

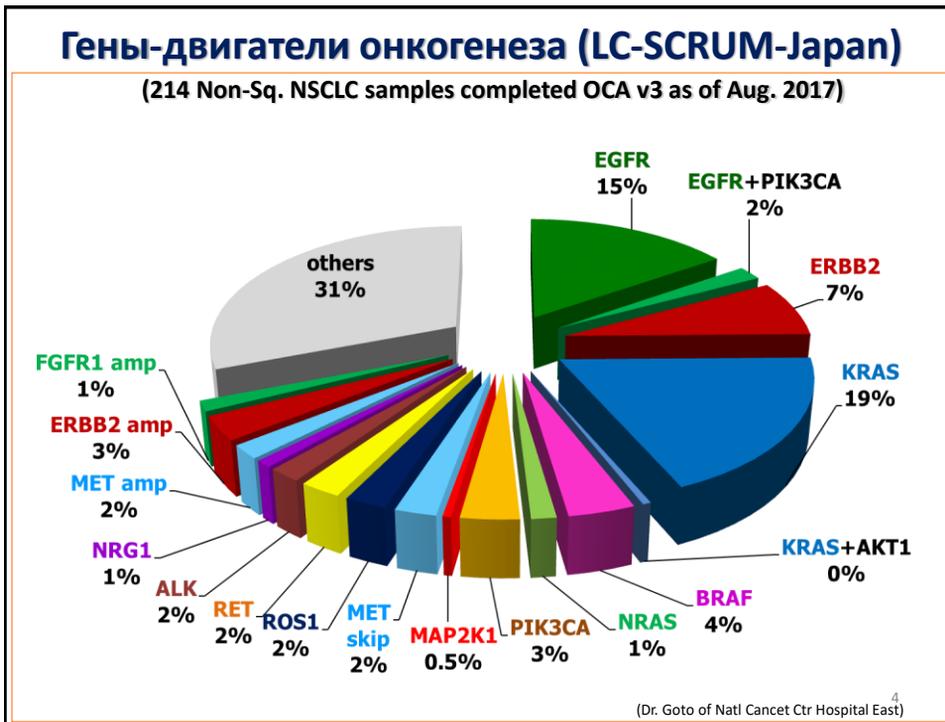
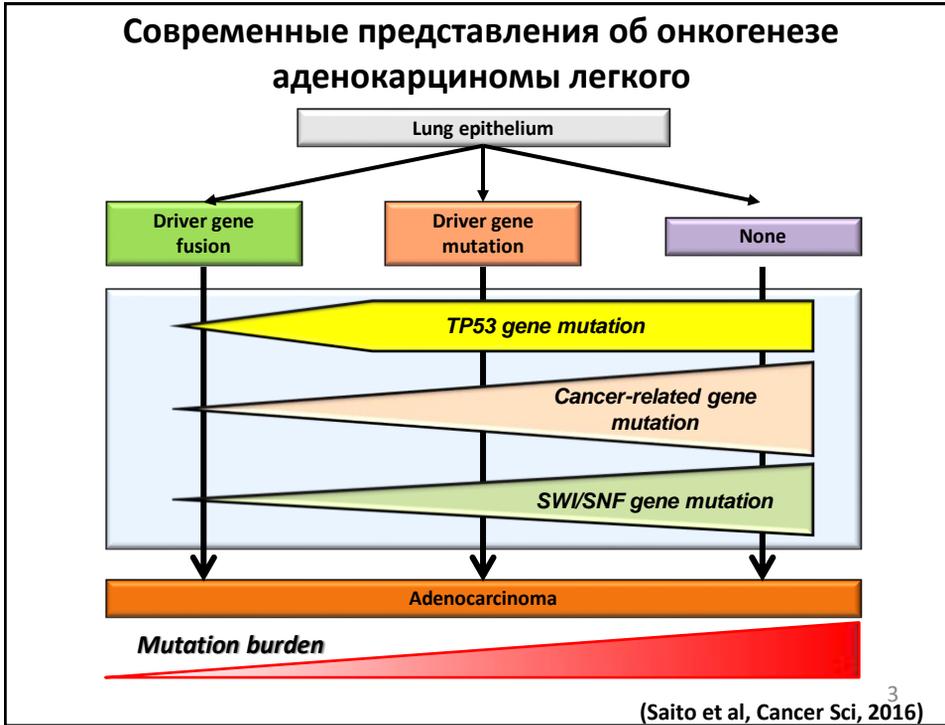
Клинически значимые мутации и  
рациональные алгоритмы их поиска при  
НМРЛ

Демидова И.А.

Лаборатория молекулярной биологии  
ГБУЗ «МГОБ 62 ДЗМ»

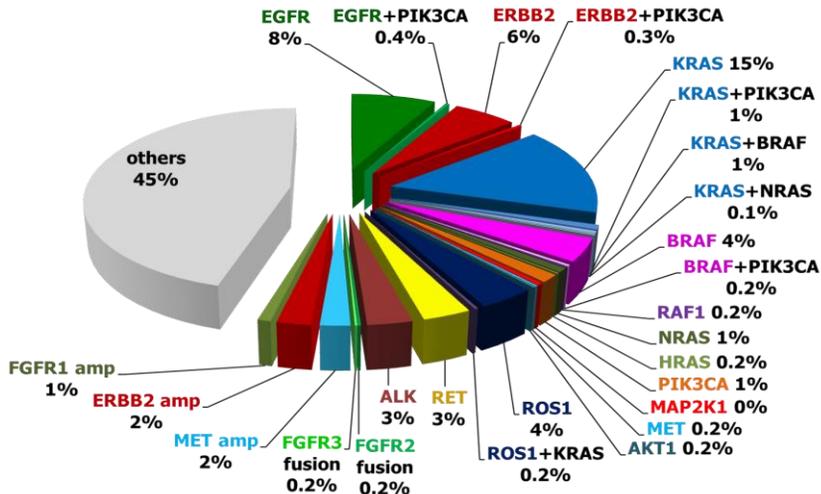
Генетический анализ как конкурент  
морфологии?

