



Среда, 24 апреля 16-00
Конференц-зал ИЦиГ

Публичная лекция
Сергея Коваленко



*Рак – болезнь генома.
Возможно ли лекарство?*

Онкологические заболевания в Новосибирске

Заболеваемость в 2011-2012 гг

- в 2012 году 6737 новых случаев (6636 в 2011)

- Максимальный прирост - рак кожи, молочной железы, легких

Локализация	2011	2012
Рак кожи	928	1039
Рак молочной железы	663	761
Рак легкого	645	697
Колоректальный рак	846	766

Рак – совокупность множества заболеваний

○ Общее:

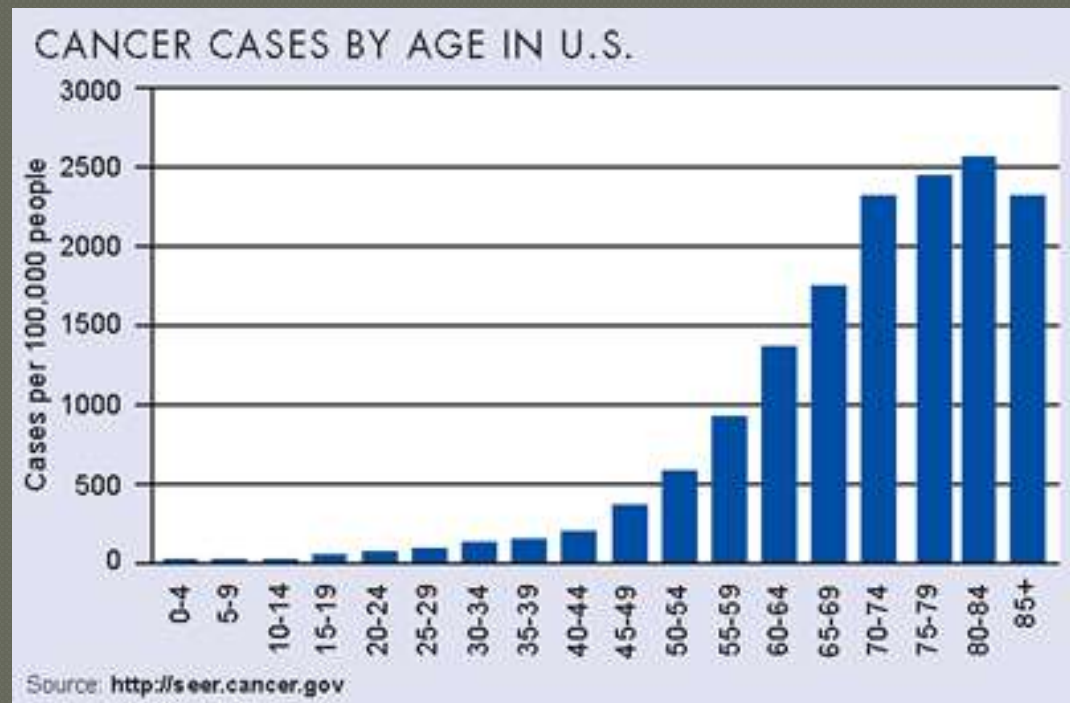
- **Потеря контроля над делением клеток**
- Инвазия, метастазирование, ангиогенез
- **Генетическая нестабильность**
- Нет выраженного иммунного ответа

○ Различаются:

- локализация
- морфология
- биохимия
- экспрессия генов
- генетические изменения
- маркеры
- прогноз развития
- возможность рецидивов
- чувствительность к химиотерапии

Эволюция и рак

- Онкологические заболевания возникают в пост-репродуктивном возрасте
- «Омолаживающая функция» для популяции



Препараты для лечения онкологических заболеваний –

В ОСНОВНОМ **цитостатики**

- Случайно/
эмпирически
обнаруженные
- Найденные в
результате
реализации
теории/концепции

50-е годы XX века: противораковые препараты - производные нуклеозидов как ингибиторы синтеза ДНК

- Производные пиримидинов – широкое распространение в химиотерапии солидных опухолей

- Производные пуринов - лечение лейкозов

Аналоги пуринов – азатиоприн, меркаптопурин

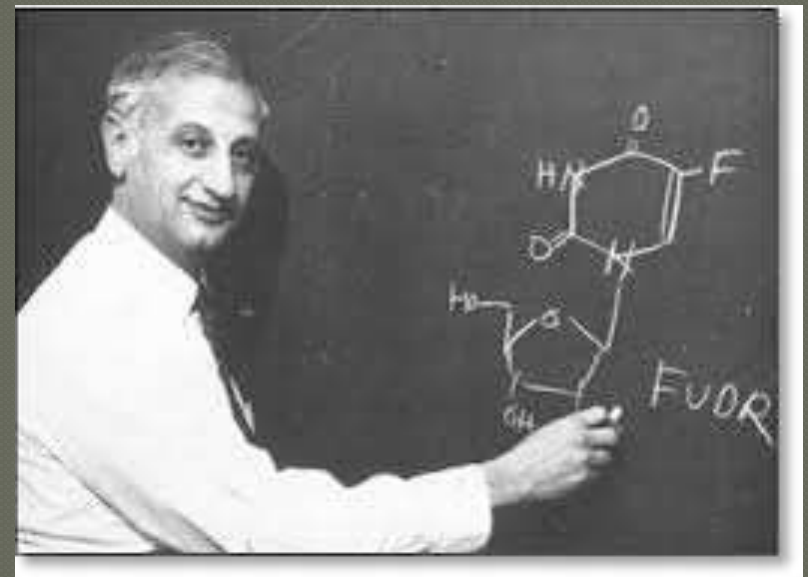
- используются в химиотерапии лейкозов
- Нобелевская премия 1988 года



Гертруда Белле

5-фторурацил – один из наиболее популярных препаратов в онкологии

- Противораковые свойства 5-фторурацила были открыты Чарльзом Хайдельбергером в 1957 году



Удачный синтез эмпирики и концептуального подхода - Камптотецин

Экстракт

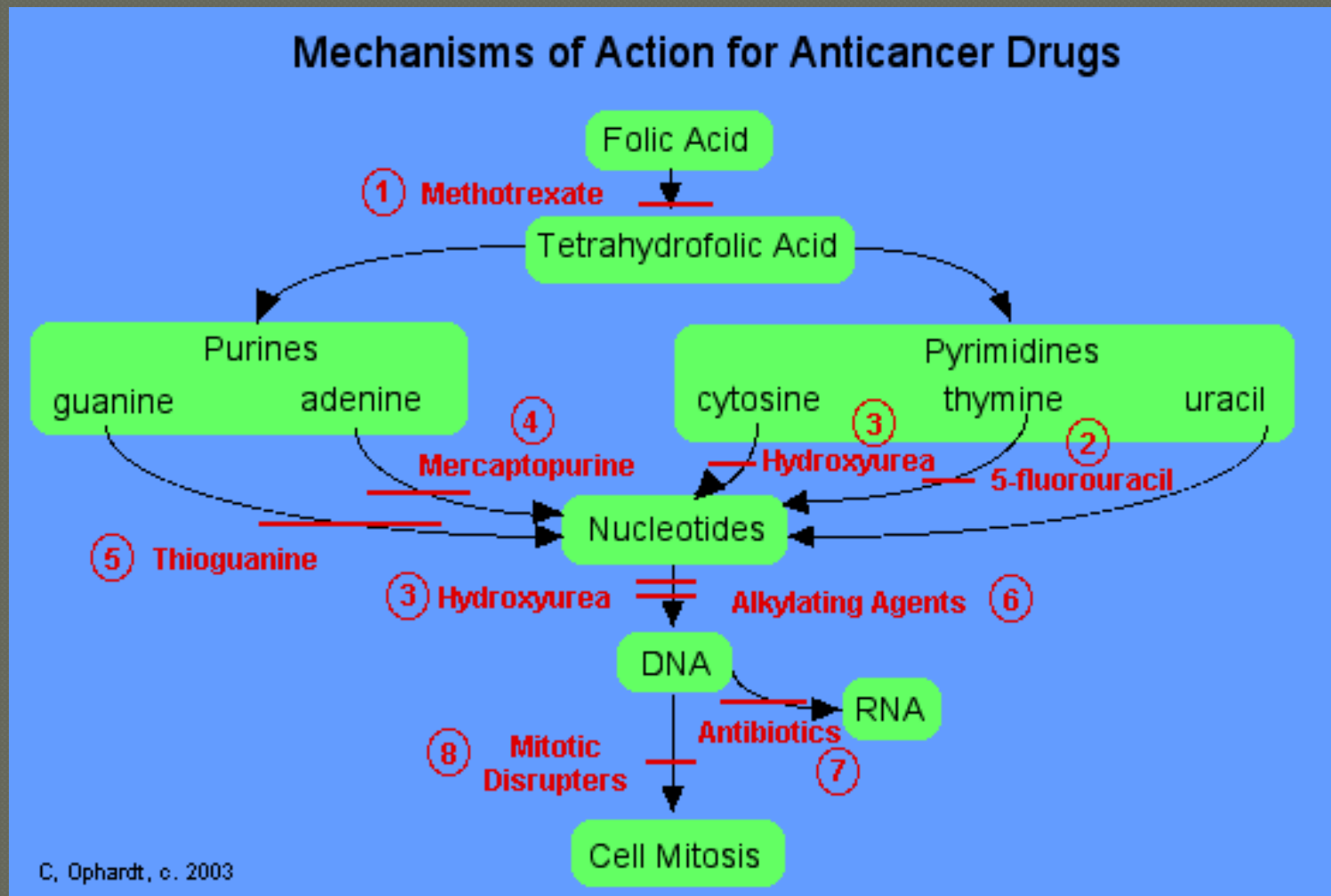
Camptotheca acuminata

использовался в китайской
народной медицине для
лечения рака

В 1966 году ученые Pfizer
выделили ингибитор
топоизомеразы I из
Camptotheca -
Камптотецин

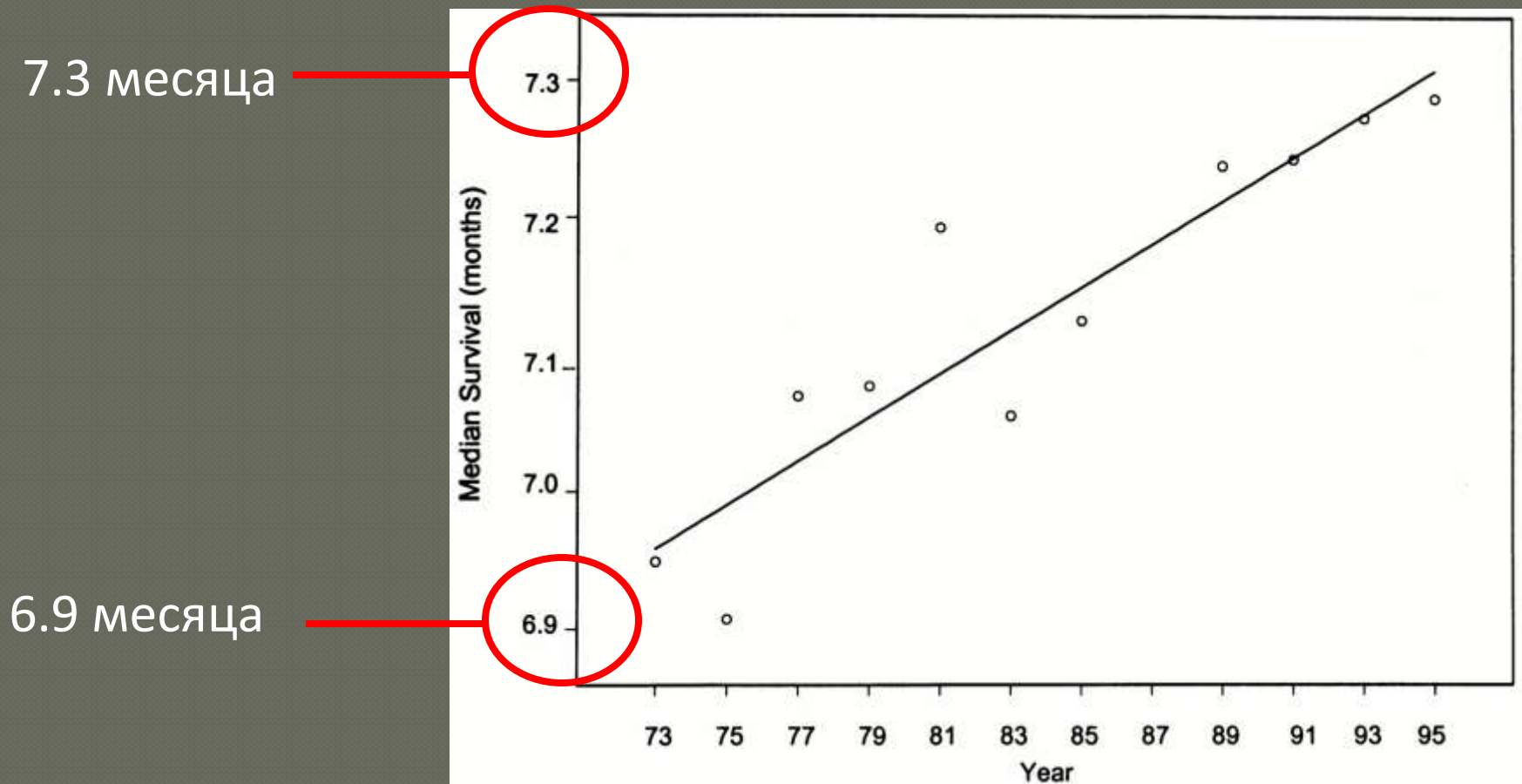


Большинство противораковых препаратов воздействуют на синтез ДНК/деление клетки (2003 год!)



Медиана выживаемости больных раком легкого в США 1973-1995

Фармфирмы истратили на разработку препаратов более \$100bn!



