



СЕЧЕНОВСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)
Институт молекулярной медицины

Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

к.м.н., доц. Михайленко Д.С.

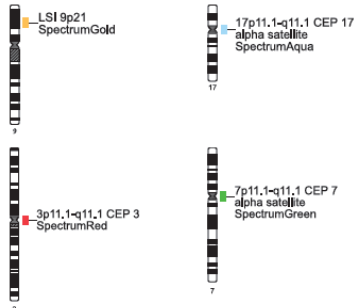
Научно-практическая конференция РООП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.

Лабораторная диагностика РМП

1. Общий анализ мочи, посев мочи
2. Цитологический анализ мочи
3. Если цитология, УЗИ, экскреторная урография, цистография, КТ позволили заподозрить РМП – выполняется цистоскопия с биопсией и последующим патоморфологическим исследованием полученного биоптата
4. Существующие белковые онкомаркеры: NMP22, ВТА, UBC-антиген – имеют ряд ограничений

Научно-практическая конференция АОП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.

UroVysion – FISH осадка мочи в диагностике РМП



- анализируют первые 25 атипичных клеток
- минимум 4 из 25 атипичных клеток показывают aberrации 2 и более исследуемых хромосом в каждой из них
- 12 и более атипичных клеток несут гомозиготную делецию 9p21



Результат теста считают положительным

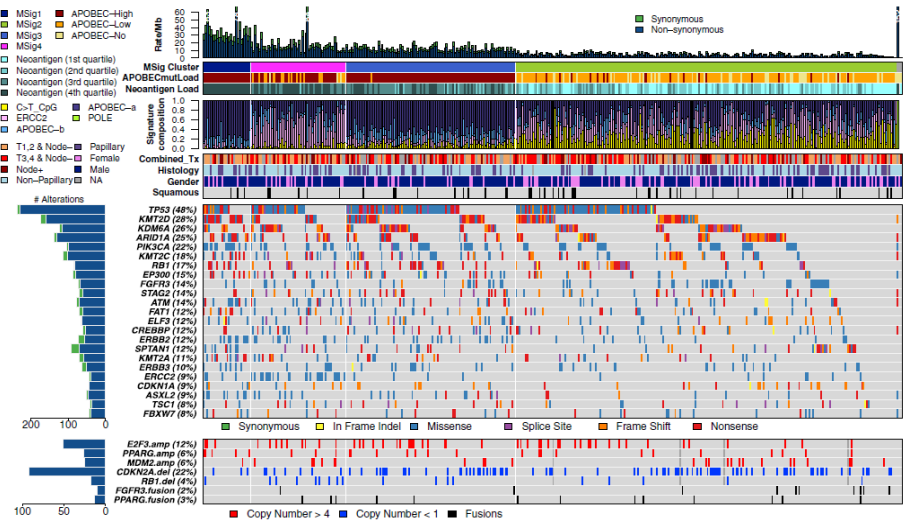
Ограничения метода:

- необходимость валидации результатов теста вторым специалистом при пограничном уровне хромосомных aberrаций
- некорректность его результатов при бактериурии
- недостаточное для анализа количество атипичных клеток в осадке мочи при опухоли размером менее 5 мм
- возможность ложноположительного результата у пациентов с опухолями мочеполовой системы других локализаций, также несущими множественные хромосомные aberrации

Клиническая чувствительность и специфичность UroVysion составляет 71 и 66%, соответственно (суммарно для всех подгрупп РМП). UroVysion одобрен FDA как диагностический тест у пациентов с гематурией при подозрении на РМП.

