

LA BIOPSIA LIQUIDA

DR.SSA FEDERICA RE

*Chair of Hematology - Unit of Bone Marrow
Transplantation*

University of Brescia

federica.re@unibs.it

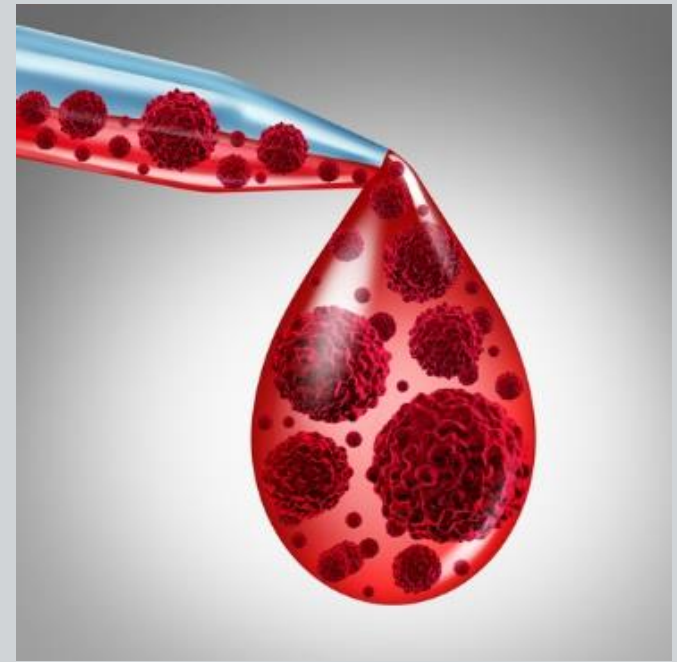


UNIVERSITY
OF BRESCIA



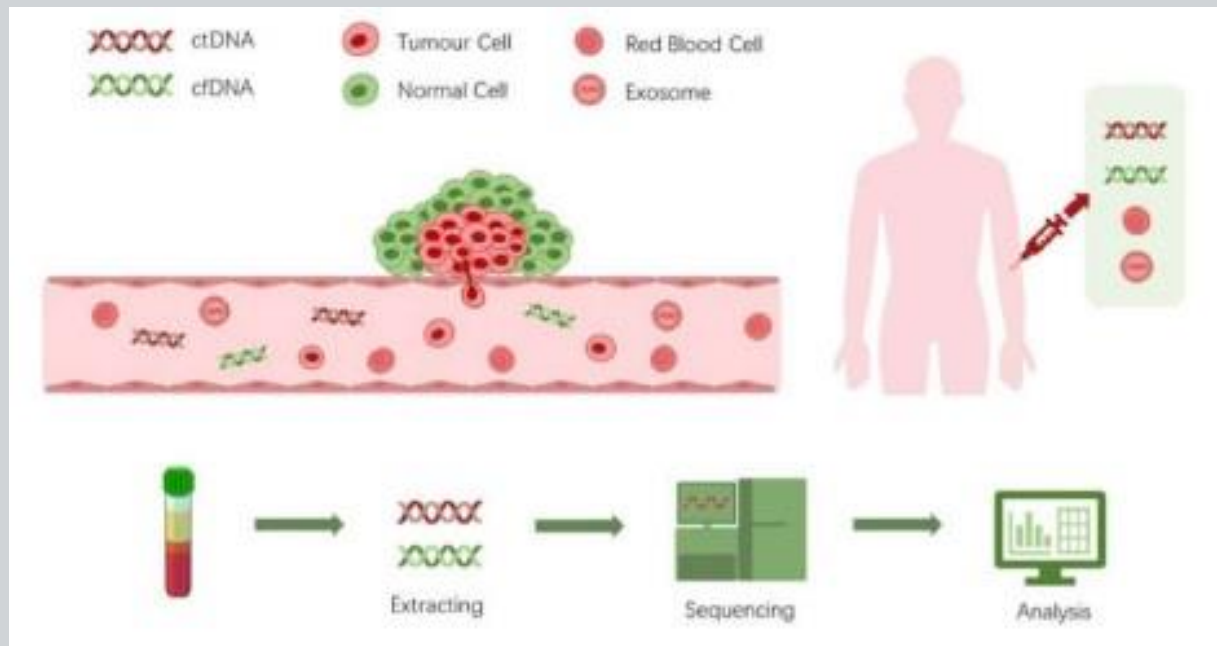
AGENDA

- **INTRODUZIONE ALLA BIOPSIA LIQUIDA**
- **LE PRINCIPALI TECNICHE**
- **I BIOMARKER DIAGNOSTICI**
- **APPLICAZIONI DI BIOPSIA LIQUIDA IN AMBITO ONCO-EMATOLOGICO**



La biopsia liquida: definizione

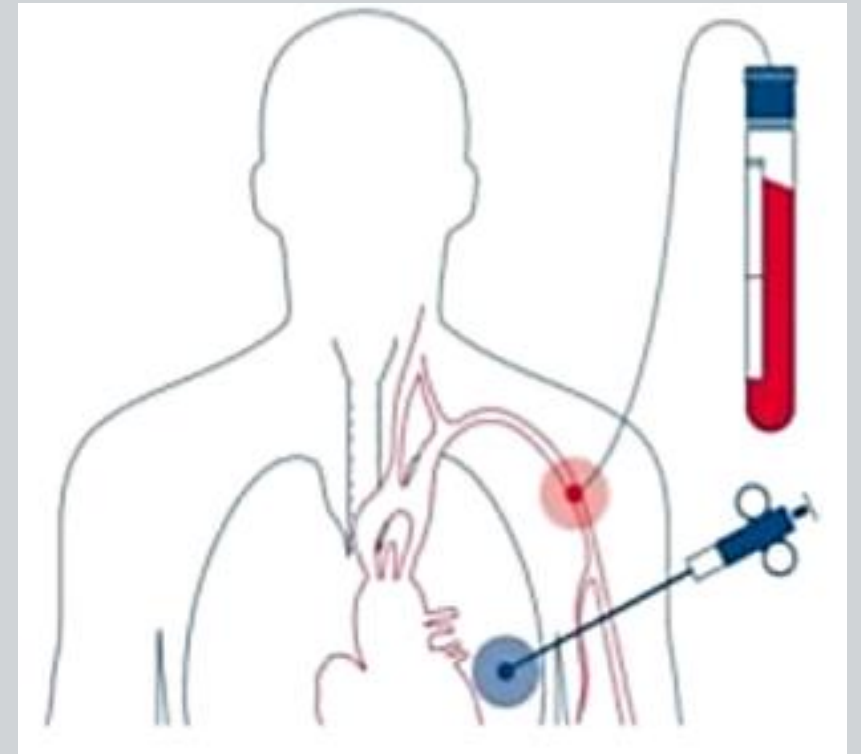
- Le cellule, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, secernono una grande varietà di molecole e nanoparticelle con differenti composizioni, strutture e funzioni, il tutto prende il nome di SECRETOMA.



Definizione: la biopsia liquida è una tecnica di campionamento e analisi dei fluidi biologici, in molti casi del sangue, ma non esclusivamente, e che permette di analizzare il secretoma cellulare.