Breathnach et al (2001) JCO 19(6): 1734

Успешное применение цитостатиков для ряда локализаций

- 5-FU при лечении
колоректального
рака :
5- летняя
выживаемость
увеличилась с 45%
до 70%

- Лейкозы:
4-летняя
выживаемость
увеличилась с 40% до
60% (для отдельных
форм)

Тамоксифен эффективен при лечении ER+ рака молочной железы

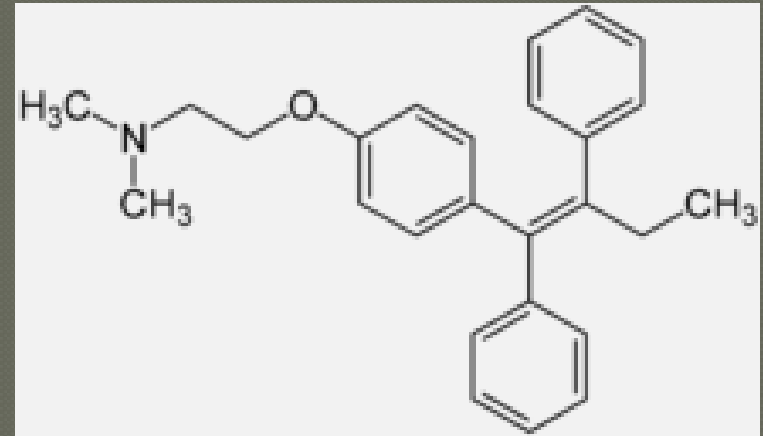
- 80-е годы: тамоксифен увеличивает 5-летнюю выживаемость в среднем на 25%!
- В 2000 рекомендован WHO для пожизненного применения больным РМЖ после мастэктомии



Dr. Craig Jordan

Тамоксифен

- Синтезирован в 50-х годах как антиэстроген, потенциальный контрацептив
- Связывается с эстрогеновыми рецепторами. Может быть как анти-, так и про-эстрогеном

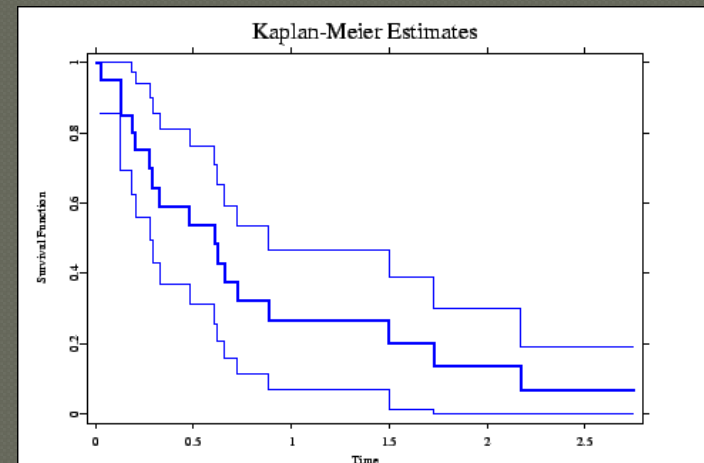
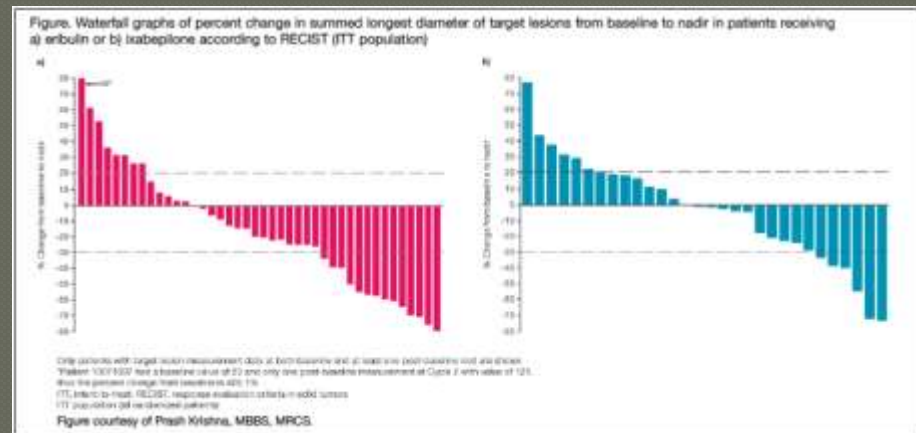


От синтеза тамоксифена до его повсеместного использования – 40 лет

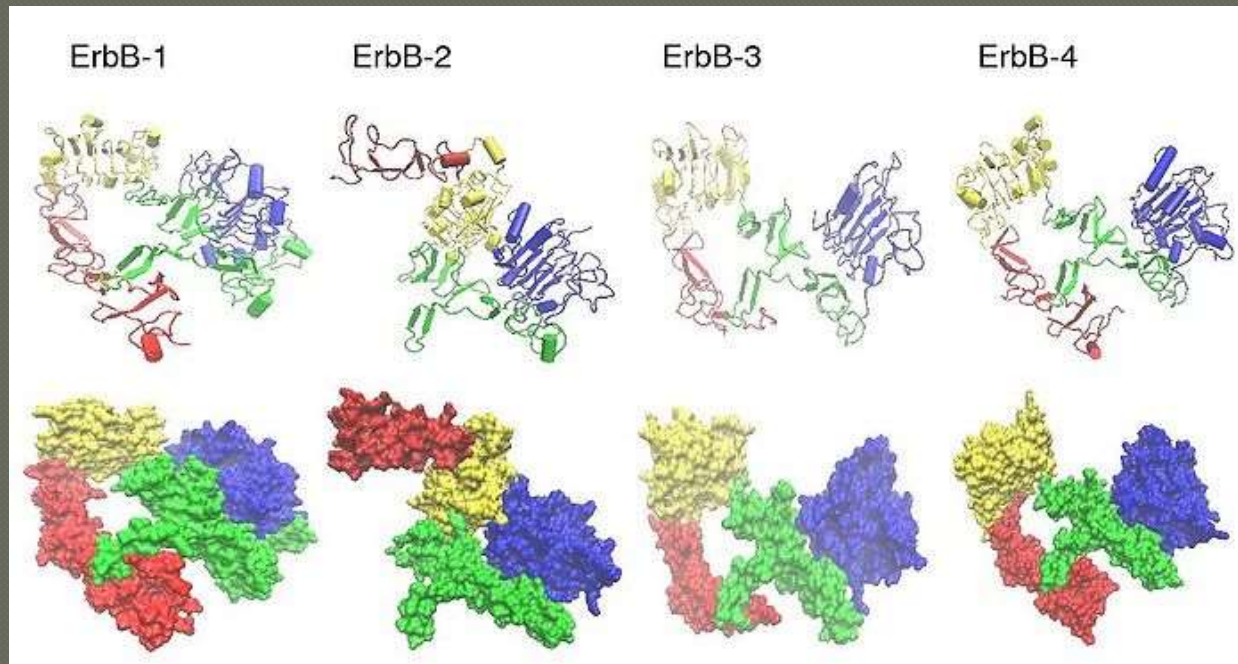
Почему больные так долго ждали?

3 варианта доказательств эффективности препарата в ОНКОЛОГИИ

- 1. Case study
- 2. Waterfall graph
- 3. Kaplan-Meier graph



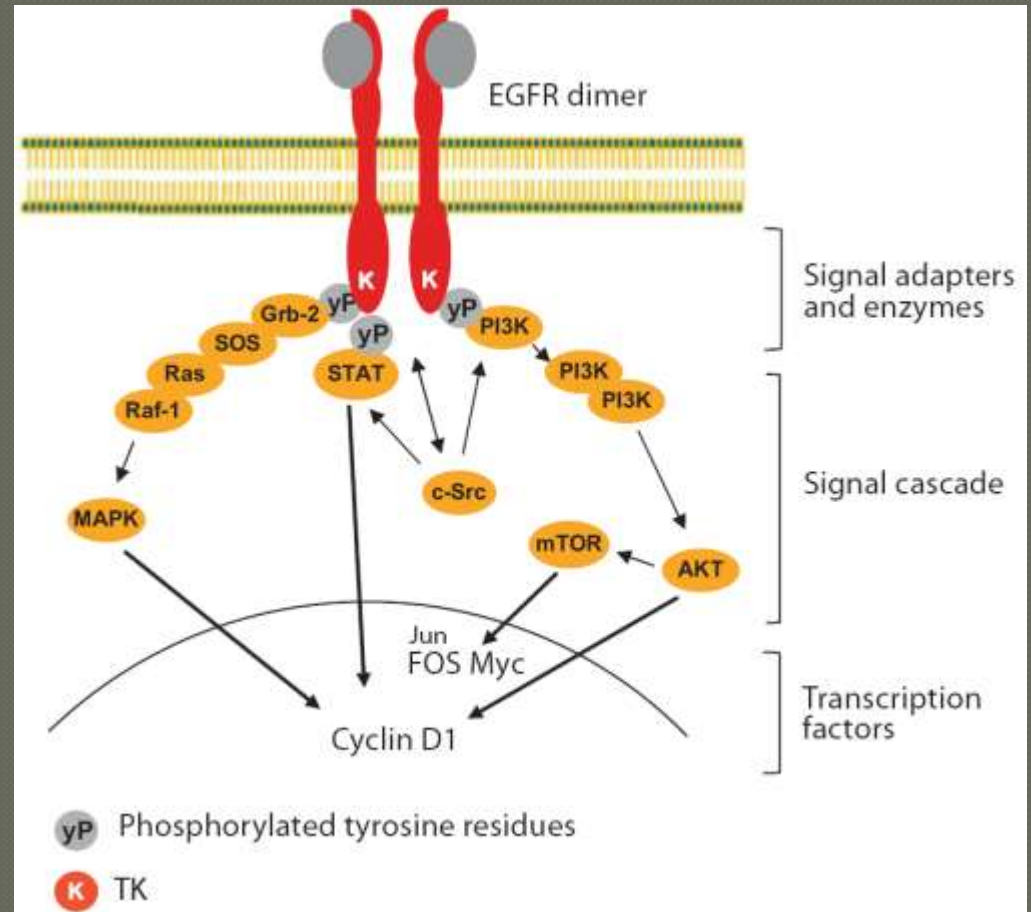
На волне успеха тамоксифена 1990 годы – повышенный интерес к рецепторам



- ErbB семейство рецепторов

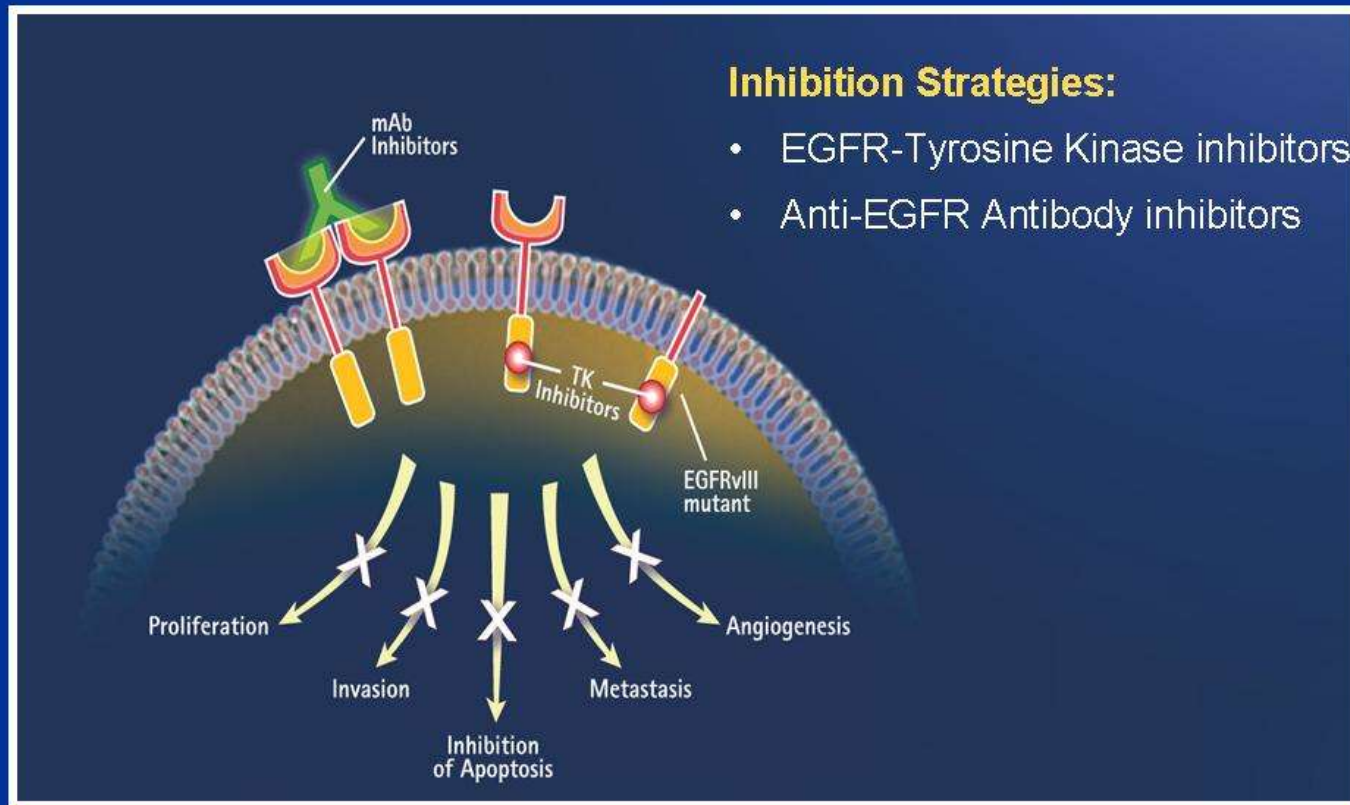
Структура рецептора

- Функции рецептора осуществляются через тирозинкиназную активность внутриклеточного домена



