Роль передовых методов диагностики в лечении онкологических заболеваний

Кирилл Соловьев, к.б.н.

Группа молекулярно-генетической диагностики BIOCAD

20 апреля 2018 года

©BIOCAD 2018

BIOCAD
Biotechnology Company

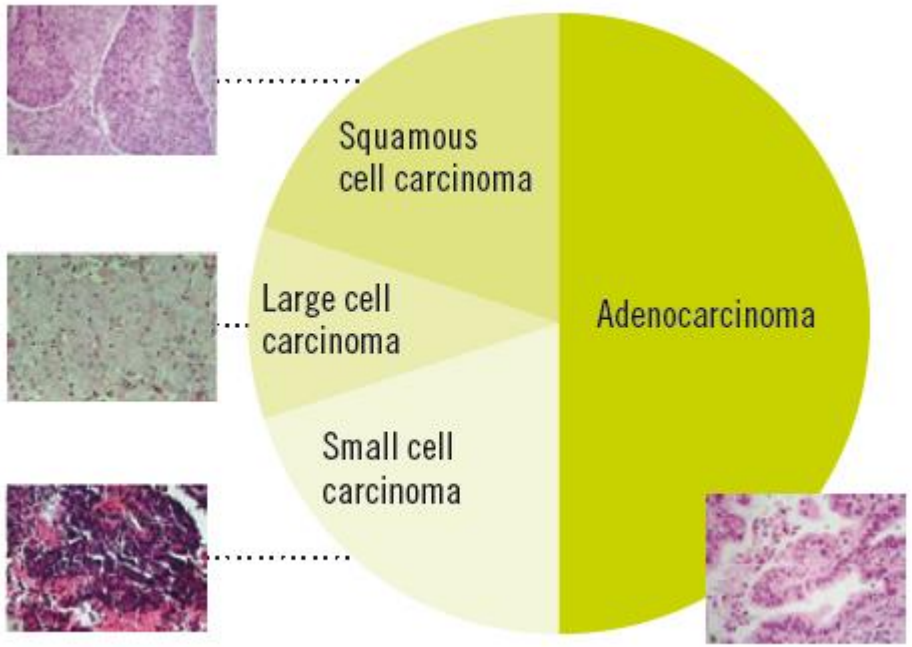
Что мы знаем о генетике онкологических заболеваний?

©BIOCAD 2018

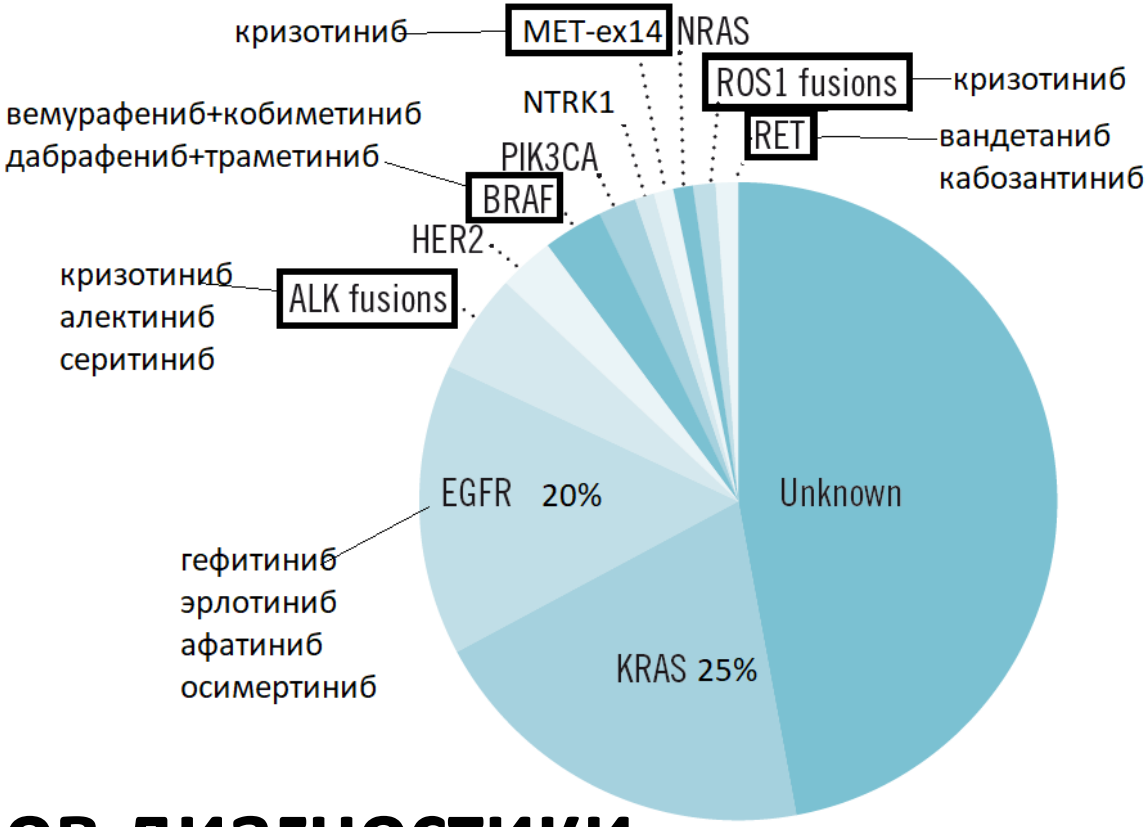
Речь пойдет о роли методов молекулярной генетики и геномики в онкологии.