Biopsia convenzionale vs biopsia liquida

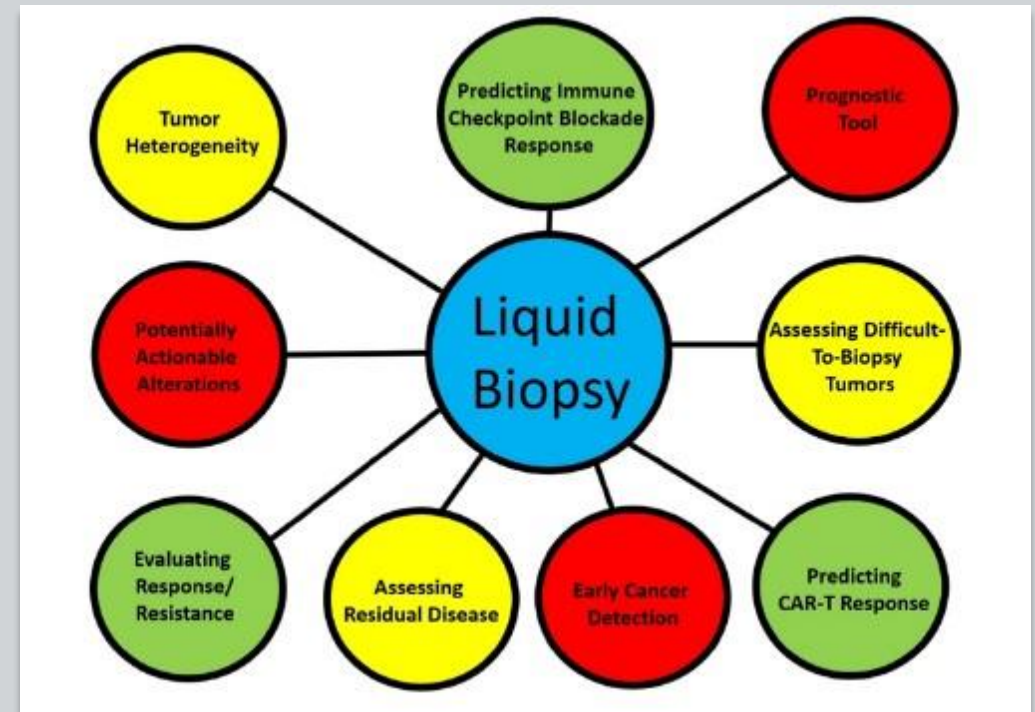
- 1) **BIOPSIA TUMORALE:** invasiva e dolorosa; non adatta per il monitoraggio; spesso non è possibile re-biopsiare; è costosa e richiede tempo
- 2) **BIOPSIA LIQUIDA:** poco invasiva; nessun rischio per il pz; rappresentativo del tumore; elevata sensibilità; adatta al monitoraggio; consente di re-biopsiare; supera l'eterogeneità del pz; rapida e conveniente



La biopsia liquida: applicazioni cliniche

Molti tumori rilasciano frammenti di DNA, cellule tumorali, vescicole extracellulari nel sangue periferico che permettono di fare:

- 1) **DIAGNOSI PRECOCE**
- 2) **PROGNOSI**
- 3) **RISCHIO DI RECIDIVA E PROGRESSIONE DI MALATTIA**
- 4) **IDENTIFICAZIONE DEI MECCANISMI DI RESISTENZA E DEI TARGET TERAPEUTICI**
- 5) **COMPrensione DEI MECCANISMI DI SVILUPPO DELLE METASTASI**



I biomarker diagnostici

Circulating cell-free nucleic acids DNA but also mRNA (mRNAs, microRNA and long non coding RNA)

Circulating tumor cells released by the primary tumor in circulation to form metastases at peripheral sites

Extracellular vesicles containing proteins and nucleic acids (RNAs and DNA)

1

Acidi nucleici circolanti: Dna/Rna ctDNA (DNA tumorale circolante)

2

CTCs (cellule tumorali circolanti)

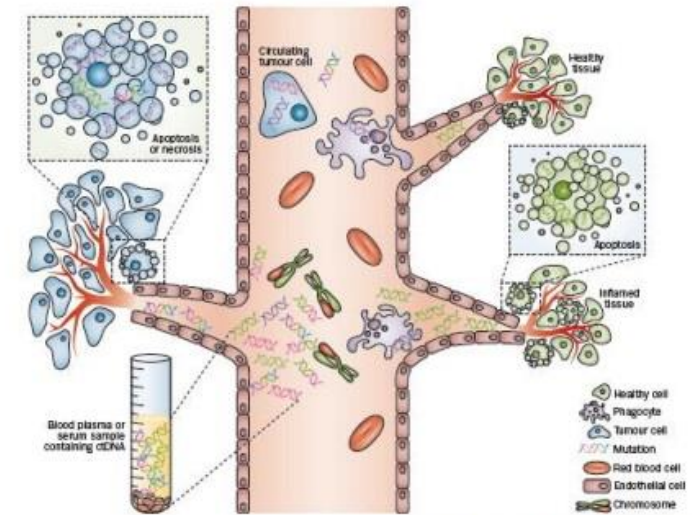
3

Esosomi

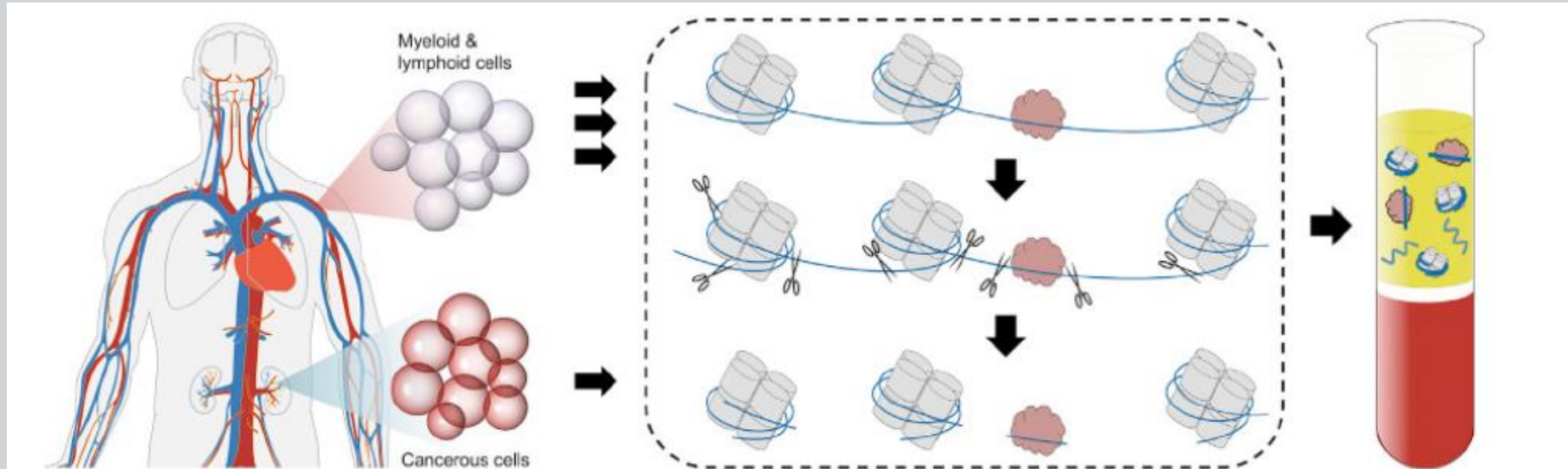
Dna/Rna (mRna/microRna)