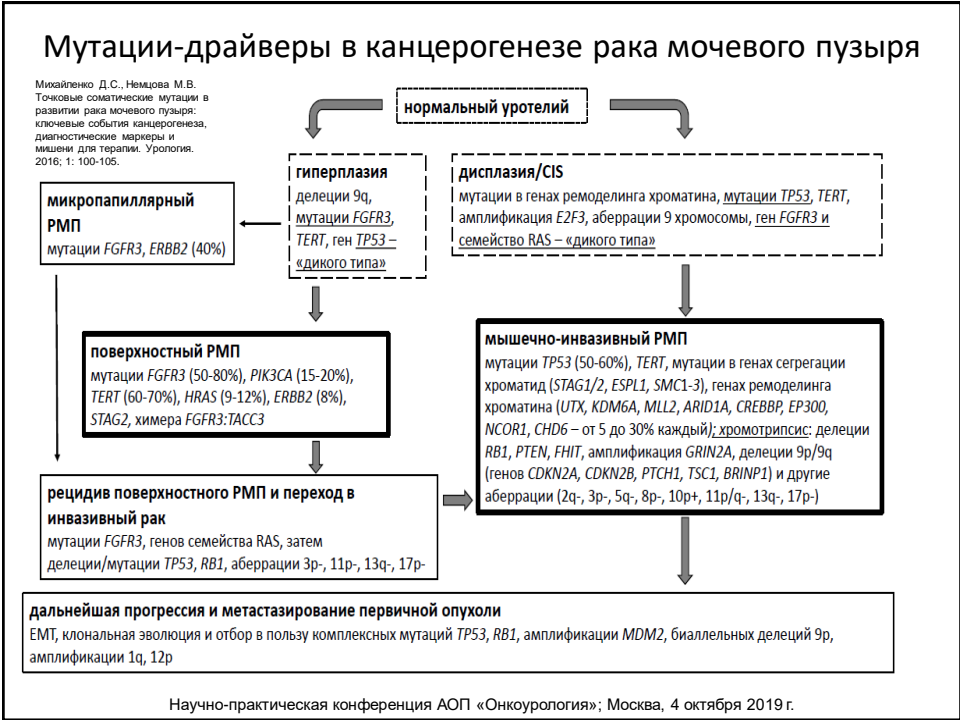
Научно-практическая конференция АОП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.

Что дают результаты современных полногеномных исследований?



Robertson A.G. et al. Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer. Cell. 2017; 171(3): 540-556.

Научно-практическая конференция АОП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.



CxBladder Triage – на основе панели РНК-маркеров

G
Biomarker Gene Descriptions
> MDK: blood vessel growth and cell migration
> HOXA13: Cell differentiation
> CDK1: Cell division
> IGFBP5: Programmed cell death
> CXCR2: Inflammation

P
Phenotypic Clinical Characteristics
Age < Approximately 90% of people with bladder cancer are over 55
Sex < Men are up to 4 times more likely to develop bladder cancer than women
Smoking History < Current or ex-smokers are 3 times more likely to get bladder cancer than non-smokers
Hematuria History < The occurrence, frequency and duration of hematuria is a classic warning sign of possible bladder cancer

$$P \text{ INDEX} = -3.78 + (0.81 \times \text{Age} + 0.46 \times \text{Gender} + 0.78 \times \text{Smoking history} + 0.59 \times \text{Hfreq})$$

+

$$G \text{ INDEX} = -6.22 + (0.77 \times \text{IGFBP5} - 1.11 \times \text{HOXA13} + 1.56 \times \text{MDK} + 1.24 \times \text{CDK1} - 0.43 \times \text{CXCR2})$$

↓

$$G + P \text{ INDEX} = -8.46 + (0.79 \times \text{IGFBP5} - 1.60 \times \text{HOXA13} + 2.10 \times \text{MDK} + 0.95 \times \text{CDK1} - 0.38 \times \text{CXCR2}) + (0.64 \times \text{Age} + 1.11 \times \text{Gender} + 0.98 \times \text{Smoking history} + 0.56 \times \text{Hfreq})$$