Эволюция представлений о гетерогенности РЛ

Гистологические подтипы



Молекулярные подтипы НМРЛ



Эволюция методов диагностики

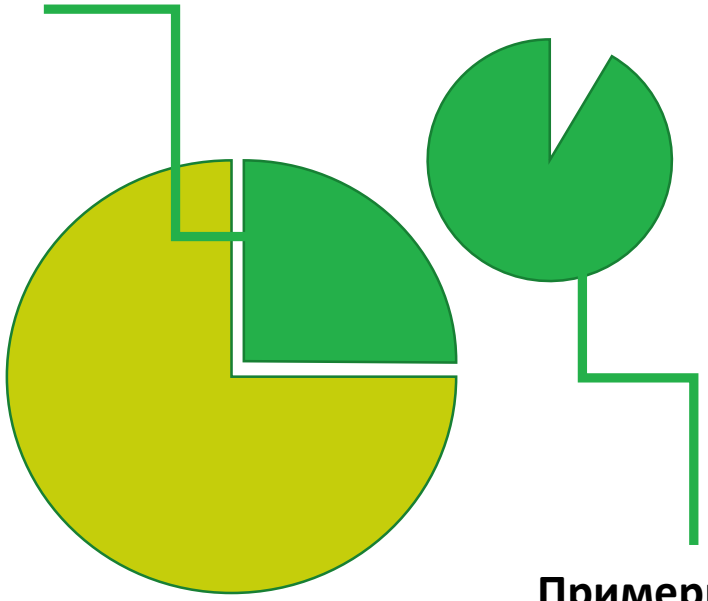
IHC→ FISH/qPCR/dPCR→ NGS

©BIOCAD 2018

AmpliCAD-EGFR-тест. Оценка статуса мутаций L858R, del19 и T790M гена *EGFR*.

Мутации *EGFR*,входящие в тест-систему

Среди больных НМРЛ встречаемость мутаций в *EGFR* 10% (США) - 35% (Азия) Примерно 20% в РФ



Примерно 90% мутаций *EGFR* это L858R, del19

Название	Изменение в нуклеотидах	Номер в базе данных COSMIC
T790M	c.2369C>T 6240	6240
L858R	c.2573T>G	6224
Делеции в 19-ом экзоне	c.2235_2249del15	6223
	c.2235_2252>AAT	13551
	c.2236_2253del18	12728
	c.2237_2251del15	12678
	c.2237_2254del18	12367
	c.2237_2255>T	12384
	c.2236_2250del15	6225
	c.2238_2255del18	6220
	c.2238_2248>GC	12422
	c.2238_2252>GCA	12419
	c.2239_2247del9	6218
	c.2239_2253del15	6254
	c.2239_2256del18	6255
	c.2239_2248TTAAGAGAAG>C	12382
	c.2239_2258>CA	12387
	c.2240_2251del12	6210
	c.2240_2257del18	12370
	c.2240_2254del15	12369
	c.2239_2251>C	12383

http://www.rosoncoweb.ru/news/society/2017/06/27-2/

Distribution of EGFR Mutations in 10,607 Russian Patients with Lung Cancer. Imyanitov, Evgeny N., et al., 2016, Molecular Diagnosis & Therapy https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs40291-016-0213-4

© BIOCAD 2017

BIOCAD Biotechnology Company

Состав набора AmpliCAD-EGFR-тест

- «ПЦР-микс» (Taq, буфер, Mg2+, dNTP)
- смесь праймеров и зондов «T790M»
- смесь праймеров и зондов «L858R»
- смесь праймеров и зондов «del- 19»
- смесь праймеров и зондов внешнего контроля амплификации «ВК» (на 28 экзон *EGFR*)
- положительный контрольный образец «ПКО»
- отрицательный контрольный образец «ОКО» (вода не содержащая нуклеаз)
- инструкция по применению

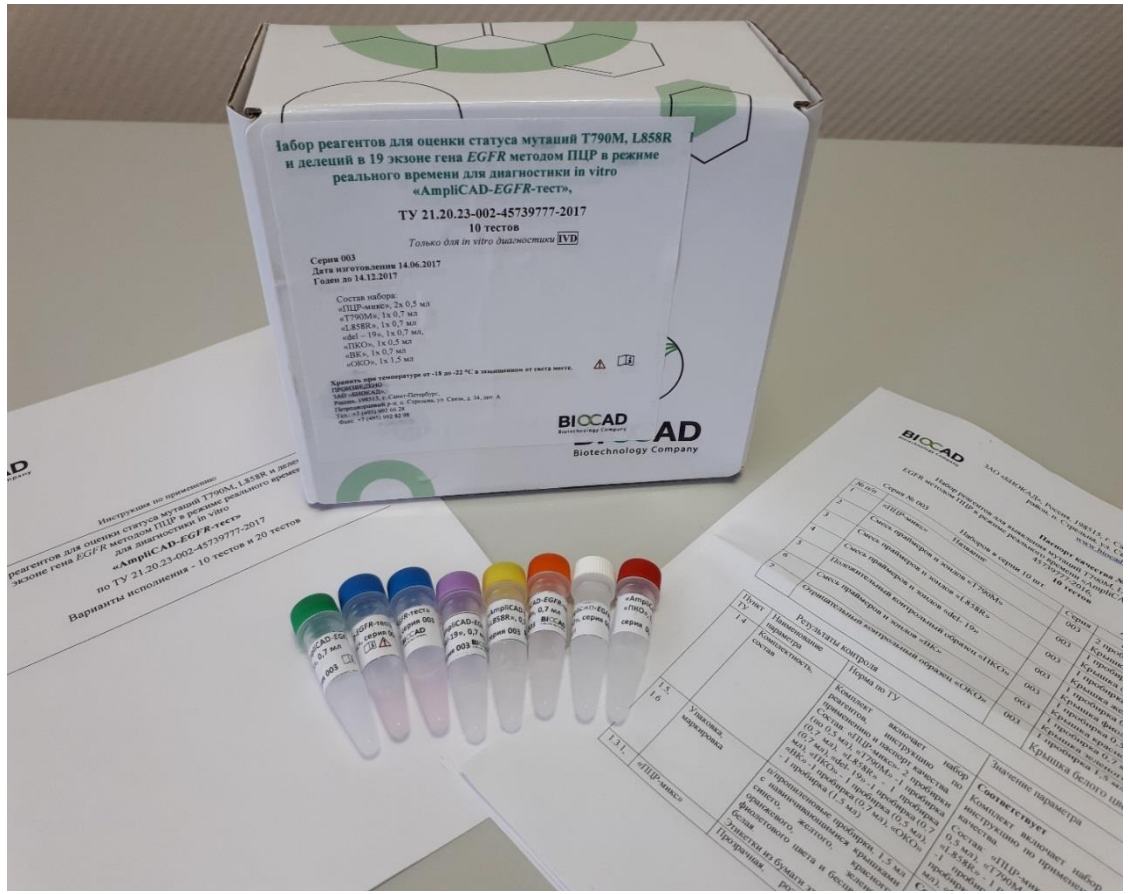
Принцип действия – ПЦР с аллель-специфическими праймерами