- Что первично и что вторично?
- И можем ли мы самонадеянно считать морфологию пережитком прошлого?
- Безусловно, нет.
- Только сочетание накопленных знаний может обеспечить нам адекватный анализ структуры опухоли и попытаться прийти, наконец, к той самой прецизионной терапии, о которой так много говорят



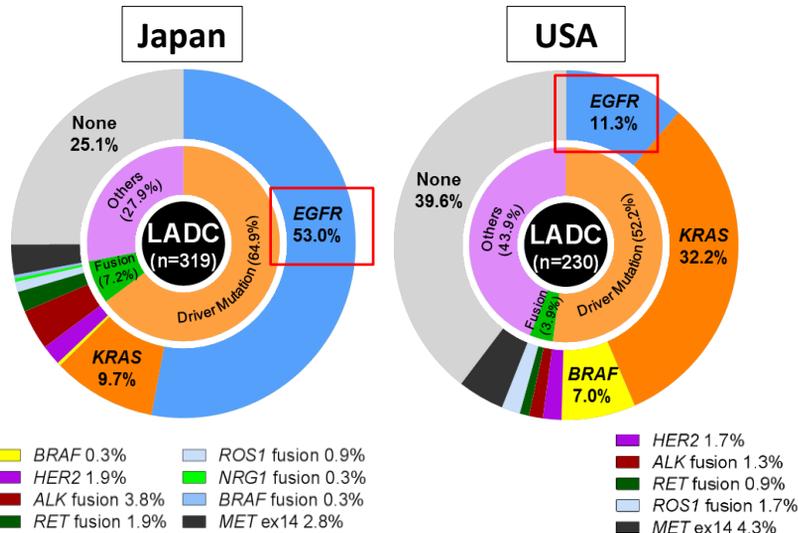
## Сочетание генов-драйверов онкогегеза (LC-SCRUM-Japan)

(1688 Non-Sq. NSCLC samples completed OCP as of Apr. 2017)



(Dr. Goto of Natl Cancer Ctr Hospital East)

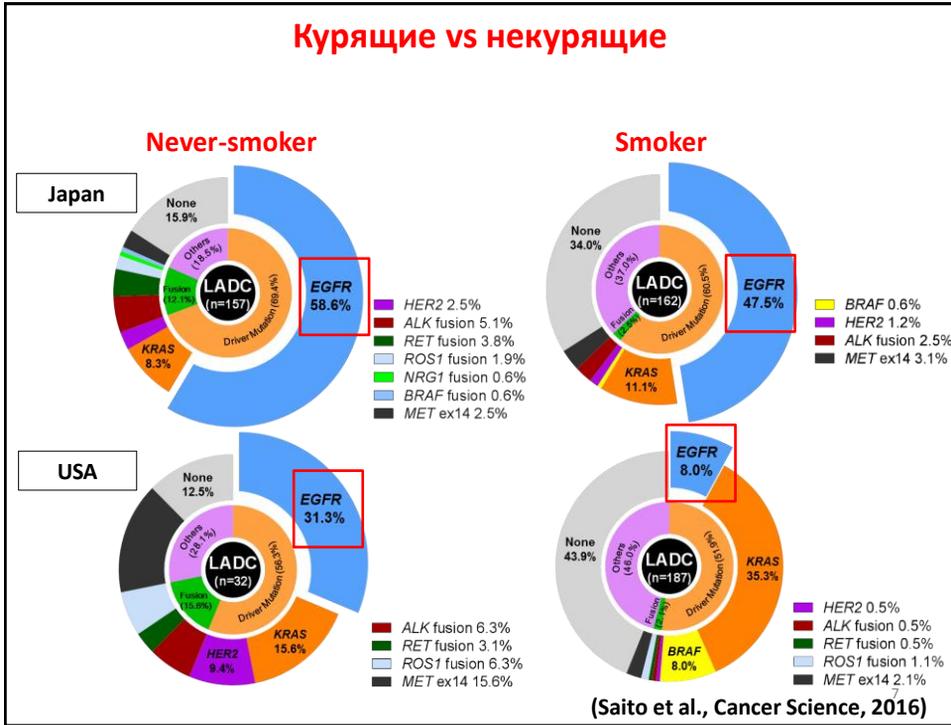
## Япония vs США (аденокарцинома)