Kavalieris L. et al., BMC Urology. 2015; 15:23

AUC для P-индекса 0,66 → AUC для G+P-индекса 0,86
AUC для G-индекса 0,83

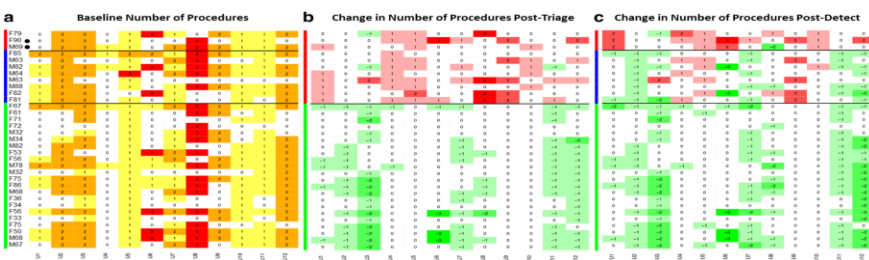
Научно-практическая конференция АОП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.

CxBladder Triage + Detect – сравнение с другими методами

Table 3 Measured and published sensitivity and specificity for each test in the integrated dataset before imputation, mean and 95 % CIs

	Measured		Published	
	Sensitivity, % (95 % CI)	Specificity, % (95 % CI)	Sensitivity, % (95 % CI)	Specificity, % (95 % CI)
Cytology	45.5 (40.6–50.4)	96.3 (94.5–97.9)	56.1 (43.3–68.3) [18]	94.5 (91.9–96.5) [18]
NMP22	44.9 (37.4–52.3)	89.0 (86.5–91.5)	50.0 (37.4–62.6) [18]	88.0 (84.6–91.0) [18]
FISH	40.0 (22.7–52.3)	87.3 (83.7–91.6)	72 (69–75) [22]	83 (82–85) [22]
			61.9 [23]	89.7 [23]
			18 [24]	90 [24]
Cxbladder Detect	79.5 (71.1–87.8)	82.2 (79.2–85.0)	81.8 [18]	85.1 (fixed) [18]

Breen V. et al., 2015.



Lough T. et al., 2018.

Научно-практическая конференция АОП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.

Комбинация анализа мутаций *FGFR3* с метилированием и экспрессией других генов (CertNDx Bladder Cancer Assay)



ORIGINAL ARTICLE

A Noninvasive Multianalyte Urine-Based Diagnostic Assay for Urothelial Cancer of the Bladder in the Evaluation of Hematuria

R. Jeffrey Kames, MD; Cecilia A. Fernandez, PhD; and Anthony P. Shuber, MS

TABLE 1. MADR Assay Performance for the Derivation Population

Biomarker	Negative assay criteria	NPV (%)	Sensitivity (% [range])	POE (% [range])
<i>TWIST1</i>	<139 K	ND	84 (71-94)	82 (76-86)
<i>NID2</i>	<680 K	ND	33 (20-48)	100 (99-100)
<i>MMP-2</i>	<1,100 ng/mL	ND	35 (22-51)	74 (68-79)
<i>FGFR3</i>	Negative	ND	10 (3-23)	99 (97-100)
All 4 biomarkers		99.5	94 (83-99)	65 (58-71)
Biomarker		PPV (%)	Specificity (% [range])	POE (% [range])
<i>FGFR3</i>	Positive	71	99 (97-100)	10 (3-23)

MADR = multianalyte diagnostic readout; MMP-2 = matrix metalloproteinase 2; ND = not determined; NPV = negative predictive value; PPV = positive predictive value; POE = power of exclusion; POI = power of inclusion.

Научно-практическая конференция АОП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.

Комбинация анализа мутаций *FGFR3* с метилированием других генов

Table 4 Comparison of sensitivities of *FGFR3* mutations, methylation, and combined markers according to stage and grade