Материалом для исследования служит ДНК, выделенная из FFPE срезов

Рекомендованный прибор Rotor-Gene Q

10 или 20 тестов

(для проведения анализа 10 или 20 пациентам)



В разработке AmpliCAD-EGFR test 2.0 для cfDNA…

©BIOCAD 2018

Технология быстро меняется

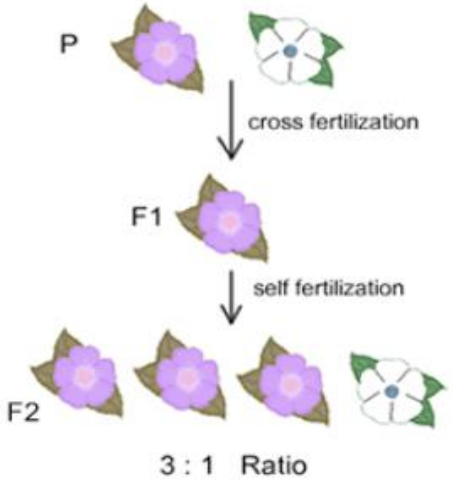
1880

1950

2018

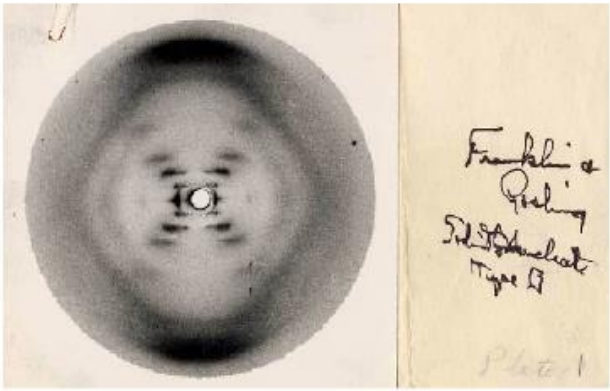
©BIOCAD 2018

Вместе с технологией меняется наука



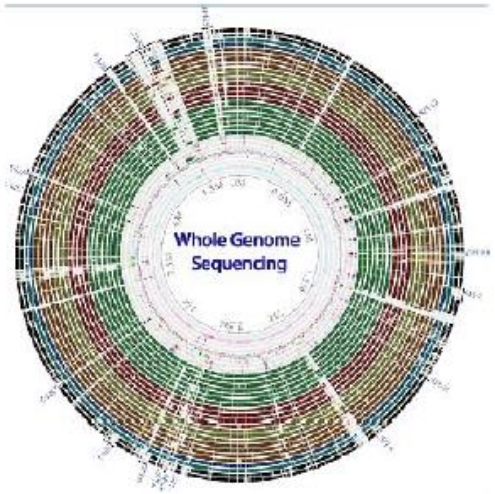
Эксперимент Менделя

1865



Структура ДНК

1953

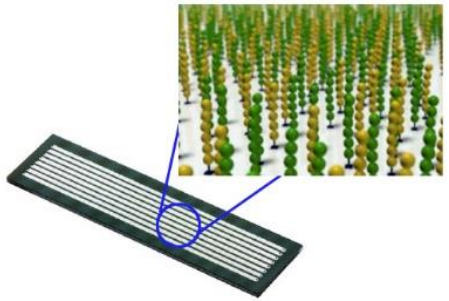
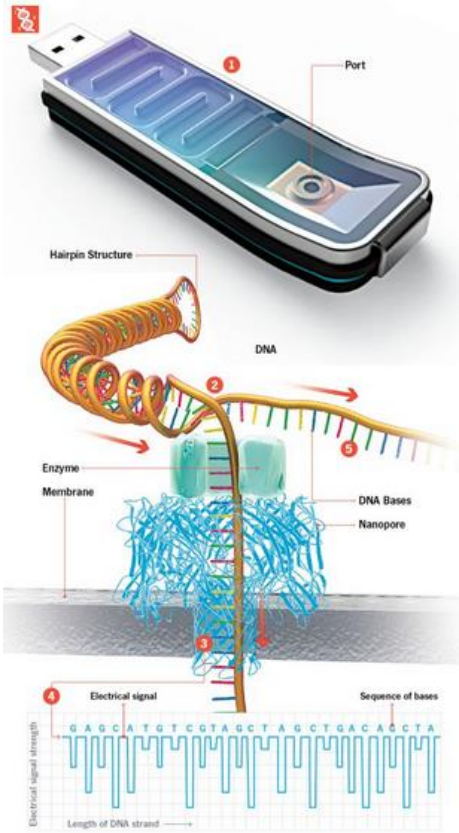
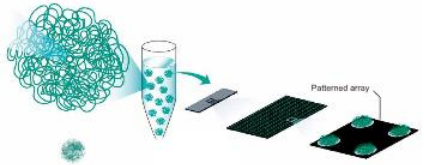


Секвенирование геномов

2018

©BIOCAD 2018

Геномные технологии. Технологии секвенирования 2018

флуоресцентное	полупроводниковое	мономолекулярное		наноболлы
illumina	ThermoFisher SCIENTIFIC	PACIFIC BIOSCIENCES	Oxford NANOPORE Technologies	华大基因 BGI
				
