

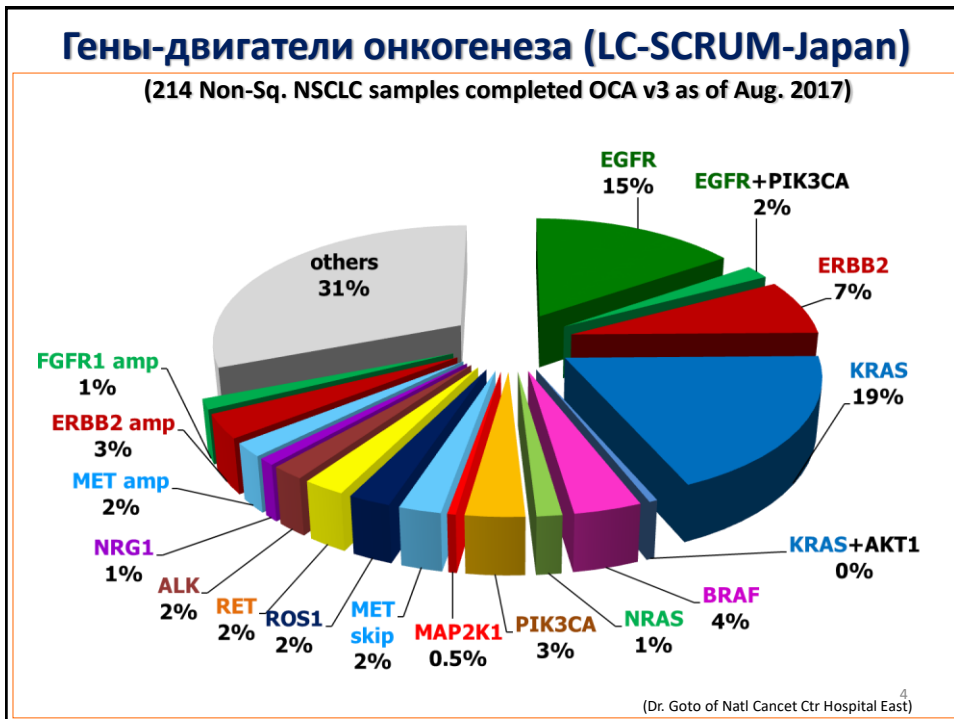
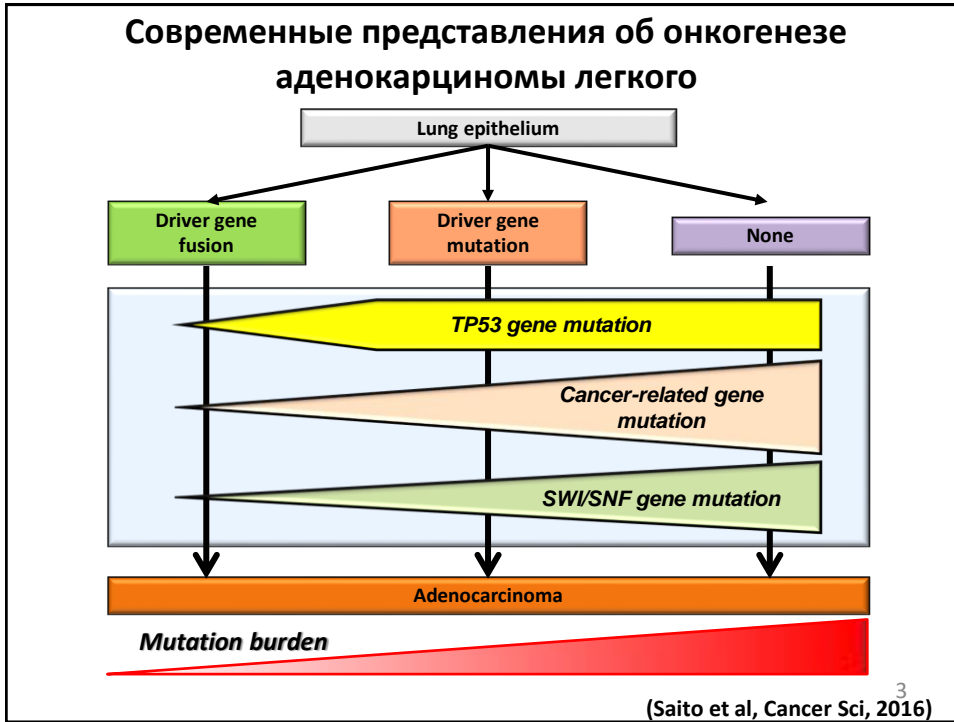
Клинически значимые мутации и
рациональные алгоритмы их поиска при
НМРЛ

Демидова И.А.