A. Diagnosis study						
Markers	Primary tumor (n = 167)				Tumor grade, % (no.)	
	Tumor stage, % (no.)	pT1 (n = 25)	CIS (n = 6)	Other (n = 10)	Low (n = 100)	High (n = 67)
<i>FGFR3</i>						
All mutations	46.0 (58)	28.0 (7)	16.7 (1)	30.0 (3)	53.0 (53)	23.9 (16)
S249C	69.0 (40)	42.8 (3)			62.2 (33)	62.5 (10)
Y375C	13.8 (8)	28.6 (2)		33.3 (1)	17.0 (9)	12.5 (2)
R248C	10.3 (6)	28.6 (2)	100 (1)	33.3 (1)	11.3 (6)	25.0 (4)
G372C	5.2 (3)				5.7 (3)	
S249C/R248C	1.7 (1)				1.9 (1)	
S249C/Y375C				33.3 (1)	1.9 (1)	
Methylation	90.5 (114)	100 (25)	100 (6)	90.0 (9)	89.0 (89)	100 (67)
Combined markers	94.4 (119)	100 (25)	100 (6)	90.0 (9)	94.0 (94)	100 (67)
B. Follow-up study						
Markers	Recurrence (n = 72)				Tumor grade, % (no.)	
	pT1a (n = 55)	pT1 (n = 11)	CIS (n = 2)	Other (n = 4)	Low (n = 47)	High (n = 25)
<i>FGFR3</i>						
All mutations	43.6 (24)	36.4 (4)		50.0 (2)	46.8 (22)	32.0 (8)
S249C	58.3 (14)	100 (4)			54.6 (12)	75.0 (6)
Y375C	20.8 (5)				13.7 (3)	25.0 (2)
R248C	16.7 (4)			50.0 (1)	22.7 (5)	
G372C	4.2 (1)				4.5 (1)	
S249C/R248C				50.0 (1)	4.5 (1)	
Methylation	89.1 (49)	90.9 (10)	100 (2)	50.0 (2)	85.1 (40)	96.0 (24)
Combined markers	96.4 (53)	100 (11)	100 (2)	50.0 (2)	93.6 (44)	96.0 (24)

Roperch J.P. et al. Promoter hypermethylation of HS3ST2, SEPTIN9 and SLIT2 combined with *FGFR3* mutations as a sensitive/specific urinary assay for diagnosis and surveillance in patients with low or high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *BMC Cancer*. 2016; 16: 704.

Научно-практическая конференция АОП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.

Тест-система UroSEEK

Анализируемые aberrации:

- точковые мутации в генах *FGFR3*, *TP53*, *CDKN2A*, *ERBB2*, *HRAS*, *KRAS*, *PIK3CA*, *MET*, *VHL* и *MLL*
- мутации в промоторе гена *TERT*
- анеуплоидии

Table 1 Distribution of mutations of the UroSEEK gene panel in noninvasive bladder cancer

	Low-grade noninvasive papillary carcinoma	High-grade noninvasive papillary carcinoma + carcinoma in situ	p-value
UroSEEK genes	185/188 (98%)	161/185 (87%)	<0.0001
TERTSeqS	145/188 (77%)	121/185 (65%)	0.017
UroSeqS	131/188 (70%)	108/185 (58%)	0.030
<i>FGFR3</i>	87/188 (46%)	42/185 (23%)	<0.0001
<i>TP53</i>	15/188 (8%)	51/185 (28%)	<0.0001
<i>PIK3CA</i>	35/188 (19%)	9/185 (5%)	<0.0001
<i>CDKN2A</i>	10/188 (5%)	7/185 (4%)	0.644
<i>HRAS</i>	6/188 (3%)	3/185 (2%)	0.515
<i>KRAS</i>	5/188 (3%)	4/185 (2%)	1.0
<i>ERBB2</i>	1/188 (1%)	3/185 (2%)	0.604
<i>VHL</i>	1/188 (1%)	3/185 (2%)	0.604
<i>MLL</i>	0/188 (0%)	1/185 (1%)	0.994
<i>MET</i>	0/188 (0%)	0/185 (0.0%)	.