NEW HiSeq 2500	Ion S5	Sequel		BGISEQ-500

©BIOCAD 2018

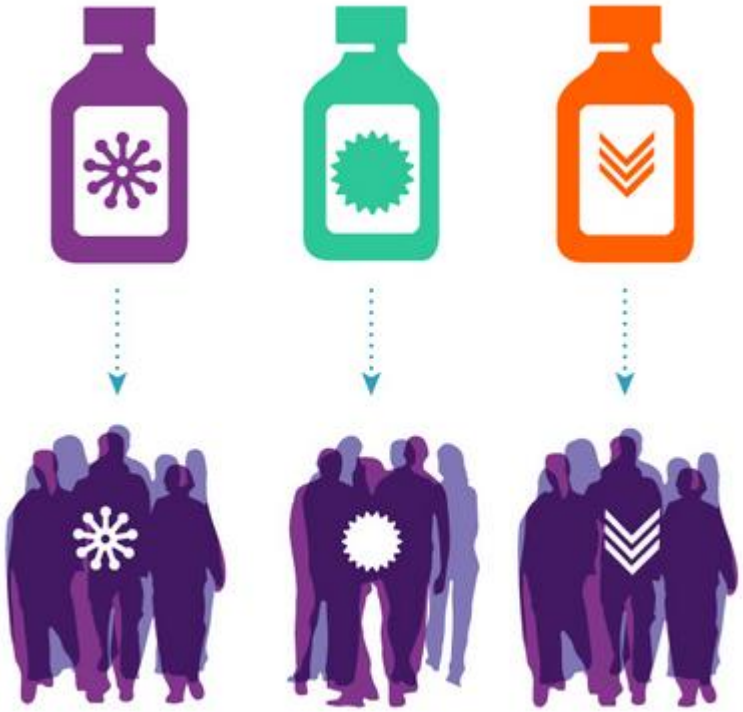
Стоимость

- Стоимость снижается
- Всё-равно, пока стоимость остаётся довольно высокой
- Внедрение геномного секвенирования в медицинскую практику, в силу его высокой стоимости, пока затруднено

©BIOCAD 2018

Клиническое применение NGS. Таргетная терапия.

- Наличие у пациента определенного генетического изменения во многом определяет будет ли для его лечения эффективен тот или иной препарат.
- Определение мутационного статуса - сейчас является необходимым условием назначения целого ряда таргетных препаратов.
- NGS позволяет оценить одновременно статус всех клинически-значимых мутаций.
- Используют короткие панели генов.
- Экономия биопсийного материала пациента.
- Экономия времени за счет того, что не нужно делать отдельный анализ для оценки статуса каждой отдельной мутации.



Using the genetic changes in a patient's tumor to determine their treatment is known as precision medicine.
Credit: National Cancer Institute

©BIOCAD 2018

Клиническое применение NGS. Таргетная терапия.

INDICATIONS	BIOMARKER	FDA-APPROVED THERAPY*
Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)	*EGFR* exon 19 deletions and *EGFR* exon 21 L858R alterations	Gilotrif® (afatinib), Iressa® (gefitinib), or Tarceva® (erlotinib)
	EGFR exon 20 T790M alterations	Tagrisso® (osimertinib)
	ALK rearrangements	Alecensa® (alectinib), Xalkori® (crizotinib), or Zykadia® (ceritinib)
	BRAF V600E	Tafinlar® (dabrafenib) in combination with Mekinist® (trametinib)
Melanoma	*BRAF* V600E	Tafinlar® (dabrafenib) or Zelboraf® (vemurafenib)
	BRAF V600E or V600K	Mekinist® (trametinib) or Cotellic® (cobimetinib), in combination with Zelboraf® (vemurafenib)
Breast Cancer	*ERBB2* (HER2) amplification	Herceptin® (trastuzumab), Kadcyla® (ado-trastuzumab-emtansine), or Perjeta® (pertuzumab)
Colorectal Cancer	*KRAS* wild-type (absence of mutations in codons 12 and 13)	Erbitux® (cetuximab)
	KRAS wild-type (absence of mutations in exons 2, 3 and 4) and *NRAS* wild-type (absence of mutations in exons 2, 3 and 4)	Vectibix® (panitumumab)
Ovarian Cancer	*BRCA1/2* alterations	Rubraca® (rucaparib)

©BIOCAD 2018

Клиническое применение NGS. Иммунотерапия.

- Иммунотерапия – очень эффективный подход в борьбе против рака, но эффективность не одинакова для всех пациентов.
- Как выявить пациентов, для которых иммунотерапия будет максимально эффективна?
- Недавние эксперименты показывают, что чем больше специфических мутаций приводящих к появлению неоантигенов будут иметь опухолевые клетки, тем больше шансов, что опухоль будет атакована иммунной системой.
- Какой биологический процесс лежит в основе того, что соматические мутации приводят к появлению (обычно уникальных) высокоиммуногенных опухолевых антигенов (неоантигенов)?
- Какая связь в этом контексте между MMR, MSI, TMB и неоантигенами?