Лаборатория молекулярной биологии
ГБУЗ «МГОБ 62 ДЗМ»

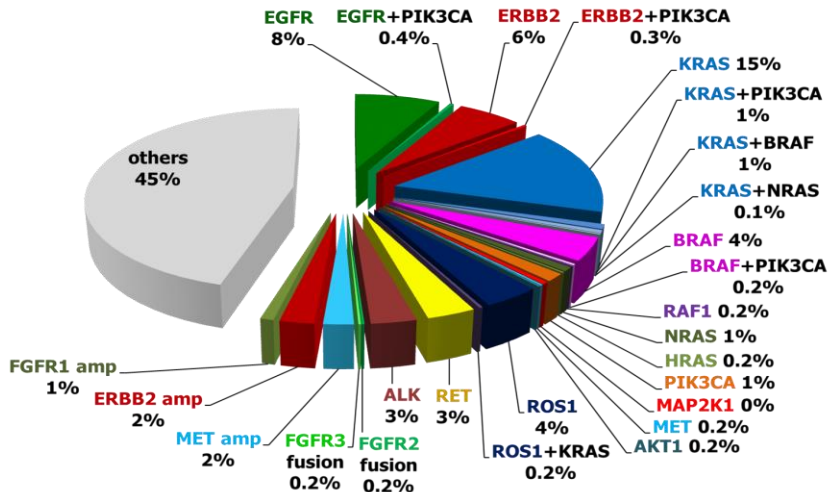
Генетический анализ как конкурент
морфологии?

- 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



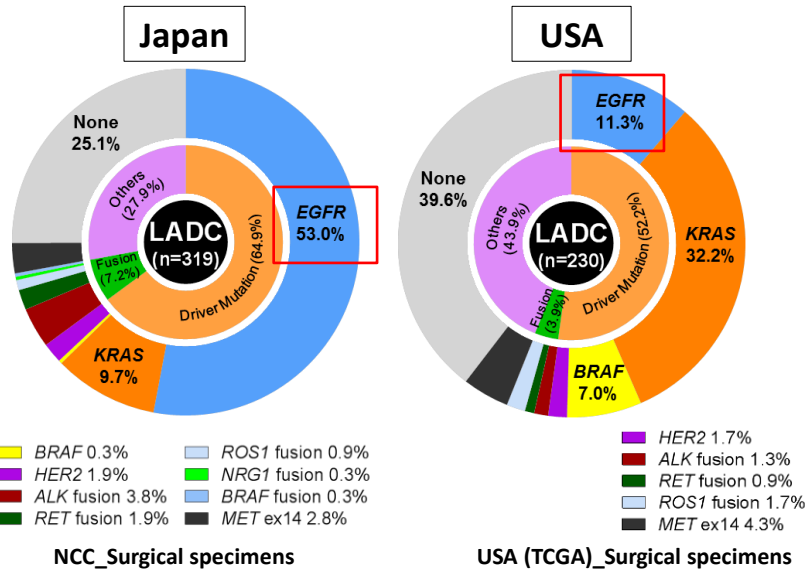
Сочетание генов-драйверов онкогегеза (LC-SCRUM-Japan)

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



(Dr. Goto of Natl Cancer Ctr Hospital East)

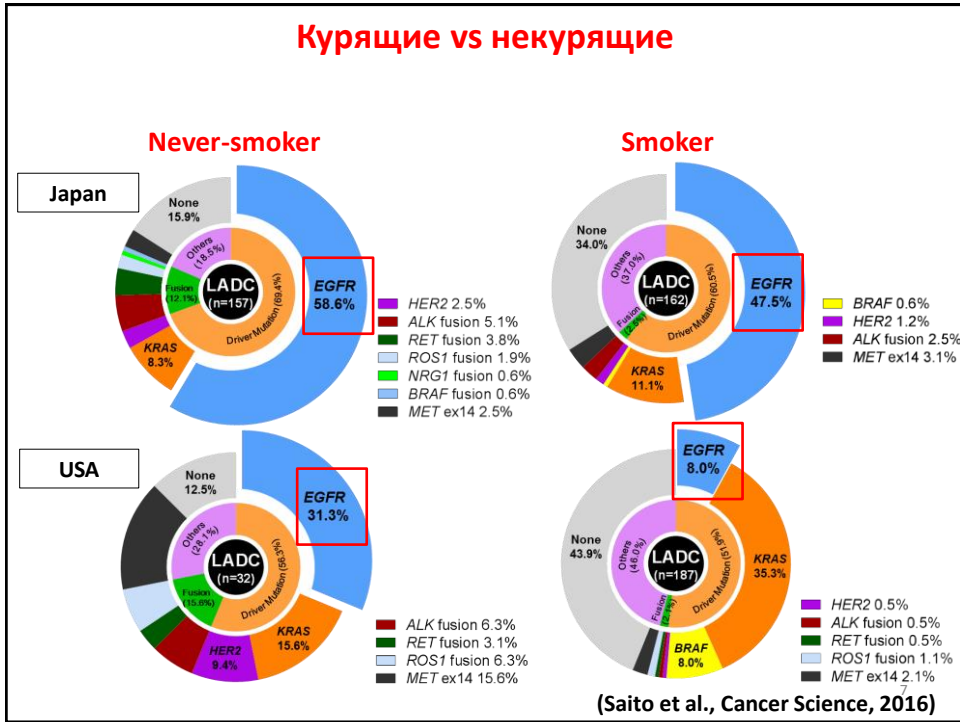
Япония vs США (аденокарцинома)