Два подхода к ингибированию активности рецепторов

The EGFR Axis

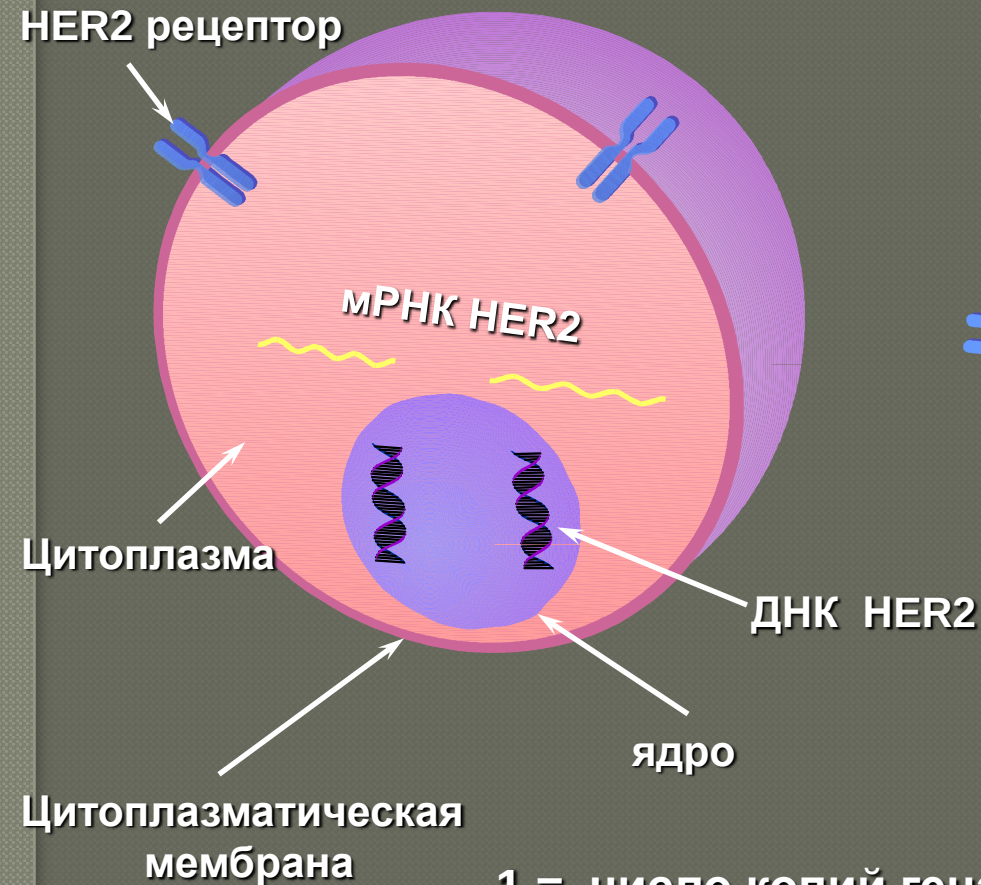


Увеличение дозы генов

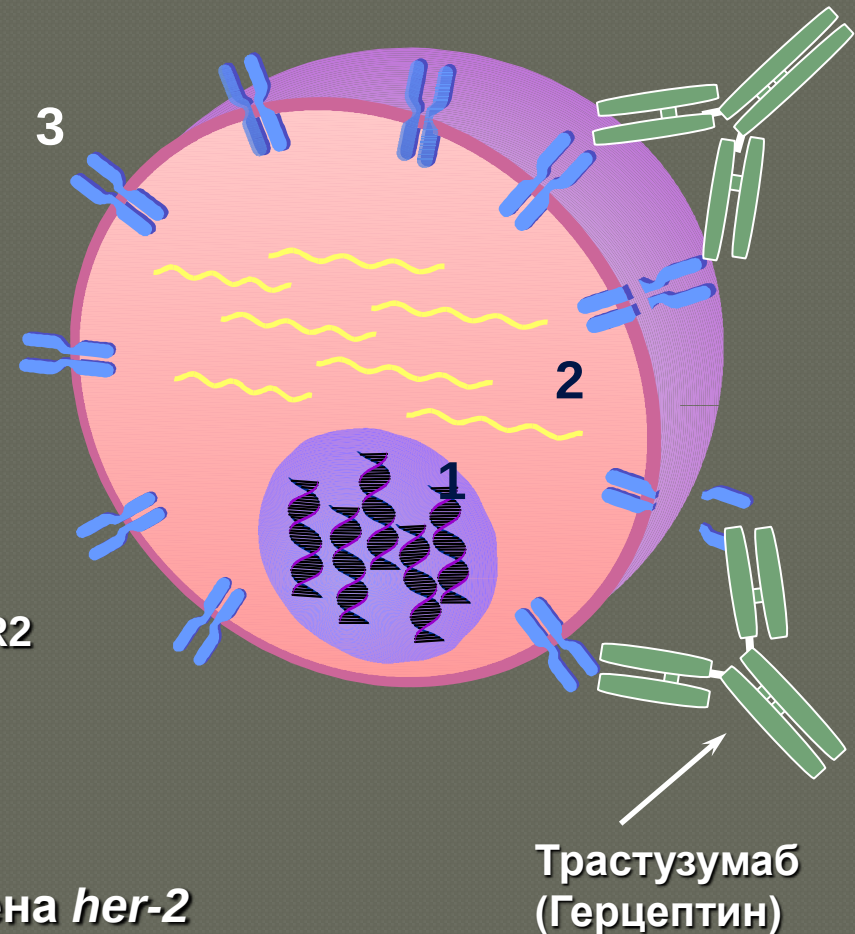
- В клетках опухоли – рецепторы EGFR, HER2/neu, FGFR2
- В клетках опухоли увеличение дозы гена - более, чем в 30% случаев
- Первые «персонализированные» препараты