Meccanismi di rilascio

- **Secrezione**
- **Necrosi**
- **Apoptosi**

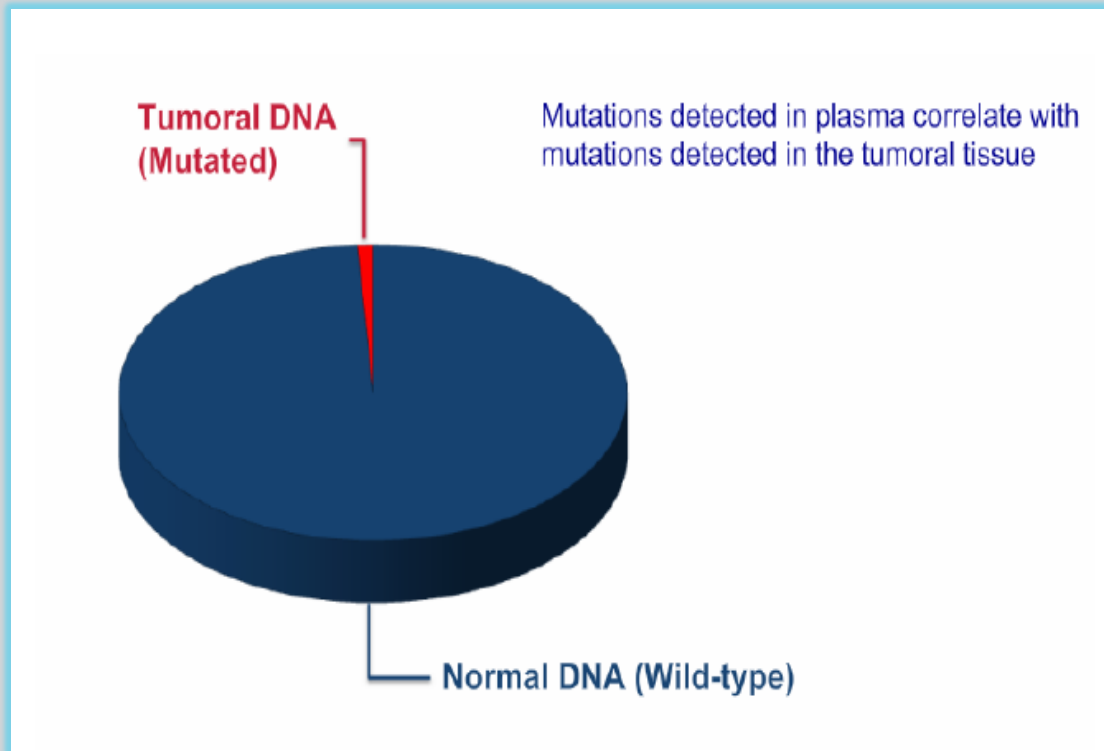


I biomarker diagnostici: **ctDNA** (1)



- Negli individui sani deriva dall'apoptosi delle normali cellule ematopoietiche
- Nei pazienti è rilasciato dalle cellule apoptotiche tumorali
- E' altamente frammentato: DNA da 180 bp a 200 bp (tagliato dalle nucleasi attorno ai nucleosomi)
- E' poco abbondante (15 ng/ml negli individui sani, 30 ng/ml nei pazienti con linfoma)
- Instabile, fragile → processamento veloce dopo raccolta del campione

I biomarker diagnostici: **ctDNA** (1)



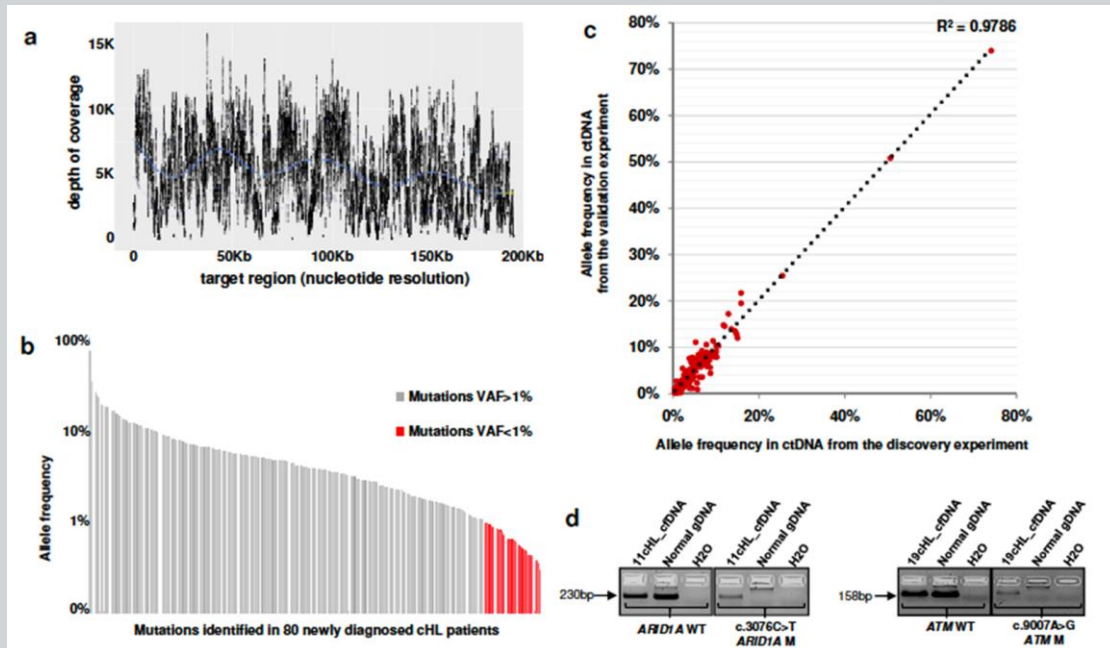
cfDNA is the vast majority (95% to 99%) of the total DNA extracted from blood



ctDNA CANNOT BE SELECTIVELY ISOLATED

I biomarker diagnostici: ctDNA (1)

Rilevazione del ctDNA nel sangue necessita di tecnologie ad elevata sensibilità



Technique	Sensitivity	Optimal Application
Sanger sequencing	> 10%	Tumor tissue
Pyrosequencing	10%	Tumor tissue
Next-generation sequencing	2%	Tumor tissue
Quantative PCR	1%	Tumor tissue
ARMS	0.10%	Tumor tissue
BEAMing, PAP, Digital PCR, TAM-Seq	0.01% or lower	ctDNA, rare variants in tumor tissue

	Metodo	Sensibilità (% di DNA mutato)
Tecniche di screening	Sequenziamento diretto (Sanger)	10-15%
	Pirosequenziamento	5-10%
	High resolution melting analysis	5%
Tecniche a bersaglio molecolare	ARMS Real-Time PCR	1 -5%
	Strip hybridization	1%
	PNA/LNA Clamp	0.1%-1%
	ME PCR/Sequencing	0.1%-1%
	Digital PCR	0.01%
	BEAMing	0.01%-0.001%

I biomarker diagnostici: CTC (2)

Le CTCs potrebbero rappresentare un vero e proprio surrogato del tessuto tumorale su cui poter eseguire la determinazione del profilo molecolare del tumore.