©BIOCAD 2018

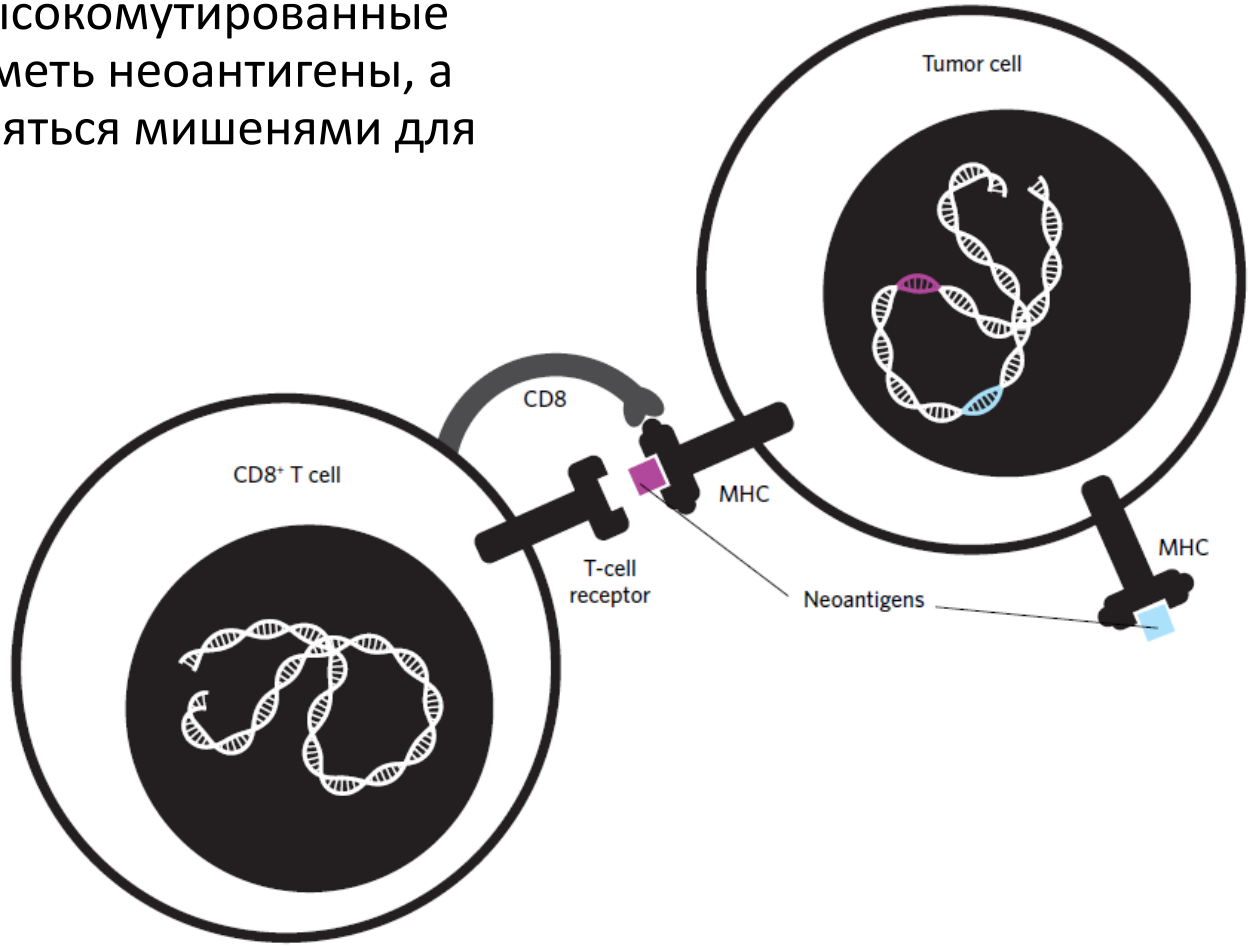
Неоантигены

- Неоантигены как биомаркер. Гипотеза: высокомутированные опухоли с большей вероятностью будут иметь неоантигены, а значит с большей вероятностью будут являться мишенями для активированных иммунных клеток.

- Методы выявления неоантигенов :

Полноэкзомное ДНК секвенирование (WES NGS).

Биоинформатические методы селекции и предсказания тех мутантных пептидов, которые при презентировании будут узнаваться иммунной системой.

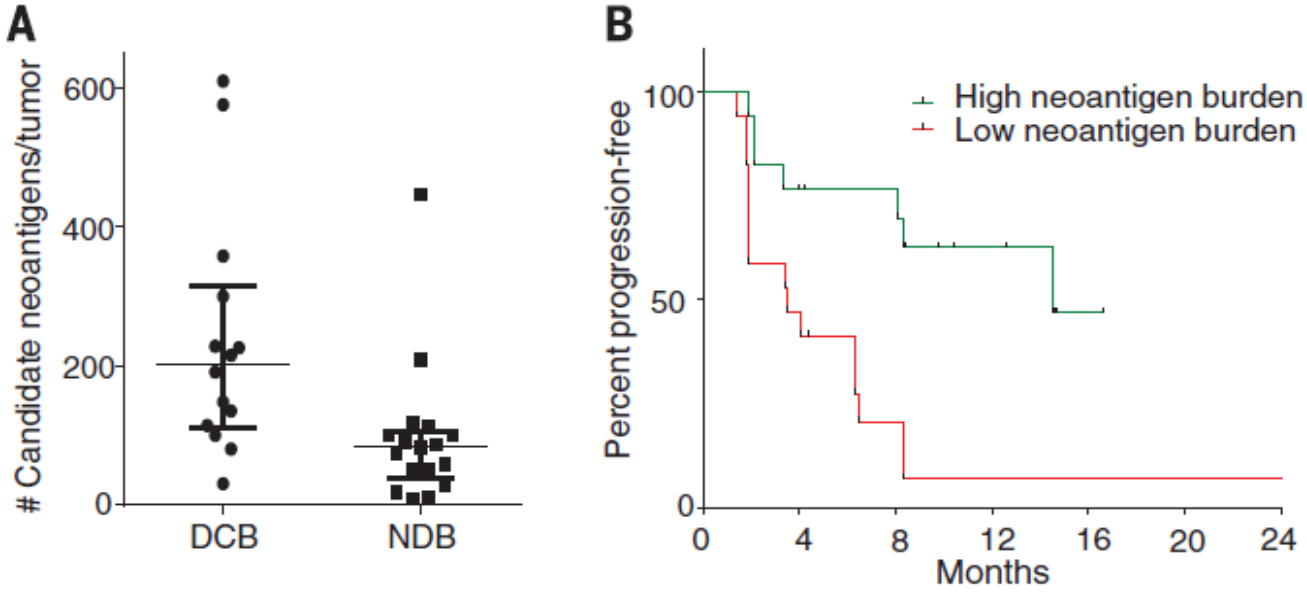


©BIOCAD 2018

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25838375

https://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/49000/title/Neoantigens-Enable-Personalized-Cancer-Immunotherapy/