Увеличение экспрессии HER2 в клетках опухоли РМЖ

Норма



Амплификация / Гиперэкспрессия

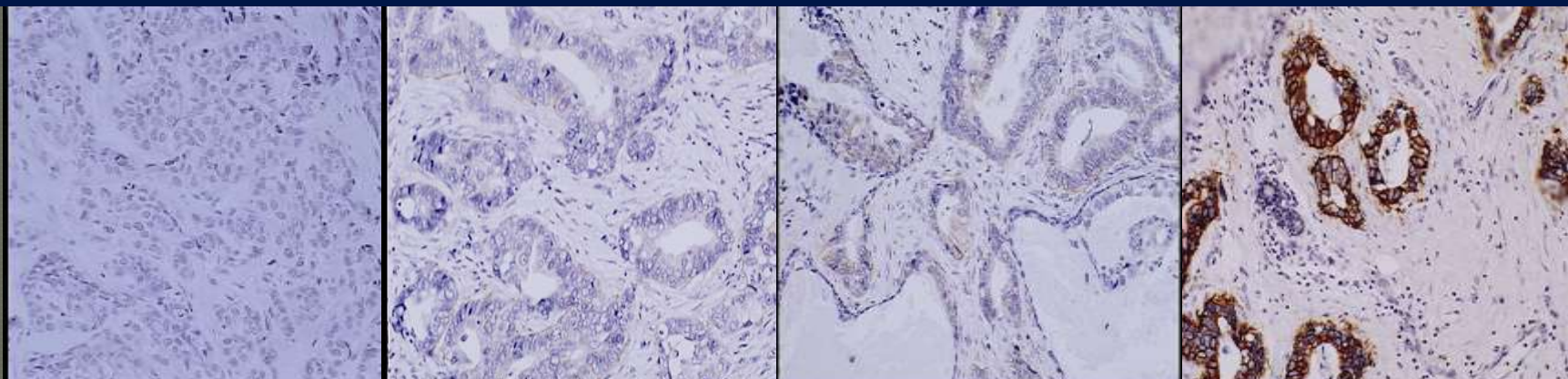


1 = число копий гена *her-2*

2 = транскрипция мРНК гена *her-2*

3 = экспрессия белка HER2 на поверхности

Определение HER2 статуса с помощью иммуногистохимии и FISH-анализа

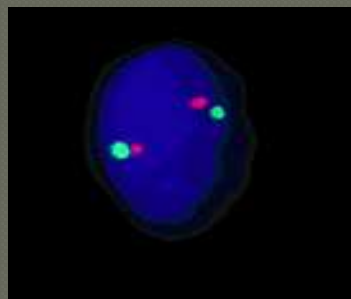


0

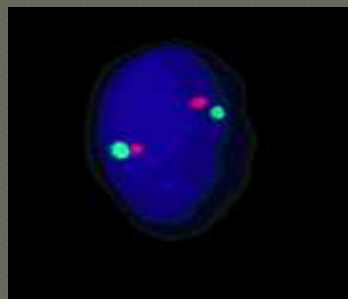
1+

2+

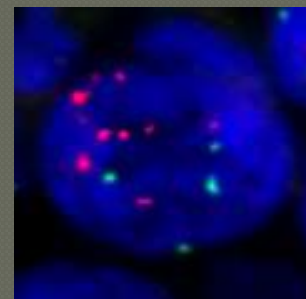
3+



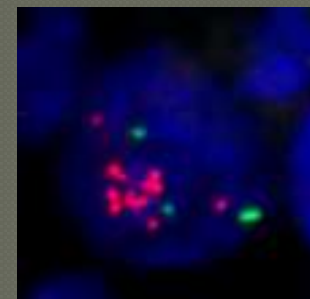
Норма



Норма



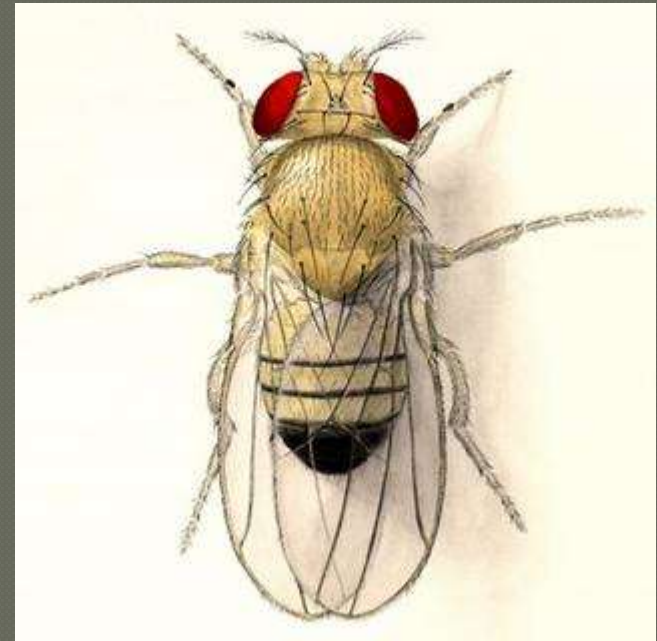
Амплификация



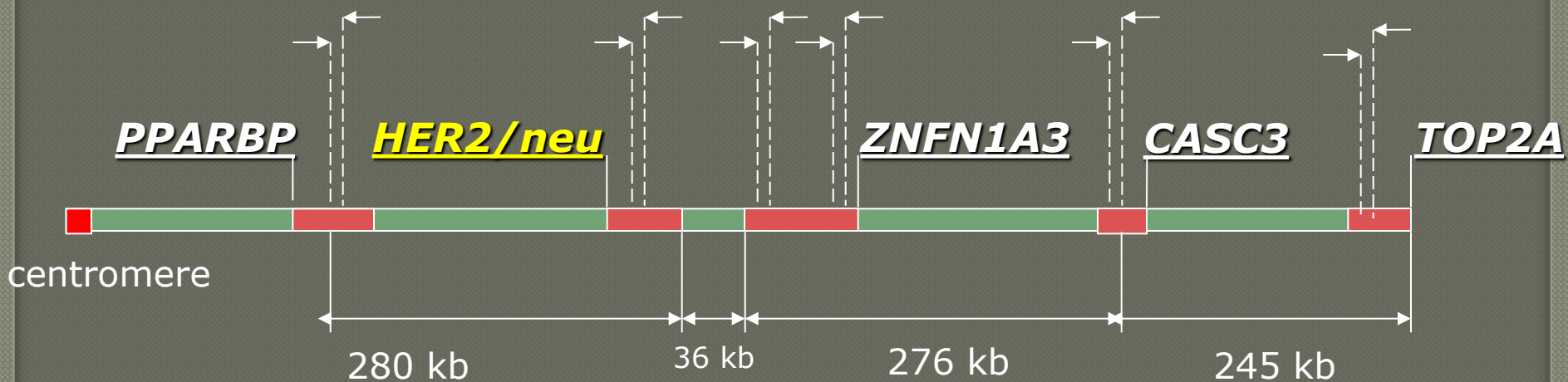
Амплификация
высокий уровень

Внутрихромосомная амплификация – необычный и плохо изученный процесс

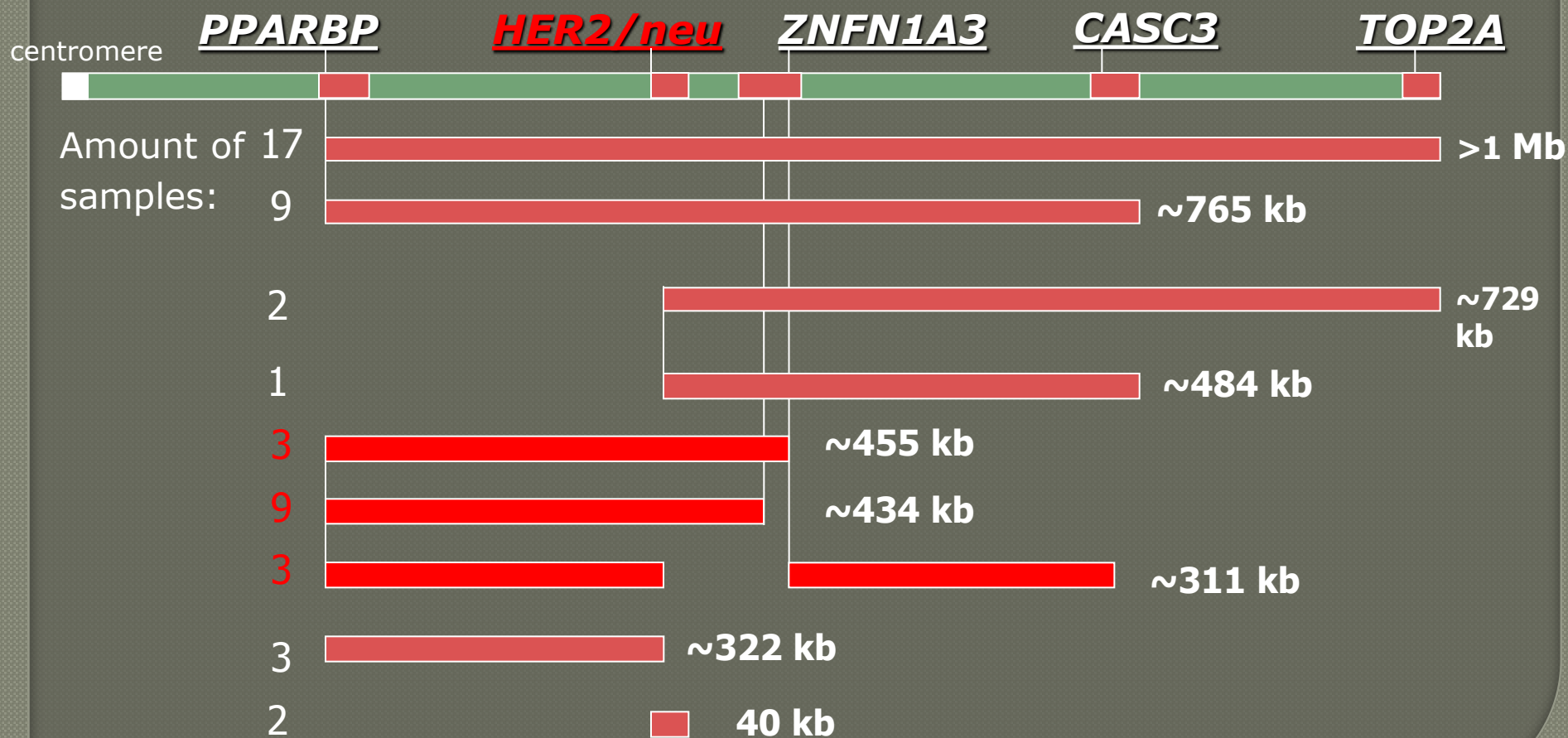
- В норме – описан только у *Drosophila* для *Egg Shell Protein*. Процесс находится под специфической регуляцией



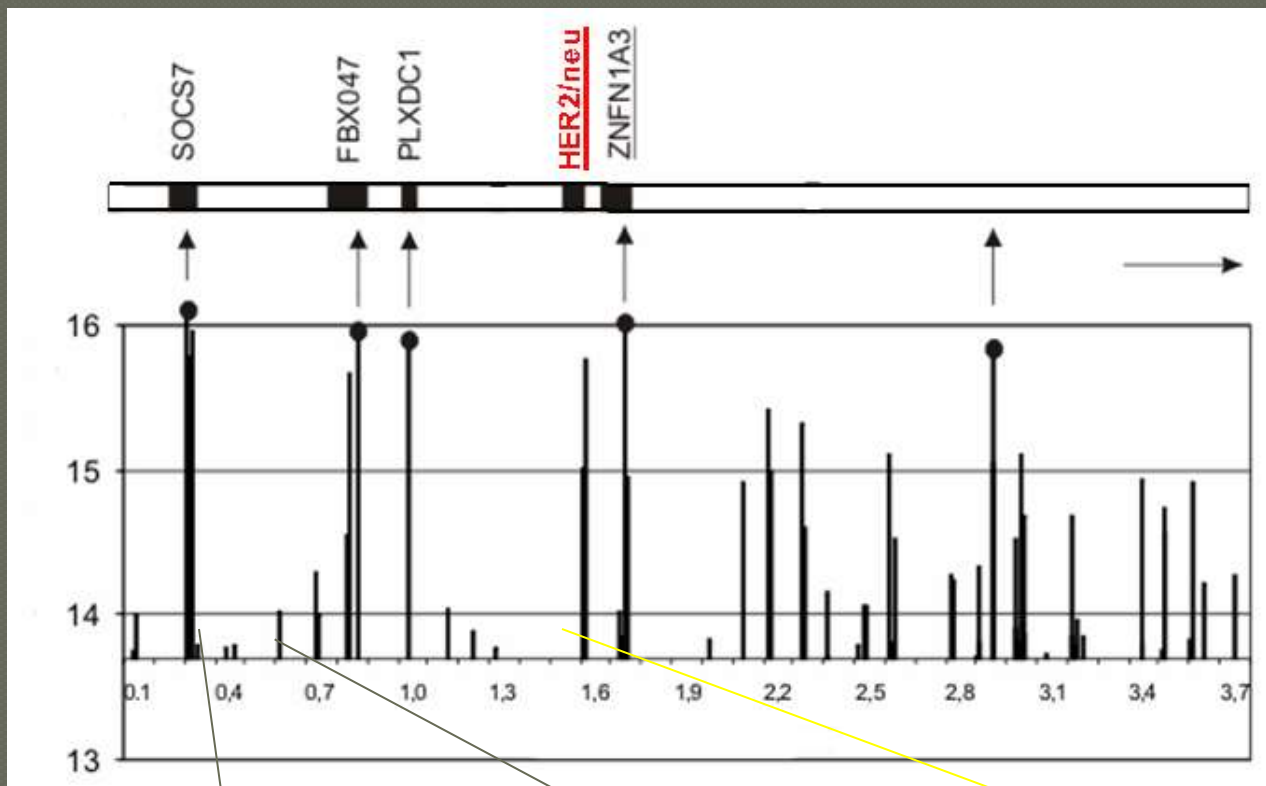
Анализ дозы гена вокруг HER2/neu



Различные ампликоны в клетках РМЖ в районе HER2/neu



Анализ торсионной напряженности для 4Мб ДНК в окружении гена HER2/neu



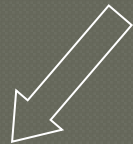
FlexSOCS7 - 1
FlexSOCS7 - 2
FlexSOCS7 - 3

FlexFBX047

FlexPLXDC1

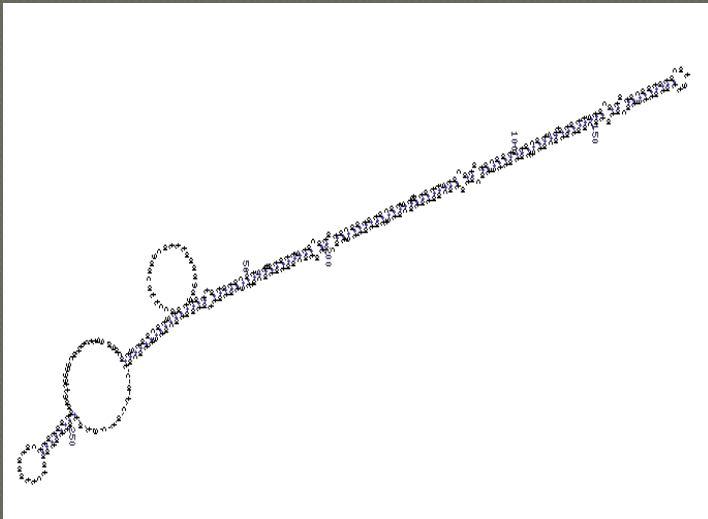
FlexZNF - 1
FlexZNF - 2

ДНК на границе ампликонов может формировать причудливые структуры



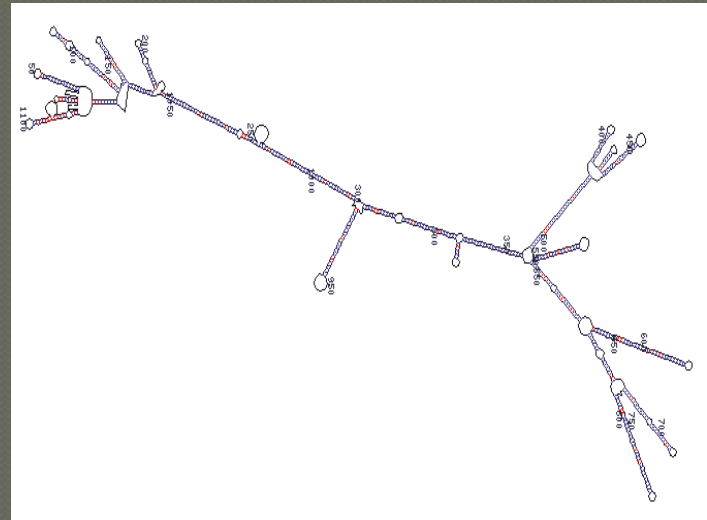
FlexZNF-1

292 bp long



FlexZNF-2

1133 bp long



**Анализ вторичных структур
ДНК – возможное выявление
— новых «знаков препинания в
геноме**

Препараты на основе МОНОКЛОНАЛЬНЫХ антител к рецепторам

- (Anti-Her2)

Герцептин (трастузумаб) – лечение HER2+ рака молочной железы, рака желудка

(Anti –EGFR)

Цетуксимаб – лечение колоректального рака

(Anti-VEGFR)

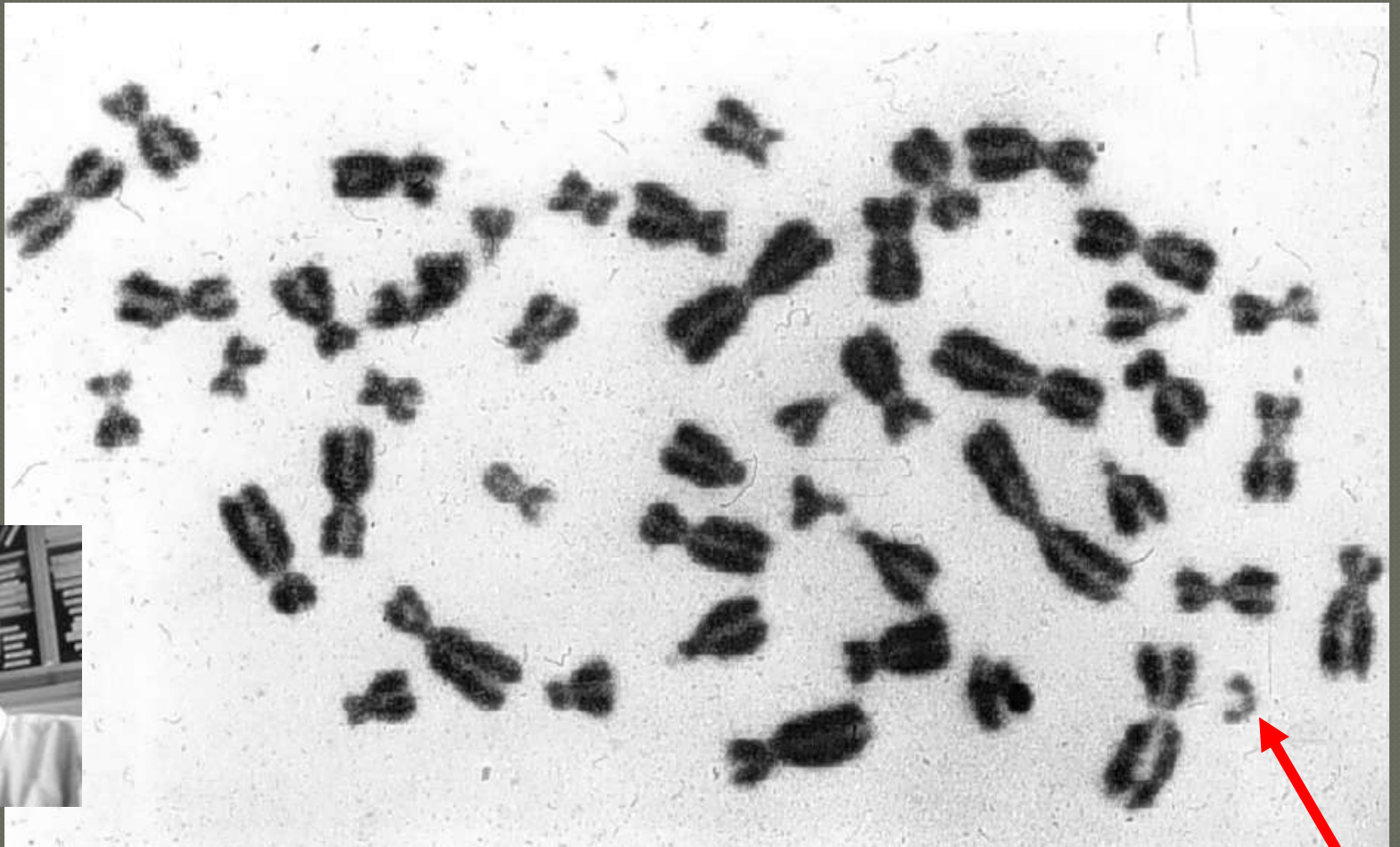
Авастин - лечение колоректального рака

Возможны ли избирательные ингибиторы протеинкиназ?