Table 2 Distribution of mutations of the UroSEEK gene panel in invasive bladder cancer

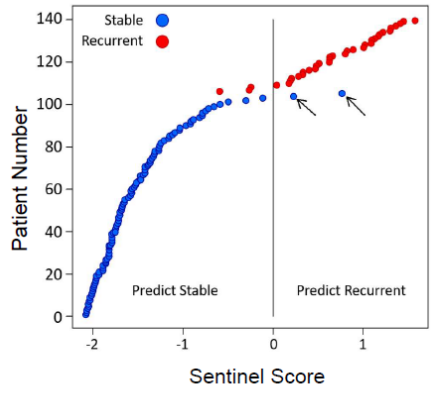
	pT1 tumors	Muscle-invasive bladder cancer	p-value
UroSEEK genes	101/111 (91%)	40/43 (93%)	0.933
TERTSeqS	80/111 (72%)	27/43 (63%)	0.354
UroSeqS	62/111 (56%)	32/43 (74%)	0.053
<i>FGFR3</i>	21/111 (19%)	5/43 (12%)	0.399
<i>TP53</i>	31/111 (28%)	23/43 (54%)	0.005
<i>PIK3CA</i>	10/111 (9%)	1/43 (2%)	0.273
<i>CDKN2A</i>	5/111 (5%)	7/43 (16%)	0.035
<i>HRAS</i>	3/111 (3%)	1/43 (2%)	1.0
<i>KRAS</i>	3/111 (3%)	0/43 (0%)	0.661
<i>ERBB2</i>	3/111 (3%)	1/43 (2%)	1.0
<i>VHL</i>	4/111 (4%)	0/43 (0%)	0.486
<i>MLL</i>	0/111 (0%)	0/43 (0%)	.
<i>MET</i>	0/111 (0%)	0/43 (0%)	.

Assay categories (UroSEEK and its components) and significant p-value are listed in bold

Springer S.U. et al., 2017; Eich M.L. et al., 2019.

Научно-практическая конференция АОП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.

Тест-система на основе определения экспрессии малых интерферирующих РНК: miR Sentinel BCR Test



Training Data Set :
 44 with recurrent disease confirmed by positive cystoscopy
 106 with stable disease, confirmed by negative cystoscopy

The miR-BCR Test correctly identified:

- 41/44 patients no cancer (sensitivity >95%)
- 102/104 patients with cancer (specificity >98%)

2019 г. Но пока только по информации разработчиков.....

Научно-практическая конференция АОП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.

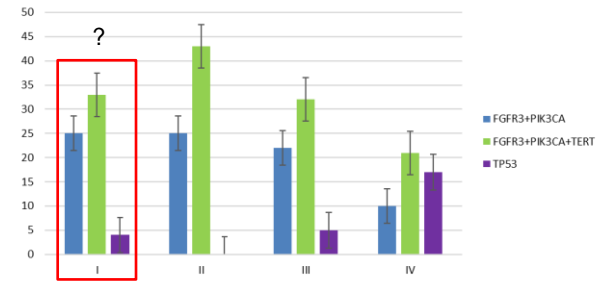
Анализ мутаций FGFR3, PIK3CA, TERT и TP53 в образцах РМП (собственные данные)



67% образцов имели как минимум одну из тестируемых мутаций

Распределение мутаций в группах сравнения:

Ключевой вопрос прогноза:
 pTaG2/3+pT1G1 (II) vs pT1G2/3 (III) vs >pT2 (IV):
 есть ли генетические прогностические классификаторы лучше?

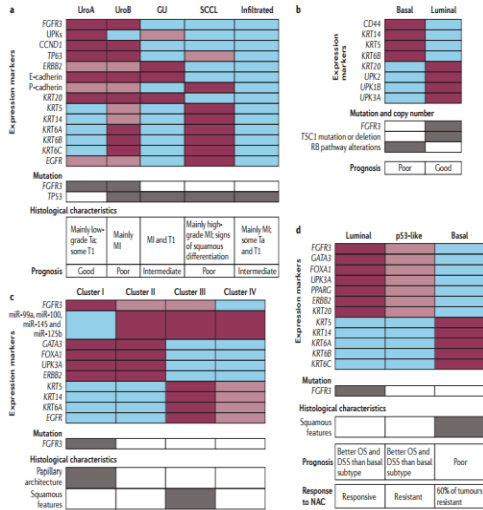


Научно-практическая конференция АОП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.