NCC_Surgical specimens

USA (TCGA)_Surgical specimens

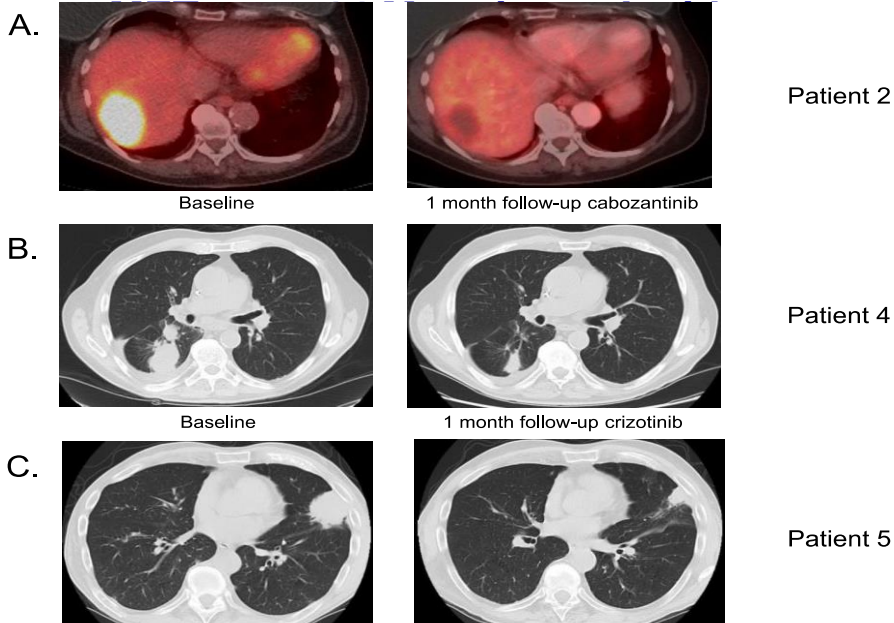
(Saito et al, Cancer Science, 2016)



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

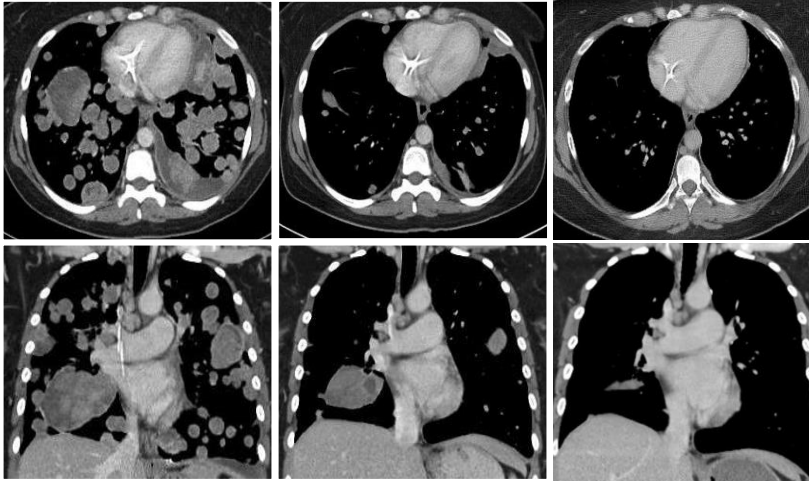


Транслокации NTRK

Study baseline

LOXO-101 cycle 2 day 1

LOXO-101 cycle 5 day 1

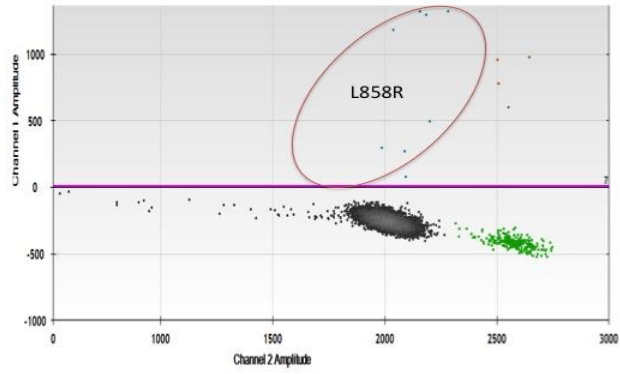


Doebele et al. Cancer Discovery 2015



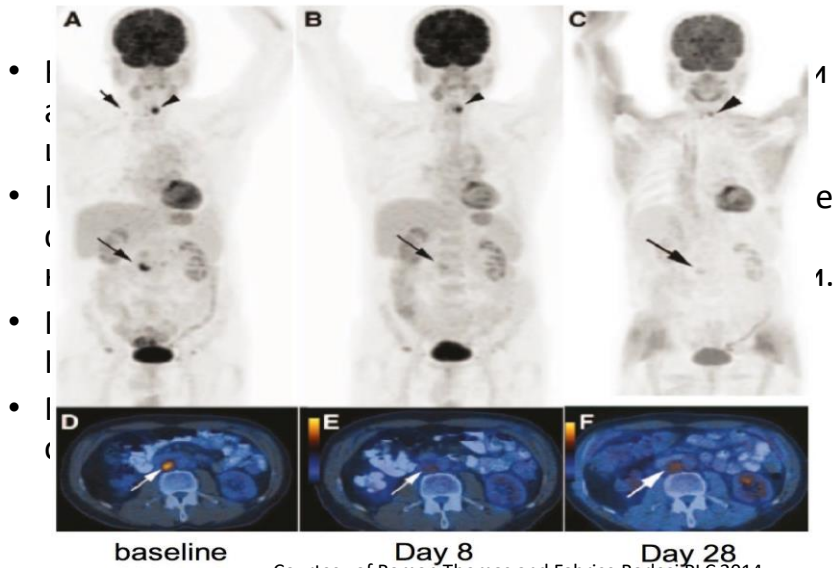
Gay ND et al, JTO Aug;12(8):e107-e110. doi: 10.1016/j.jtho.2017.04.025. Epub 2017 May 10.