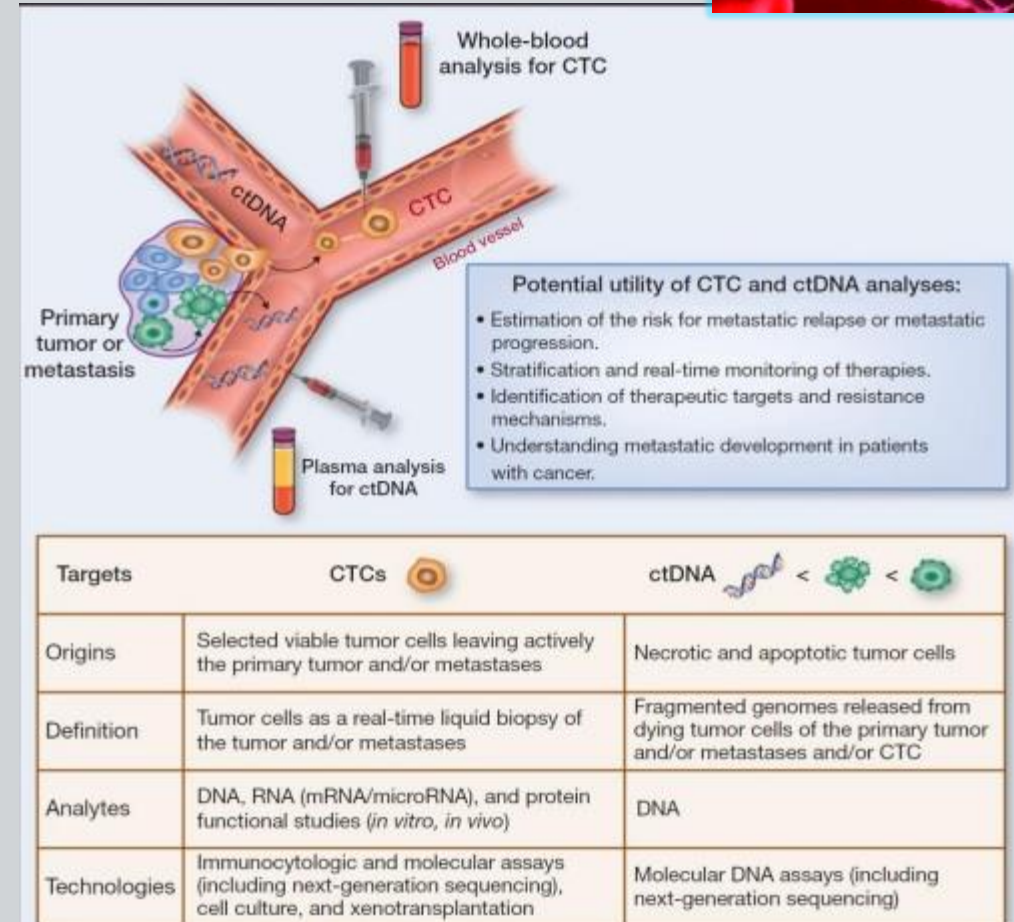
Il loro utilizzo rimane ancora limitato:

-difficoltà di individuare *metodi standardizzati* per il loro isolamento e arricchimento data l'elevata eterogeneità delle CTCs stesse

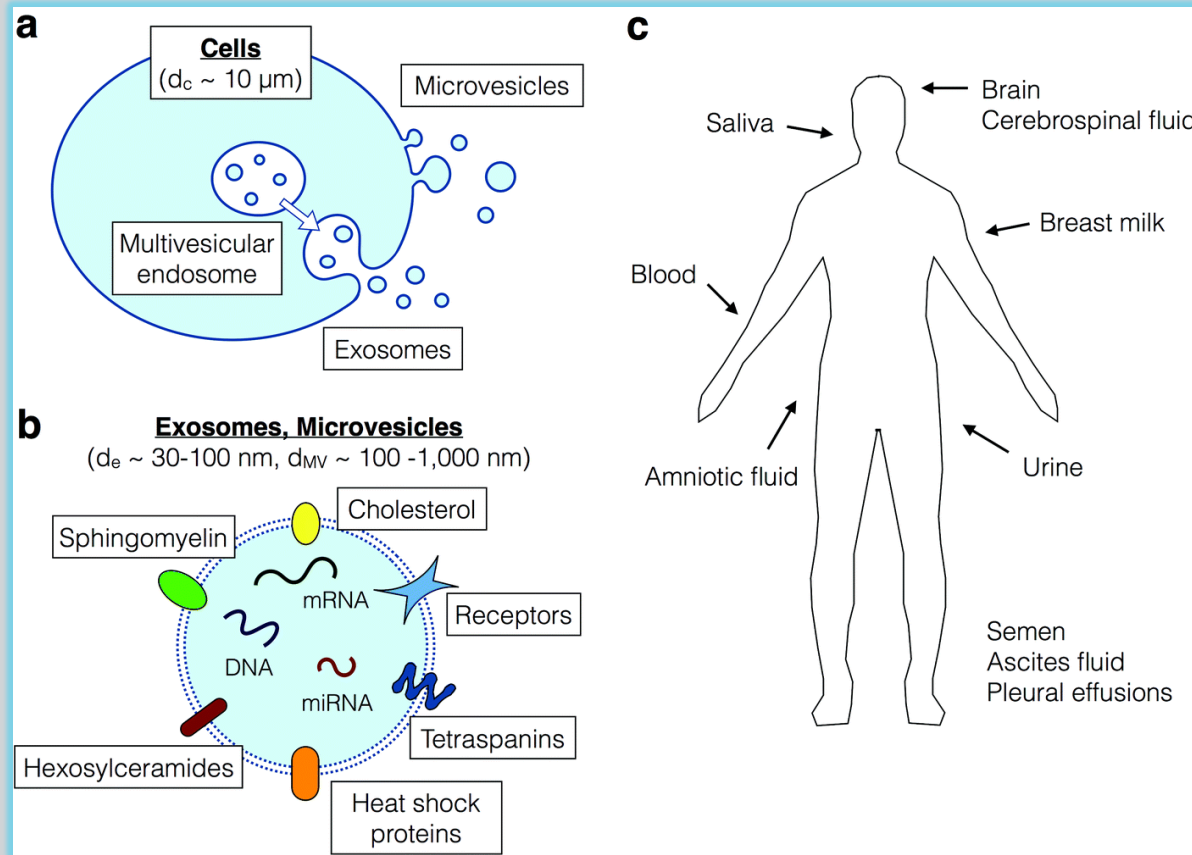
-ridotta quantità in circolo, corrispondente (5-30 cellule/ml di plasma) → 50 ml di plasma richiesti per l'analisi

-*Instabile, fragile* → processamento veloce dopo raccolta del campione

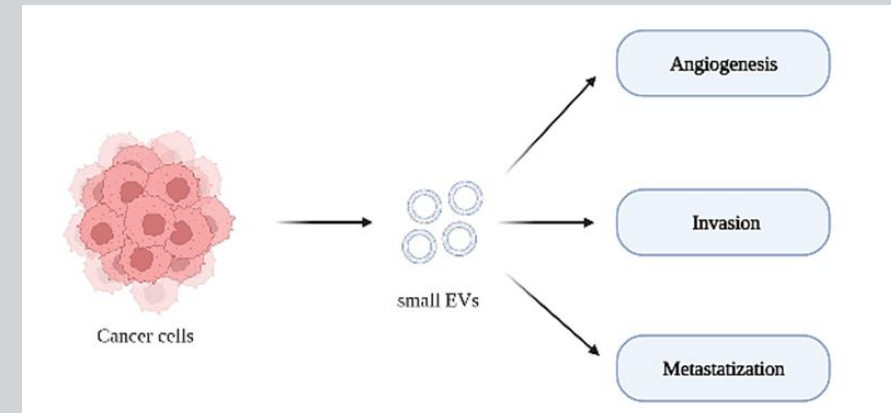
- *Fenotipicamente eterogenee* in diversi stadi