NCC\_Surgical specimens

USA (TCGA)\_Surgical specimens

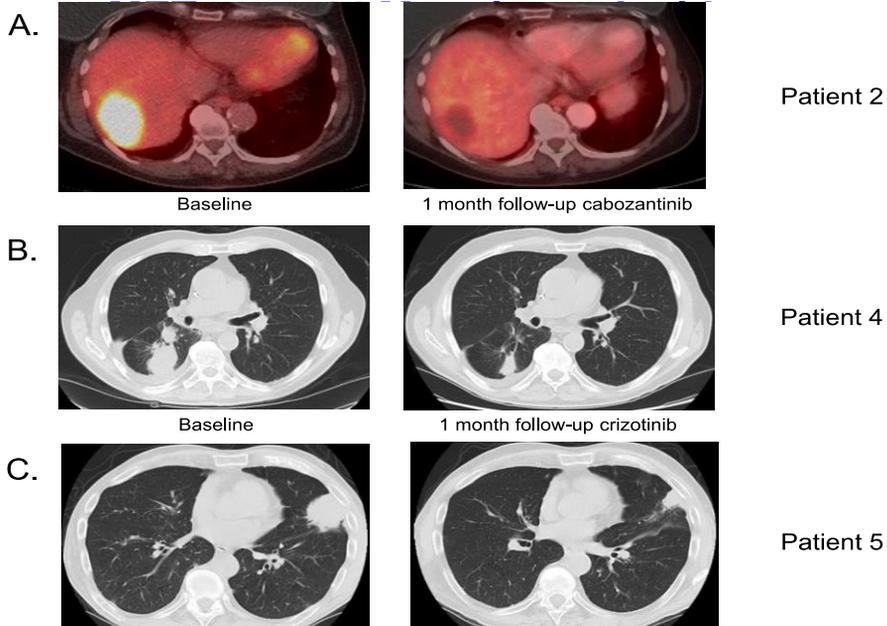
(Saito et al, Cancer Science, 2016)



## И что же новое ожидает нас ?

- **NEW**
- Сплайсинговые мутации MET exon14
- Транслокации NTRK
- Транслокации NRG, BRAF, PDGFRa
- **“NEW” OLD**
- ROS1?? Вопросов больше, чем ответов
- RET?
- BRAF?
- Амплификация MET – существует ли она вне мутаций?
- HER2 инсерции?

### Сплайсинговые мутации 14 экзона MET

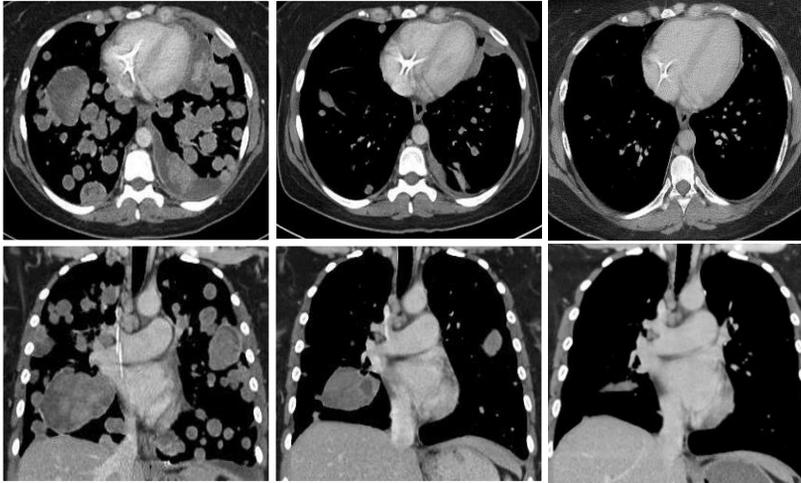


# Транслокации NTRK

Study baseline

LOXO-101 cycle 2 day 1

LOXO-101 cycle 5 day 1

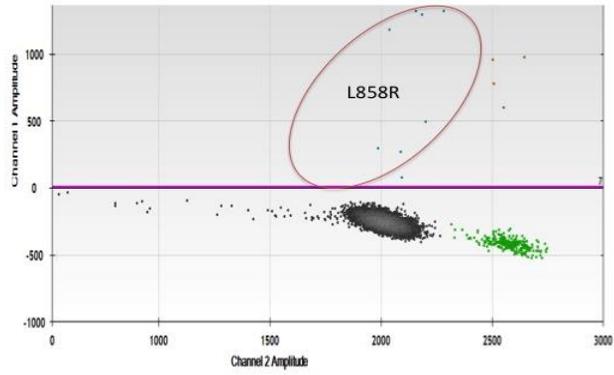


Doebele et al. Cancer Discovery 2015



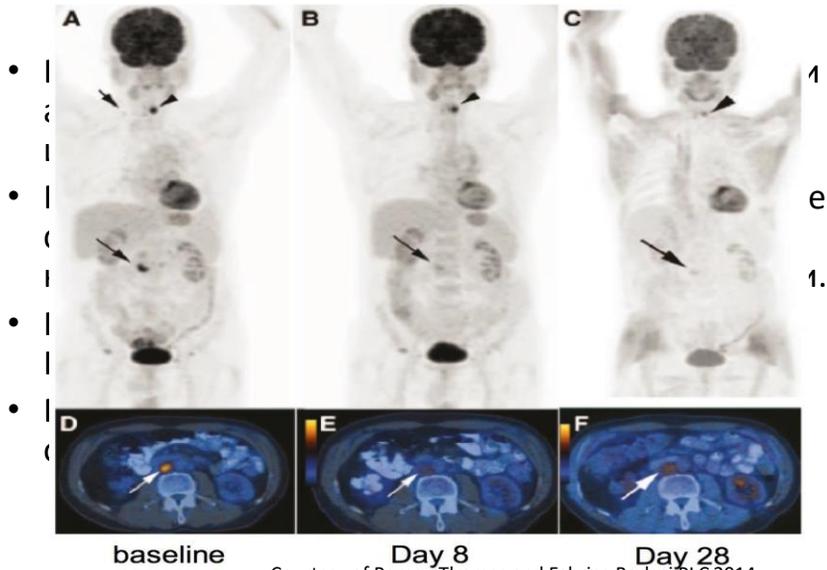
Gay ND et al, JTO Aug;12(8):e107-e110. doi: 10.1016/j.jtho.2017.04.025. Epub 2017 May 10.