ROS1

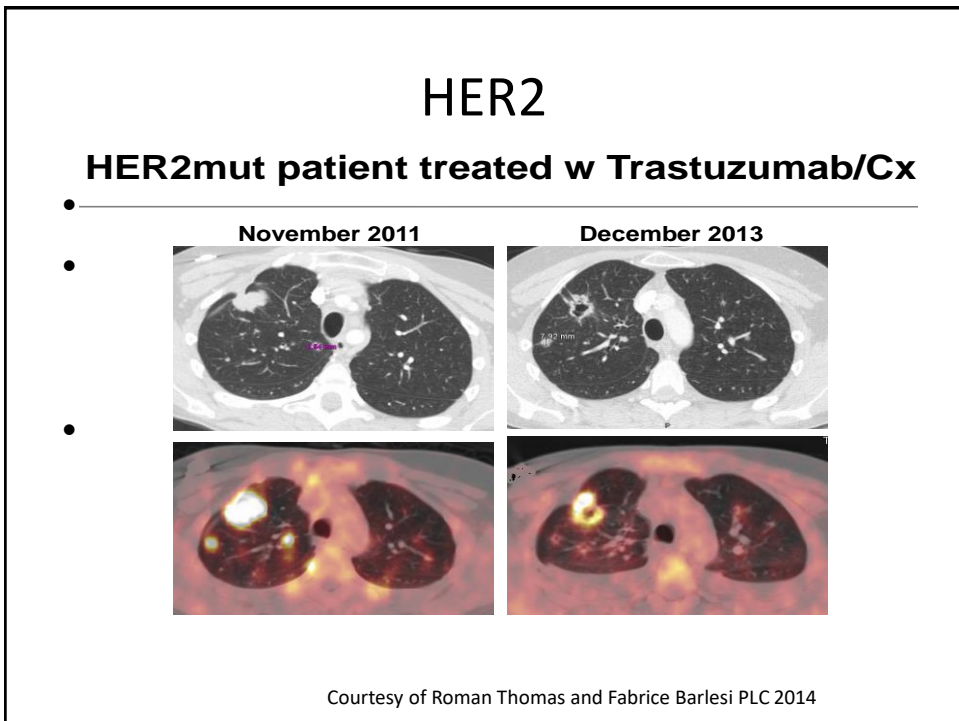
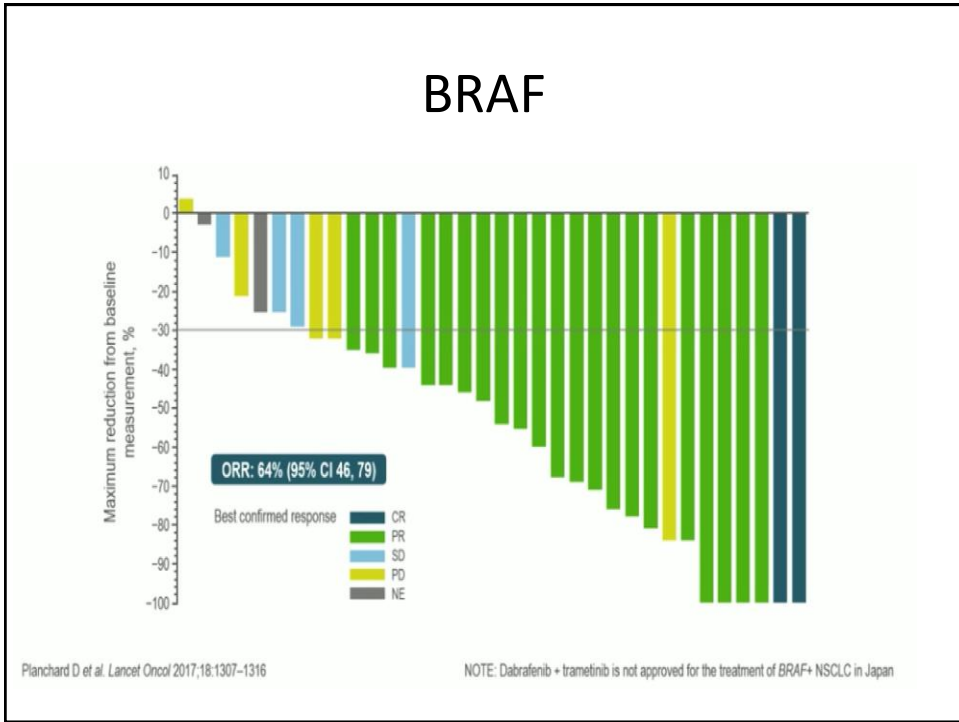