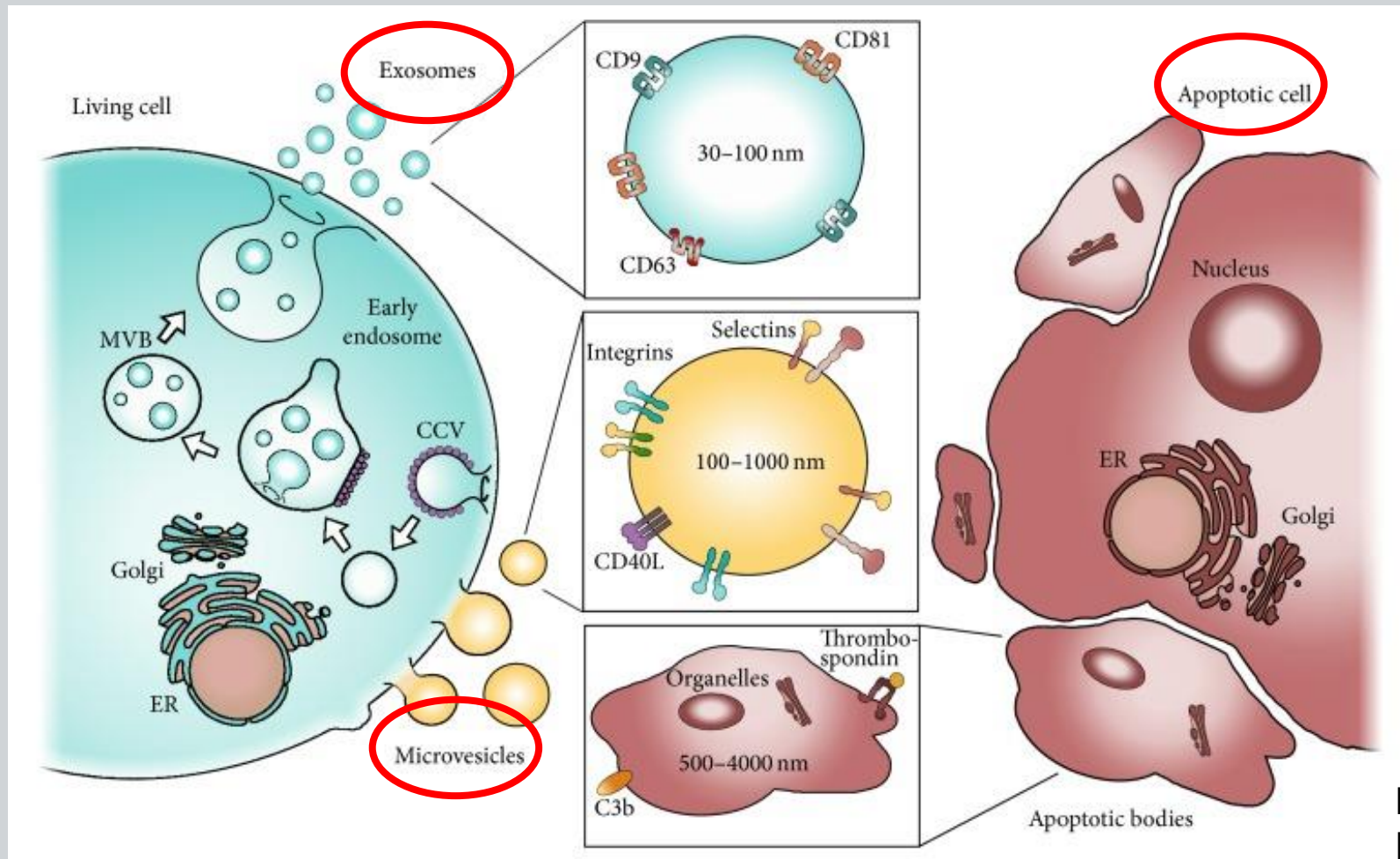
I biomarker diagnostici: vescicole extracellulari (3)



- Il numero totale di Evs è $10^{7-8}/\text{ml}$, le Evs tumore-specifiche sono stimate $10^{2-3}/\text{ml}$
- Facili da isolare e analizzare direttamente dal sangue
- Sono una popolazione eterogenea
- Trasportatori di diversi biomarkers provenienti dalla cellula di origine



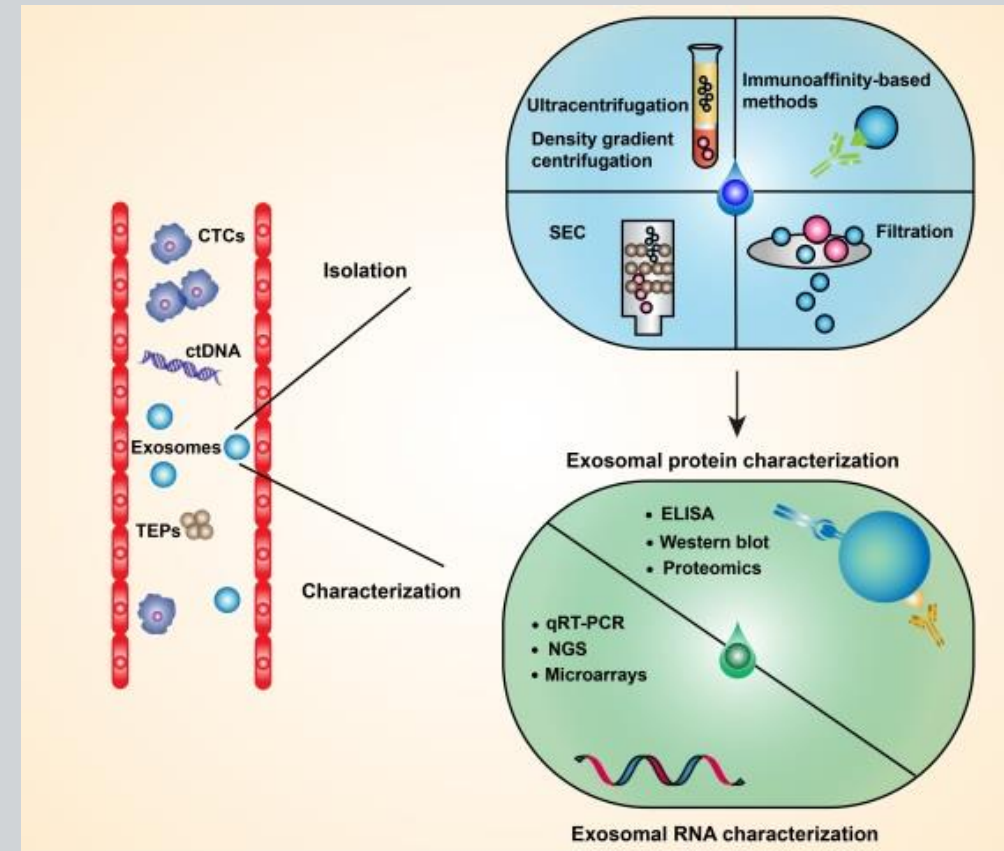
I biomarker diagnostici: vescicole extracellulari (3)



