

Роль циркулирующей в крови опухолевой ДНК при раке толстой кишки

М.Ю. Федянин, Е.М. Полянская, С.А. Тюлядин

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23

Контакты: Михаил Юрьевич Федянин fedianinmi@mail.ru

Под термином «жидкостная биопсия» (“liquid biopsy”) понимают изучение различных дериватов опухоли (циркулирующая опухолевая ДНК, циркулирующие опухолевые клетки, опухолевая РНК, белки опухоли) в плазме крови. Данные жидкостной биопсии дают информацию о молекулярных нарушениях и морфологии в реальном времени по всей опухолевой массе и позволяют оценить в динамике эволюционные изменения образования, гетерогенность заболевания и эффективность терапии. Несмотря на впечатляющую перспективу применения данного метода в диагностике и мониторинге заболевания, тем не менее существует ряд проблем по внедрению жидкостной биопсии при различных онкопатологиях. В данном обзоре литературы мы сконцентрируемся на роли циркулирующей ДНК как источнике информации об опухоли у больных раком толстой кишки.

Ключевые слова: циркулирующая опухолевая ДНК, рак толстой кишки, биомаркеры

DOI: 10.17650/2220-3478-2016-6-3-43-52

The role of circulating tumor DNA in patients with colon cancer

M. Yu. Fedyanin, E. M. Polyanskaya, S. A. Tjulyandin

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia;
23 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

The term “liquid biopsy” describes the study of various tumor derivatives (circulating tumor DNA, circulating tumor cells, tumor RNA, tumor proteins) in the blood plasma. Results of liquid biopsy provide real-time information on the molecular pathologies and morphological features throughout the whole tumor mass and allow to estimate evolutionary changes of tumor mass in the dynamics, heterogeneity of mass formation and effectiveness of the therapy. Despite the impressive perspective of this method in the diagnosis, monitoring of disease, there is a number of problems for the implementation of liquid biopsy for various cancer pathologies. In this literature review, we focus on the role of circulating DNA as a source of information about the tumor in patients with colon cancer.

Key words: circulating tumor DNA, colon cancer, biomarkers

Введение

В последние 5 лет термин «жидкостная биопсия» (“liquid biopsy”) стал очень популярен в онкологии. Под ним понимают изучение различных дериватов опухоли в плазме крови. Объяснением этому служит все большая персонализация лечения онкологических пациентов, основанная на молекулярных изменениях в опухоли конкретного больного. В процессе лечения возникают новые генетические изменения в образовании, определяющие его резистентность к проводимому лечению. Традиционная тканевая биопсия представляет данные лишь по одному небольшому участку первичной опухоли или метастаза, зачастую взятому еще до начала лечения. От выполнения повторных биопсий, как правило, пациенты отказываются. В клинике бывают случаи, когда блоки первичной опухоли утеряны, качество морфологического материала или его неправильное хранение не позволяет выполнить генетическое исследование, локализация метастазов препятствует выполнению биопсии. Все это определило

развитие альтернативных путей изучения опухолевого материала у онкологических больных. В качестве источника информации об образовании применяют его различные дериваты (циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), опухолевая циркулирующая ДНК (цДНК), опухолевая РНК, белки опухоли). Данные жидкостной биопсии дают информацию о молекулярных нарушениях и морфологии в реальном времени по всей опухолевой массе и позволяют оценить в динамике эволюционные изменения образования, гетерогенность заболевания и эффективность терапии. Это определяется возможностью многократного взятия образцов крови пациента для анализа в процессе терапии, в отличие от традиционной тканевой биопсии, что помогает оценить механизмы резистентности к лечению и, возможно, уже в скором будущем модифицировать терапевтическую схему в соответствии с выявляемыми молекулярными нарушениями в опухоли. В данном обзоре литературы мы сконцентрируемся на роли цДНК как источника информации об опухоли у больных раком толстой кишки.

Методы выделения и изучения циркулирующей ДНК

Использование опухолевой цДНК в качестве сурrogата опухолевого генома было предложено еще в 70-е годы прошлого века [1]. Саму внеклеточную циркулирующую в крови ДНК (нуклеиновые кислоты) у здоровых людей удалось выделить еще в 1940-е годы Р.М. Mandel и Р. Métais [2].

Источником опухолевой цДНК являются погибшие вследствие некроза, фагоцитоза или апоптоза клетки опухоли [3]. Процентное содержание опухолевой цДНК от общей цДНК в плазме крови, по данным К. Nibi и соавт., составляет от 0,2 до 10,0 % [4]. При этом оборот опухолевой цДНК довольно высокий за счет того, что период полураспада цДНК колеблется от нескольких минут до нескольких часов [5]. Следует отметить, что нормальных значений цДНК не определено, так как они значимо варьируют в зависимости от различных физиологических условий [6]. В свою очередь, гетерогенность и клональная эволюция опухоли в процессе лечения могут приводить к различиям между мутационным статусом первичной опухоли и цДНК, особенно при метастатическом поражении [7, 8].

В обзоре литературы, выполненном Т. Lecomte и соавт., уровень выявления мутаций в цДНК при раке толстой кишки варьировал от 9 до 100 %. Однако большинство исследований, вошедших в анализ, включали небольшое число пациентов [9]. Таким образом, сравнивать ранние работы, посвященные цДНК, довольно трудно. Тем не менее изучение опухолевой цДНК имеет значительные перспективы от скрининга и диагностики до мониторинга терапии онкологических заболеваний. При этом можно не только оценивать концентрацию опухолевой цДНК в крови, но и определять мутации в цДНК, как и отношение мутантных цДНК к их общему количеству.

За последние 5 лет различные независимые исследовательские группы показали возможность выделения опухолевой цДНК в крови у больных раком толстой кишки [10]. Такая возможность определяется чувствительностью методов изучения мутировавших последовательностей ДНК, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Основной проблемой применения в данных целях классической ПЦР является ее низкая чувствительность в выделении небольшого количества мутантных аллелей в большом количестве неизменной ДНК. В связи с этим стали разрабатываться новые технологии для решения данной проблемы.

