления у пациентов с рефрактерными опухолями

Haber et Velculescu, Cancer Discovery 2014

Может ли жидкая биопсия полностью заменить тканевую при первичном диагнозе?

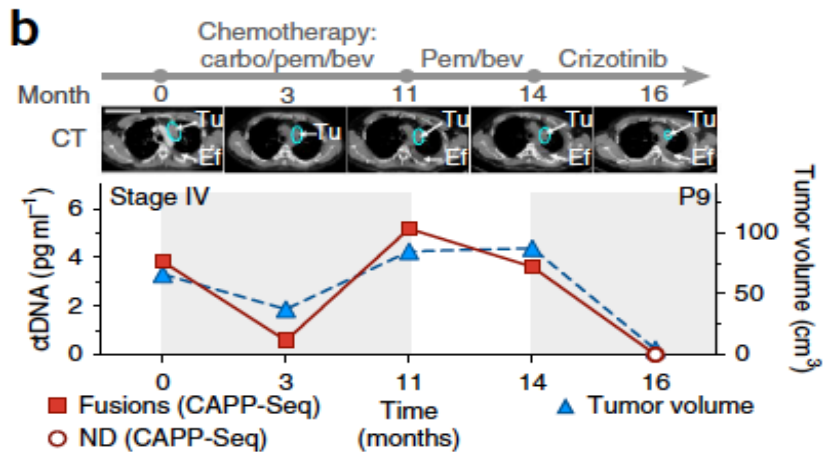
- Увы. Пока нет
- Но она может быть применена для пациентов с недостаточным материалом
- Тяжелым общим статусом
- Недоступностью взятия материала по анатомическим причинам

Наиболее важная область применения – определение причин резистентности у пациентов на таргетной терапии



Yu et al., Clin Cancer Res 2013

## Привлекательная функция – мониторинг МРД

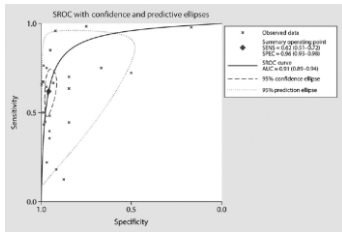


Chaudari A. ASCO 2017, Cancer Discovery 2017

### *Но проблемы, увы, никто не отменял*

- Чувствительность используемого метода
- Низкая аллельная частота исследуемых мутаций
- Обдуманый выбор пациентов для исследования
- Получение и правильная первичная обработка образцов
- Правильная оценка биомаркера – насколько он специфичен для данной патологии?

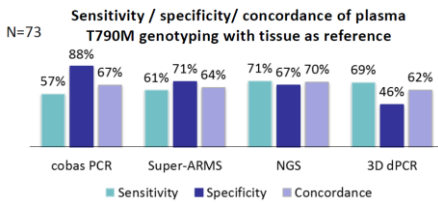
## Вернемся к тем генам, которые важны для НМРЛ : EGFR в первую очередь



Чувствительность. Данные метаанализа  
27 исследований 3110 больных  
**Чувствительность 62%**

ASSESS: проспективное генотипирование активирующих мутаций EGFR (1162 patients; 56 centres)

**Средняя чувствительность 46%** (range 15.8% - 68.4%).



Qui M et al. Can Epid Biomark Rev 2015; Reck M et al JTO 2016; 11, 1682; Zhang X-C et al. MA 06.09 WCLC 2017

## Возможно, необходимо использование более чувствительных методик?

### Digital droplet PCR

EGFR ex19del (new dx)	86%	
EGFR L858R(new dx)	69%	
KRAS (new dx)	64%	
EGFR T790M (relapse)	77%	(Specificity 63%)