Собственные данные лаборатории МГОБ 62

RET

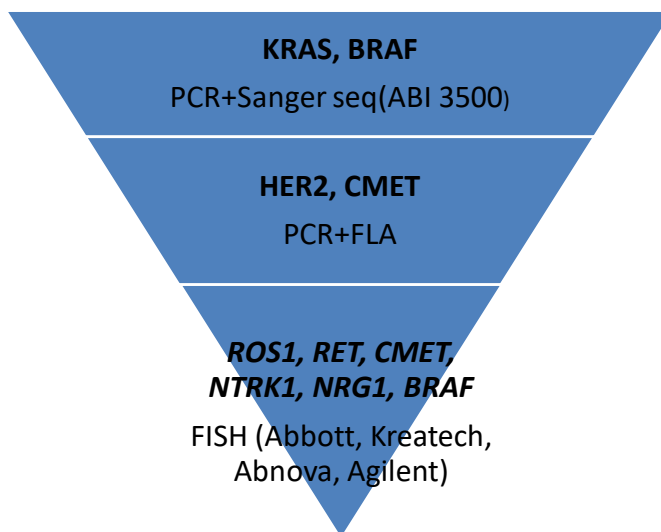


Courtesy of Roman Thomas and Fabrice Barlesi PLC 2014



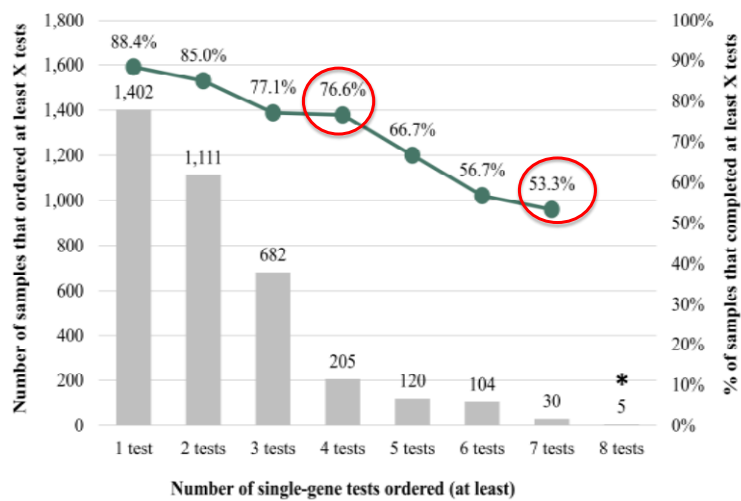
Как нам найти иголку в стоге сена??

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

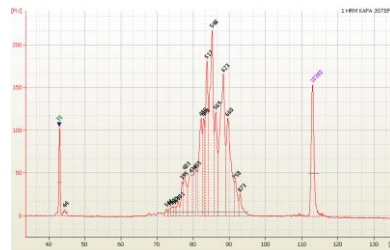
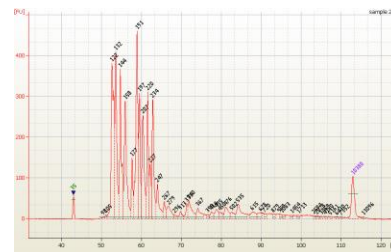
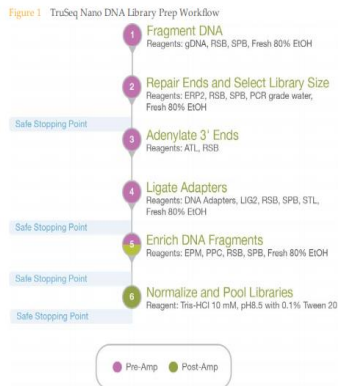
ERBB2 ex20