Следует отметить, что внеклеточная ДНК с длиной в среднем около 180 пар оснований высоко фрагментирована в плазме крови [11]. У онкологических больных большая часть данных фрагментов короче 100 пар оснований [12]. Это позволяет повысить чувствительность метода ПЦР за счет укорочения ампликонов [13, 14]. В исследовании R.F. Andersen и соавт. провели анализ цДНК у 46 больных раком толстой кишки с мутацией в гене *KRAS* в первичной опухоли. С помощью

длинных ампликонов мутации в цДНК удалось выявить только в 61 % случаев, тогда как при применении метода коротких ампликонов стало возможным повысить конкордантность по мутационному статусу до 74 % [15]. Кроме этого, наряду с методикой изучения коротких ампликонов [15, 16] был предложен и ряд других разработок для повышения чувствительности метода выделения и анализа опухолевой цДНК. Так, рекомендуется использовать для анализа плазму, а не сыворотку крови пациента [7, 17], сочетать несколько методов анализа ДНК (мутационного анализа и метилирования ДНК) [18]. К примеру, в исследовании E. Danese и соавт. изучили конкордантность мутационного статуса гена *KRAS* и метилирования гена *SEPT9* между первичной опухолью и цДНК у 85 больных раком толстой кишки во время операции с помощью методов ARMS-qPCR и methylation specific qPCR. Общая конкордантность между мутационным статусом первичной опухоли и цДНК по мутационному статусу гена *KRAS* составила 89,4 %. Однако среди 29 больных с мутацией в гене *KRAS* аналогичная мутация в цДНК была обнаружена лишь у 22 (75,8 %). Это определило чувствительность теста в 85 %, а специфичность – в 93 %. По метилированию промотора гена *SEPT9* конкордантность составила 86 %, чувствительность – 83 %, специфичность – 100 % [19]. К такому же выводу – о необходимости комбинации как минимум 2 маркеров в целях повышения чувствительности метода детекции опухолевой цДНК – пришли и F. Di Fiore и соавт., предложившие определять не только мутацию в гене *KRAS*, но и метилирование промотора гена *RASSF2A* цДНК [20].

Еще одним способом повышения чувствительности метода выделения и анализа опухолевой цДНК является nucleic acid (PNA) – based PCR. Данная техника, по убеждению авторов, решает проблему небольшого числа мутантных аллелей в плазме крови, позволяя выявить 1 мутантный аллель на 10 тыс. Так, в 2014 г. группа исследователей из Тайваня представила анализ сравнения мутационного статуса гена *KRAS* в первичной опухоли и в цДНК в плазме крови 52 больных раком толстой кишки III–IV стадий с помощью данного варианта ПЦР. Только у 28,8 % больных была выявлена мутация гена *KRAS* в первичной опухоли, тогда как в 50 % случаев мутация гена *KRAS* была обнаружена в цДНК. То есть у 21,1 % больных с «диким» типом гена *KRAS* в опухоли обнаруживалась мутация в цДНК. Общая конкордантность по мутационному статусу гена составила 78,8 %. Авторы объяснили данное явление гетерогенностью заболевания [21].

Можно сделать вывод, что в основе повышения чувствительности большинства методов лежит насыщение изучаемого образца мутантными аллелями в процессе процедур амплификации с последующим применением чувствительных техник по детекции данного измененного гена. Однако эти процедуры весьма тру-

доек и требуют многократного выполнения тестов, что осложняет их внедрение в рутинную клинико-лабораторную практику.

Сравнивая частоту выявления ЦОК и опухолевой цДНК, отметим, что во всех случаях выявления ЦОК в крови пациента всегда обнаруживается и опухолевая цДНК. Однако зачастую при отсутствии ЦОК в крови выявляется опухолевая цДНК [22]. Некоторые исследовательские группы выявили значимую корреляцию между выявлением ЦОК и мутацией в гене *KRAS* цДНК у больных метастатическим раком толстой кишки [23].

Стоит отметить, что любые манипуляции с опухолью приводят к увеличению уровня цДНК в крови пациента. Так, установка стентов в просвет толстой кишки в целях профилактики кишечной непроходимости приводила к увеличению уровня цДНК в крови в несколько раз с последующим снижением до первоначального уровня через 4 дня [24]. После метастазэктомии у всех ($n = 10$) больных с метастазами рака толстой кишки в печень отмечено повышение уровня цДНК в крови к 7-му дню после оперативного вмешательства. У 3 пациентов с прогрессированием заболевания в течение 6 мес после выполнения радикальной операции уровень цДНК увеличивался или оставался повышенным после хирургического лечения. Авторы исследования отметили, что развитие послеоперационных осложнений может уменьшать скорость снижения уровня цДНК [25]. В исследовании T. Reinert и соавт., изучив концентрацию цДНК после хирургического вмешательства у 11 больных раком толстой кишки, выявили, что динамика уровня цДНК определяется следующими факторами: гибель нормальных клеток в результате хирургической травмы (определяя пик цДНК к 8-му дню после операции), гибель клеток вследствие послеоперационных осложнений, гибель клеток вследствие сопутствующей патологии, адъювантной химиотерапии и разрушение лейкоцитов в результате приготовления образцов крови для анализа. Также отмечено, что рост уровня опухолевой цДНК при прогрессировании заболевания наступает раньше получения объективных данных о прогрессировании [26]. Интересно, что применение техники No-touch isolation при удалении первичной опухоли снижает частоту выявления опухолевой цДНК до 14 % с 73 % при классической методике оперативного вмешательства [27].

Диагностическая польза и прогностическое значение циркулирующей ДНК при ранних стадиях рака толстой кишки

По сравнению со здоровыми добровольцами ($n = 100$) и пациентами с аденомой толстой кишки ($n = 70$) у больных с метастатическим раком толстой кишки ($n = 100$), получавших 2-ю линию химиотерапии, уровень цДНК в плазме крови был значимо выше. Этот уровень влиял на медиану времени до прогрессирования и продолжительность жизни: 2,1 мес (95 % дове-

рительный интервал (ДИ) 2,0–3,4), 6,5 мес (95 % ДИ 4,2–7,2; отношение рисков (ОР) 2,53 (95 % ДИ 1,57–4,06); $p \leq 0,0001$), 7,4 мес (95 % ДИ 4,3–8,7) и 13,8 мес (95 % ДИ 11,9–18,9; ОР 2,52 (95 % ДИ 1,54–4,13); $p < 0,0001$) соответственно [28]. Такие же обнадеживающие данные по возможности использования опухолевой цДНК в качестве биомаркера выявления рака толстой кишки и его прогрессирования получили S. Pucciarelli и соавт., изучившие различия в концентрации опухолевой цДНК у здоровых добровольцев ($n = 55$), пациентов с аденомами толстой кишки ($n = 24$) и больных с различными стадиями рака толстой кишки ($n = 136$). При пороговом значении уровня опухолевой цДНК в 4,86 нг/мл чувствительность и специфичность метода составили 78,52 и 86,08 % соответственно [29]. Аналогичные результаты получены и другими исследовательскими группами [14, 30–32].