Таргетная иммунотерапия рака мочевого пузыря



Панели прогностических экспрессионных маркеров при РМП



Лучше отвечают на атезолизумаб пациенты со II кластером по TCGA, а на ниволумаб – с III кластером TCGA

Rosenberg J.E. et al. 2016, Felsenstein K.M. et al. 2018, Wezel F. et al. 2017.

Knowles M.A., Hurst C.D., 2014.

Научно-практическая конференция АОП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.

Преимущества и недостатки предикторов ответа на таргетную иммунотерапию

	Advantages	Disadvantages
PD-L1 Immunohistochemistry	<ul style="list-style-type: none"> Most well-characterized biomarker to date Rapid turn around time from biopsy IHC assays are standardized specific to each therapy Relatively inexpensive 	<ul style="list-style-type: none"> Discordant results across studies Poor negative predictive value: responses seen in PD-L1 negative tumors Multiple antibodies in use to detect PD-L1 Unclear if composite score or tumor cell score is more reflective of the tumor microenvironment Biomarker is dynamic over time and does not reflect PD-1/PD-L1 interactions in tumor draining lymph nodes Does not assess status of the immune microenvironment
TCGA Subtyping	<ul style="list-style-type: none"> Evidence of increased immunotherapy response in luminal cluster II subtypes with atezolizumab Basal cluster I subtype demonstrated increased ORR with nivolumab therapy Distinct classifications based on tumor gene signatures (i.e. few patients with gene signatures between groups) 	<ul style="list-style-type: none"> Multiple gene cluster assays used, difficult to standardize TCGA subtyping in patients treated with immunotherapy is limited to small numbers in each cohort (<60 patients in IMVigor study) May require deep sequencing to appropriately identify the TCGA subtype Responses are achieved in all 4 TCGA clusters, suggesting a low negative predictive value Does not assess status of the immune microenvironment
Tumor Mutational Burden	<ul style="list-style-type: none"> Clear examples of durable responses (> 6 months) in patients with high mutation burden Correlation demonstrated in subgroup analyses between tumor mutation burden and overall response rates with atezolizumab and pembrolizumab 	<ul style="list-style-type: none"> Difficult to standardize between sequencing assays Relative weight of TP53 and translocations not yet elucidated Relationship between tumor mutation burden and neoantigen burden is still undefined Depth of sequencing required to predict responders vs nonresponders undetermined Evolution of tumor over time may change the relative mutation burden Does not assess status of the immune microenvironment
Immune Cell Gene Expression Profiling	<ul style="list-style-type: none"> Higher reproducibility relative to PD-L1 IHC to predict immunotherapy responses Only biomarker assessing immune cell status rather than tumor characteristics Correlated with response to therapy in subgroup analyses of nivolumab and pembrolizumab trials 	<ul style="list-style-type: none"> No standardized commercially available gene panel as of yet. Multiple gene panels currently available (T-cell panel, combined T-cell tumor cell panel, IFN-γ specific) Insufficient negative predictive value: responders seen in all groups Cost

Aggen D.H., Drake C.G. Biomarkers for immunotherapy in bladder cancer: a moving target. J Immun Ther Cancer (2017) 5:94

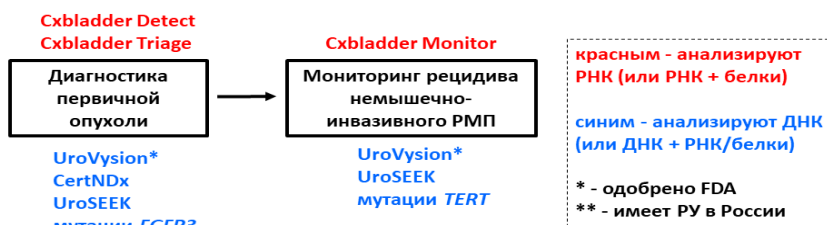
Научно-практическая конференция АОП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.

Общий обзор показаний к применению молекулярно-генетических тест-систем при РПЖ и РМП

Рак предстательной железы



Рак мочевого пузыря



Научно-практическая конференция АОП «Онкоурология»; Москва, 4 октября 2019 г.