# ROS1

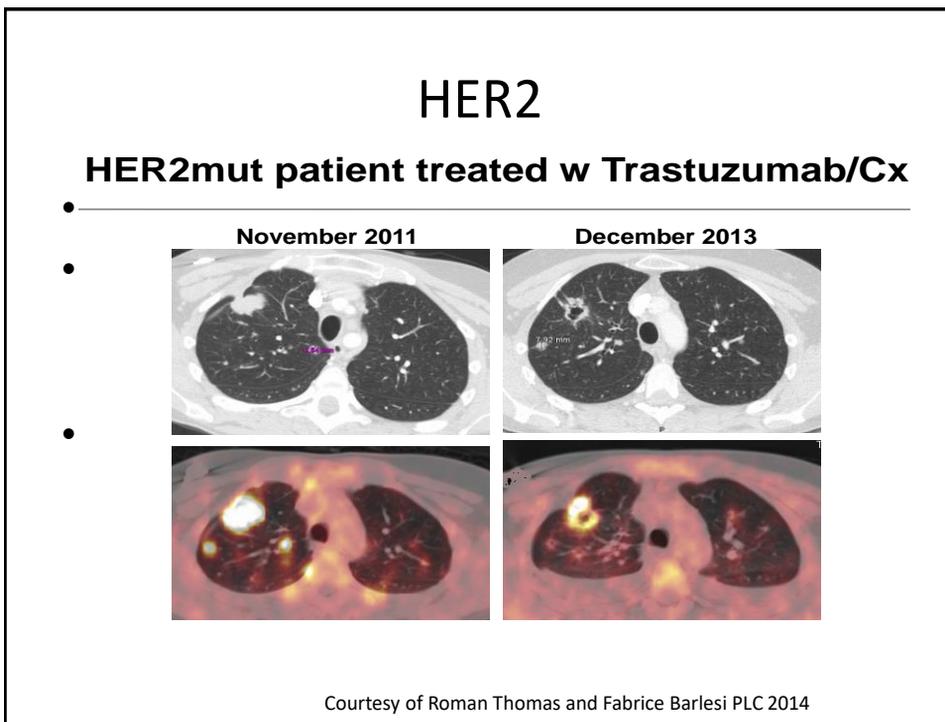
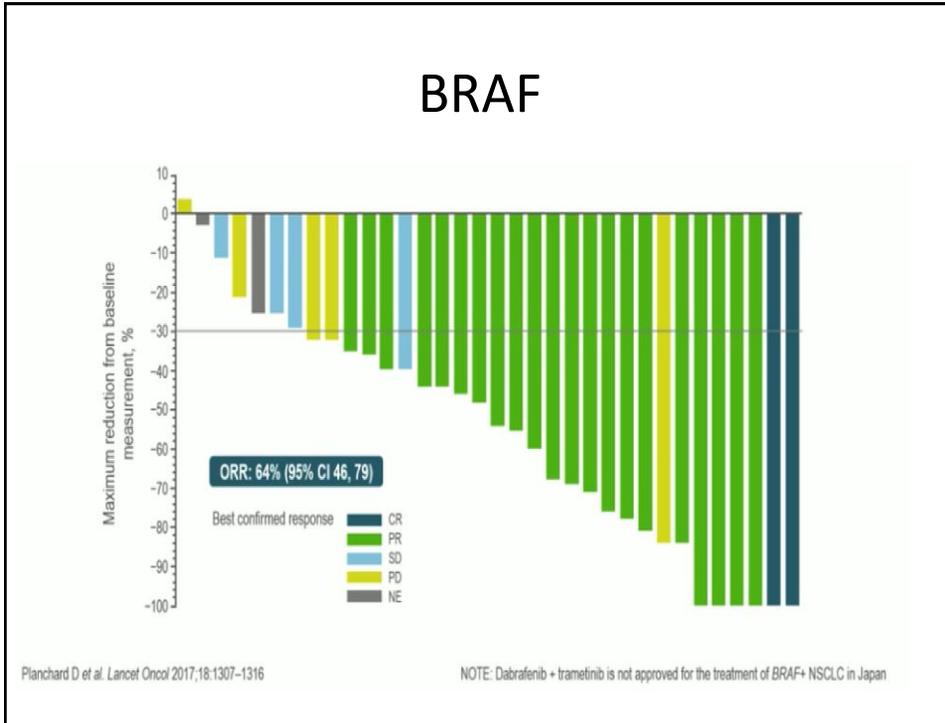