При анализе мутационного статуса генов *TP53*, *APC*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *FBXW7* и *SMAD4* в цДНК и в опухолевом материале 19 пациентов с метастатическим раком толстой кишки применялась технологическая платформа MPS (Safe-SeqS). У 84,2 % больных в опухоли обнаружилась хотя бы 1 мутация в 1 из перечисленных генов, во всех случаях подтвержденная и цДНК (7 – *KRAS*, 3 – *TP53*, 3 – *BRAF*, 2 – *APC* и 1 – *PIK3CA*). Как и в других исследованиях, более высокая концентрация цДНК была ассоциирована с низкими показателями общей выживаемости (при пороговом значении 2,5 нг/мл): 6,9 мес против 12,2 мес; $p = 0,0086$ [33]. Эти же авторы с данной технологической платформой MPS (Safe-SeqS) в дальнейшем решили проспективно оценить прогностическое значение мутационных изменений опухолевой цДНК, взятой через 4–10 нед после операции, у 250 больных раком толстой кишки II стадии. При этом у 175 пациентов удалось взять образцы цДНК и через 3 мес после хирургического лечения. Предварительные данные о результатах лечения 112 пациентов были доложены в 2014 и 2015 гг. Хотя бы 1 мутация в перечисленных генах была обнаружена у всех больных. Прогрессирование заболевания развилось у 7 (77,8 %) из 9 больных с позитивной цДНК после оперативного лечения, тогда как в случае отсутствия цДНК в плазме крови после хирургического вмешательства прогрессирование наступило лишь у 7 (6,8 %) из 103. Данная закономерность выявлялась независимо от стадии Т. При этом у половины пациентов с прогрессированием опухолевая цДНК выявлялась в процессе наблюдения после операции. Также наличие опухолевой цДНК значимо было ассоциировано с короткой безрецидивной выживаемостью (ОР 25,7; $p < 0,001$). Авторы работы сделали вывод о возможности оценки уровня опухолевой цДНК в крови пациента в процессе наблюдения за развитием рецидива болезни [33, 34].

Исследователи из Франции с помощью технологии Inplex оценили прогностическое значение таких параметров, как общая концентрация цДНК в плазме,

уровень фрагментации цДНК, мутационный статус генов *KRAS* и *BRAF* в цДНК и процент мутантной цДНК, у 98 больных метастатическим раком толстой кишки. Так, наличие мутации в гене *BRAF* цДНК, высокий уровень цДНК в плазме крови, высокий процент мутантной цДНК (медиана 10,3 %) обладали значимым негативным влиянием на общую выживаемость [35].

Конкордантность между мутационным статусом опухоли и циркулирующей ДНК

Одно из ключевых исследований, посвященных изучению конкордантности мутационных изменений цДНК и опухолевого материала, было проведено С. Bettegowda и соавт. Конкордантность мутационного статуса гена *KRAS* в первичной опухоли и в цДНК была оценена у 206 больных раком толстой кишки. Чувствительность метода оценки цДНК составила 87,2 %. У 26 пациентов при наличии мутации в первичной опухоли она не выявлялась в цДНК. При детальном анализе данной подгруппы пациентов отмечено, что такая ситуация была характерна в подгруппе с низким уровнем раково-эмбрионального антигена, муцинозным гистотипом опухоли, низким уровнем аланинаминотрансферазы и лейкоцитов, молодым возрастом больного. Авторы сделали вывод, что при небольшой распространенности заболевания чувствительность метода выявления мутаций в цДНК значимо снижается. Также в данной работе было доказано и негативное прогностическое значение концентрации цДНК у больных раком толстой кишки. Исследователи выявили мутацию в гене *KRAS* цДНК у 38 % пациентов с прогрессированием заболевания на фоне анти-EGFR-терапии и с «диким» типом гена *KRAS* в первичной опухоли, при этом у 62,5 % пациентов мутация в гене *KRAS* цДНК локализовалась в 61-м кодоне 2-го экзона. Суммарно у 96 % больных были выявлены изменения цДНК, касающиеся генов MAPK-сигнального пути при прогрессировании на фоне терапии анти-EGFR-моноклональными антителами [22].

Исследователи из Китая в целях изучения конкордантности между опухолью и цДНК выбрали методы ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру и NGS-технологией. При этом пороговое значение мутации в гене *KRAS* было принято > 0,5 %. Всего в исследование были включены 27 пациентов, которым выполняли операцию по удалению первичной опухоли. Чувствительность и специфичность определения мутационного статуса гена *KRAS* в цДНК составили 76,9 и 78,6 % соответственно. При этом в отношении мутаций в цДНК, но не в опухолевом материале чувствительность технологии NGS превосходила секвенирование по Сэнгеру [36].

Аналогичные относительно неудовлетворительные данные по чувствительности мутационного анализа цДНК в отношении гена *KRAS* были получены и D. Sefrioui и соавт. Метод, который применяли исследователи

у 35 больных метастатическим раком толстой кишки, получавших химиотерапию, в целях изучения статуса гена *KRAS* в цДНК, – TaqMan Mutation Detection Assay (TMDA). При сравнении мутационного статуса гена *KRAS* в опухоли и в цДНК чувствительность и специфичность метода составили 62 и 100 % соответственно. Авторы работы также отметили корреляцию между концентрацией цДНК и 3-месячными показателями выживаемости без прогрессирования [37]. Применение же цифровой ПЦР (Digital 3D™ QuantStudio) в качестве метода детекции мутации в гене *KRAS* цДНК у 34 пациентов с метастатическим раком толстой кишки характеризовалось аналогичными показателями чувствительности (63 %) и специфичности (100 %) [38].

A. Marziali и соавт. в целях снижения частоты ошибок секвенирования разработали собственный процесс отбора таргетной ДНК «дикого» типа, назвав данную технологию OnTarget. Применение такого подхода позволило добиться высоких показателей чувствительности (92 %) и специфичности (100 %) по определению мутационных изменений в генах цДНК у 17 больных раком толстой кишки [39].

R. Scott и соавт. представили результаты изучения соответствия мутационного анализа опухолевого материала и цДНК у 31 больного раком толстой кишки III и IV стадий с помощью теста OncoBEAM. Данный тест включал панель из 33 мутаций генов *RAS*. Отмечена высокая частота соответствия мутационного статуса гена *KRAS* между цДНК и опухолью – 93,5 % [40]. В 2015 г. были представлены результаты метаанализа 2 исследований по соответствию мутационного статуса генов *RAS* в опухоли и цДНК у больных метастатическим раком толстой кишки с помощью тест-системы OncoBEAM. Всего был изучен материал от 68 пациентов из Европы и Австралии, из которых 46 были с впервые выявленным заболеванием. Данная тест-система показала высокую частоту соответствия мутационного статуса между цДНК и опухолевым материалом – 96 %; в 100 % случаев подтверждался «дикий» тип генов, в 92 % – наличие мутации. Частота выявления мутации в опухоли и цДНК составила 55 и 57 % соответственно. В этих 3 случаях расхождения данных в цДНК был выявлен низкий процент мутаций в генах *RAS* от всей цДНК [41]. В настоящий момент продолжается исследование по валидации данной тест-системы на большем числе пациентов.

Исследователи из Японии изучили цДНК 29 больных метастатическим раком толстой кишки. Мутации в гене *KRAS* цДНК были обнаружены у 86 % пациентов с мутацией данного гена в первичной опухоли и у 14 % без таковой. Из 12 больных, которым были назначены анти-EGFR-моноклональные антитела с «диким» типом генов *KRAS* и *BRAF* в первичной опухоли, у 9 с отсутствием мутации и в цДНК наблюдали выраженный клинический ответ. Только у 1 из 3 пациентов

с мутацией в гене *KRAS* цДНК также был достигнут объективный ответ. Через 12 мес у 1 пациента отмечено появление мутации в гене *KRAS* цДНК на фоне анти-EGFR-терапии [42].