24 ROI, 4500 bp (3500), 10 ng

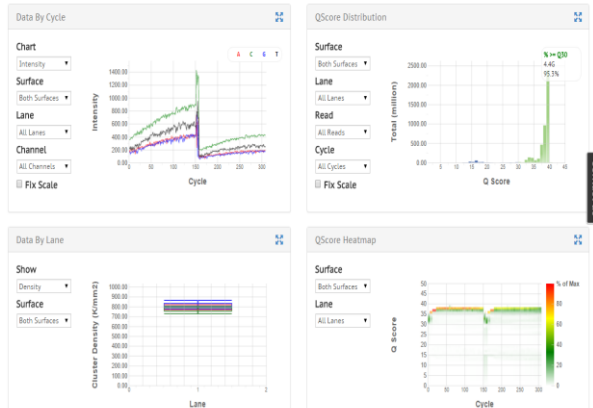
Приготовление библиотеки

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

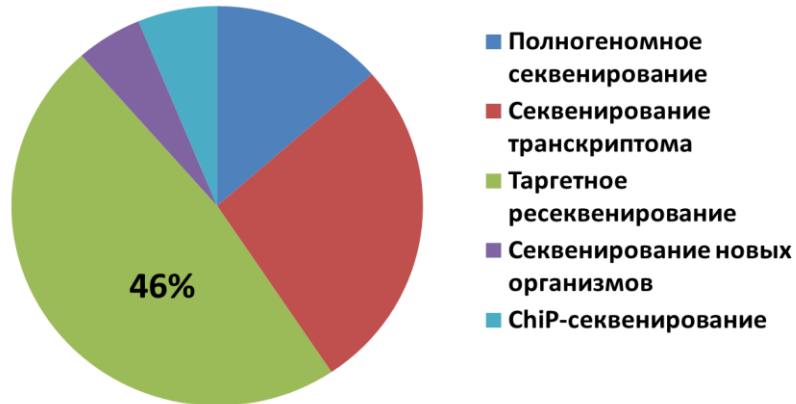
Total Reads	PF Reads	% Reads Identified (PF)	CV	Min	Max
15954167	15040511	94.8244	0.5116	0.0190	12.5829

Биоинформатика

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

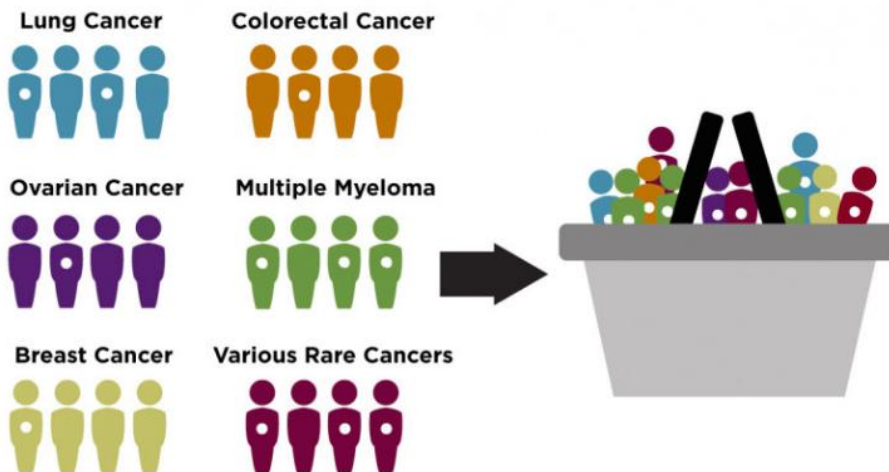
Насколько мы готовы использовать метод NGS в клинической практике?

Распределение различных видов NGS



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

А как же более широкие подходы? Basket trials

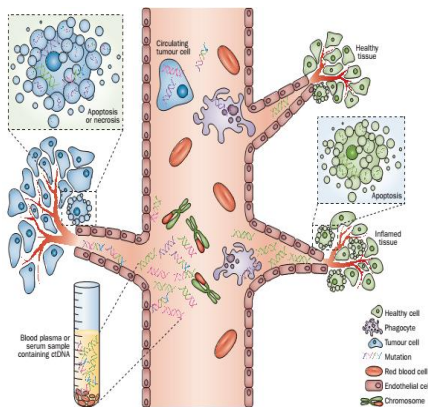


Renfro et al *Cancer Letters* 2017

За и против



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



- 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

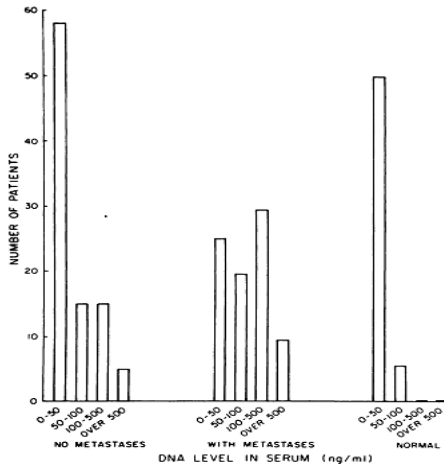


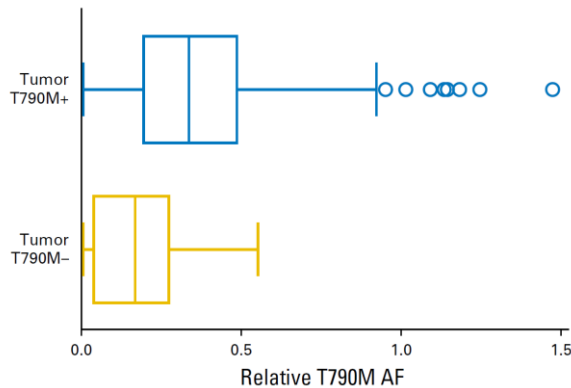
Chart 2. DNA levels in metastatic and nonmetastatic patients, compared to normal controls. The highest concentration in each group ranged between 500 and 5000 ng/ml.