### NGS-based assay

Multiple tumour types and targets  
85% sensitivity

### Range of data

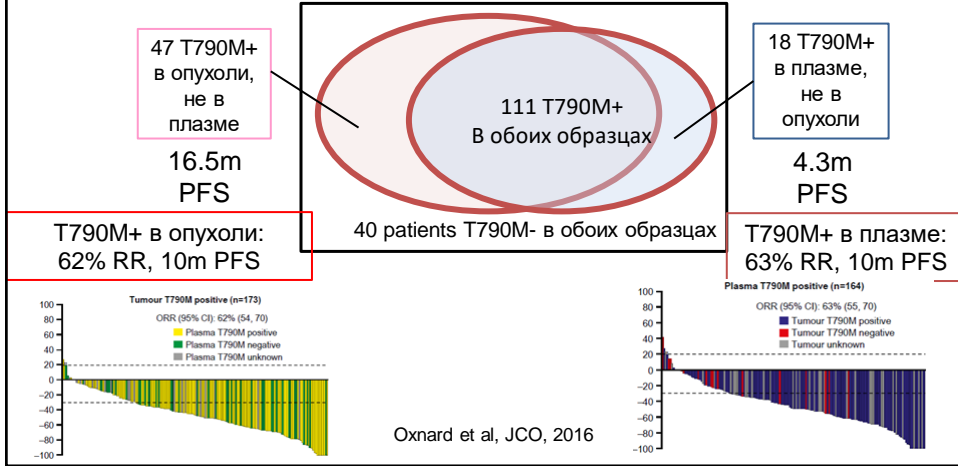
Newer studies (2015-17)  
50-100% (mutation dependant)

Sacher AG et al. JAMA Oncol 2016; 2,1014, Lanman RB et al. PLoS One 2015; 10, e0140712, Sacher AG et al. JTO 2017; 12,



## И чем это нам грозит?

Плазма пациентов из исследования AURA была исследована цифровым ПЦР (216 парных образцов – опухоль и плазма)



## Параллельные исследования

Валидационные исследования на 180 образцах с известным генотипом показали

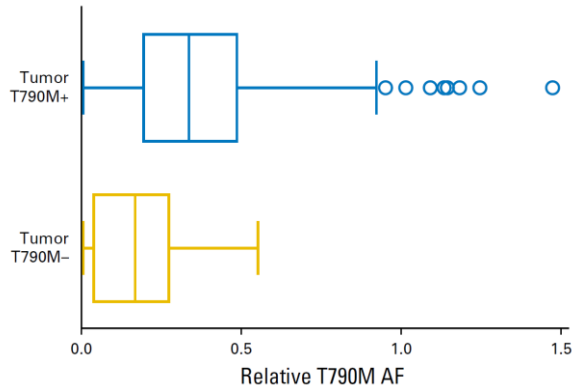
- Выраженная вариация концентрации мутантной ДНК
- 100% специфичность для мутаций-двигателей онкогенеза (0 FPR, 100% PPR)
- 63% специфичность для T790M
- Почему такие различия?



Sacher et al, JAMA Onc, 2016

## Тем более концентрация мутантной ДНК в плазме существенно меньше, чем в ткани

Данные уже упомянутого исследования AURA  
(216 пациентов с образцами опухоли и плазмы)



Oxnard et al, JCO, 2016

## А для T790M очень характерен аллельный дисбаланс

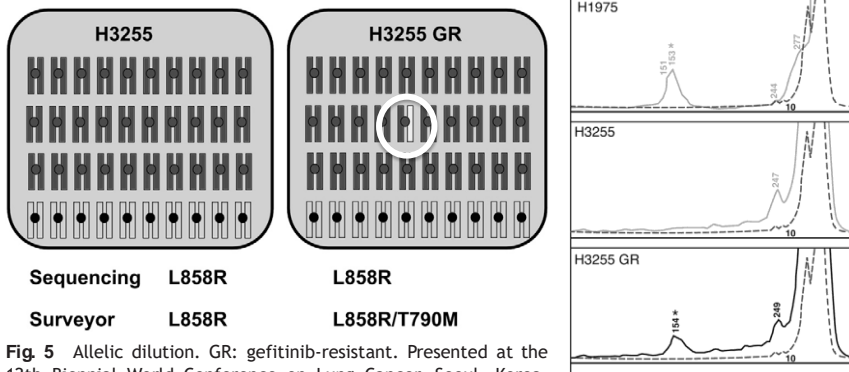
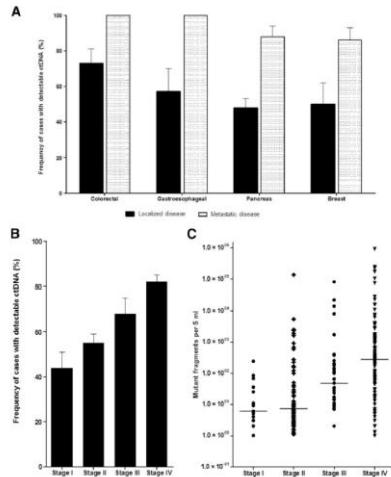


Fig. 5 Allelic dilution. GR: gefitinib-resistant. Presented at the 12th Biennial World Conference on Lung Cancer, Seoul, Korea, 2007. Reproduced with permission of author (Pasi A Jänne).

