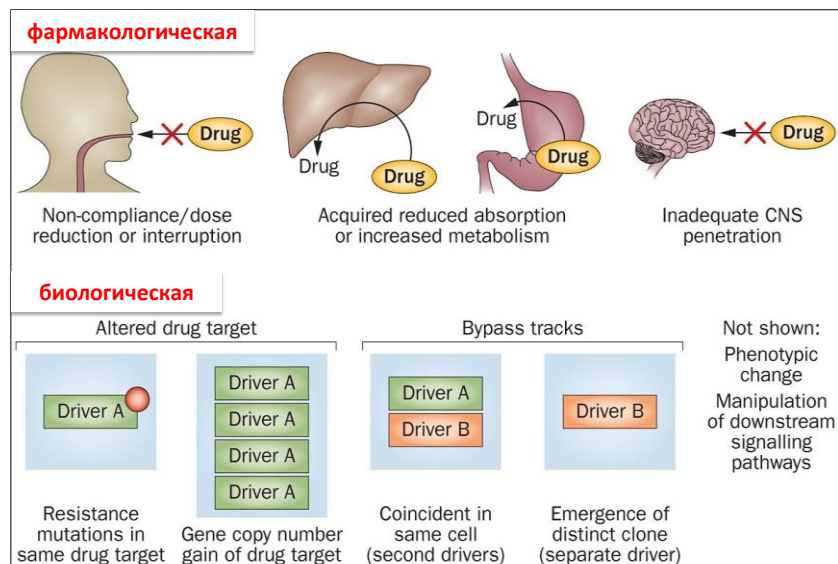


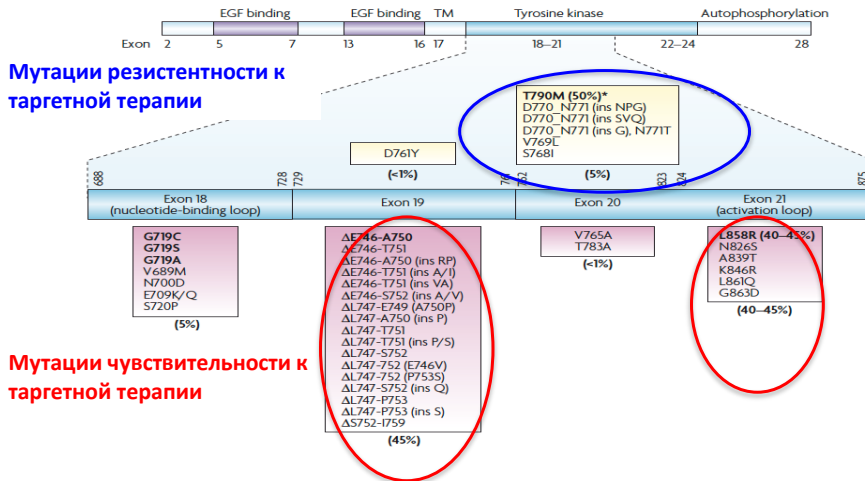
Исследование приобретенных мутаций у пациентов рНМРЛ со вторичной резистентностью: жидкостная биопсия или биопсия после прогрессирования