В другом исследовании при метастатическом раке толстой кишки с мутацией в гене *KRAS* отмечено высокое совпадение по мутационному статусу гена *KRAS* между опухолевым материалом и цДНК в плазме крови ($n = 20$) и моче ($n = 16$) – в 95 и 94 % соответственно. При этом исследователи изучали ультракороткие ампликоны (до 31 вр) для выявления мутации в гене *KRAS* в цДНК [43]. Такие же высокие результаты соответствия мутационного статуса первичной опухоли и цДНК в моче были получены и для гена *BRAF* – 94 %. Анализ был проведен среди 34 пациентов с метастатическими злокачественными опухолями различной локализации с мутацией в гене *BRAF*, включая 8 больных раком толстой кишки (см. таблицу) [44].

С. Trevisiol и соавт. с помощью метода RFLP-ПЦР выявили мутации во 2-м экзоне гена *KRAS* в опухолях 28 (33 %) пациентов с раком толстой кишки. Из них только у 36 % данные изменения регистрировались в цДНК. Исследователи подтвердили негативное прогностическое значение наличия мутации в гене *KRAS* цДНК у больных с метастатическим заболеванием [49]. Негативное прогностическое значение выявления мутации в гене *KRAS* цДНК при метастатическом и операбельном раке толстой кишки было показано и другими исследовательскими группами [50, 51].

В работах M.S. Kopreski и соавт. и J. Mora и соавт. мутации в гене *KRAS* цДНК были выявлены у 28 и 8,5 % пациентов соответственно. При этом в 1-м исследовании совпадение по мутационному статусу гена и первичной опухоли отмечено в 83 %, «дикий» же тип гена в первичной опухоли в 93 % случаев сопровождался и отсутствием мутации в цДНК. Во 2-м исследовании чувствительность метода оказалась низкой: если в цДНК мутация в гене *KRAS* была выявлена у 8,5 % больных, то в первичной опухоли она выявлялась уже у 41,0 % [32, 52]. В других исследованиях, проведенных в конце 90-х годов прошлого века, частота соответствия мутационного статуса гена *KRAS* в цДНК и опухолевом материале варьирует от 19 до 86 % [4, 53, 54].

Что касается совпадения по другим молекулярным изменениям в опухоли и в цДНК, то в этой связи интересны результаты следующих двух исследований. У 148 пациентов с аденомой или злокачественной опухолью толстой кишки проспективно был взят опухолевый материал и образцы крови для анализа на наличие фенотипа хромосомной нестабильности (CIN), метилирования ДНК (CIMP) и микросателлитной нестабильности (MSI). В аденомах MSI-, CIN- и CIMP-фенотипы были выявлены в 4, 32 и 7 % случаев соответственно. При этом изменений в цДНК плазмы крови от этих пациентов выявлено не было. Среди больных раком толстой кишки MSI-, CIN- и CIMP-

Конкордантность мутационного статуса опухолевого материала и циркулирующей ДНК

Автор	Метод детекции	Число пациентов, n	Ген	Конкордантность, %
R.F. Andersen и соавт., 2015 [15]	PCR-based	46	<i>KRAS</i>	71,0
E. Danese и соавт., 2015 [19]	PCR-based	85	<i>KRAS</i> and methylation of <i>SEPT9</i>	89,4
Y.B. Kuo и соавт., 2014 [21]	PNA-based PCR	52	<i>KRAS</i>	78,8
C. Bettgowda и соавт., 2014 [22]	PCR-based	206	<i>KRAS</i>	88,2
M.S. Kopreski и соавт., 2000 [32]	PCR-based	34	<i>KRAS</i>	83,0
F. Liu и соавт., 2015 [36]	NGS	27	<i>KRAS</i>	76,9
A. Marziali и соавт., 2014 [39]	OnTarget	17	<i>KRAS</i>	92,0
D. Sefrioui и соавт., 2014 [40]	TaqMan Assay	35	<i>KRAS</i>	62,0
F. Jones и соавт., 2015 [41]	OncoBEAM	68	<i>RAS</i>	92,0
T. Yamada и соавт., 2014 [42]	PCR-based	29	<i>KRAS</i>	86,0
J.C. Poole и соавт., 2015 [43]	PCR-based	20	<i>KRAS</i>	95,0
M.P. Morelli и соавт., 2014 [45]	GUARDANT sequencing technology	49	<i>KRAS</i>	70,0
J. Taberno и соавт., 2015 [46]	BEAMing	503	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i>	76,0 88,0 97,0
A.L.A. Wong и соавт., 2015 [47]	BEAMing	35	<i>KRAS</i>	77,0
M. Teufel и соавт., 2015 [48]	BEAMing	143	<i>KRAS</i>	65,0

фенотипы были выявлены в 10, 36 и 32 % случаев соответственно. Конкордантность с изменениями в цДНК отмечена у 25 % пациентов с MSI, у 23 % с CIN и у 60 % с CIMP-фенотипом. Минимальной для проведения полноценного анализа считали концентрацию цДНК 0,2 нг/мл [55].

Панель из 54 генов для анализа их мутационных изменений по технологии Guardant360 в цДНК была применена у 120 больных метастатическим раком толстой кишки, в среднем получивших 3 линии химиотерапии. Анализ мутации 50 генов в опухолевом материале был проведен с помощью технологии секвенирования (Ion Torrent). У 83 % пациентов в цДНК были выявлены изменения хотя бы в 1 из 54 генов исследуемой

панели (в среднем 4,2 мутации на 1 больного), включая амплификацию генов *EGFR*, *MET* или *ERBB2* у 26 %. В опухолевом материале генетические aberrации выявлены у 88 % пациентов, при этом значимо менее часто — в среднем 2,9 мутации на 1 больного [56].

Таким образом, метод детекции мутаций в интересующих генах в цДНК является краеугольным камнем в достижении высоких показателей соответствия мутационному статусу опухолевого материала.

Клональная эволюция рака толстой кишки

В 1976 г. P. Nowell предположил, что прогрессирование опухоли определяется селекцией наиболее агрессивных субклонов опухолевых клеток вследствие приобретаемых генетических различий между клетками. То есть происходит эволюционный отбор клеток опухоли, способных к выживанию, инвазии и метастазированию [57]. Внедрение методов изучения генома NGS (next generation sequencing) подтвердило генетическую гетерогенность опухолевых клеток в одной опухоли, в том числе и при раке толстой кишки [58, 59].

Драйверные мутации в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* зачастую совпадают между клетками первичной опухоли и метастазов, что подтверждает их раннее возникновение в процессе туморогенеза [60]. При сравнении 15 пар синхронных метастазов и первичных опухолей было подтверждено соответствие по мутационному статусу генов *PIK3CA* и *TP53* [61]. В других исследованиях также не выявлено значимых мутационных различий в генах семейства *RAS* между первичной опухолью в кишке и метастазах в печень [62, 63]. Однако в работе T. Xie и соавт. описано появление новых мутаций в генах *FBXW7*, *DCLK1*, *FAT2* в метастазах рака толстой кишки по сравнению с первичной опухолью [62]. Генетический профайлинг отдельных клеток 15 образцов рака толстой кишки также подтвердил, что мутации в генах *APC*, *KRAS*, *PIK3CA* и *TP53* являются ранними событиями канцерогенеза [64].