Janne et al Lung Cancer 2008 (Suppl2) S3-S9

## Ложнонегативные случаи – как быть?



- Прямая зависимость количества цодНК от стадии IIB –IVB
- При более ранних стадиях – шанс выявления цодНК ничтожен
- Оптимум – тканевая биопсия

Bettegowda C et al Sci Trans Med 2014

## Ложнонегативные случаи – как быть?

- Сложные нарушения генотипа
- Взятие пробы на фоне или после ХТ
- Появление новых aberrаций, связанных с другой онкопатологией
- Выход – тканевая биопсия

Oxnard et al WCLC 2017

## Ложнопозитивные случаи – как быть?

- Необходима адекватная валидация метода:
  - 57-летний больной азиатской расы, НМРЛ, плазма отправлена на анализ

**SUMMARY:**  
EGFR Mutations (Del19, L858R, T790M):

Alteration	Result	Percent Mutant Allele	Mutant Copy Number
T790M	Detected	0.2% mutation frequency of T790M over EGFR wild-type.	1
L858R	Not Detected	N/A	N/A
Del19	Detected	7.6% mutation frequency of Del19 over EGFR wild-type.	65

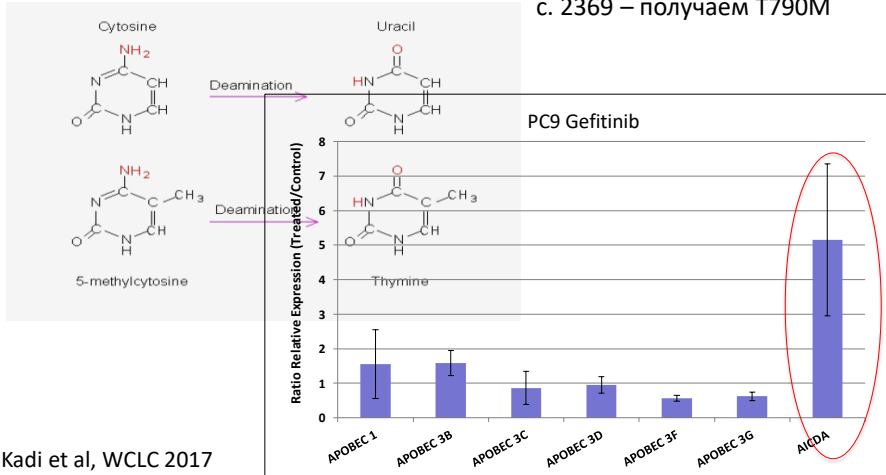
- Полный ответ на эрлотиниб ~12м, биопсия - T790M-neg (?)
- Низкий уровень T790M при первичном обследовании оказался артефактом
- Скорее всего аллельная частота T790M < 0.5-1% - артефакт, требующий более тщательной калибровки метода