Собственные данные лаборатории МГОБ 62

# RET

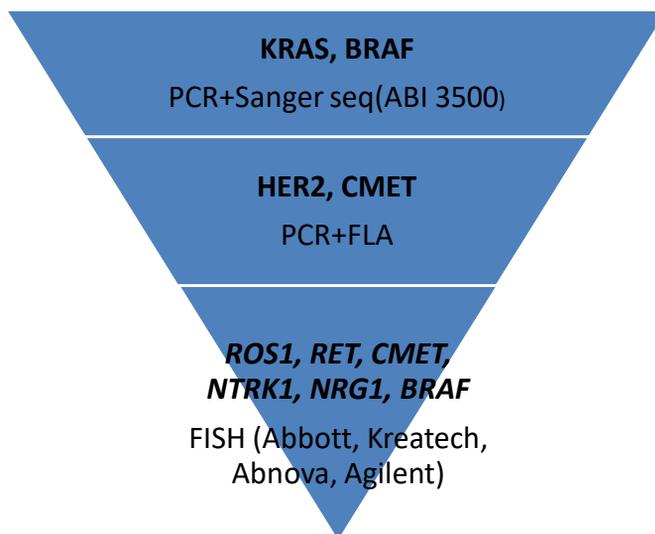


Courtesy of Roman Thomas and Fabrice Barlesi PLC 2014



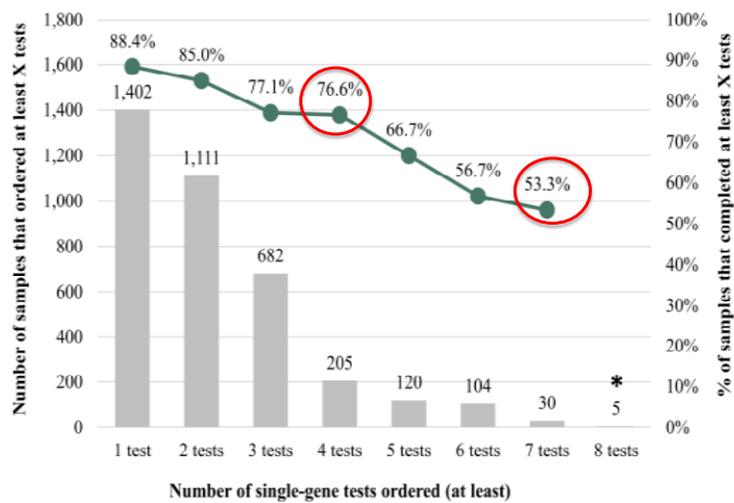
Как нам найти иголку в стоге сена??

## Первоначальный алгоритм



## Второй этап – использование NGS

### Сложности поэтапного тестирования



Tiffany M et al. *Clin Lung Cancer* 2018, in press

## Возможности таргетного ресеквенирования

Sample types	# single-gene tests, n slides (n samples with slides cut)								Oncomine™ Dx Target Test
	1	2	3	4	5	6	7	8	
CNB, <25% tumor	2.7 (39)	4.8 (60)	5.9 (83)	9.5 (8)	9.0 (1)	12.4 (11)	18.3 (3)	16.0 (1)	1.0 (41)
CNB, ≥25% tumor	2.6 (118)	3.9 (208)	5.4 (241)	8.7 (47)	8.4 (10)	11.7 (44)	16.5 (13)	19.0 (2)	1.0 (28)
CNB unknown	1.4 (8)	N/A (0)	N/A (0)	2.0 (1)	N/A (0)	N/A (0)	N/A (0)	N/A (0)	N/A (0)
All CNB	2.6 (165)	4.1 (268)	5.5 (324)	8.7 (56)	8.5 (11)	11.8 (55)	16.8 (16)	18.0 (3)	1.0 (69)

Tiffany M et al. *Clin Lung Cancer* 2018, in press

## Возможности таргетного ресеквенирования

Sample types	# single-gene tests ordered per sample, % successful (n samples)								Oncomine™ Dx Target Test
	≥1	≥2	≥3	≥4	≥5	≥6	≥7	≥8	
CNB, <25% tumor	95.7% (209)	87.1% (170)	70.0% (110)	70.8% (24)	62.5% (16)	60.0% (15)	* (4)	* (1)	70.7% (41)
CNB, ≥25% tumor	98.2% (685)	91.8% (570)	82.9% (362)	85.8% (120)	76.3% (76)	66.2% (65)	61.1% (18)	* (2)	82.1% (28)
CNB unknown	8.5% (94)	2.1% (48)	0.0% (23)	0.0% (10)	* (4)	* (4)	* (2)	* (1)	* (0)
Total	89.2% (988)	85.3% (788)	70.2% (495)	77.9% (154)	70.8% (96)	61.9% (84)	58.3% (24)	* (4)	75.4% (69)

Tiffany M et al. *Clin Lung Cancer* 2018, in press

## Кастомизированная панель

- 8 генов (*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *PDGFRA*, *PI3KCA*, *ERBB2*), 24 локуса:

*EGFR* ex18,19,20,21

*KRAS* ex2,3,4

*BRAF* ex15

*NRAS* ex2,3,4

*KIT* ex9,11,13,17, 14,18

*PDGFRA* ex12,18

*PI3kCA* ex9,20

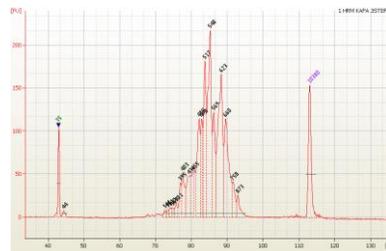
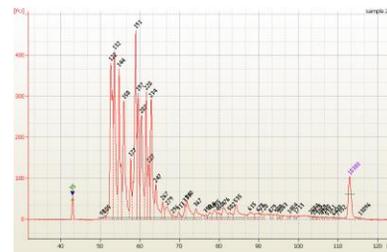
*ERBB2* ex20