В случае «диких» типов генов *RAS* у пациентов с метастатическим раком толстой кишки отмечена эффективность терапии анти-EGFR-моноклональными антителами. Однако в дальнейшем у них развивается вторичная резистентность к данному типу таргетного воздействия, а у части больных имеется и первичная резистентность к анти-EGFR-терапии. Интересное наблюдение было описано L.A. Diaz и соавт., которые выявили у 40 % больных метастатическим раком толстой кишки при прогрессировании заболевания на фоне терапии панитумумабом (анти-EGFR-моноклональное антитело) мутации в гене *KRAS* в цДНК. При этом у 3 пациентов были выявлены множественные aberrации в гене *KRAS*. Путем математического моделирования авторы статьи пришли к выводу, что данные изменения в гене *KRAS* существовали в отдельных клонах еще до лечения панитумумабом. Однако дан-

ная гипотеза не была подтверждена секвенированием опухолевого материала до терапии панитумумабом. Соответственно, появление мутаций в гене *KRAS* может быть и поздним событием, возникающим при терапии анти-EGFR-моноклональными антителами [65].

Аналогичное по дизайну исследование было проведено С. Vettegowda и соавт., которые изучили спектр мутаций в цДНК у пациентов с «диким» типом гена *KRAS* в первичной опухоли толстой кишки при прогрессировании на фоне терапии цетуксимабом. Были выявлены 66 различных генетических изменений в цДНК, которые не присутствовали в первичной опухоли. Половина этих изменений локализовалась во 2-м экзоне гена *KRAS*, а у 2 пациентов была найдена мутация в гене *BRAF*, отсутствовавшая ранее, также у 2 пациентов выявлены мутации в киназном домене гена *EGFR* [22].

S. Mohan и соавт. выполнили секвенирование генов (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *EGFR*) цДНК у 10 пациентов с метастатическим раком толстой кишки и «диким» типом гена *KRAS* в первичной опухоли при прогрессировании на фоне терапии анти-EGFR-моноклональными антителами. У 40 % больных исследователи выявили увеличение количества копий гена *KRAS*. При этом, как и в других исследованиях, данное событие было взаимоисключающим с мутацией в том же гене и было ассоциировано с резистентностью к анти-EGFR-терапии [66–68].

В более расширенной публикации данного исследования среди 14 больных с метастатическим раком толстой кишки и «диким» типом гена *KRAS* в первичной опухоли при прогрессировании на фоне химиотерапии без анти-EGFR-моноклональных антител только у 1 пациента была обнаружена мутация в гене *KRAS* цДНК (в низкой концентрации 0,01 %). Тогда как среди 10 пациентов с прогрессированием болезни на фоне цетуксимаба у 7 (70 %) больных была обнаружена мутация в гене *KRAS* и еще у 1 (10 %) — амплификация гена *KRAS*. При этом мутация в 71 % случаев локализовалась в 13-м кодоне. У пациентов без мутации в гене *KRAS* цДНК после терапии цетуксимабом была выявлена амплификация гена *MET* цДНК, что расценено авторами как причина резистентности к анти-EGFR-воздействию [66, 69].

Исследователи из клиники MD Anderson с помощью технологии секвенирования GUARDANT изучили расхождение по мутационному статусу и числу копий 54 генов между опухолевым материалом и цДНК пациентов с метастатическим раком толстой кишки, рефрактерным к фторурацилу. При этом мутантными генотипами считали случаи с частотой мутантного аллеля более 0,1 %. Из 49 пациентов, которые ранее получали анти-EGFR-моноклональные антитела и имели «дикий» тип гена *KRAS* в опухоли, в 30 % случаев выявляли мутации в гене *KRAS* цДНК, а амплификацию гена *KRAS* отмечали у 12 %. У 14 % пациентов из описанных 49 выявляли мутацию в гене *EGFR*.

Однако если пациенты с «диким» типом гена *KRAS* не получали моноклональные антитела, мутация в цДНК встречалась только у 5 % больных. Амплификацию генов *EGFR*, *BRAF*, *MYC* и *SMO* у пациентов в цДНК выявляли в 23, 11, 11 и 4 % соответственно, что превышало аналогичные показатели по первичной опухоли [45].

Данные наблюдения об отсутствии изменений в гене *KRAS* в цДНК при прогрессировании на фоне только химиотерапии (без анти-EGFR-моноклональных антител) не нашли подтверждения в других работах. Так, S. Kopetz и соавт. провели анализ конкордантности мутационного статуса генов, в том числе и *KRAS*, между первичной опухолью и метастазами. Было выявлено, что в случае, если пациент получил химиотерапию до биопсии метастатического очага, частота расхождения по мутационному статусу генов увеличивалась в 3,5 раза по сравнению с больными, не получавшими химиотерапию [70]. Аналогичные результаты были представлены и в исследовании D.M. Graham и соавт. [71].

В своей работе A.L.A. Wong и соавт. изучили динамику опухолевой цДНК у 35 больных, получавших терапию регорафенибом (мультикиназный ингибитор) по поводу химиорефрактерного метастатического рака толстой кишки. У 40 % выявлена мутация *KRAS* цДНК, у 11 % – *PIK3CA*, у 9 % – *BRAF*. У 13 % пациентов, ранее получавших анти-EGFR-моноклональные антитела, выявлена мутация *KRAS* в цДНК. Суммарно расхождение по мутационному статусу генов *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* между первичной опухолью и цДНК выявлено у 23 % пациентов. При этом в случае выявления мутантного варианта *KRAS* в цДНК доля мутированных форм от общего количества цДНК колебалась в пределах от 0,03 до 54,0 %, что совпадает с данными других работ [47, 72–77]. Такая широкая вариабельность процента мутантной формы цДНК подтверждает гетерогенность заболевания и ставит вопрос о пороговом значении мутированной цДНК, при котором необходимо считать, что опухоль имеет большую часть клеточных клонов с «диким» типом гена *KRAS* и пациенту целесообразно назначить анти-EGFR-препараты. Авторы статьи отметили, что у больных с длительным контролем болезни на фоне терапии регорафенибом общее количество цДНК было значимо ниже в процессе терапии по сравнению со случаями быстрого прогрессирования. При выявлении мутантных форм цДНК прогноз течения болезни был хуже. Однако среди больных с мутированной формой цДНК доля мутантной опухолевой цДНК не коррелировала со временем до прогрессирования [47].

При анализе частоты встречаемости мутаций в цДНК у 143 химиорефрактерных больных азиатской расы, получавших регорафениб или плацебо в исследовании III фазы CONCUR, применяли технологию BEAM.

Мутация в гене *KRAS* выявлена у 54,5 %, *NRAS* – у 7,0 %, *BRAF* – у 7,8 % и *PIK3CA* – у 16,1 % пациентов. При сравнении с архивными данными мутационного статуса гена *KRAS* первичной опухоли конкордантность с данными по цДНК составила всего 65 % [78].