Большее количество неоантигенов ассоциировано с лучшим ответом на терапию анти-PD-1 при НМРЛ



Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. Rizvi et al. Science. 2015 Apr 3;348(6230):124-8

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25765070

©BIOCAD 2018

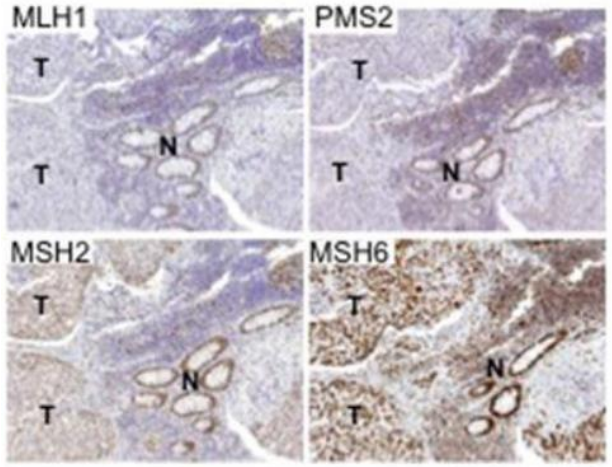
Есть ли альтернатива WES?

Микросателлитная нестабильность (MSI), как предиктор ответа на иммунотерапию

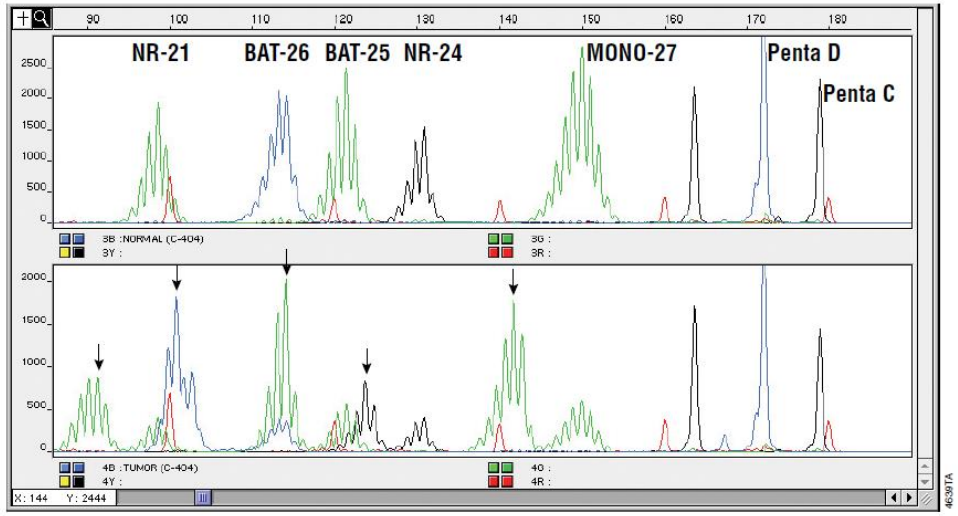
Методы определения статуса MSI:

- Дефекты белков мисматч-репарации (MMR) приводят к появлению соматических мутаций
- Выявление дефектов белков MMR методом ИГХ

Le et al., **Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade,** Science, 2017, 357: 409-413 http://science.sciencemag.org/content/357/6349/409



- Сравнение маркеров в нормальном образце (например, из крови) и исследуемом методом фрагментного анализа
- Критерий: **при ≥2 из 5 маркеров с измененной длиной, присваивается статус MSI-H**



©BIOCAD 2018

Пембролизумаб – первый случай ЛС, не связанного с конкретной нозологией (tissue-agnostic)

…Beyond CRC, other tumor types in which patients had responses included
endometrial cancer (n = 5),
biliary cancer (n = 3),
gastric or GE junction cancer (n = 5),
pancreatic cancer (n = 5),
small intestinal cancer (n = 3),
breast cancer (n = 2),
prostate cancer (n = 1),
esophageal cancer (n = 1),
retroperitoneal adenocarcinoma (n = 1), and
small cell lung cancer (n = 1)…

IHC identified dMMR cancer in 47 patients, MSI-H was identified by PCR in 60 patients, and 42 patients were identified with both tests… http://www.onclive.com/web-exclusives/fda-approves-pembrolizumab-for-microsatellite-instabilityhigh-and-mismatch-repair-deficient-cancers

FDA grants accelerated approval to pembrolizumab for first tissue/site agnostic indication

SHARE | TWEET | LINKEDIN | PIN IT | EMAIL | PRINT

Listen to the FDA D.I.S.C.O. podcast about this approval

On May 23, 2017, the U.S. Food and Drug Administration granted accelerated approval to pembrolizumab (KEYTRUDA, Merck & Co.) for adult and pediatric patients with unresectable or metastatic, microsatellite instability-high (MSI-H) or mismatch repair deficient (dMMR) solid tumors that have progressed following prior treatment and who have no satisfactory alternative treatment options or with MSI-H or dMMR colorectal cancer that has progressed following treatment with a fluoropyrimidine, oxaliplatin, and irinotecan.

This is the FDA's first tissue/site-agnostic approval.

The approval was based on data from 149 patients with MSI-H or dMMR cancers enrolled across five uncontrolled, multi-cohort, multi-center, single-arm clinical trials. Ninety patients had colorectal cancer and 59 patients were diagnosed with one of 14 other cancer types. Patients received either pembrolizumab, 200 mg every 3 weeks, or pembrolizumab, 10 mg/kg every 2 weeks. Treatment continued until unacceptable toxicity, or disease progression that was either symptomatic, rapidly progressive, required urgent intervention, or associated with a decline in performance status. A maximum of 24 months of treatment was administered.