24 ROI, 4500 bp (3500 ), 10 ng

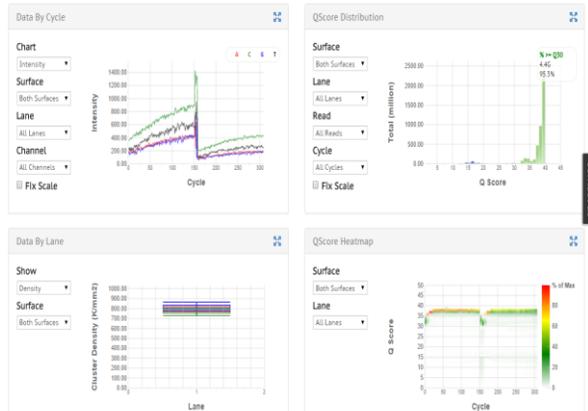
## Приготовление библиотеки

10 ng DNA treated with UNG

### Library Prep Workflow



## Контроль качества сырых данных



46,4-74,8  
(mean 58,6) %  
Среднее  
покрытие  
reads/locus>1000

Total Reads	PF Reads	% Reads Identified (PF)	CV	Min	Max
15954167	15040511	94.8244	0.5116	0.0190	12.5829

## Биоинформатика

- BioLinux machine
- BWA2
- GATK INDEL Realigner,
- primer trimming,
- GATK Unified Genotyper,
- VariantAnnotator - GATK
- Variant frequency cut off 10%

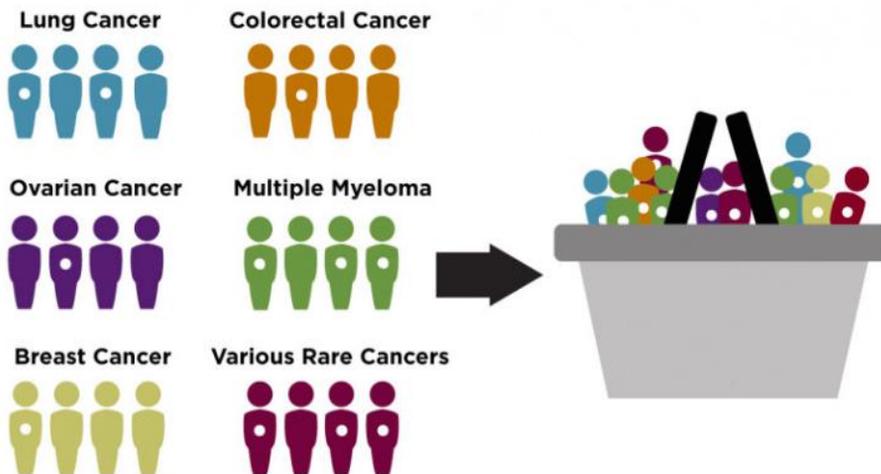
## Насколько мы готовы использовать метод NGS в клинической практике?

Распределение различных видов NGS



<http://www.pancreapedia.org/pathways/egfr>

## А как же более широкие подходы? Basket trials

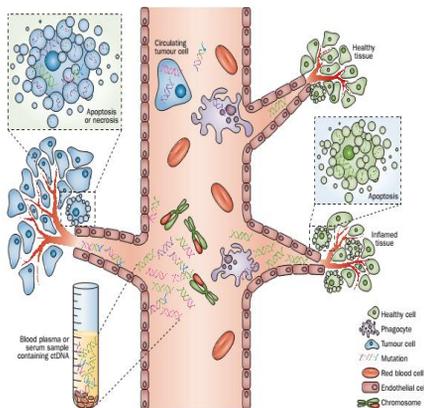


Renfro et al *Cancer Letters* 2017

## За и против



## А что насчет «жидкостной биопсии»? Сможет ли она адекватно заменить тканевую?



**Figure 1** | Release and extraction of ctDNA from the blood. ctDNA is released from healthy, inflamed or diseased (cancerous) tissue from cells undergoing apoptosis or necrosis. ctDNA can be extracted from a blood sample and genetic alterations in the DNA released from cancerous tissue detected and quantified. Tumor-derived genetic alterations that can be detected in the blood include point mutations (consecutive purple, red, green and blue DNA strands), copy number fluctuations (red portion of chromosomes) and structural rearrangements (green and red DNA strands). Abbreviations: ctDNA, circulating free DNA; cTnA, circulating tumour DNA.

- ДНК из клеток попадает в кровь..
- Насколько ее количество различается у здоровых людей и онкологических пациентов?
- Из каких клеток она попадает в русло в первую очередь?
- Зависит ли этот процесс от типа опухоли?
- От опухолевой массы?
- А если у пациента синхронные/метакронные опухоли?

Jamal-Hanjani M et al *Ann Oncol* 2016, 27, 862  
 Abbosh C et al *Nature* 2017, 545, 446

## Огромное количество влияющих факторов

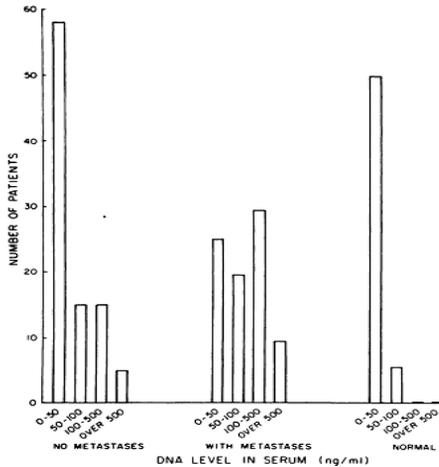


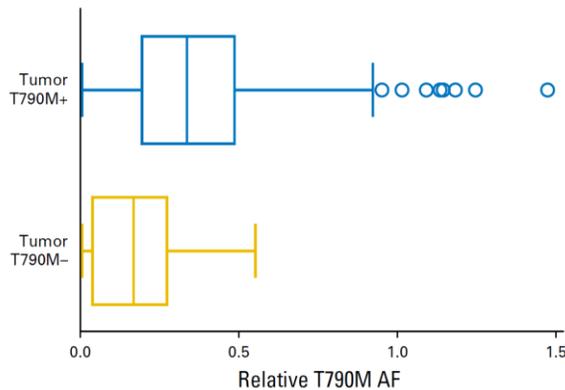
Chart 2. DNA levels in metastatic and nonmetastatic patients, compared to normal controls. The highest concentration in each group ranged between 500 and 5000 ng/ml.