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

Резистентность к таргетной терапии

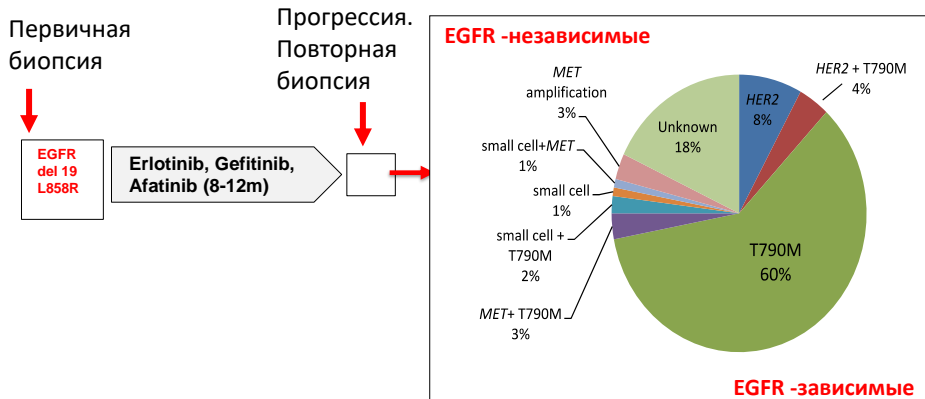


Первичные мутации гена EGFR



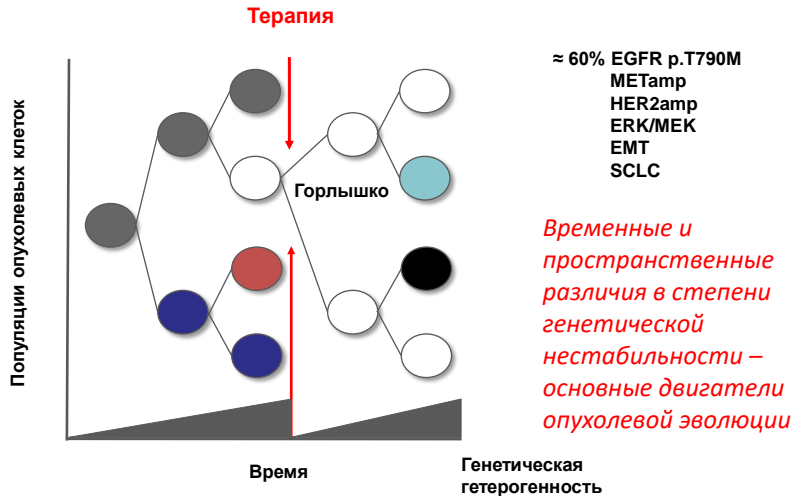
Sharma S, et al. Nat Rev Cancer 2007;7:169-81.

Приобретенные мутации НМРЛ с изначально чувствительными мутациями – две принципиально разные группы



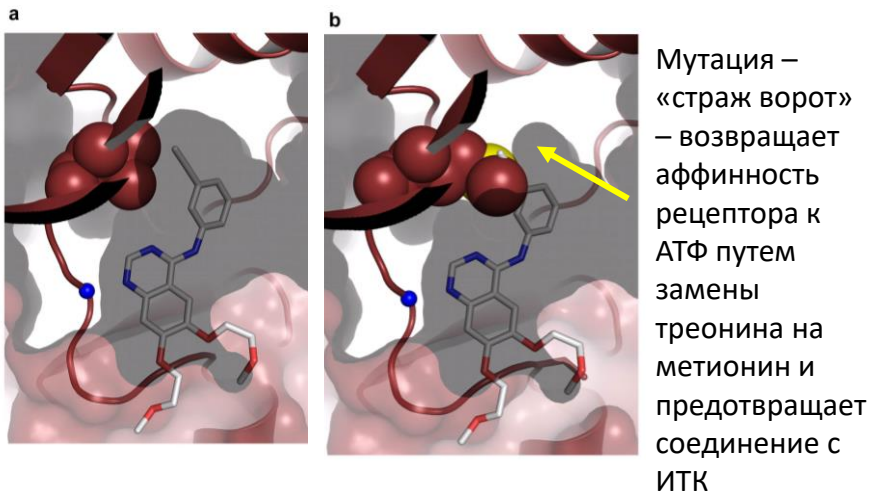
Yu et al., Clin Cancer Res 2013

Что же является основной причиной развития резистентности? Безусловно, сама таргетная терапия
Феномен «бутылочного горлышка»



Adapted from Gerlinger M & Swanton C, *Br J Cancer* 2010;103:1139–1143.