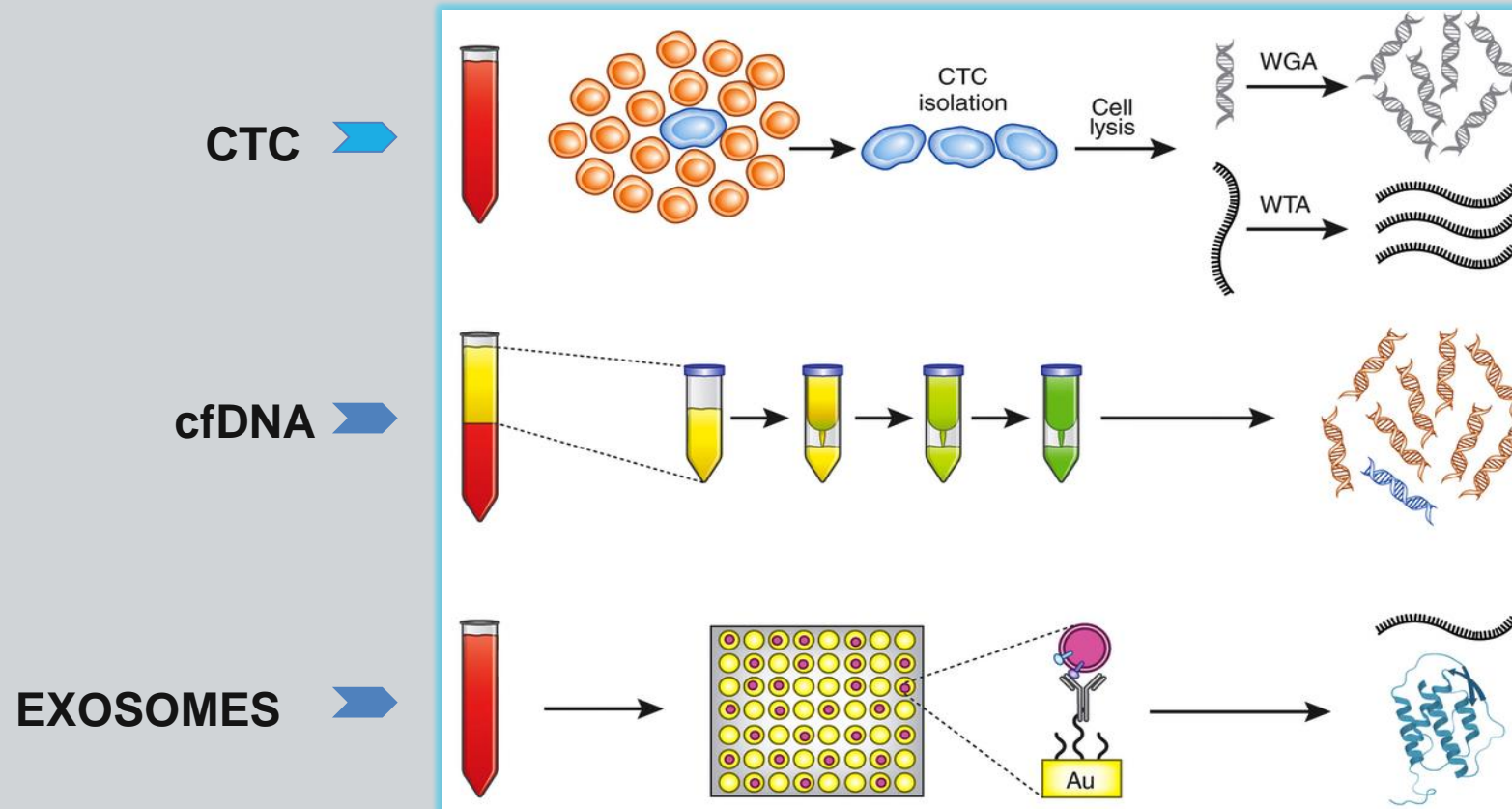
I biomarker diagnostici: vescicole extracellulari (3)

ESOSOMI

- Contengono frammenti di DNA/RNA corti (<200bp) quindi meglio detectabili → ELEVATA SENSIBILITA'
- Protegge l'acido nucleico in vescicole lipidiche (non vi è degradazione)
- Riflettono la risposta stromale e quindi del microambiente, non solo tumorale
- Tuttavia il numero degli studi riguardanti CTC e esosomi è molto inferiore rispetto all'utilizzo del cfDNA → **NECESSARIO IMPLEMENTARE STUDI CON ESOSOMI**



Diverse tecniche di isolamento



Diverse tecniche di caratterizzazione

Proteic-based

- ❑ **ICC/IF:** vesicular proteic biomarkers analysis
- ❑ **Protein electrophoresis/ Western Blot:** vesicular biomarkers analysis
- ❑ **ELISA:** vesicular proteic biomarkers analysis
- ❑ **microBCA:** vesicular proteic biomarkers analysis
- ❑ **Mass spectrometry/Raman Technology:** vesicular proteomic analysis

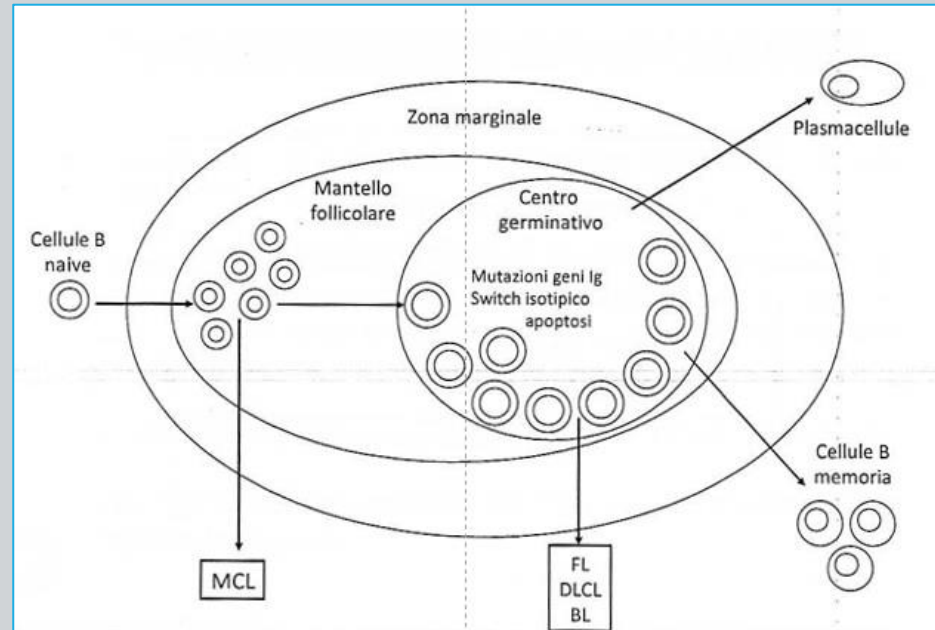
DNA/RNA-based

- ❑ **Real-time PCR/Digital PCR:** cfDNA analysis and vesicular biomarkers analysis
- ❑ **Next Generation Sequencing:** cfDNA analysis and vesicles cargo sequencing
- ❑ **Denatured high-performance liquid chromatography (DHPLC):** cfDNA analysis
- ❑ **FISH/SNP arrays:** genomic aberrations