В исследовании регорафениба на европейской популяции пациентов с химиорефрактерным метастатическим раком толстой кишки (CORRECT) также был проведен мутационный анализ цДНК. Применяемый исследователями метод BEAMing (Beads, Emulsification, Amplification, and Magnetics) выявил мутацию в гене *KRAS* у 69 %, *PIK3CA* – у 17 % из 503 пациентов, включенных в анализ, и мутацию в гене *BRAF* – у 3 % из 502. В доступном архивном опухолевом материале тем же методом были выявлены мутации в генах *KRAS*, *PIK3CA* и *BRAF* в 59, 12 и 1 % случаев соответственно. При этом конкордантность по мутационному статусу причисленных генов между цДНК и опухолевым материалом составила 76, 88 и 97 % соответственно. Исследователей удивило такое несоответствие статуса по гену *KRAS*, что в основном было ограничено случаями наличия мутации в цДНК, но отсутствия ее в опухоли, и именно эти пациенты получали ранее анти-EGFR-терапию. Из 50 больных с несоответствием по мутационному статусу у 41 (82 %) отмечены мутации в цДНК, из них у 30 было подтверждено наличие «дикого» типа гена *KRAS* в опухолевом материале с помощью BEAMing. Также авторами показана обратная зависимость между концентрацией цДНК и выживаемостью [46].

Было проведено изучение соответствия первичной опухоли ($n = 108$) и динамики ($n = 67$) мутационного статуса генов *KRAS* и *BRAF* цДНК у пациентов с метастатическим раком толстой кишки в процессе терапии 3-й линии комбинацией цетуксимаба и иринотекана. У 78 % больных с мутацией гена *KRAS* в опухоли она была выявлена и в цДНК. Чувствительность метода оценки мутационного статуса гена *KRAS* в цДНК составила 78 %, а специфичность – 100 % [77]. Мутация в гене *BRAF* цДНК подтверждена у 2 из 3 больных. Контроль заболевания чаще достигался у пациентов с низким уровнем цДНК (< 25 %) – 77 % против 30 % у больных с высоким уровнем цДНК в плазме крови (> 75 %) ($p = 0,009$). Только у 4 и 1 пациента в процессе терапии стали выявляться мутации в генах *KRAS* и *BRAF* соответственно [79]. Также выживаемость без прогрессирования и продолжительность жизни были значимо выше при низких значениях опухолевой цДНК, постепенно снижаясь при увеличении числа аллелей цДНК [80].

В Германии с помощью технологии NGS (Ion Torrent PGM) оценили динамику опухолевой цДНК у 20 пациентов с мутацией в генах *KRAS* ($n = 17$) или *NRAS* ($n = 3$) с прогрессированием заболевания в процессе лечения. При радиологических признаках прогрессирования у 15 % пациентов не отмечено появления

мутаций в генах *RAS* цДНК, у 55 % зарегистрировано повышение уровня мутантного аллеля в цДНК, у 30 % уровень мутантной формы гена не увеличивался по сравнению с уровнем на 60-й и 30-й дни до прогрессирования [81]. Интересное наблюдение было сделано исследователями из Японии, изучавшими динамику мутационных изменений в гене *KRAS* цДНК. Из 17 больных метастатическим раком толстой кишки с «диким» типом гена в цДНК до начала лечения у 3 в дальнейшем стала определяться мутация в гене *KRAS* цДНК. При этом только в 1 случае пациент получал анти-EGFR-моноклональные антитела [82].

В 2008 г. F. Diehl и соавт. опубликовали работу по мутационному анализу генов *APC*, *KRAS*, *PIK3CA* цДНК 168 образцов крови от 18 больных раком толстой кишки. Во всех образцах опухолевая цДНК определялась до хирургического лечения. У пациентов с выявляемой опухолевой цДНК в процессе наблюдения после операции в дальнейшем отмечено прогрессирование заболевания [72]. В другом исследовании также оценили динамику мутации гена *KRAS* цДНК у 25 пациентов с различными стадиями рака толстой кишки после хирургического лечения. У 64 % больных мутация в гене *KRAS* выявлялась в первичной опухоли, из них только у 56 % она была также выявлена и в цДНК. У 8 из 9 пациентов с мутацией в цДНК последняя определялась и после операции. При этом у 62,3 % из них в дальнейшем развилось прогрессирование. В то же время исследователи не увидели значимой корреляции между показателями выживаемости и наличием мутации в гене *KRAS* цДНК [83].

G. Siravegna и соавт. также подтвердили появление мутаций в генах *RAS* в цДНК на фоне терапии анти-EGFR-моноклональными антителами. Однако после отмены данных препаратов отмечалось и снижение уровня мутированного аллеля *KRAS* в цДНК, и он не определялся на фоне последующих линий химиотерапии. Исследователи подчеркнули, что мутация в гене *KRAS* цДНК не появлялась в процессе монохимиотерапии с бевацизумабом или без. Таким образом, появляется возможность реиндукции анти-EGFR-моноклональных антител при исчезновении клона опухолевых клеток с мутацией в гене *KRAS*. Особенно это

интересно в контексте того, что опухолевые клетки с «диким» типом генов выживают в присутствии анти-EGFR-моноклональных антител, если культивируются вместе с клетками с мутантным генотипом. Это происходит за счет протективного действия лигандов к EGFR (трансформирующий фактор роста α и амфирегулин), секретирующихся клетками с мутацией в генах *RAS* [84]. В отношении 3 пациентов G. Siravegna и соавт. так и поступили – возобновили терапию анти-EGFR-моноклональными антителами при исчезновении мутации в гене *KRAS* цДНК и получили клинически значимый ответ опухоли. Однако в дальнейшем мутация в этом гене снова стала определяться. Авторы предполагают, что интермиттирующее назначение анти-EGFR-терапии позволит предотвратить динамику отдельных опухолевых клонов. В качестве методов оценки статуса генов применяли капельную цифровую ПЦР и метод BEAMing. Оба метода обладают высокой чувствительностью, позволяя детектировать 0,01–0,001 % мутаций в гене *KRAS* от всей цДНК [85]. В 97 % случаев (у 97 из 100 пациентов с метастатическим раком толстой кишки) авторы подтвердили соответствие мутационного статуса генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* опухолевого материала и цДНК. У 8 больных выявлены изменения в цДНК, которые не обнаружались в опухолевом материале [86].

Заключение

В заключение следует отметить, что в настоящее время возрастает роль жидкостной биопсии в онкологии. На смену определению ЦОК приходят новые суррогаты материала для молекулярного анализа: цДНК, матричная РНК. И хотя все больше данных накапливается по прогностическому значению наличия ЦОК и цДНК у больных раком толстой кишки, все же в первую очередь данный вариант жидкостной биопсии войдет в клиническую практику как материал для определения мутационного статуса генов *RAS* и *BRAF*. В дальнейшем мы увидим большое количество исследований по оценке динамики мутационных изменений в цДНК в процессе терапии анти-EGFR-препаратами и, возможно, это изменит режим назначения данных моноклональных антител.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37(3):646–50.
2. Mandel P.M., Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguine chez l'homme. *CR Acad Sci Paris* 1948;142:241–3.
3. Crowley E., Di Nicolantonio F., Loupakis F., Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10(8):472–84.
4. Hibi K., Robinson C.R., Booker S. et al. Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1998;58(7):1405–7.
5. Schwarzenbach H., Hoon D.S., Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11(6):426–37.
6. Atamaniuk J., Vidotto C., Tschan H. et al. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem* 2004;50(9):1668–70.