The major efficacy outcome measures were objective response rate (ORR) assessed by blinded independent central radiologists' review according to RECIST 1.1, and response duration. ORR was 39.6% (95% CI: 31.7, 47.9). Responses lasted six months or more for 78% percent of those who responded to pembrolizumab. There were 11 complete responses and 48 partial responses. ORR was similar irrespective of whether patients were diagnosed with CRC (36%) or a different cancer type (46% across the 14 other cancer types).

The identification of MSI-H or dMMR tumor status for the majority of patients (135/149) was prospectively determined using local laboratory-developed, investigational polymerase chain reaction (PCR) tests for MSI-H

©BIOCAD 2018

Опухолевая мутационная нагрузка (tumor mutation burden, TMB) как предиктор ответа на иммунотерапию

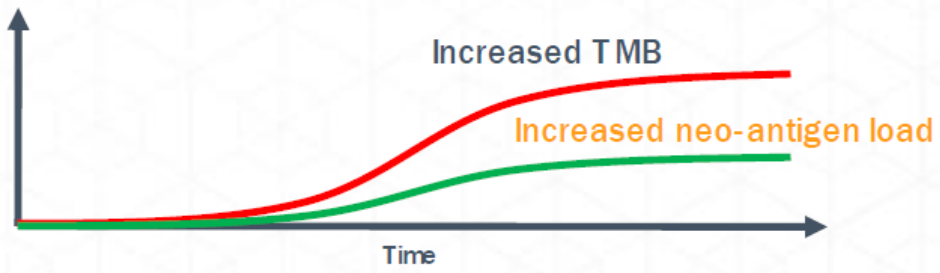
- Число соматических мутаций найденных среди 1 млн пар оснований просеквенированного фрагмента генома (mut/Mb).
- Интерпретация пока не окончательно утверждена.
- Методы оценкиTMB:

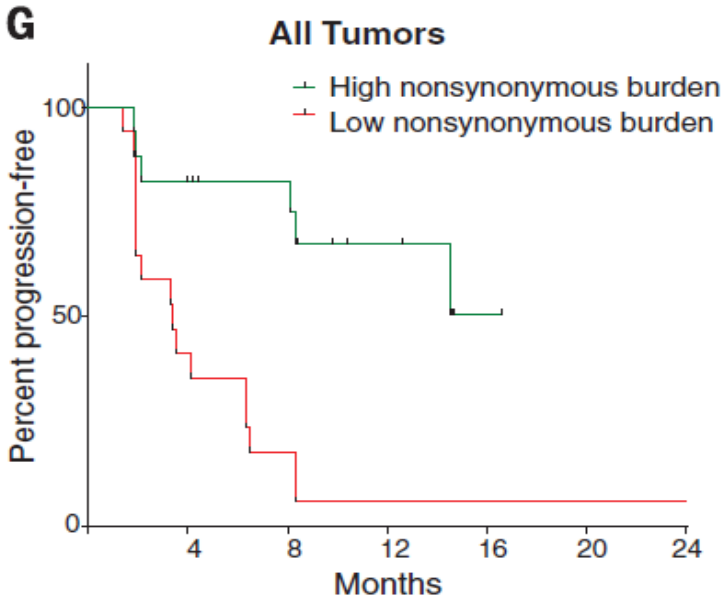
1) полноэкзонное секвенирование (WES)

2) полногеномное секвенирование

- **Можно ли снизить масштабы секвенирования?**

3) Секвенирование панелей генов с применением технологии capture-select/гибридизационных зондов?