Cell-based

- ❑ **Flow-cytometer:** subcellular localization or colocalization of markers in CTC
- ❑ **Mass spectrometry/Raman Technology:** CTC

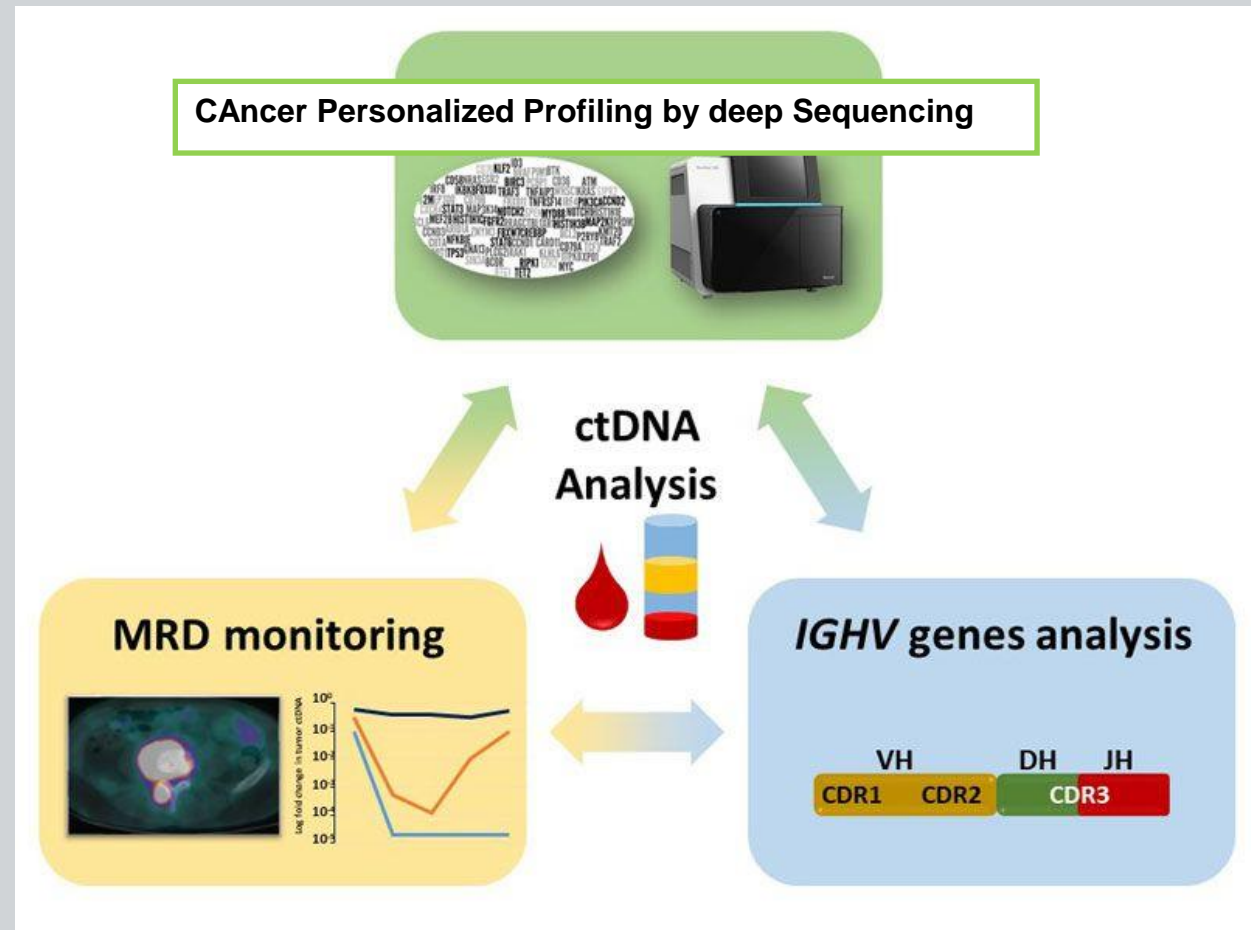
Biopsia liquida in ematologia



L'applicazione ideale e immediata è sui **LINFOMI**, la controparte «solida» delle patologie ematologiche, ma altre applicazioni sono in sviluppo, anche per la parte «liquida»

La Biopsia liquida nei **linfomi** (ctDNA)

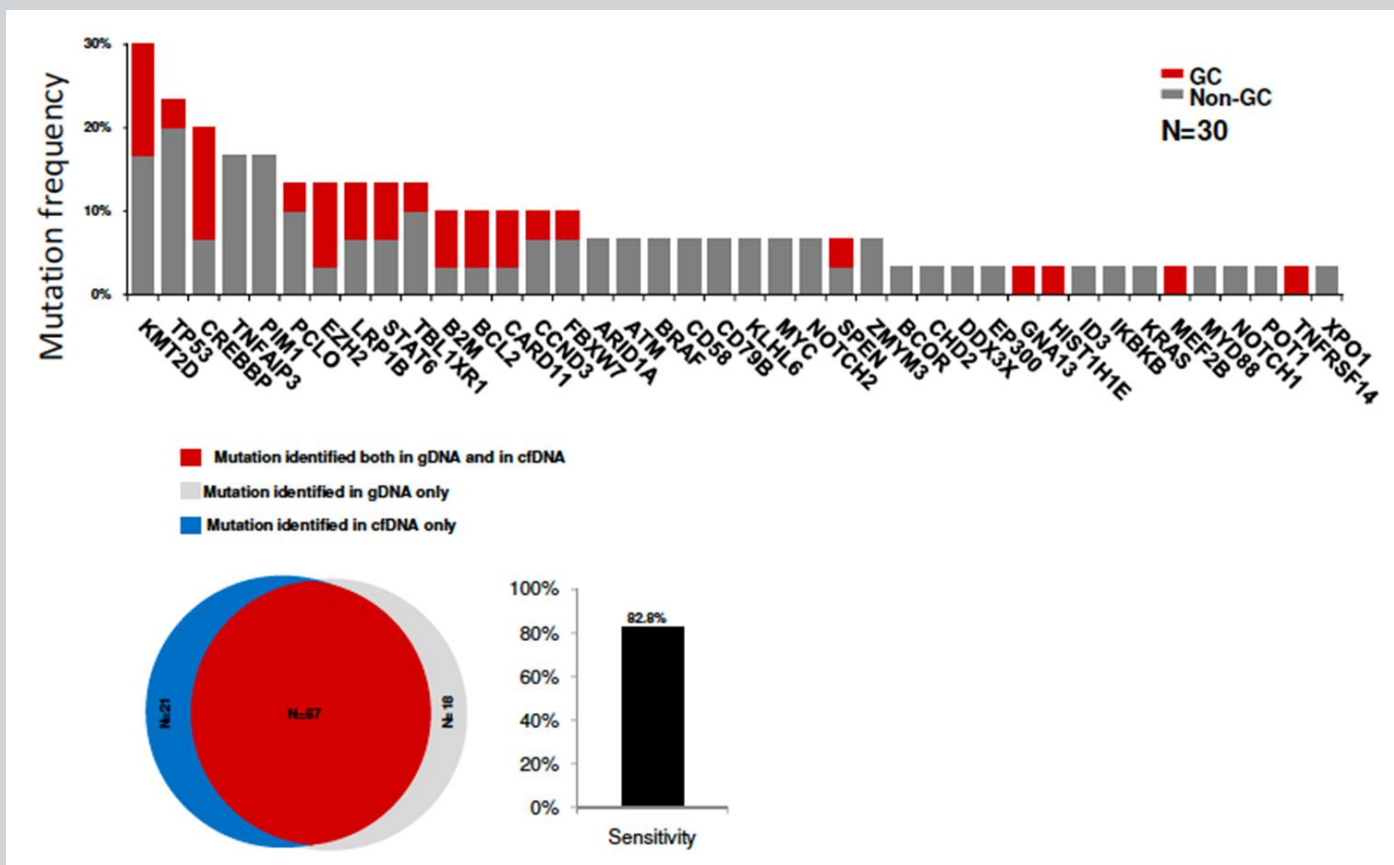
- Genotyping
- Clonal evolution
- MRD monitoring