- 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

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

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

Данные исследования AURA (antiT790M – AZD9192)  
(216 пациентов с образцами опухоли и плазмы)



Oxnard et al, JCO, 2016

## Основные проблемы и возможные пути их решения

- Крайняя нестойкость цодНК (необходима правильная первичная обработка крови)
- Существенные колебания в уровне цодНК как между пациентами, так и у одного пациента с течением времени (исследования у пациентов с продвинутыми стадиями болезни обычно более информативны)
- Чувствительность стандартных методов недостаточна для работы с цодНК (использование наиболее чувствительных подходов)

D Tan, WCLC 2017

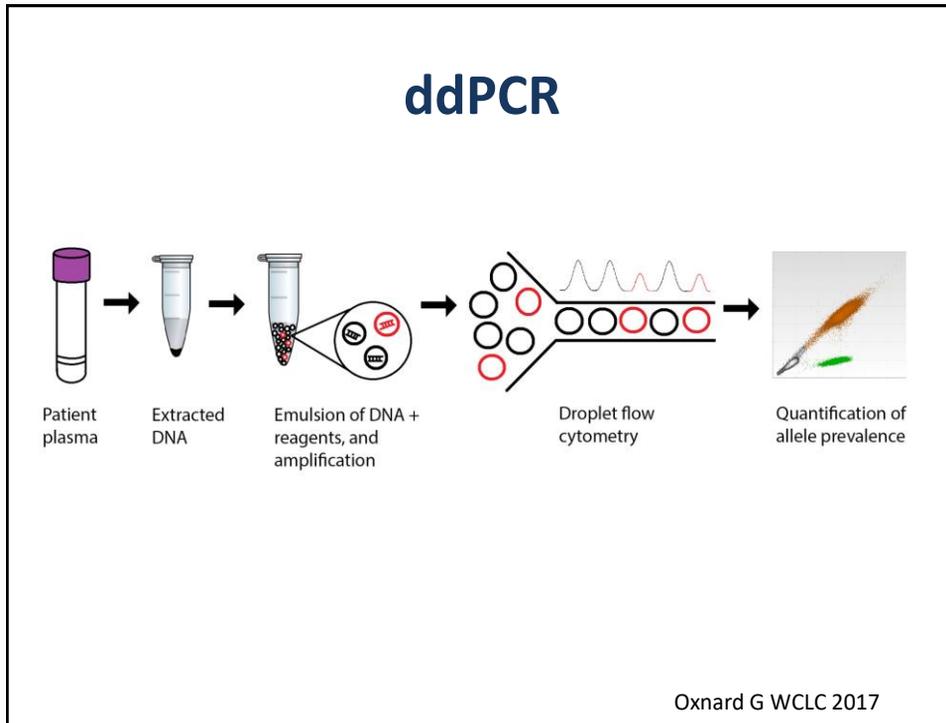
## Общепринятый наиболее чувствительный метод – цифровая ПЦР

Table 2. Plasma Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Assay Sensitivity, Specificity, and Positive Predictive Value

Assay	Sensitivity Analysis			Specificity Analysis			Positive Predictive Value, % (95% CI)
	Sensitivity, % (95% CI)	No. True Positive <sup>a</sup>	False Negative <sup>b</sup>	Specificity, % (95% CI)	No. True Negative <sup>c</sup>	False Positive <sup>d</sup>	
<b>EGFR exon 19 del</b>							
Newly diagnosed	86 (57-98)	12	2	100 (96-100)	101	0	100 (74-100)
Acquired resistance	81 (64-92)	29	7	100 (85-100)	23	0	100 (88-100)
Overall	82 (69-91)	41	9	100 (97-100)	124	0	100 (91-100)
<b>EGFR L858R</b>							
Newly diagnosed	69 (39-91)	9	4	100 (96-100)	102	0	100 (66-100)
Acquired resistance	78 (52-94)	14	4	100 (91-100)	41	0	100 (77-100)
Overall	74 (55-88)	23	8	100 (97-100)	143	0	100 (85-100)
<b>EGFR T790M</b>							
Acquired resistance	77 (60-90)	27	8	63 (38-84)	12	7	79 (62-91)
<b>KRAS G12X</b>							
Newly diagnosed	64 (43-82)	16	9	100 (94-100)	62	0	100 (79-100)

<sup>a</sup> True positive indicates positive test result in both tissue and plasma.<sup>c</sup> True negative indicates negative test result in both tissue and plasma.<sup>b</sup> False negative indicates positive test result in tissue and negative result in plasma.<sup>d</sup> False positive indicates negative test result in tissue and positive result in plasma.