Вторичная мутация T790M – основная причина резистентности к ИТК I-II поколения



Kobayashi et al., *NEJM* 2005

Удивительно, но этот механизм достаточно универсален

- **CML:** BCR-ABL; Imatinib Resistance, **T315I**

CATCCTGAG: ACT Threonine
ATT Isoleucine

- **GIST:** cKIT; Imatinib Resistance, **T670I**

CTGCCTTTA: ACT Threonine
ATT Isoleucine

- **CEL:** PDGFRA; Imatinib Resistance, **T674I**

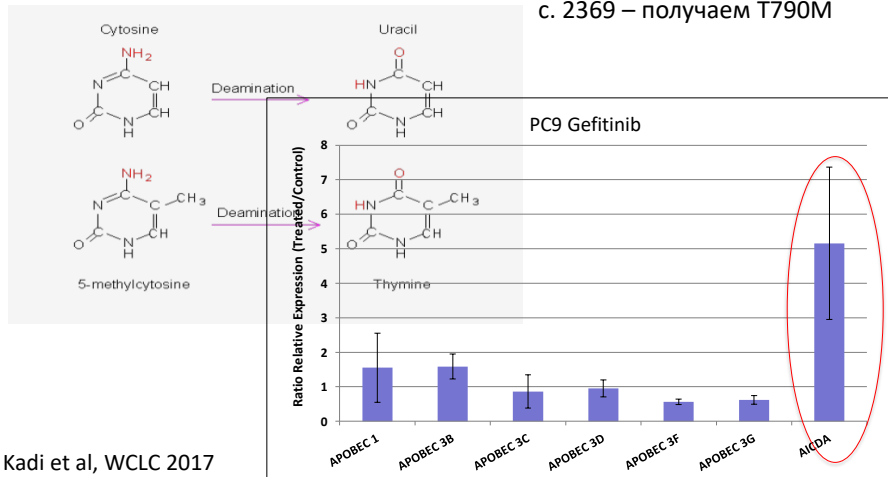
CATCCAGAG: ACA Threonine
ATA Isoleucine

Kadi et al, WCLC 2017

Причина – деаминация цитозина, вызванная активацией ферментов, инициируемой ИТК

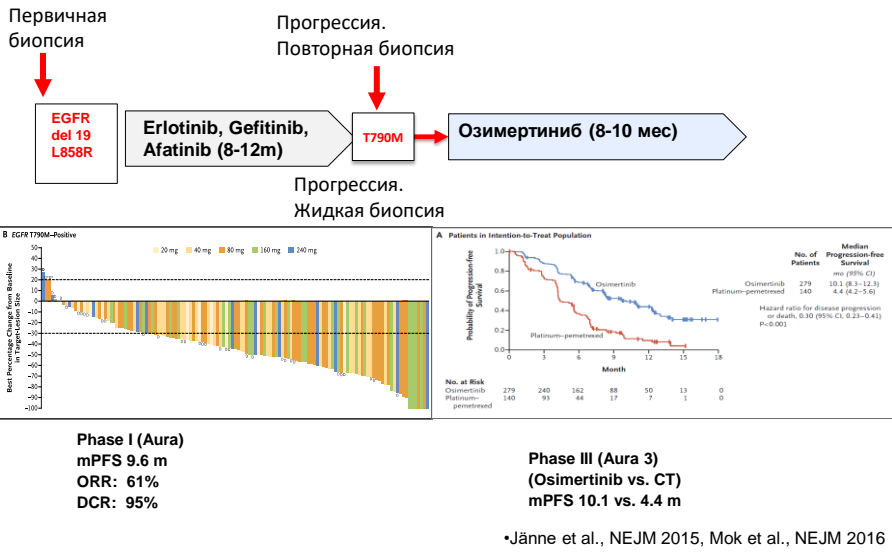
Cytosine Deamination

AICDA деаминирует цитозин в с. 2369 – получаем T790M