- Более 600 протеинкиназ в организме человека
- Киназные домены консервативны
- *И всё-таки стоит попробовать!*

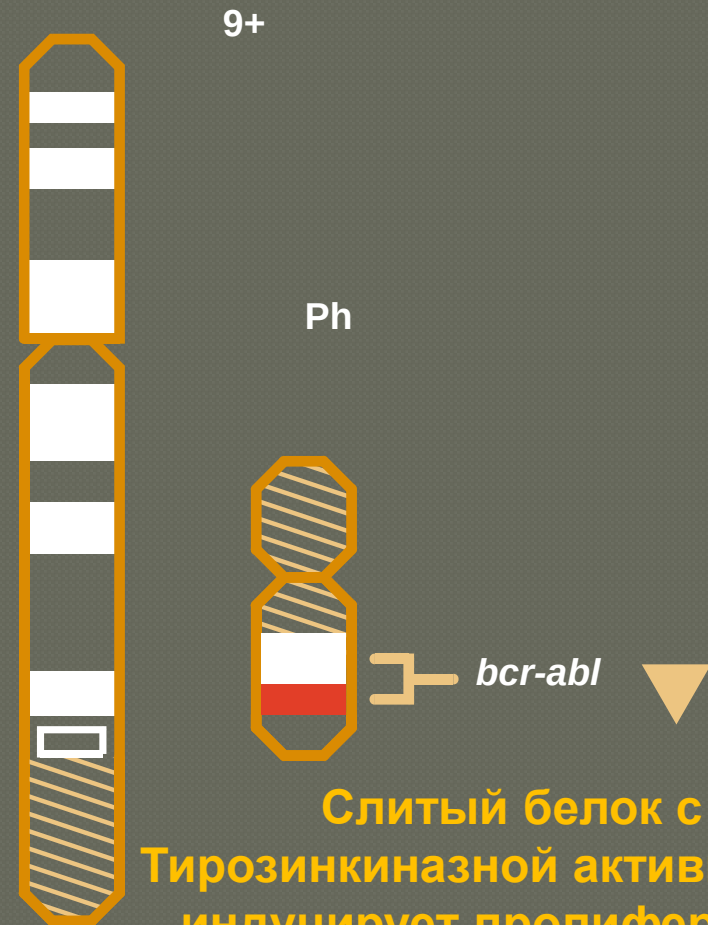
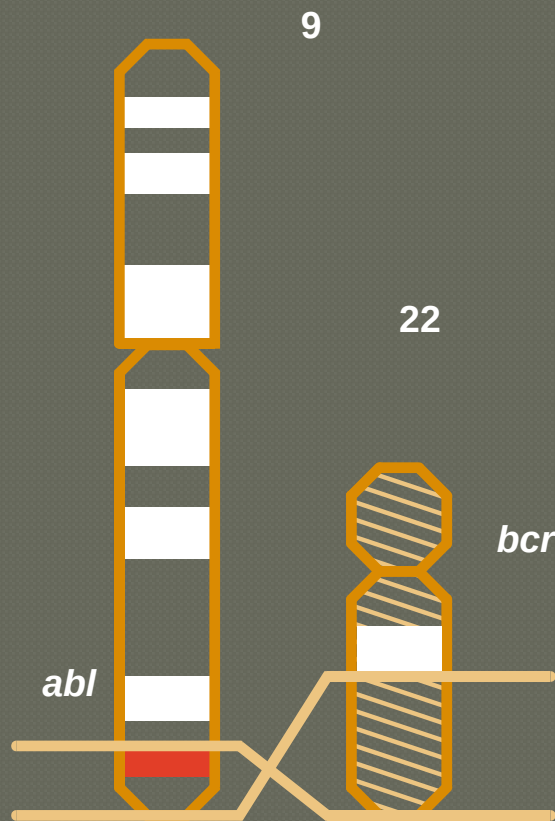
**Наиболее впечатляющие
результаты – лечение лейкозов
с помощью специфических
ингибиторов ТК**

1960 Nowell и Hungerford обнаружили, что одна копия 22 хромосомы очень короткая у пациентов с хроническим миелолейкозом

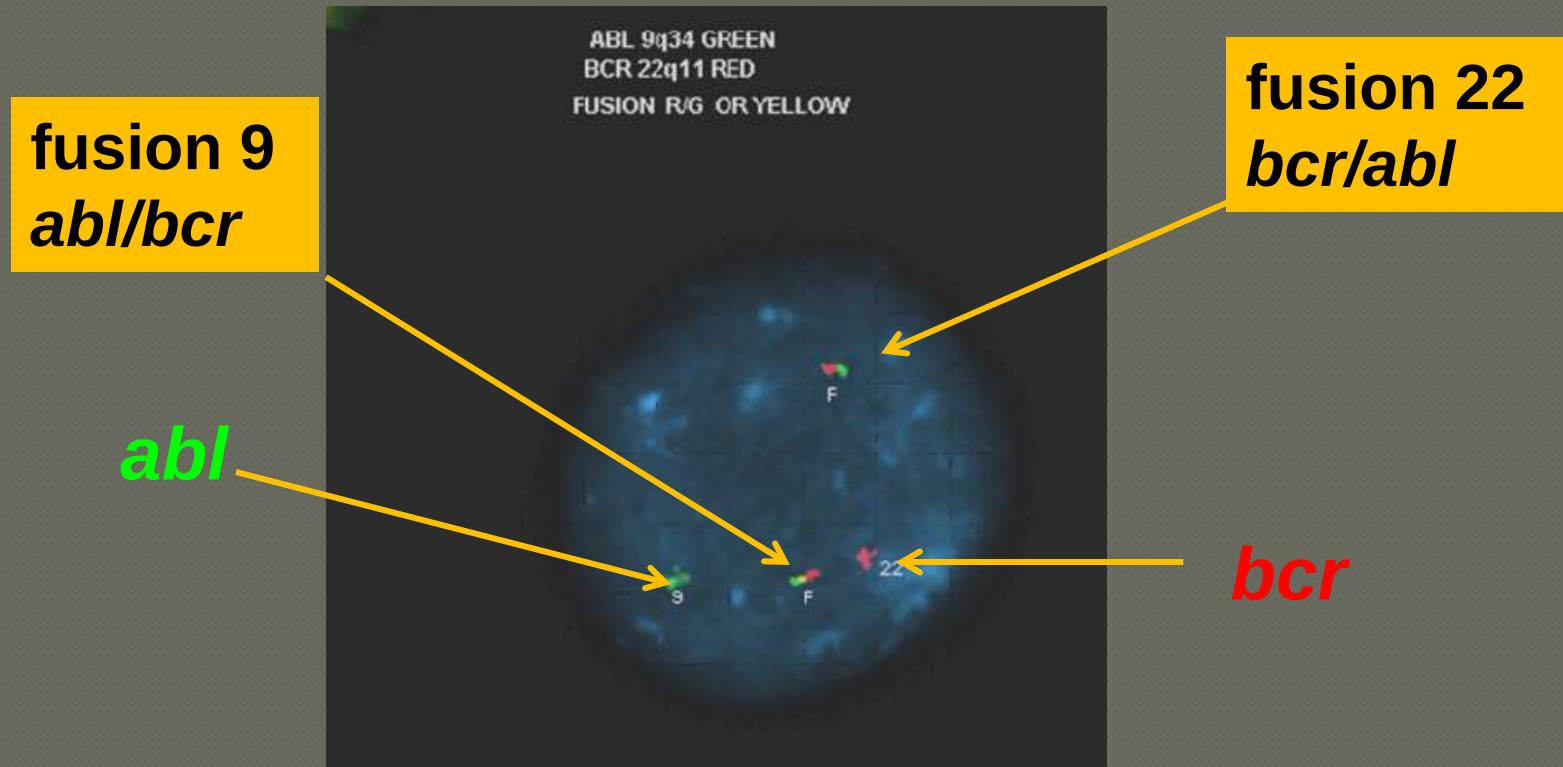


Peter Nowell

Транслокация, приводящая к формированию Филадельфийской хромосомы $t(9;22)$



Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) В диагностике CML



Метод сегодня - RealTime PCR



Гливек – специфический ингибитор тирозинкиназы bcr-abl – 1996 год

- ремиссии у 65-75% больных острым нелимфобластным лейкозом и у 85% больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ)
- у 25-40% больных полная ремиссия сохраняется 5 и более лет.

Молекулярно-генетический анализ при лейкозах

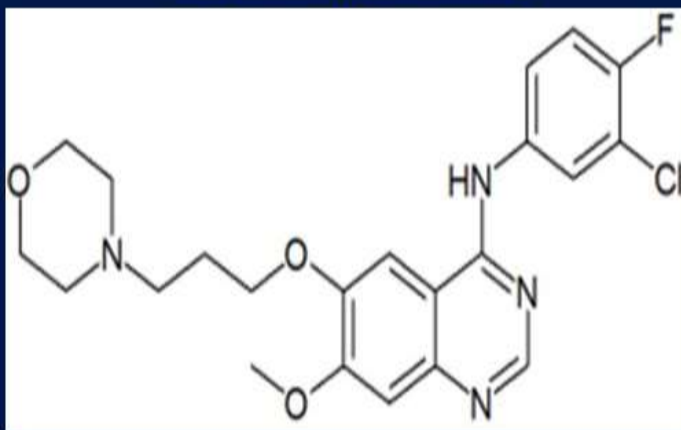
- Мониторинг количества bcr-abl – содержащих клеток
- Анализ мутаций во фрагменте гена, кодирующем киназный домен – устойчивость к Гливеку

Ингибиторы ТК EGFR –
успешная реализация
концепции при лечении рака
легкого

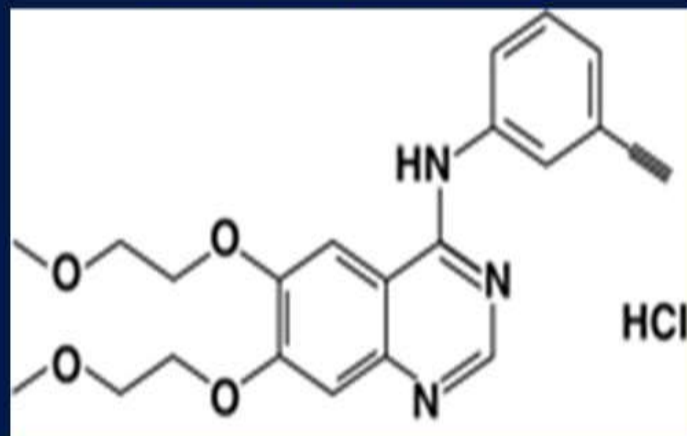
Наиболее эффективные ингибиторы ТК активности EGFR

The Twins

Iressa (gefitinib)



Tarceva (erlotinib)



Загадка Ирессы

- Ингибитор эффективен в исследованиях *in vitro*
- Показатели выживаемости больных раком легкого не улучшались при использовании Ирессы
- Примерно у 10% пациентов – выраженное улучшение при использовании Ирессы

Иресса эффективна

- Только у пациентов, содержащих мутацию в гене EGFR

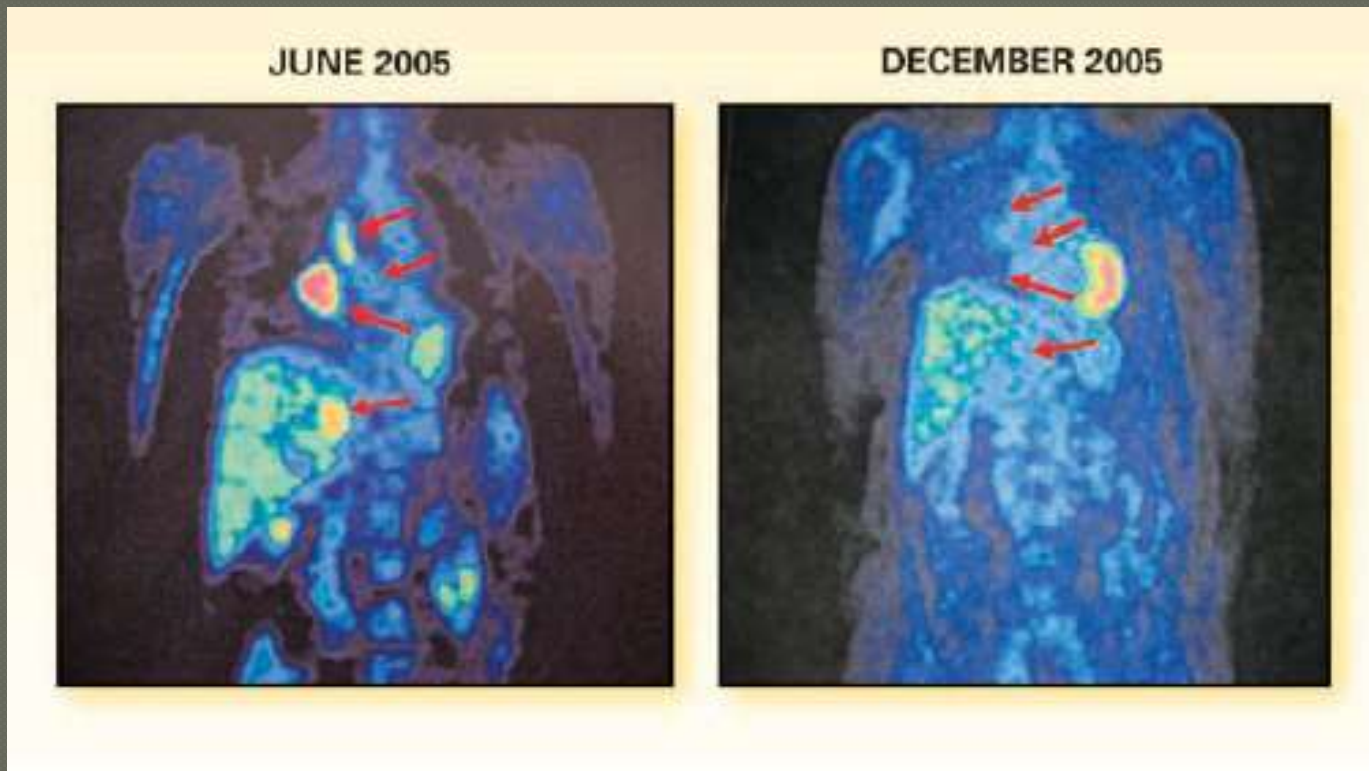
*(New England Journal of Medicine, 2004
Lynch T. et al.)*

- Медиана продолжительности жизни увеличивается более, чем на 12 месяцев!