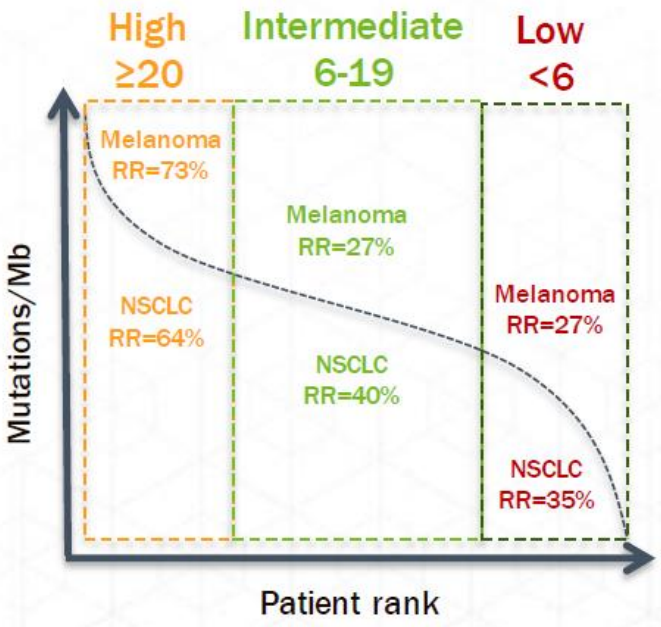




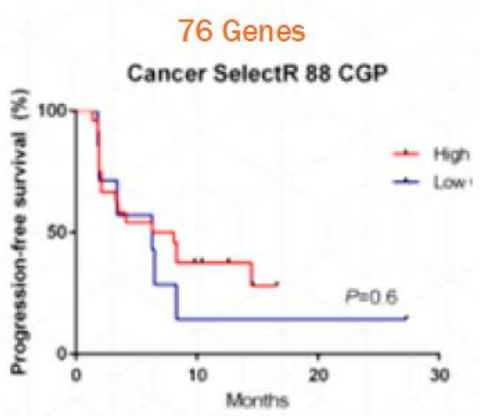
©BIOCAD 2018

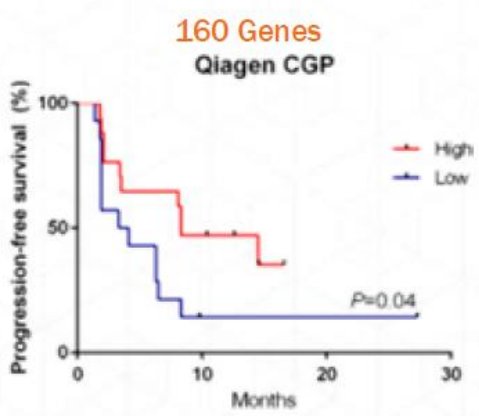
Применение TMB анализа в клинике

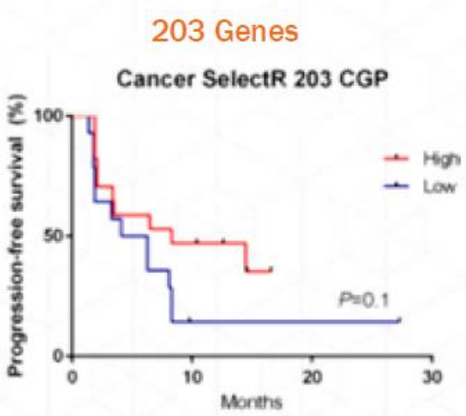
- **Статус TMB:**
- Высокой >=20 mut/Mb
- Средний 6-19 mut/Mb
- Низкий < 6 mut/Mb

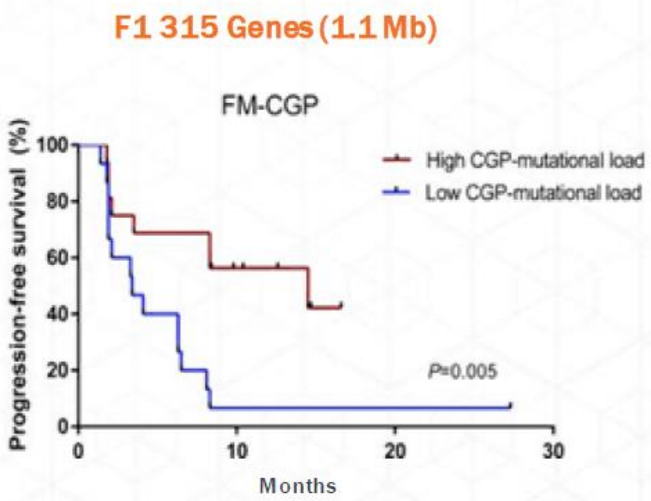


Секвенирование панелей генов для оценки TMB





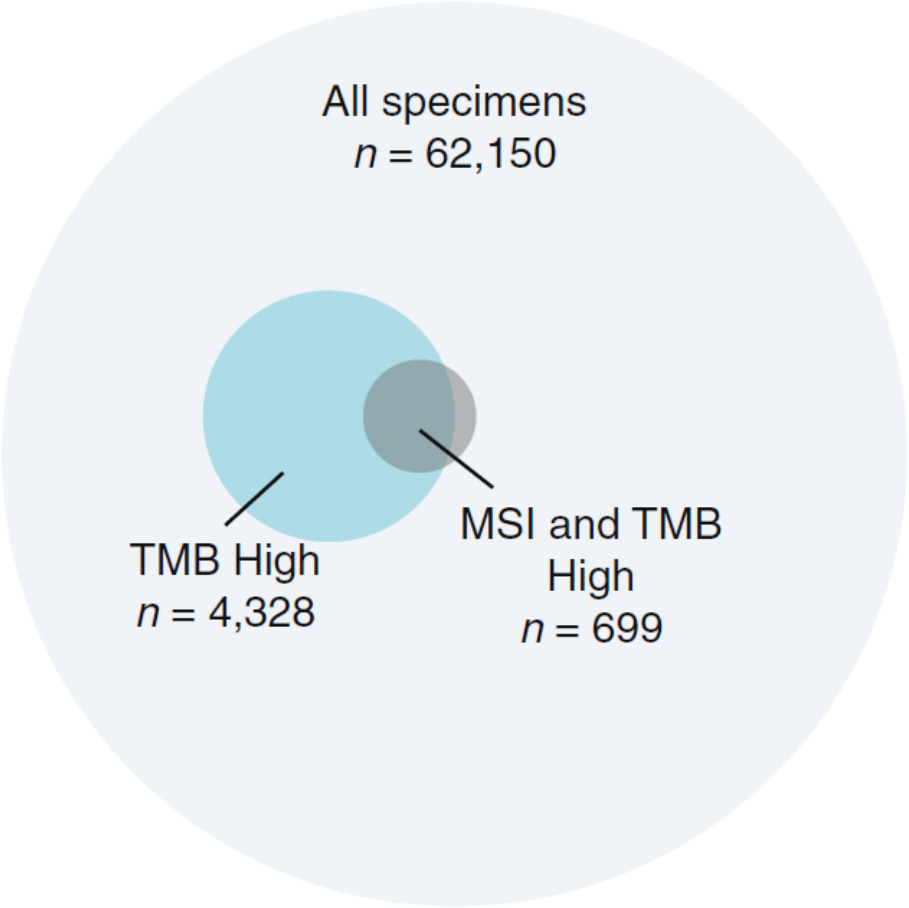




©BIOCAD 2018

Соотношение между MSI и TMB

- Большинство случаев MSI-H имеют статус и TMB-H (84%), но не наоборот
- Только 14,5% из TMB-H случаев имеют статус MSI-H
- Определение статуса MSI не может заменить оценку TMB



©BIOCAD 2018

Chalmers et al. Genome Medicine (2017) 9:34 DOI 10.1186/s13073-017-0424-2 https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-017-0424-2
Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden

Заключение

- Появление новых терапевтических подходов ведет к появлению новых биомаркеров.
- Некоторые новые биомаркеры очень важны, но их оказывается невозможно выявить, оценить, измерить при помощи существующих методов.
- Требуются более высокопроизводительные и более чувствительные методы.
- Стоимость анализа высокопроизводительными методами, хоть и снижается в последнее время, но все еще остается высокой, что затрудняет внедрение таких методов в клиническую практику.
- Внедрение новых методов не отменяет, а дополняет существующие методы диагностики, делая тем самым диагностический подход в целом более интегративным.

©BIOCAD 2018

Спасибо за внимание!

©BIOCAD 2018