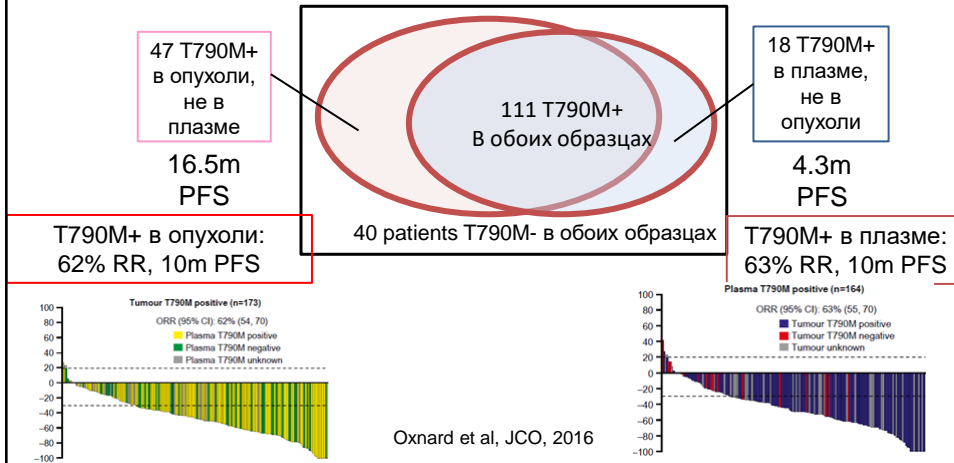
Kadi et al, WCLC 2017

Но препараты 3-го поколения демонстрируют прекрасный эффект при возникновении T790M



Насколько адекватна в данной ситуации жидкая биопсия?

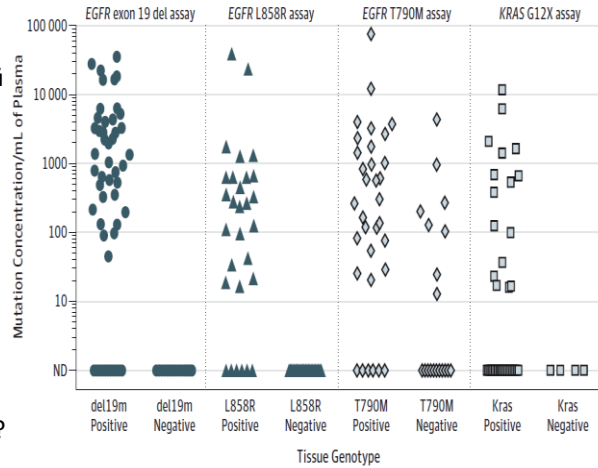
Плазма пациентов из исследования AURA была исследована цифровым ПЦР (216 парных образцов – опухоль и плазма)



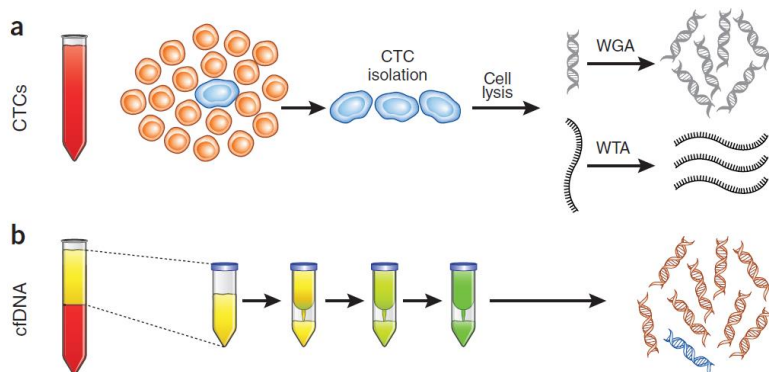
Параллельные исследования

Валидационные исследования на 180 образцах с известным генотипом показали

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

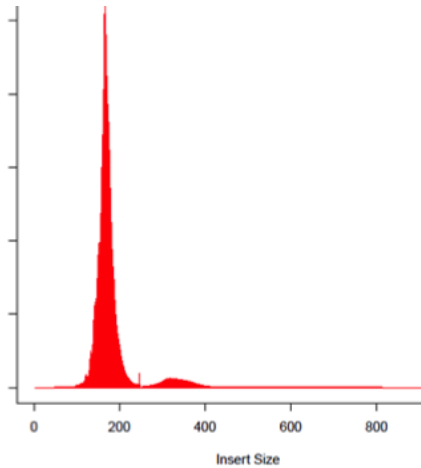


Что же такое «жидкие биопсии»? Чем они хороши и чем не очень?