Sacher et al. JAMA Oncology 2016

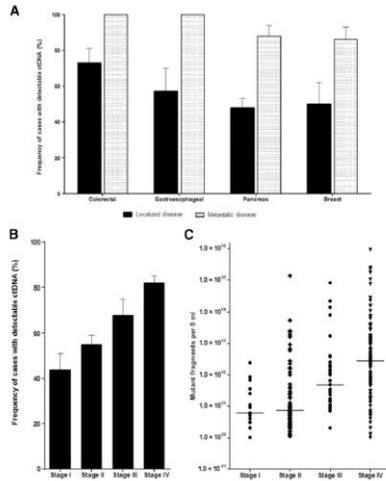


### Собственный опыт клинического применения

- Методом ddPCR обследовано 65 первичных пациентов (с недостаточным материалом для генетического исследования)
- Обнаружено 18 пациентов с мутациями 19 и 21 экзонов гена EGFR (26,5%)
- Для сравнения – среднее количество выявляемых мутаций при исследовании морфологических и цитологических препаратов – 19-20%
- В чем причина более высокой чувствительности при исследовании цоДНК?
  - небольшая группа пациентов?
  - использование более чувствительного метода?
  - ложнопозитивные результаты?
- Используемая платформа – BioRad C100

Данные лаборатории молекулярной биологии МГОБ 62

## 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

## Ложнопозитивные случаи – как быть?

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

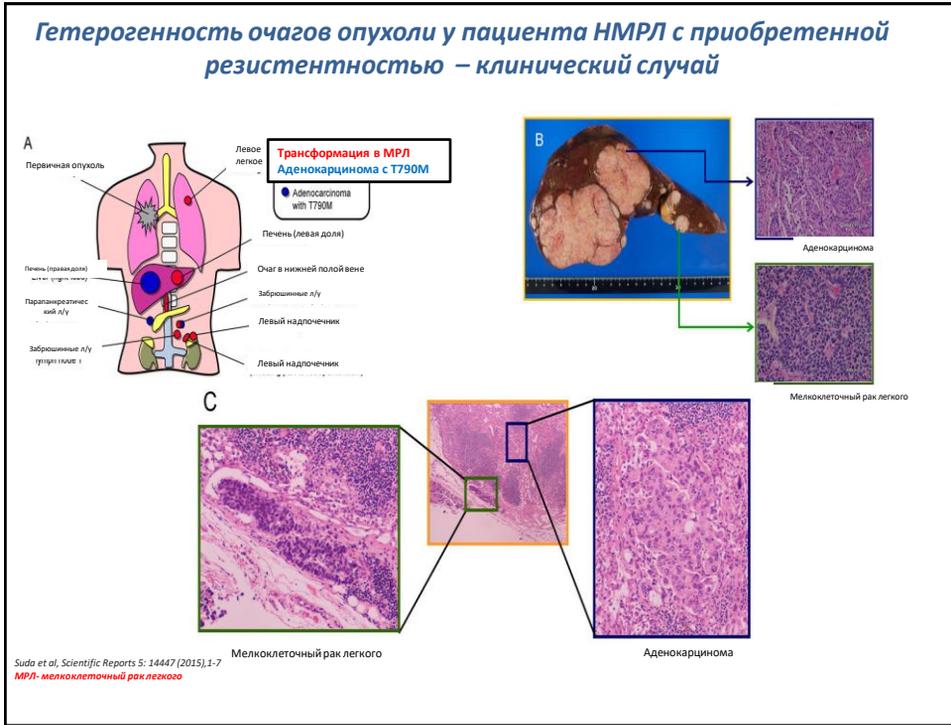
### SUMMARY:

EGFR Mutations (Del19, L858R, T790M):

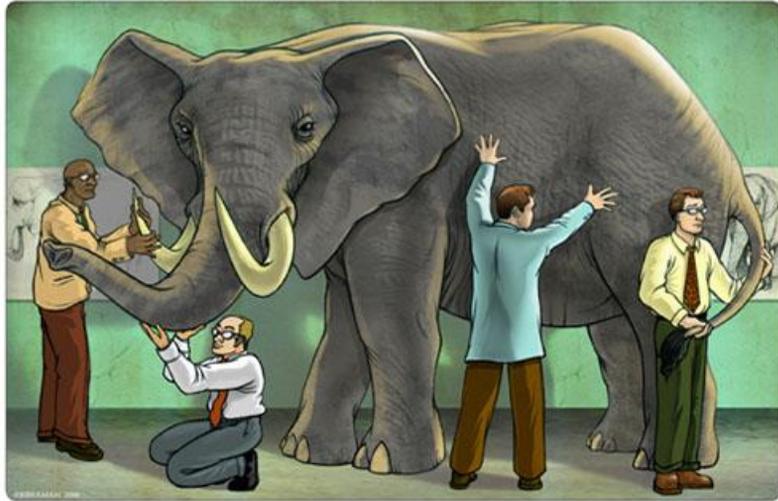
Alteration	Result	Percent Mutant Allele	Mutant Copy Number
T790M	Detected	0.2% mutation frequency of T790M over EGFR wild-type.	1
L858R	Not Detected	N/A	N/A
Del19	Detected	7.6% mutation frequency of Del19 over EGFR wild-type.	65

- Полный ответ на эрлотиниб ~12m, 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



Что мы видим с помощью стандартной  
тканевой биопсии?



H.Wekelee et al WCLC 2017

Что мы видим с помощью  
многонаправленной жидкой биопсии?



Из собственного архива Демидовой И.А.

## Заключение

- Оптимизация алгоритма определения мутаций сможет помочь ускорить определение и расширить спектр генетических нарушений у пациентов с аденокарциномой легкого
- Все более очевидно, что предпочтительным методом исследования биопсий является секвенирование нового поколения
- Морфология по-прежнему не потеряла своего значения, также как и тканевая биопсия
- Жидкостная биопсия будет, несомненно, развиваться дальше. Но сможет ли она когда-нибудь полностью заменить тканевую?

Спасибо за внимание!