**Иресса может показывать
поразительные результаты – до
полного исчезновения опухоли!**

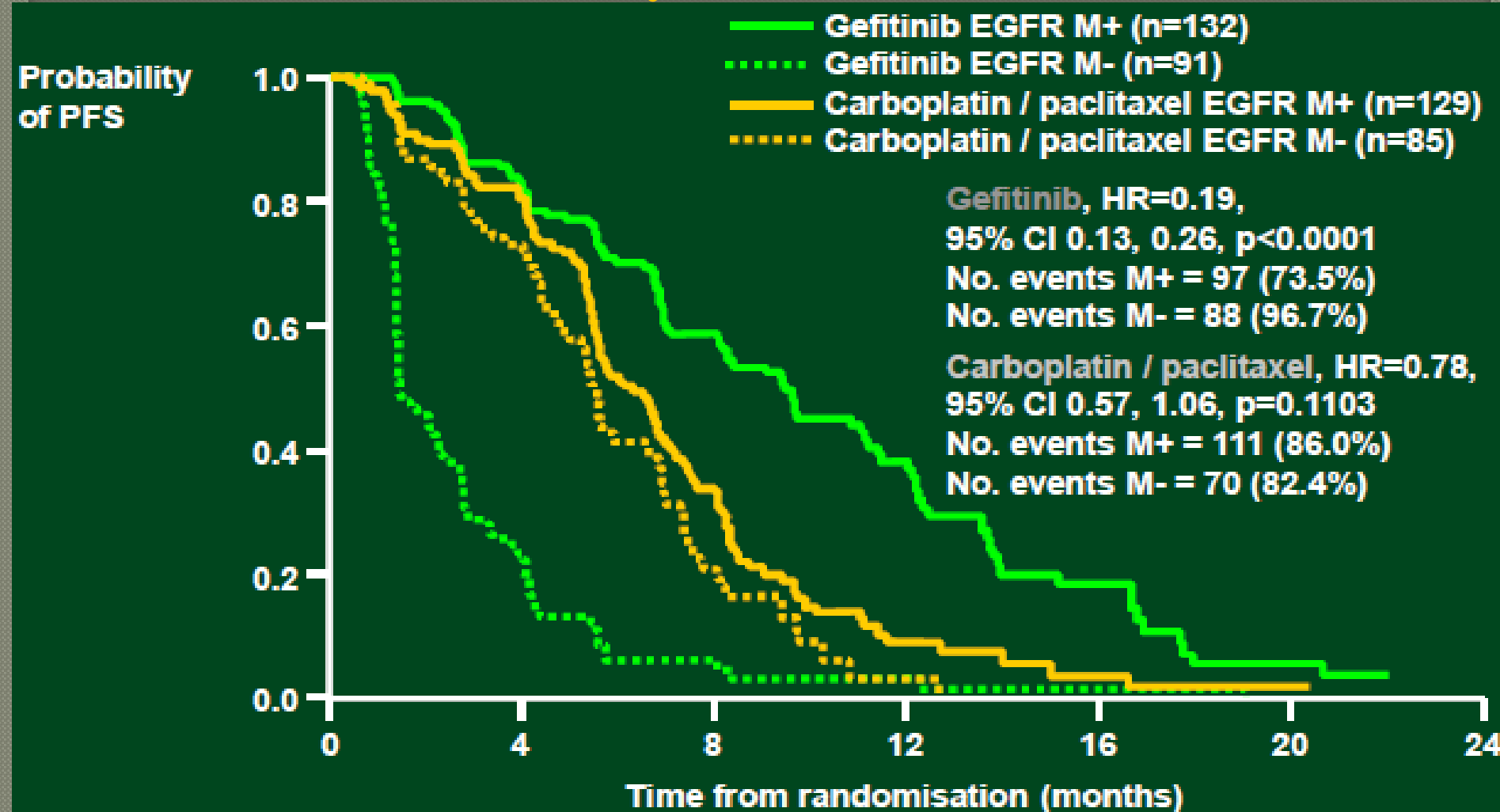


ПЭТ скан пациента с делецией в экзоне 19 гена EGFR. Полная ремиссия после терапии Эрлотиинибом



Rosell et al. 2006 Clin Cancer Res 12 7222

Выживание без прогрессии опухоли в зависимости от наличия мутаций в гене EGFR



Анализ опухолевой ткани

Проблемы:

- Низкое содержание опухолевых клеток
- Неоднородное качество образцов
- Прямое секвенирование не выявляет низкочастотные мутации



Asano et al. 2006.
Clin. Canc. Res. 12:43-48

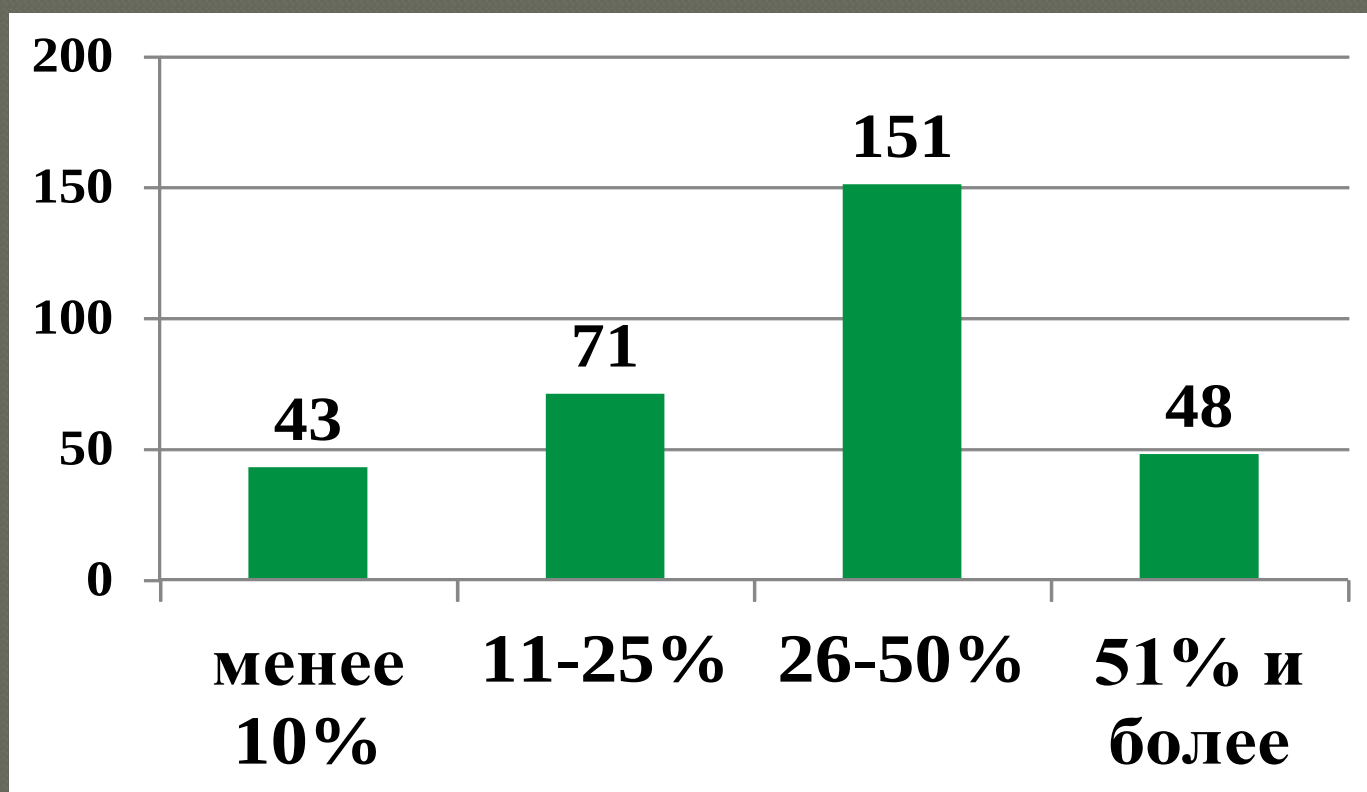
Биопсия
легкого.
Обведен
участок
содержащий
опухолевые
клетки.

2009 – 2012

Исследование «Эпиклин» –
инициировано фарм. компанией
«Астра Зенека» (UK-Sweden)

Сибирь – исполнитель лаборатория
генодиагностики «Биолинк»

Распределение образцов по доле опухолевых клеток



Общие данные об исследовании:

	пациентов	%
Всего поступило	371	
Всего обследовано	358	96,5
Не обследовано, ввиду непригодности материала	13	3,5

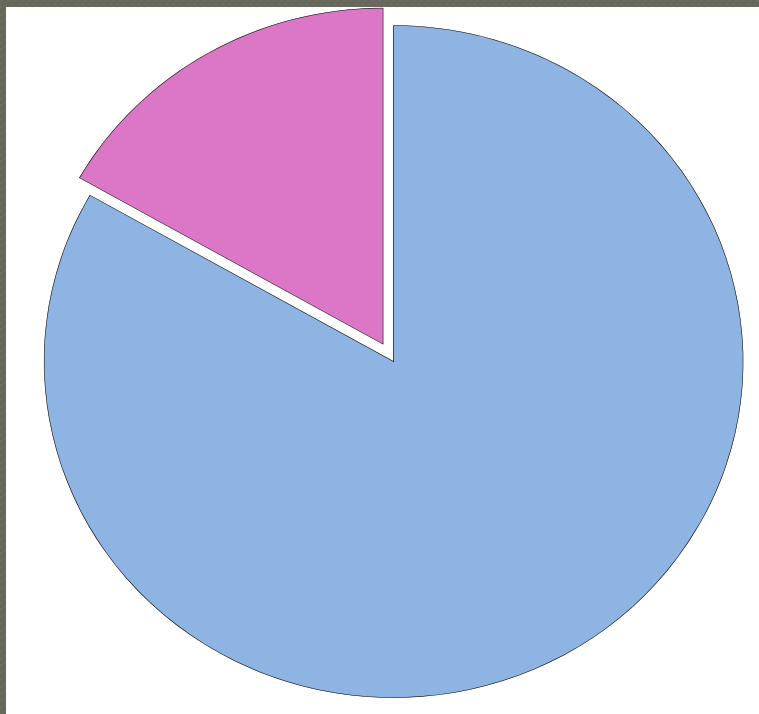
География

Барнаул	40
Иркутск	69
Кемерово	28
Новосибирск	76
Омск	81
Томск	27
Ханты-Мансийск	12
Чита	22
Якутск	14

Частота встречаемости соматических мутаций в гене EGFR среди пациентов с НМРЛ из Сибири.

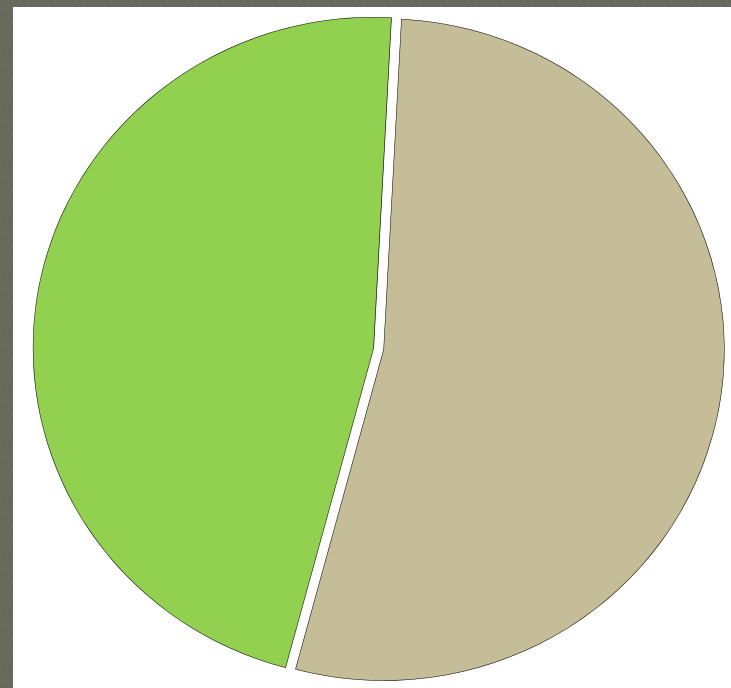
Доля пациентов с мутациями
в гене EGFR:

M+ 16,8% (n=60)



Соотношение видов мутаций
в гене EGFR:

L858R 46,7% (n=28)

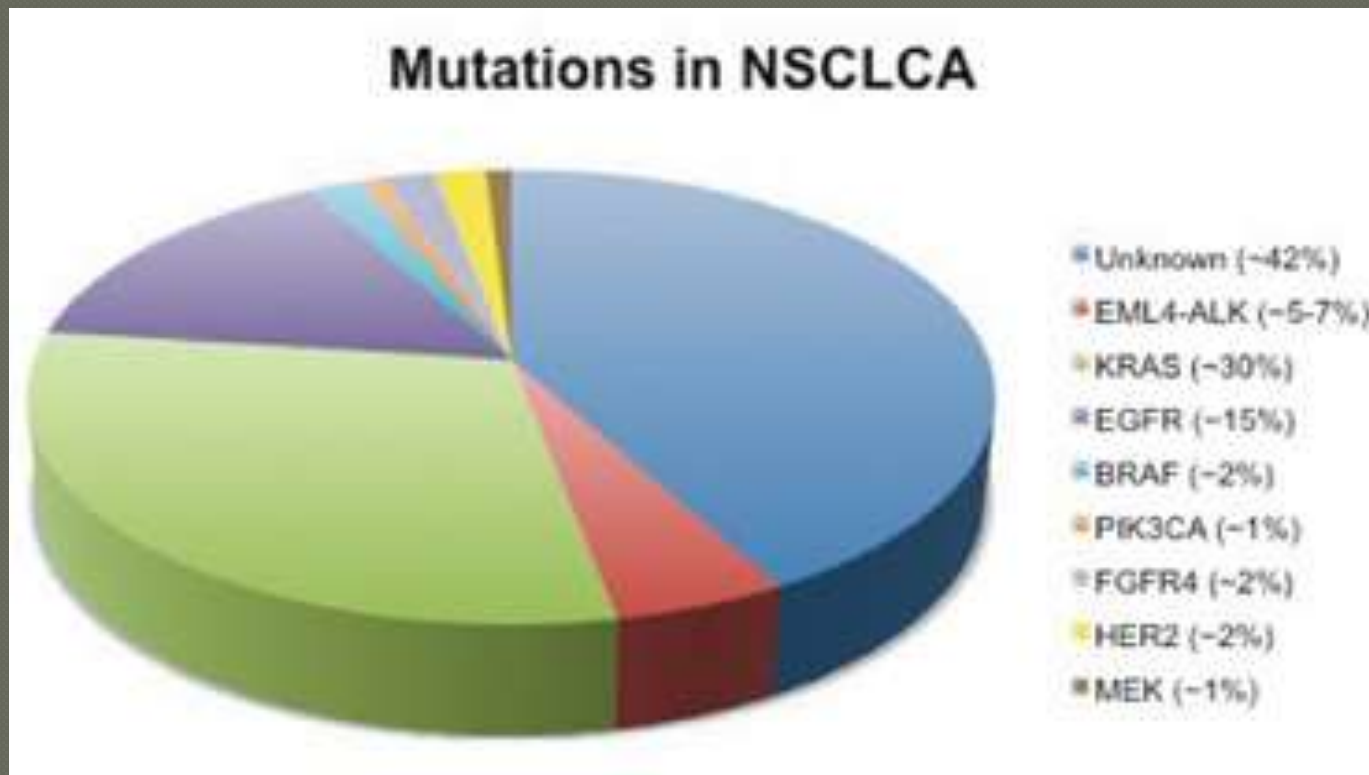


del 746-750 53,3% (n=32)