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

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>

Процесс образования циркулирующей внеклеточной ДНК

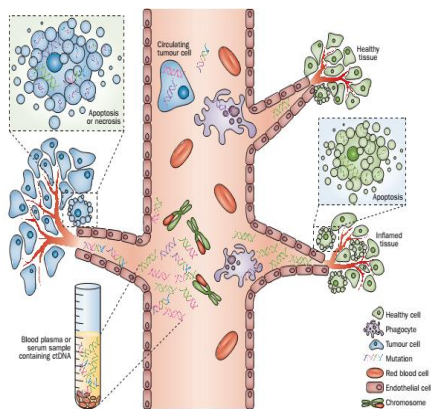


Figure 1 | Release and extraction of cfDNA from the blood. cfDNA is released from healthy, inflamed or diseased (cancerous) tissue from cells undergoing apoptosis or necrosis. cfDNA can be extracted from a blood sample and genetic alterations in the DNA released from cancerous tissue detected and quantified. 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: cfDNA, circulating free DNA; CTC, circulating tumour DNA.

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

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

Огромное количество влияющих факторов

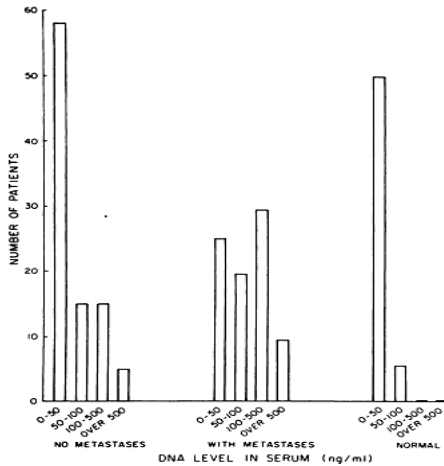


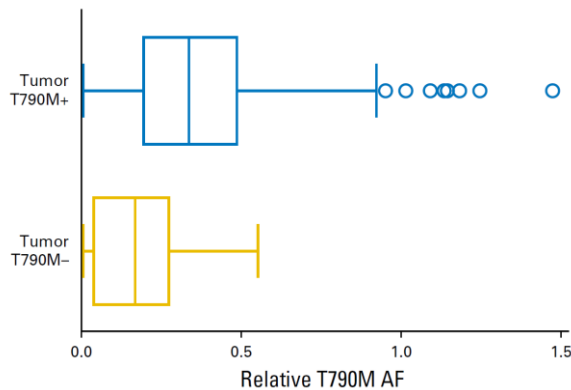
Chart 2. DNA levels in metastatic and nonmetastatic patients, compared to normal controls. The highest concentration in each group ranged between 500 and 5000 ng/ml.