- 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

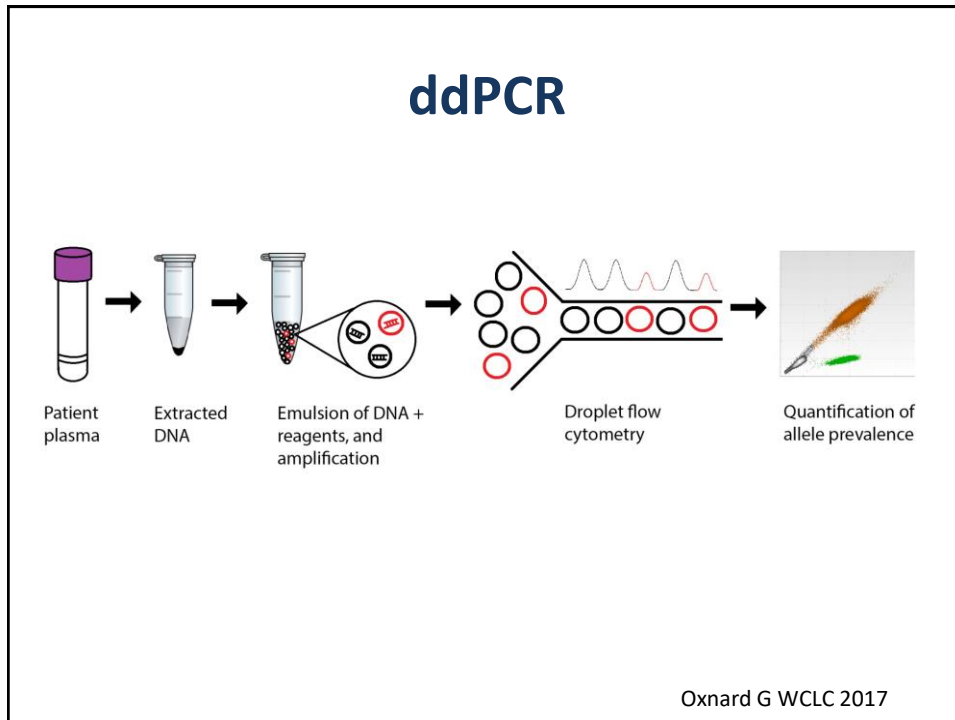
Общепринятый наиболее чувствительный метод – цифровая ПЦР

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 ^a	False Negative ^b	Specificity, % (95% CI)	No. True Negative ^c	False Positive ^d	
EGFR exon 19 del							
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)
EGFR L858R							
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)
EGFR T790M							
Acquired resistance	77 (60-90)	27	8	63 (38-84)	12	7	79 (62-91)
KRAS G12X							
Newly diagnosed	64 (43-82)	16	9	100 (94-100)	62	0	100 (79-100)

^a True positive indicates positive test result in both tissue and plasma.^c True negative indicates negative test result in both tissue and plasma.^b False negative indicates positive test result in tissue and negative result in plasma.^d False positive indicates negative test result in tissue and positive result in plasma.