Oxnard et al WCLC 2017

## Причина – деаминация цитозина, вызванная активацией ферментов

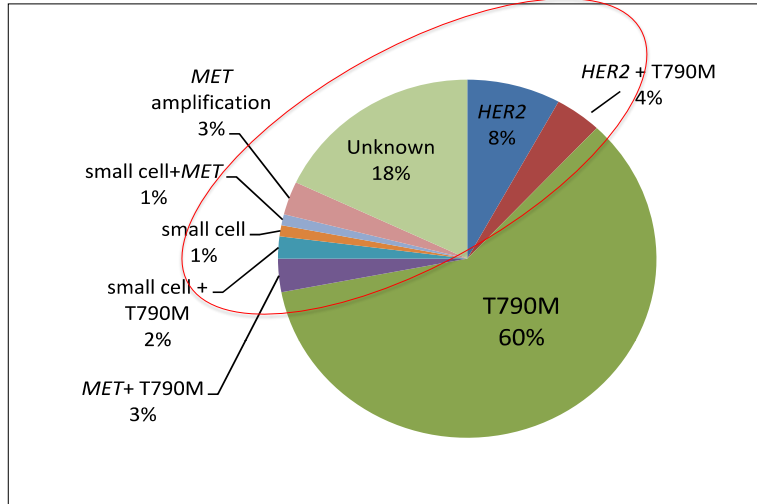
### Cytosine Deamination

AICDA деаминирует цитозин в с. 2369 – получаем T790M



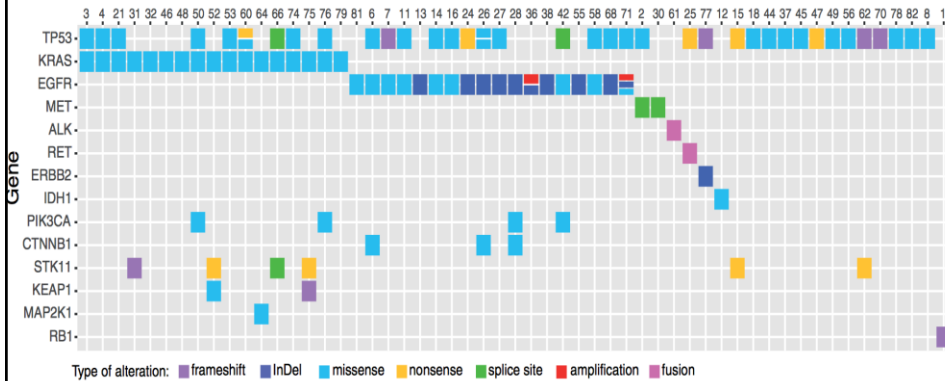
Kadi et al, WCLC 2017

Однако – у 40% пациентов резистентность определяется другими причинами, не связанными с T790M



Wolf et al WCLC 2017

## Мы можем многое с помощью NGS

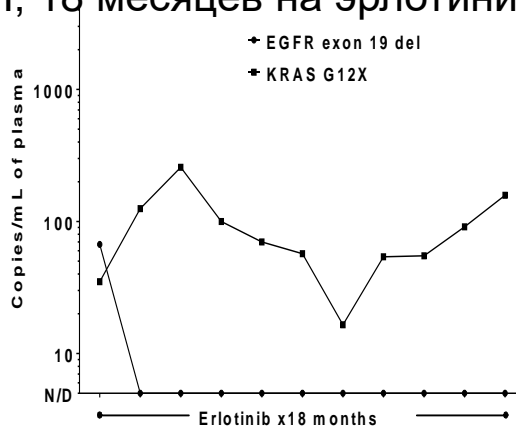


Но всегда ли при этом мы можем помочь больному?  
 Что делать с гетерогенностью опухоли?  
 Всегда ли мы видим ДНК, принадлежащую одной опухоли?

Müller, JTO 2017- NEOliquid assay

## Появление неожиданных мутаций

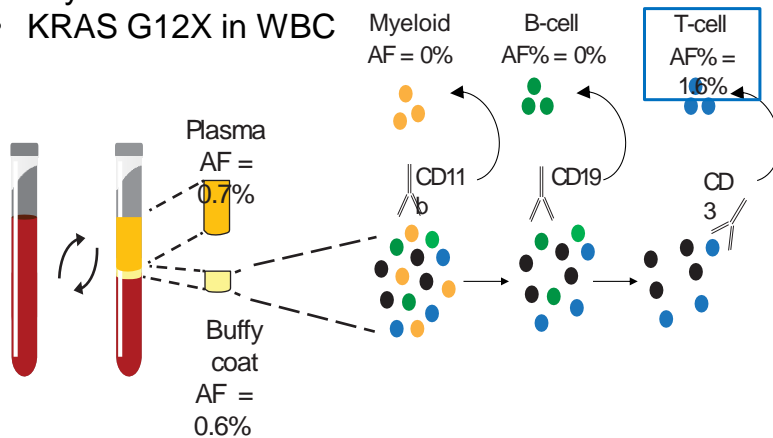
- 80 летняя женщина с *EGFR*-mutant НМРЛ, 18 месяцев на эрлотинибе