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



Oxnard et al, JCO, 2016

А для T790M очень характерен аллельный дисбаланс

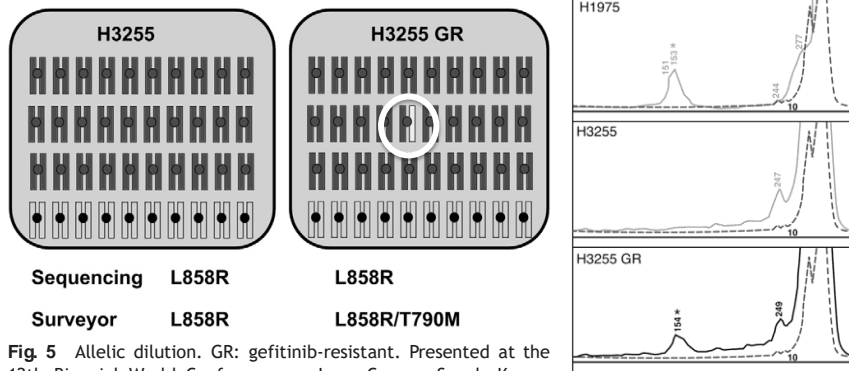
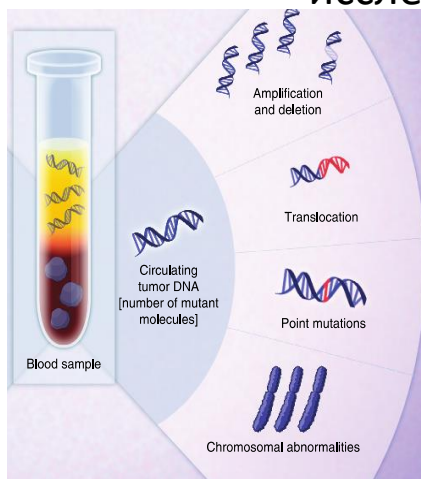


Fig. 5 Allelic dilution. GR: gefitinib-resistant. Presented at the 12th Biennial World Conference on Lung Cancer, Seoul, Korea, 2007. Reproduced with permission of author (Pasi A Jänne).

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

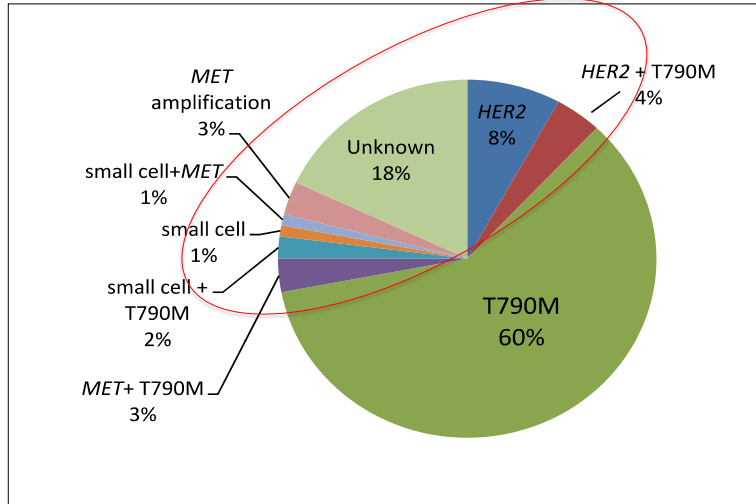
Тем не менее, цоDNA – привлекательный источник для исследований



- 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

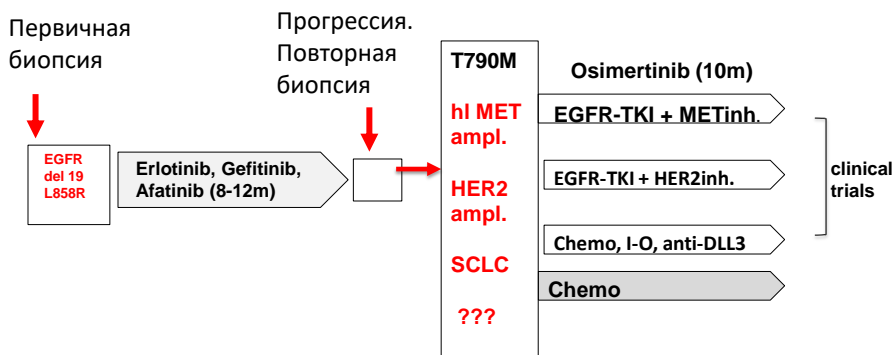
Haber et Velculescu, Cancer Discovery 2014