Sacher et al. JAMA Oncology 2016

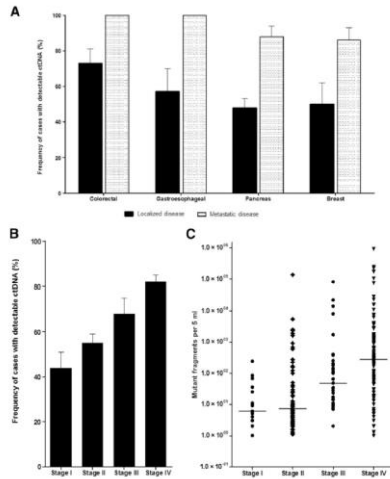


Собственный опыт клинического применения

- 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

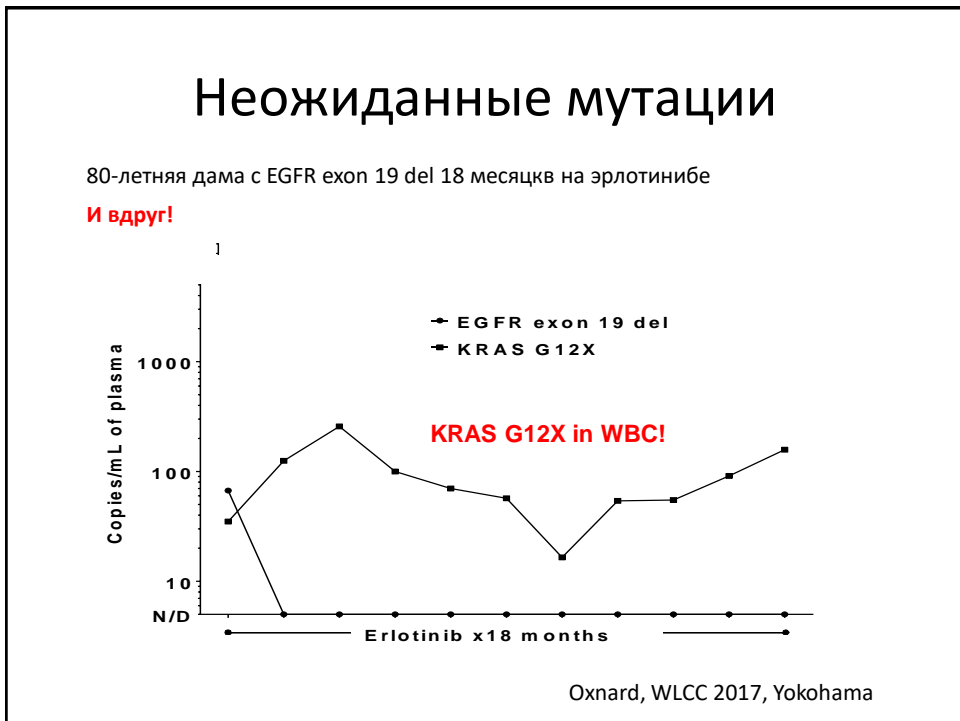
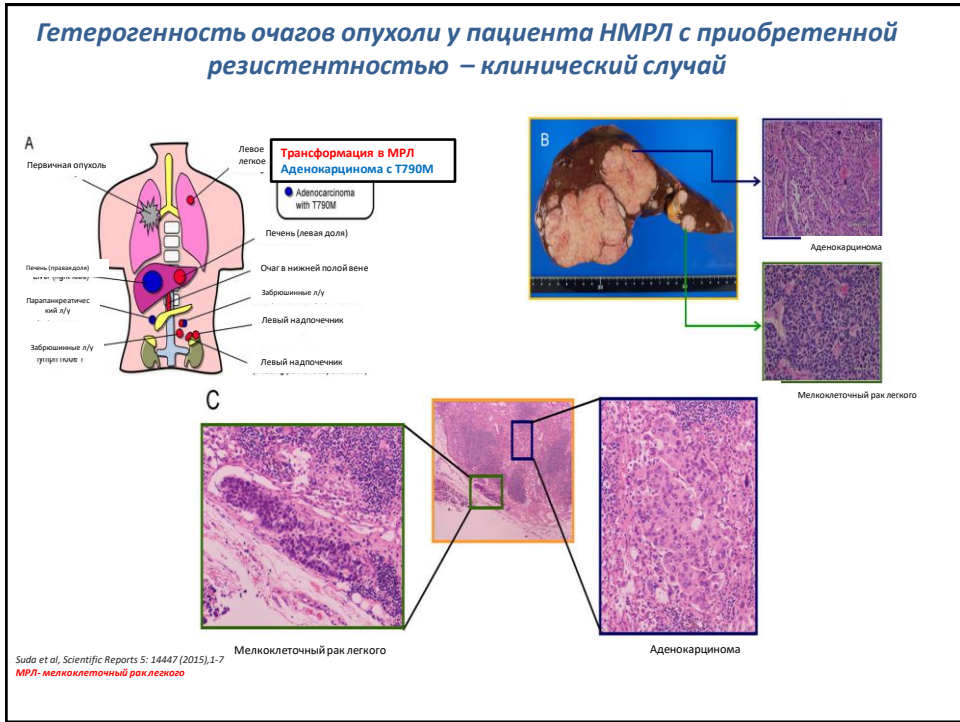
SUMMARY:

EGFR Mutations (Del19, L858R, T790M):

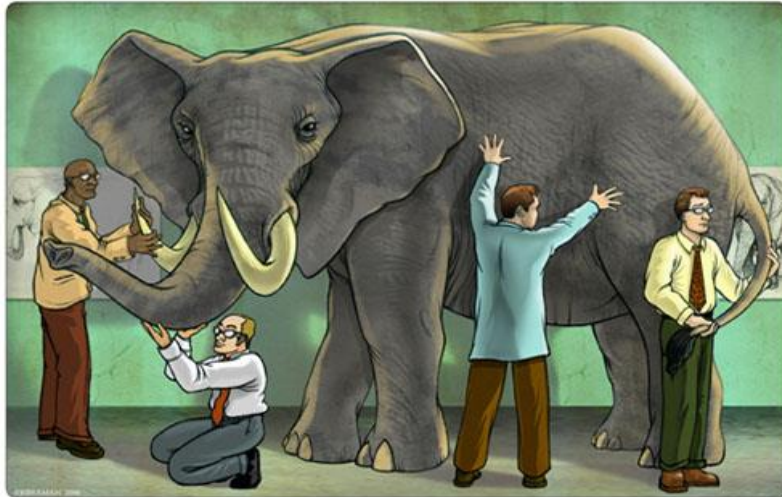
Alteration	Result	Percent Mutant Allele	Mutant Copy Number
T790M	Detected	0.2% mutation frequency of T790M over EGFR wild-type.	1
L858R	Not Detected	N/A	N/A
Del19	Detected	7.6% mutation frequency of Del19 over EGFR wild-type.	65

- 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

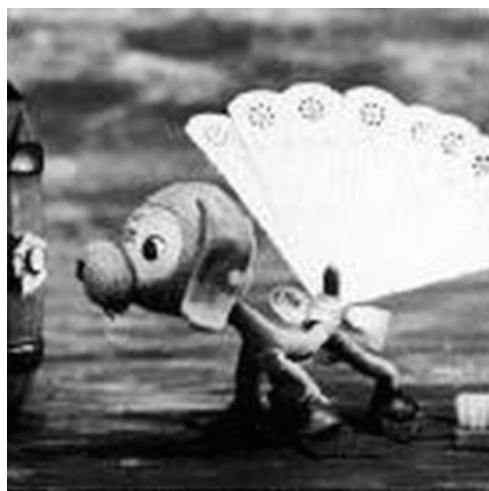


Что мы видим с помощью стандартной
тканевой биопсии?



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!