7. Heitzer E., Ulz P., Geigl J.B. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clin Chem* 2015;61(1):112–23.
8. Ignatiadis M., Dawson S.J. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality? *Ann Oncol* 2014;25(12):2304–13.
9. Lecomte T., Ceze N., Dorval E., Laurent-Puig P. Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin Biol* 2010;34(12):662–81.
10. Xie F., Yan X., Madan A. et al. Examination of circulating DNA by using next generation sequence technology in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2015;33(suppl):abstr e14507.
11. Jahr S., Hentze H., Englisch S. et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61:1659–65.
12. Mouliere F., Robert B., Arnau P.E. et al. High fragmentation characterizes tumour derived circulating DNA. *PLoS One* 2011;6(9):e23418.
13. Sikora A., Zimmermann B.G., Rusterholz C. et al. Detection of increased amounts of cell-free fetal DNA with short PCR amplicons. *Clin Chem* 2010;56(1):136–8.
14. Diehl F., Li M., Dressman D. et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(45):16368–73.
15. Andersen R.F., Spindler K.L., Brandslund I. et al. Improved sensitivity of circulating tumor DNA measurement using short PCR amplicons. *Clin Chim Acta* 2015;439:97–101.
16. Thierry A.R., Mouliere F., El Messaoudi S. et al. Clinical validation of the detection of *KRAS* and *BRAF* mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 2014;20(4):430–5.
17. Jung K., Fleischhacker M., Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker – a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta* 2010;411(21–22):1611–24.
18. Wasserkort R., Kalmar A., Valcz G. et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer* 2013;13:398.
19. Danese E., Minicozzi A.M., Benati M. et al. Comparison of genetic and epigenetic alterations of primary tumors and matched plasma samples in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 2015;10(5):e0126417
20. Di Fiore F., Charbonnier F., Lefebvre B. et al. Clinical interest of *KRAS* mutation detection in blood for anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008;99(3):551–2.
21. Kuo Y.B., Chen J.S., Li Y.S. et al. Comparison of *KRAS* mutation analysis of primary tumors and matched 2 circulating cell-free DNA in plasmas of patients with colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 2014;433:284–9.
22. Bettegowda C., Sausen M., Leary R.J. et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6(224):224ra24.
23. Garcia J.L., Matos I., Mejorada R.L. et al. Mutational analysis of circulating DNA and cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2014;25(suppl 4):iv546–63.
24. Takahashi G., Yamada T., Kan H. et al. Self-expandable colonic stent increases plasma level of circulating cell free DNA significantly in patients with obstructive colorectal cancer. *ECCO* 2015;abstr 2028.
25. Iwai T., Yamada T., Kan H. et al. Follow-up after resection of metastatic liver tumor from colorectal cancer using circulating cell-free DNA. *ECCO* 2015;abstr 434.
26. Reinert T., Schøler L.V., Thomsen R. et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut* 2016;65(4):625–34.
27. Hayashi N., Egami H., Kai M. et al. No-touch isolation technique reduces intra-operative shedding of tumor cells into the portal vein during resection of colorectal cancer. *Surgery* 1999;125(4):369–74.
28. Spindler K.L.G., Appelt A.L., Pallisaard N. et al. Cell-free DNA levels in colorectal cancer patients treated with irinotecan, healthy controls, and non-cancer patients with comorbidity. *J Clin Oncol* 2014;32(5s):abstr 3559.
29. Pucciarelli S., Enzo M., Agostini M. et al. Cell-free circulating DNA as a promising marker of colorectal cancer detection and progression. *J Clin Oncol* 2009;27(15s):abstr 11059.
30. Danese E., Montagnana M., Minicozzi A.M. et al. Real-time polymerase chain reaction quantification of free DNA in serum of patients with polyps and colorectal cancers. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(11):1665–8.
31. Frattini M., Gallino G., Signoroni S. et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett* 2008;263(2):170–81.
32. Kopreski M.S., Benko F.A., Borys D.J. et al. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(11):918–23.
33. Tie J., Kinde I., Wang Y. et al. Circulating tumor DNA (ctDNA) as a marker of recurrence risk in stage II colon cancer (CC). *J Clin Oncol* 2014;32(5s):abstr 11015.
34. Tie J., Wang Y., Kinde I. et al. Circulating tumor DNA (ctDNA) in nonmetastatic colorectal cancer (CRC): Potential role as a screening tool. *J Clin Oncol* 2015;33(s3):abstr 518.
35. Messaoudi S.E., Mouliere F., Mollevi C. et al. Circulating DNA as a strong multimarker prognostic tool in metastatic colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2014;32(5s):abstr 3604.
36. Liu F., Li C., Zhao J. et al. Detection of *KRAS* mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer by the next-generation sequencing. *ECCO* 2015;abstr 2185.
37. Sefrioui D., Vasseur N., Sesboué R. et al. Plasma cell-free DNA and fraction of circulating *KRAS* mutations as prognostic in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(3s):abstr 490.
38. Sefrioui D., Vasseur C., Sesboué R. et al. Clinical interest of digital PCR for routine detection of circulating DNA in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2014;25(suppl 4):iv546–63.
39. Marziali A., Vysotskaia V., Wiggin M. et al. Circulating tumor DNA as a highly specific diagnostic marker for colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(suppl):abstr e22126.
40. Scott R., Dooley S., Lewis W. et al. Concordance of RAS mutation status in CRC patients by comparison of results from circulating tumour DNA and tissue-based testing. *Ann Oncol* 2015;26(suppl 4):1–100.
41. Jones F., Edelstein D., Wichner K. et al. Concordance of RAS mutation status in metastatic CRC patients by comparison of results from circulating tumor DNA and tissue-based RAS testing. *ECCO* 2015;abstr 2012.
42. Yamada T., Kan H., Matsumoto S. et al. Liquid biopsy detection of *KRAS* and *BRAF* mutations may be useful as a prognostic or predictive marker. *Ann Oncol* 2014;25(suppl 4):iv58–84.
43. Poole J.C., Vibat C.R.T., Benesova L. et al. Highly sensitive quantitative detection of circulating tumor DNA in urine and plasma from advanced colorectal cancer patients in aid of early diagnosis of clinically relevant *KRAS* mutations. *J Clin Oncol* 2015;33(suppl 3):abstr 654.
44. Janku F., Vibat C.R.T., Falchook G.S. et al. Low frequency *KRAS* G12/13 mutations in urine cell-free (cf) DNA from patients with *BRAF* V600E-mutant advanced cancers. *J Clin Oncol* 2015;33(suppl 3):abstr 11048.
45. Morelli M.P., Overman M.J., Sanchez E.V. et al. Frequency of concurrent gene mutations and copy number alterations in circulating cell-free DNA (cfDNA) from refractory metastatic CRC patients. *J Clin Oncol* 2014;32(5s):abstr 11117.
46. Taberero J., Lenz H.J., Siena S. et al. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol* 2015;16(8):937–48.
47. Wong A.L., Lim J.S., Sinha A. et al. Tumour pharmacodynamics and circulating cell free DNA in patients with refractory colorectal carcinoma treated with regorafenib. *J Transl Med* 2015;13:57.
48. Teufel M., Kalmus J., Rutstein M. et al. Analysis of biomarkers in circulating tumor DNA from the phase 3 CONCUR study of regorafenib in Asian patients with metastatic