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



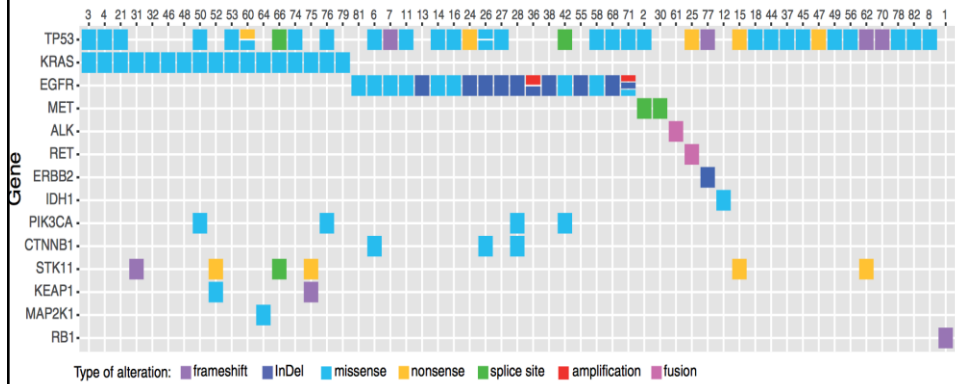
Wolf et al WCLC 2017

Какие же опции есть у нас для этих пациентов? И всегда ли жидкая биопсия может нам помочь?



Wolf et al WCLC 2017

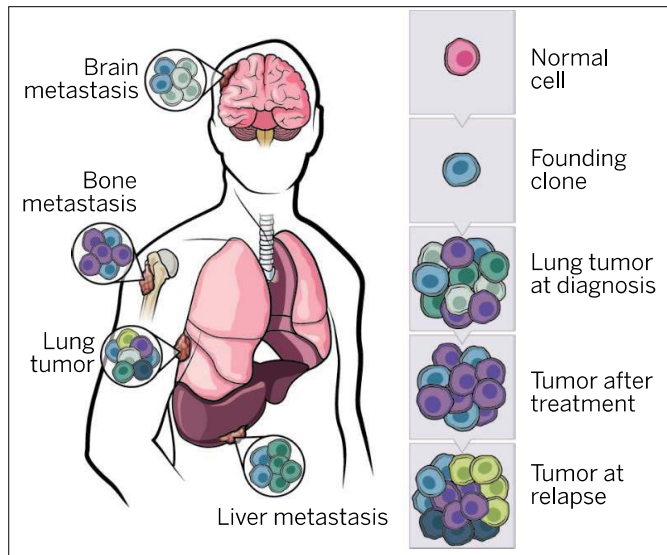
Мы можем многое с помощью NGS



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

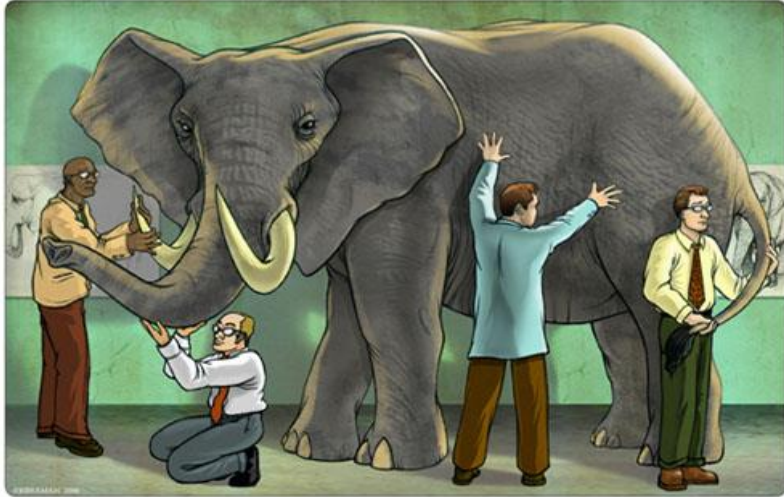
Müller, JTO 2017- NEOliquid assay

Гетерогенность опухоли



• Govindan, Science 2014

Что мы видим с помощью обычной биопсии?