При корректном мониторинге мутаций EGFR и доступности Ирессы

Более 100 больных раком легкого в
Новосибирске получают как минимум
1 дополнительный год жизни

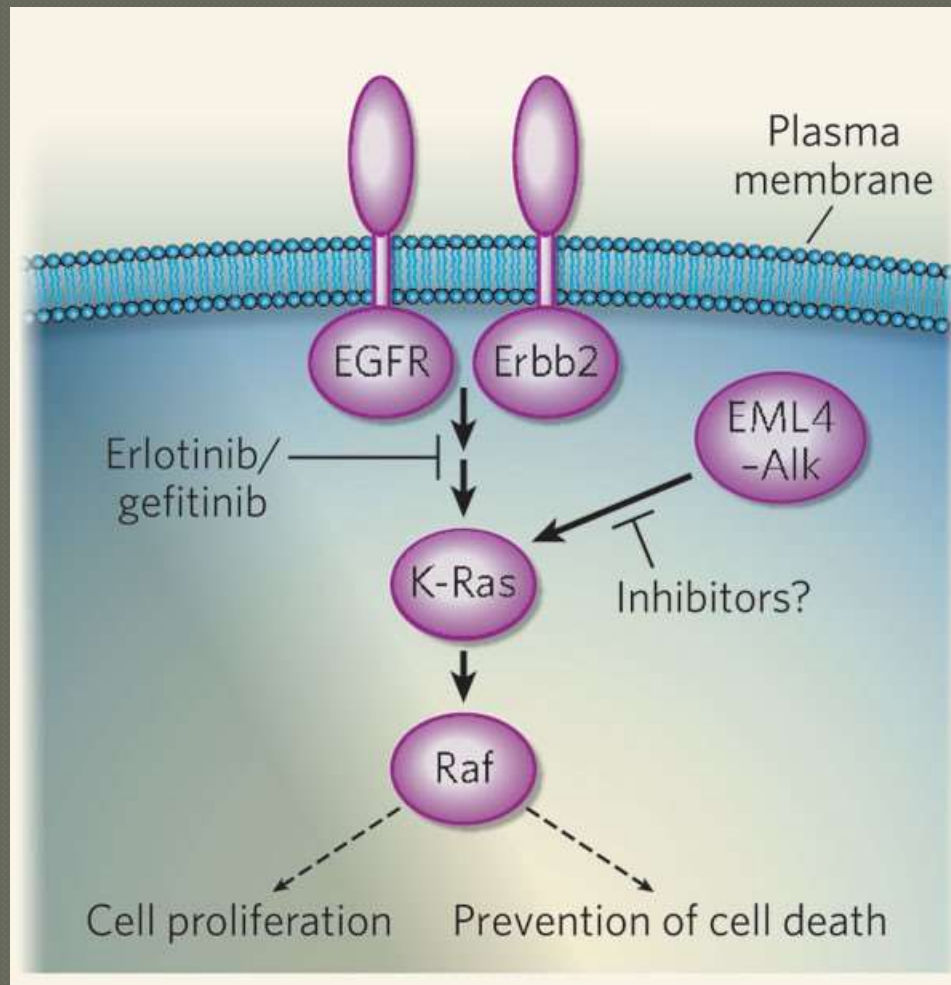
Молекулярная гетерогенность НМКРЛ



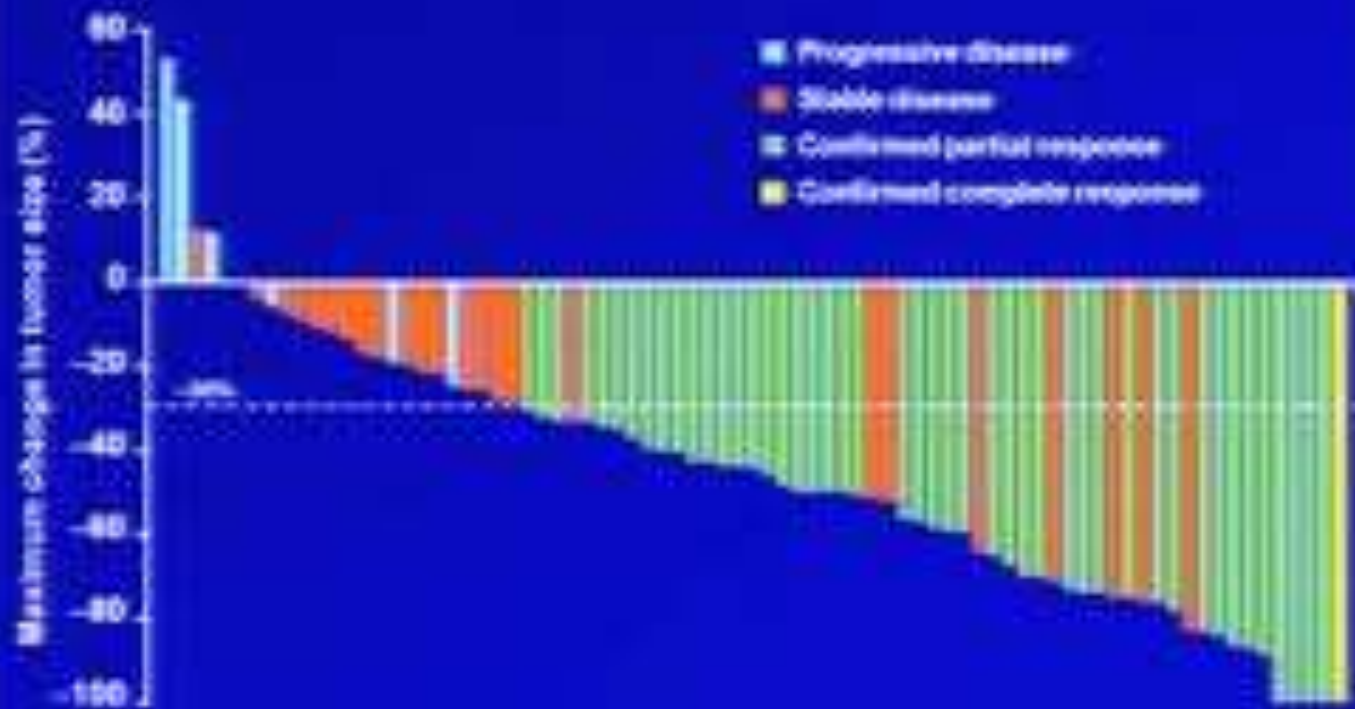
Новый генетический маркер при НМРЛ

- Транслокация EML4-ALK – обнаружена в лимфомах
- Формируется новая протеинкиназа
- Активирует KRAS
- Поддается лечению новым препаратом - **Кризотинибом**

Активация KRAS слитым белком EML4-ALK



Tumor Responses to Crizotinib for Patients with ALK-positive NSCLC



*Partial response patients with 100% change have non-target disease present

EML4-ALK транслокации



Схема выбора таргетной терапии при НМРЛ

EGFR мутации

+ *Иресса* (17% больных)

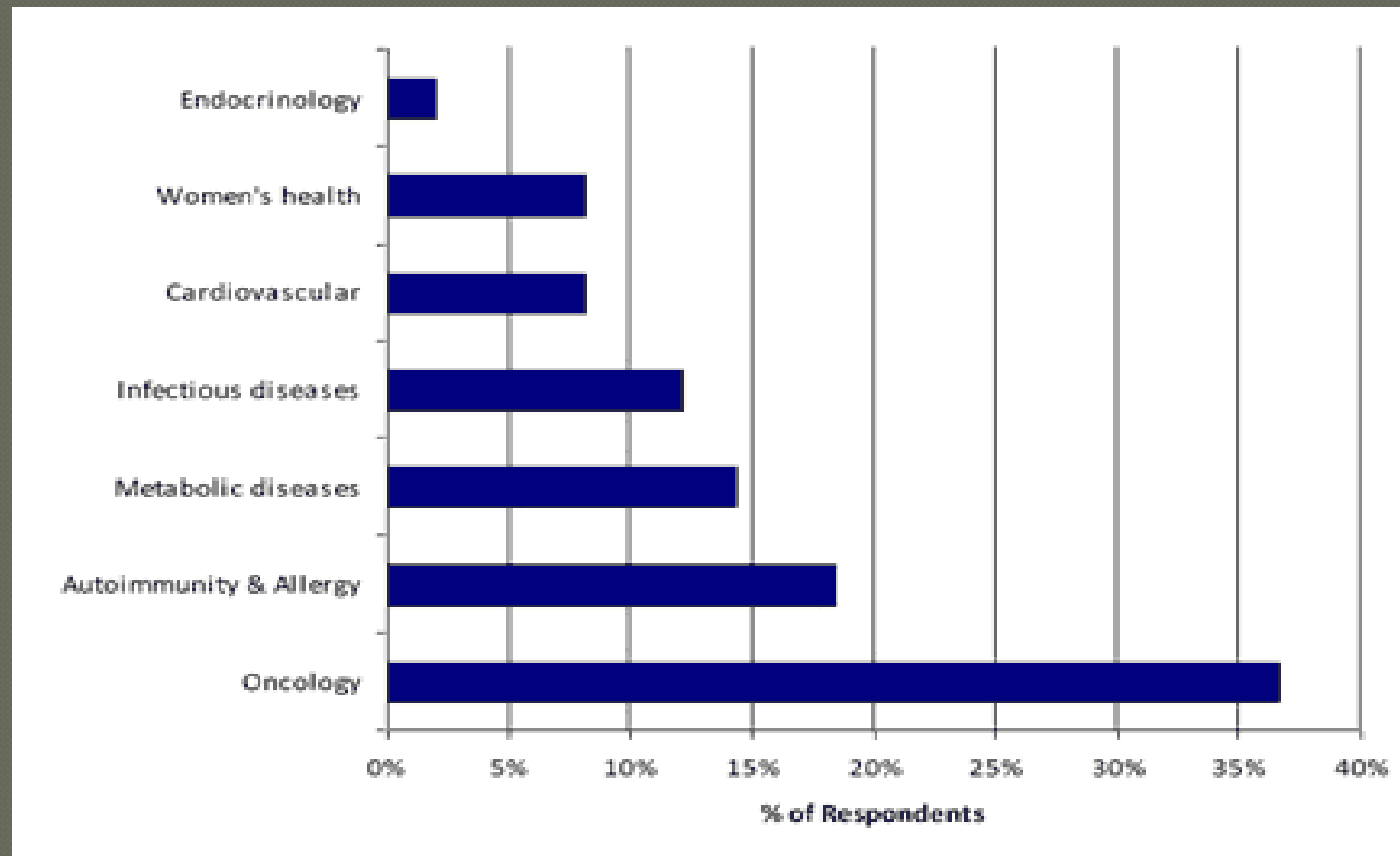
- Дальнейший анализ:
- KRAS мутации (25-30%)
- + химиотерапия

EML4-ALK – транслокация (7-10% больных) –
Кризотиниб

Использование генетического анализа при выборе лекарственной терапии

Препарат	Показания	Необходимый генетический анализ
Герцептин	РМЖ, рак желудка HER2+	Амплификация HER2/neu
Иресса/Тарцева	НМРЛ	Мутации EGFR
Цетуксимаб/Вектибикс	Колоректальный рак	Мутации KRAS
Кризотиниб	НМРЛ	EML4-ALK
Гливек	Лейкоз	транслокация t (9;22)
Дасатиниб/Нилотиниб	Лейкоз (резистентность)	Мутации в ТК домене bcr-alb
Вемуруфениб	Меланома	Мутации V600 BRAF

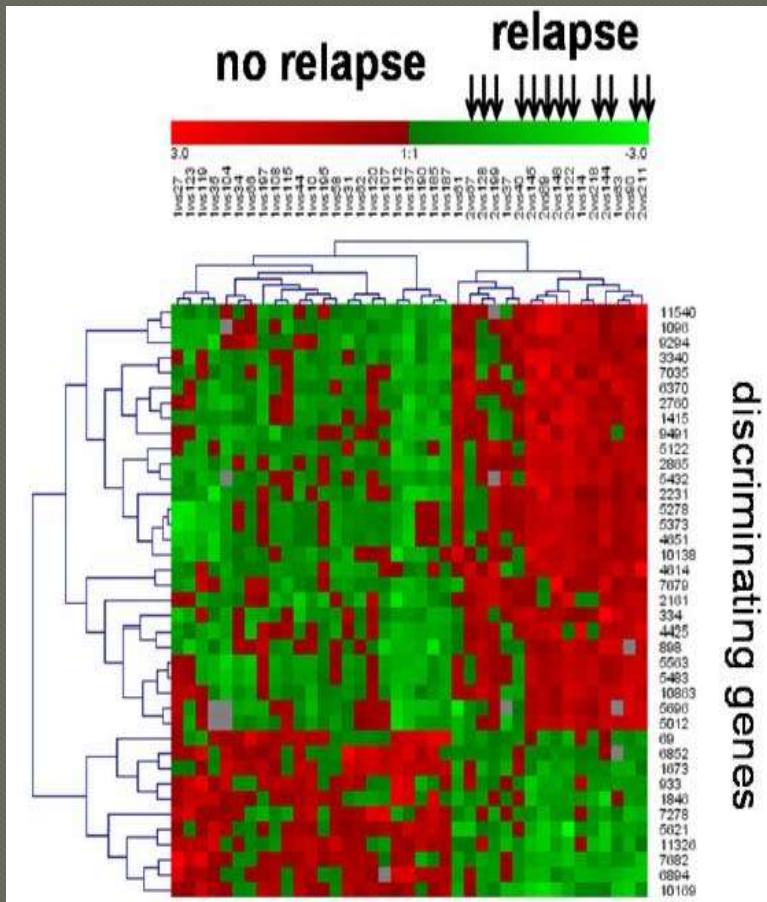
К каким заболеваниям имеет отношение персонифицированная медицина?