- colorectal cancer (mCRC): Correlation with clinical outcome. ECOO 2015;abstr 2013.
49. Trevisiol C., Di Fabio F., Nascimbeni R. et al. Prognostic value of circulating *KRAS2* gene mutations in colorectal cancer with distant metastases. *Int J Biol Markers* 2005;21(4):223–8.
50. Ryan B.M., Lefort F., McManus R. et al. A prospective study of circulating mutant *KRAS2* in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up. *Gut* 2003;52(1):101–8.
51. Lecomte T., Berger A., Zinzindohoue F. et al. Detection of freecirculating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer* 2002;100(5):542–8.
52. Mora J., Urgell E., Farre A. et al. Agreement between K-ras sequencing variations detected in plasma and tissue DNA in pancreatic and colorectal cancer. *Clin Chem* 2006;52(7):1448–9.
53. de Kok J.B., van Solinge W.W., Ruers T.J. et al. Detection of tumour DNA in serum of colorectal cancer patients. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57(7):601–4.
54. Kopreski M.S., Benko F.A., Borys D.J. et al. Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(11):918–23.
55. Minarikova P., Benesova L., Belsanova B. et al. Evaluation of circulating-tumor DNA (ctDNA) as a source material for molecular phenotyping of colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2015;33(suppl 3):abstr 642.
56. Morris V.K., Morelli M.P., Janku F. et al. Clinical utility of a circulating cell-free DNA assay for clinical trial enrollment in refractory metastatic colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2015;33(suppl 3):abstr 3601.
57. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194(4260):23–8.
58. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366(10):883–92.
59. Kreso A., O'Brien C.A., van Galen P. et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science* 2013;339(6119):543–8.
60. Brannon A., Vakiani E., Sylvester B.E. et al. Comparative sequencing analysis reveals high genomic concordance between matched primary and metastatic colorectal cancer lesions. *Genome Biol* 2014;15(8):454.
61. Donna M.A., Graham M., Mahadeo A. et al. Analysis of clonal evolution in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(5s).
62. Xie T., Cho Y.B., Wang K. et al. Patterns of somatic alterations between matched primary and metastatic colorectal tumors characterized by whole-genome sequencing. *Genomics* 2014;104(4):234–41.
63. Lee S.Y., Haq F., Kim D. et al. Comparative genomic analysis of primary and synchronous metastatic colorectal cancers. *PLoS One* 2014;9(3):e90459.
64. Sottoriva A., Kang H., Ma Z. et al. A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat Genet* 2015;47(3):209–16.
65. Diaz L.A. Jr, Williams R.T., Wu J. et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486(7404):537–40.
66. Mohan S., Heitzer E., Ulz P. et al. Changes in colorectal carcinoma genomes under anti-EGFR therapy identified by whole-genome plasma DNA sequencing. *PLoS Genet* 2014;10(3):e1004271.
67. Misale S., Yaeger R., Hobor S. et al. Emergence of *KRAS* mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012;486(7404):532–6.
68. Valtorta E., Misale S., Sartore-Bianchi A. et al. *KRAS* gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy. *Int J Cancer* 2013;133(5):1259–65.
69. Bardelli A., Corso S., Bertotti A. et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to antiEGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov* 2013;3(6):658–73.
70. Kopetz S., Overman M.J., Chen K. et al. Mutation and copy number discordance in primary versus metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 2014;32(5s): abstr 3509.
71. Graham D.M., Arseneault M., Sukhai M.A. et al. Analysis of clonal evolution in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(5s): abstr 3510.
72. Diehl F., Schmidt K., Choti M.A. et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008;14(9):985–90.
73. Leary R.J., Kinde I., Diehl F. et al. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. *Sci Transl Med* 2010;2(20):20ra14.
74. Holdhoff M., Schmidt K., Donehower R., Diaz L.A. Jr. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic *KRAS* mutations. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(18):1284–5.
75. Mouliere F., Thierry A.R. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert Opin Biol Ther* 2012;12(Suppl 1): S209–15.
76. Lee J., Mortimer S., Mei G. et al. Ultra-high-quality sequencing assay for comprehensive genetic panel analysis of tumor-derived circulating cell-free DNA in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2014; 32 (suppl 3):abstr 504.
77. Spindler K.L., Pallisgaard N., Vogelius I., Jakobsen A. Quantitative cell free DNA, *KRAS*, and *BRAF* mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. *Clin Cancer Res* 2012;18(4):1177–85.
78. Teufel M., Kalmus J., Rutstein M. et al. Analysis of biomarkers in circulating tumor DNA from the phase 3 CONCUR study of regorafenib in Asian patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): Correlation with clinical outcome. ECOO 2015;abstr 2013.
79. Pallisgaard N., Spindler K.G., Vogelius I.S. et al. Cell-free DNA, *KRAS*, and *BRAF* mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer treated with third-line cetuximab and irinotecan. *J Clin Oncol* 2011;29(suppl):abstr 3599.
80. Spindler K.G., Pallisgaard N., Skovgaard K. et al. Circulating free DNA and plasma *KRAS* mutations in metastatic colorectal cancer patients treated with bi-weekly cetuximab and irinotecan. *Ann Oncol* 2014;25(suppl 4):iv58–84.
81. Mende M., Thiede C., Schuster C. et al. Detection of tumor progression via cell-free DNA (cfDNA) in patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2015;33(suppl 3):abstr 598.
82. Takayama Y., Suzuki K., Daito T. et al. Emergence of *KRAS* mutation in detection of circulating tumor DNA during treatments for metastatic gastrointestinal cancer patients. *J Clin Oncol* 2015;33(suppl 3):abstr 11026.
83. Lindfors U., Zetterquist H., Papadogiannakis N., Olivecrona H. Persistence of *K-ras* mutations in plasma after colorectal tumor resection. *Anticancer Res* 2005;25(1B):657–61.
84. Siravegna G., Mussolin B., Buscarino M. et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med* 2015;21(7):827.
85. Hobor S., Van Emburgh B.O., Crowley E. et al. TGF- α and amphiregulin paracrine network promotes resistance to EGFR blockade in colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2014;20(24):6429–38.
86. Hindson B.J., Ness K.D. Masquelier D.A. et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 2011;83(22):8604–10.