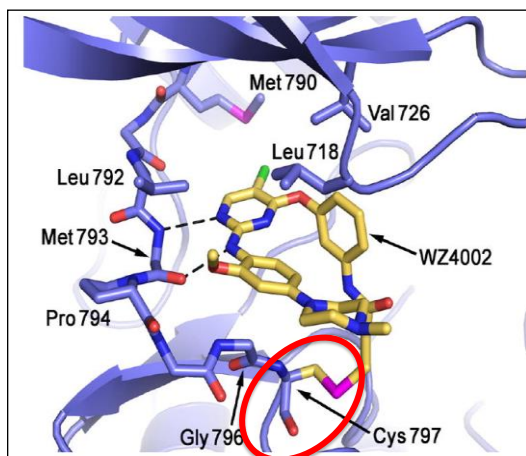
H.Wekelee et al WCLC 2017

Что мы видим с помощью
многонаправленной жидкой биопсии?



Из собственного архива Демидовой И.А.

И новая проблема – резистентность к препаратам III поколения



Мутация EGFR
C797S
ИТК III
поколения

Есть ли
противоядие?

Zhou et al, Nature 2009; Thress et al, Nature Medicine 2015

Что же делать?

- Если есть возможность взять повторно тканевую биопсию – это нужно сделать
- Жидкая биопсия – приемлемая замена тканевой, но не а 100% случаев
- Резистентность – естественное свойство опухоли, обусловленное многими факторами
- Но останавливаться нельзя...


**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКИ
В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**



практическое руководство для врачей
www.cancergenome.ru

Практическое руководство для врачей. Информационный портал молекулярно-генетической диагностики онкологических заболеваний cancergenome.ru [Электронный ресурс], 31.07.15, URL: <http://www.cancergenome.ru/Files/pdf/buklet.pdf>



Алгоритм подготовки плазмы для обнаружения мутаций в циркулирующих нуклеиновых кислотах.

1 Получите венозную кровь пациента (не менее 10 мл) в вакуумные пробирки со стабилизатором ЭДТА (сиреневая крышка). Используйте иглу максимального возможного диаметра. Можно использовать несколько пробирок на одного пациента

2 Не позднее чем через 1 час после получения крови отделите плазму:

2a Центрифугируйте пробирку с кровью 10 мин при 1.000-2.000g.

2b Не задевая осадок, отберите пипеткой из всех пробирок с кровью, полученной у пациента, верхнюю прозрачную фракцию (плазму), и перенесите её в чистую пробирку, пригодную для дальнейшего центрифугирования. Если изначально использовались несколько пробирок на одного пациента, то полученную из них плазму можно объединить в одной новой пробирке. Первую пробирку с осадком ферментные элементы утилизируйте.

2c Центрифугируйте пробирку с плазмой 10 мин при 2.000-16.000g. Если такой режим центрифугирования недоступен, центрифугируйте плазму 10 мин при 1.000-2.000g.

2d Не задевая осадок на дне пробирки, отберите пипеткой верхнюю прозрачную фракцию, и перенесите её в чистую пробирку, пригодную для замораживания (с завинчивающейся крышкой).

2e Убедитесь, что в пробирке с плазмой нет осадка. При наличии осадка повторите центрифугирование и перенесите надосадочную жидкость в новую чистую пробирку для замораживания.

2f Промарируйте пробирку с плазмой индикаторами пациента и датой забора крови. Убедитесь, что для маркировки используется водостойкий маркер.

3 Немедленно поместите плазму в морозильник с температурой -70°C или (при его отсутствии) – в морозильник с температурой $\leq 20^{\circ}\text{C}$. Не доставляйте пробирку из морозильника до прибытия курьера.

Брошюра программы совершенствования мол.генетической диагностики RUSSCO, с.4

Спасибо за внимание!