Kerr et al WCLC 2017

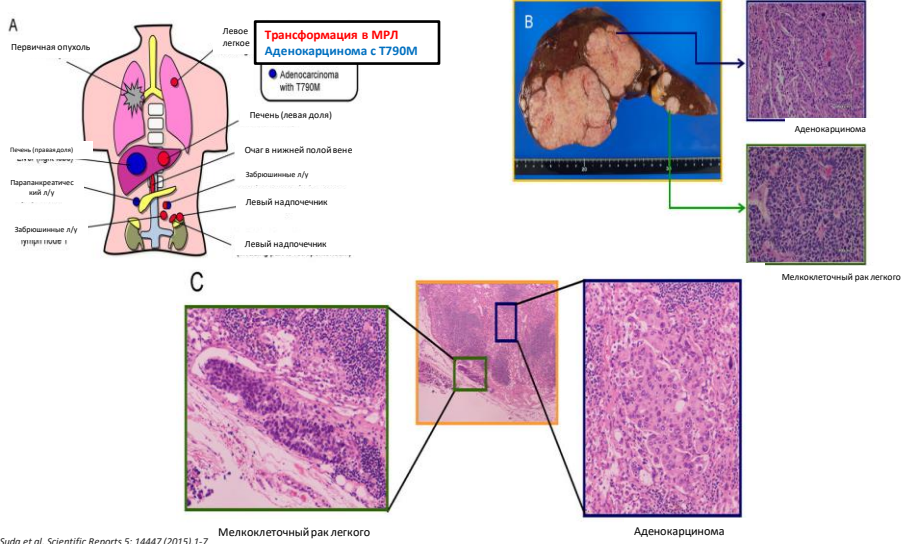
## Появление неожиданных мутаций

- 80 летняя женщина с *EGFR*-mutant НМРЛ, 18 месяцев на эрлотинибе без признаков колоректального рака или другой оккультной опухоли на PET
- KRAS G12X in WBC



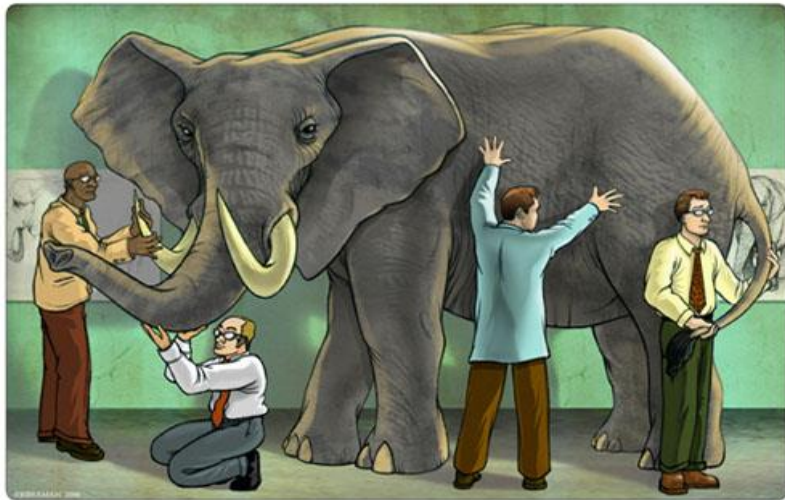
Kerr et al WCLC 2017

**Гетерогенность очагов опухоли у пациента НМРЛ с приобретенной резистентностью – клинический случай**



Suda et al, Scientific Reports 5: 14447 (2015),1-7  
 МРЛ- мелкоклеточный рак легкого

**Что мы видим с помощью обычной биопсии?**



H.Wekelee et al WCLC 2017

Что мы видим с помощью  
многонаправленной жидкой биопсии?



Из собственного архива Демидовой И.А.

## Что же делать?

- Если есть возможность взять повторно тканевую биопсию – это нужно сделать
- Жидкая биопсия – приемлемая замена тканевой, но не в 100% случаев
- Нам необходимо больше данных, больше исследований
- И все же тканевая биопсия пока основа основ –tissue is the issue!



Спасибо за внимание!