Исчерпывающий анализ генома для выбора лекарственной терапии

Возможно ли?

Транскриптомный анализ опухолей РМЖ



Perou CM, et al

Molecular portraits of human breast tumours. Nature, 2000

5 подтипов РМЖ:

- Laminal A
- Laminal B
- Basal
- HER2/neu+
- normal-like

Результаты исследований транскриптома клеток опухоли при РМЖ 2000-2012 гг

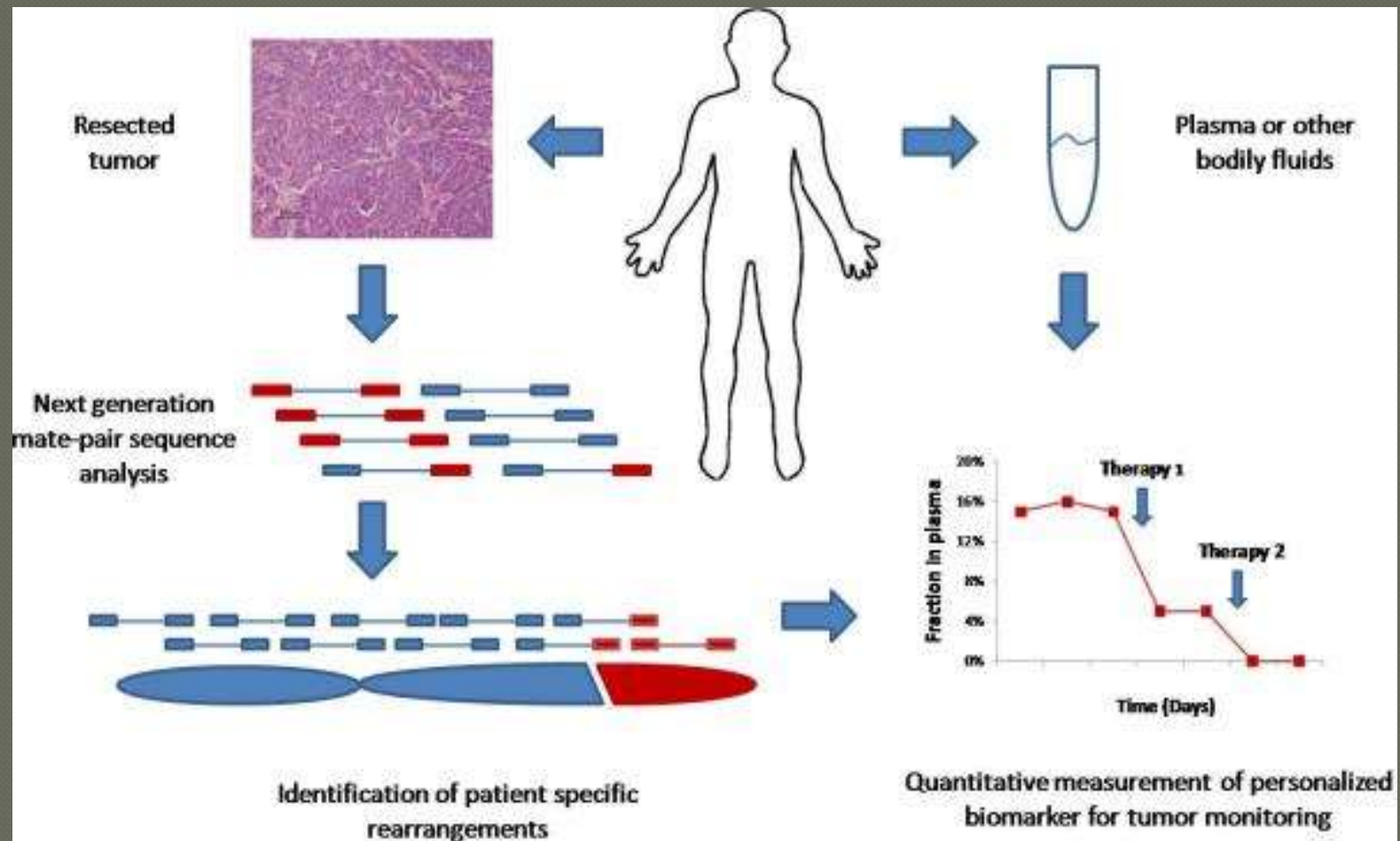
- ◎ 1. Наиболее важный результат – возможность выбора больных ER+, для которых нет необходимости использовать химиотерапию
- ◎ 2. Прогноз развития опухоли
- ◎ 3. Прогноз рецидивов
- ◎ 4. Ответ на лечение перед операцией

Полногеномный анализ клеток опухоли – результаты к концу 2012

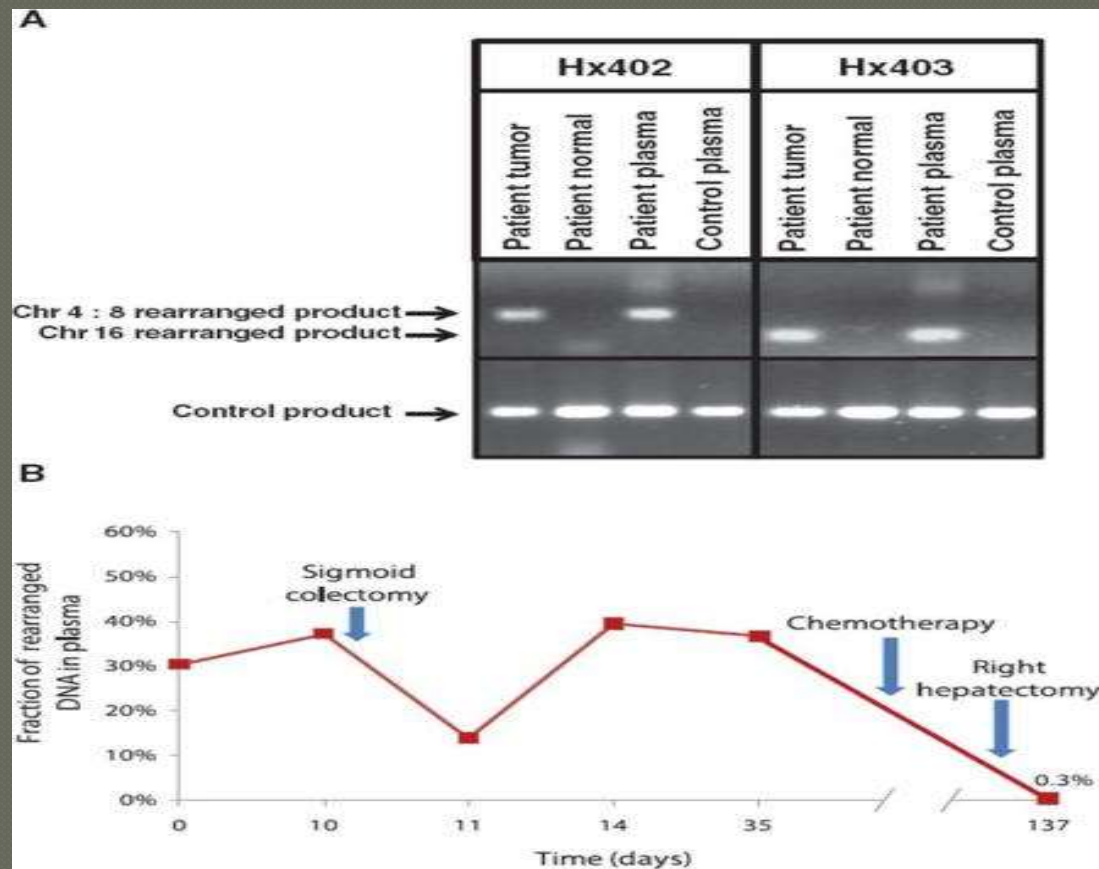
- Выявлены новые гены, связанные с раком
- Получена определенность по поводу гетерогенности опухоли – всегда есть доминирующий клон
- ДНК, специфичная для опухоли может быть обнаружена в плазме пациента

Схема персонифицированного лечения

R.J. Leary et al., (Howard Hughes MS) Science
Transl.Medicine, 2, 2010



Возможность молекулярного мониторинга при лечении рака



Новые данные по полногеномному секвенированию клеток опухоли при РМЖ

- ◎ - **2000 опухолей** – полногеномный анализ
- ◎ - определены **45 районов**, где происходят перестройки
- ◎ - **10 типов** опухолей на основе генетических особенностей
- ◎ Curtis, C. *et al. Nature* **486**, 346–352 (2012):

Новые данные по полногеномному секвенированию клеток опухоли при РМЖ

- - мутации **только в** 3 генах - ***TP53***, ***PIK3CA*** и ***PTEN*** вовлечены в раннее развитие опухолей ER-/PR-/HER2-

Shah, S. P. et al. *Nature* **486**, 395–399 (2012).

Новые данные по полногеномному секвенированию клеток опухоли при РМЖ

• Banerji, S. et al. *Nature* **486**, 405–409 (2012).

• новые мутации – в гене транскрипционного фактора *CBFB* и в гене *RUNX1*, кодирующий CBFB-связывающийся белок

• не известная ранее транслокация **MAGI3-AKT3**, приводящая к активации АКТ киназы, возможность специфического ингибирования АКТ3 (**GSK-69093**)

Новые данные по полногеномному секвенированию клеток опухоли при РМЖ

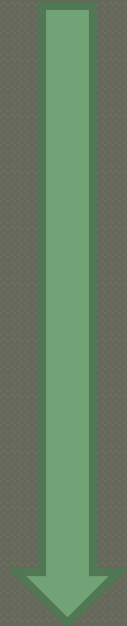
- соматические мутации только в трех генах (TP53, PIK3CA и GATA3) встречаются с частотой более 10% во всех типах опухолей
- анализ наследственных форм рака молочной железы, выявил 47 из 507 пациентов с делециями в 9 генах – **ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CHEK2, NBN, PTEN, RAD51C и TP53**
- **Nature.** 2012 Koboldt DC et al.,
Comprehensive molecular portraits of human breast tumours

Наиболее яркие результаты по полногеномному анализу других опухолей

Локализация опухолей	Вариант анализа	Результат
Колоректальный рак	72 WES, 68 RNA- seq, 2 WGS	Множественные слияния генов (RSPO2, RSPO3), возможно функционируют как онкогены
Меланома	25 WGS	PREX2 – ген, содержащий множественные мутации
Рак головы и шеи	32 WES	NOTCH1 – множественные мутации (онкоген?)

Количество новых мутаций в опухолях уменьшается в ряду

- Немелкоклеточный рак легкого
- Меланома
- Рак молочной железы
- Колоректальный рак
- Рак простаты
- Лейкозы



Геномный анализ в онкологии России и Новосибирска

Анализ проводится

- мутации EGFR при раке легкого
- мутации в гене KRAS
- FISH/CISH/PCR анализ копийности HER2/neu при РМЖ
- Транслокации bcr-abl при лейкозах

Анализ Не проводится

- мутации в гене BRAF при меланоме
- Транслокации EML4-ALK при раке легкого
- Секвенирование ТК фрагмента bcr-abl
- Секвенирование BRCA1/2 при семейных формах рака

Частоты встречаемости онкологически значимых мутаций в г.Новосибирске

Мутация	Жители г. Новосибирска (n = 7920)		Больные РМЖ (n = 570)	
	Количество носителей	Частота встречаемости	Количество носителей	Частота встречаемости
BRCA1 5382insC	20	0,25 %	14	2,46 %
BRCA1 C61G	4	0,05 %	2	0,35 %
BRCA1 185delAG	0	≤0,01 %	1	0,18 %
BRCA1 4153delA	0	≤0,01 %	1	0,18 %
BRCA2 6174delT	0	≤0,01 %	0	≤0,18 %
CHEK2 1100delC	32	0,40 %	10	1,75 %

**1 житель Новосибирска из 160 –
носитель мутации, которая с
очень высокой вероятностью
приведет к онкологическому
заболеванию**

Молекулярно-генетический
мониторинг наследственных форм рака
в НСО – **6- 10 млн.** рублей в год

Новосибирск: первая в России программа по генетическому мониторингу в онкологии

- ◉ Разработана НИИ МББ в 2012 году
- ◉ Одобрена губернатором НСО 03.07.2012
- ◉ *Начало – 15.04.2013*
- ◉ Выполнение программы позволит выявлять наследственные формы рака молочной железы на ранней стадии



A large, multi-story building with a prominent mural on its facade. The mural depicts several figures in a stylized, possibly Soviet-era artistic style. The building is surrounded by greenery, including a large evergreen tree on the left and a bush in the foreground. The text "Спасибо за внимание!" is overlaid in yellow on the image.

Спасибо за внимание!