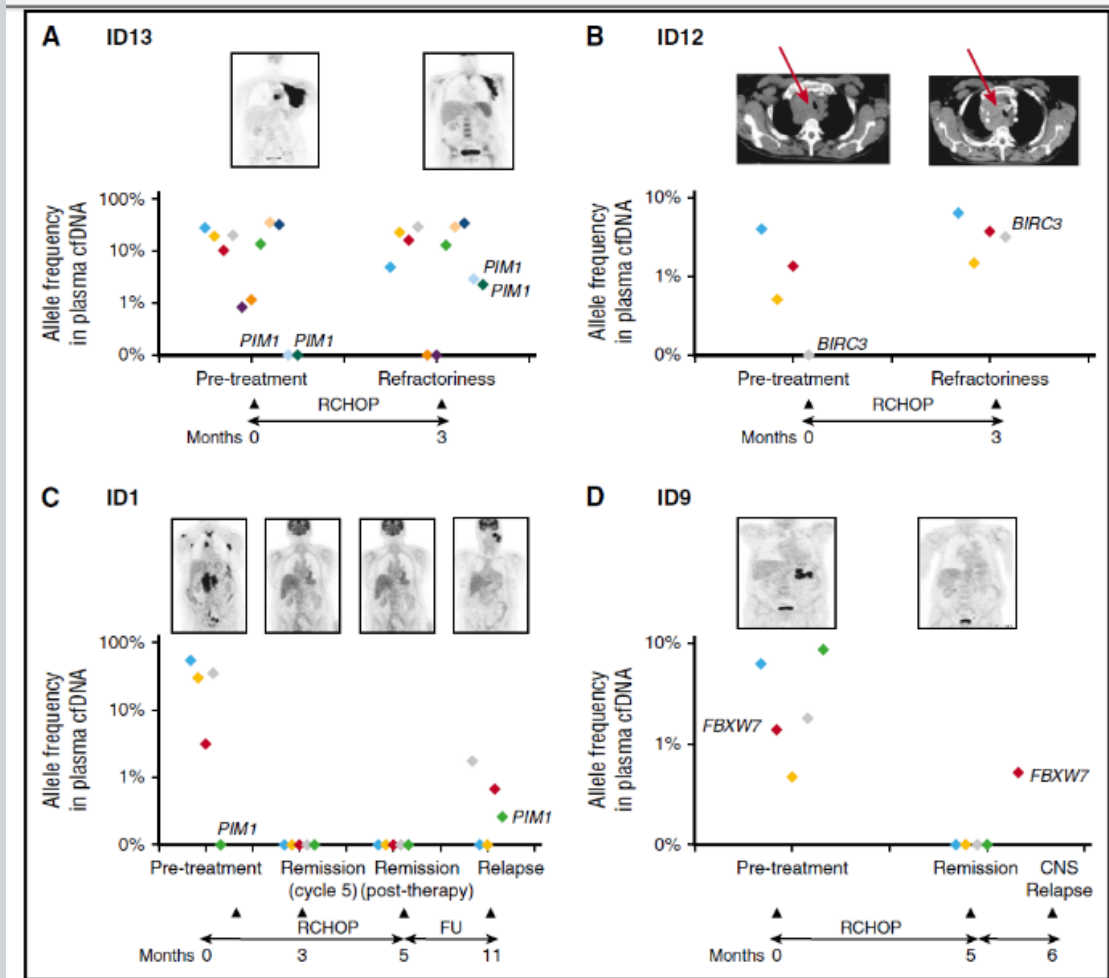
La biopsia liquida nei **linfomi**: la genotipizzazione (ctDNA)

Viene monitorato il profilo genico nei pz con linfoma follicolare B durante terapia R-CHOP.

CONCORDANZA TRA IL cfDNA e il gDNA



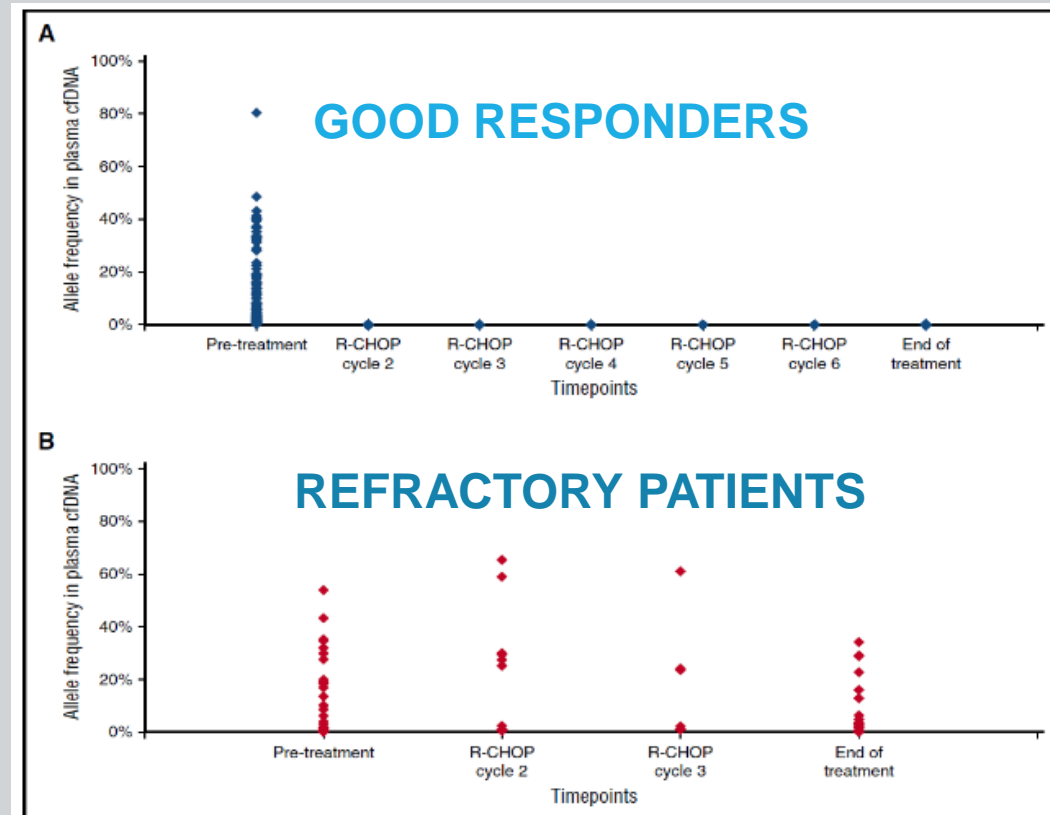
La biopsia liquida nei **linfomi**: l'evoluzione clonale (ctDNA)



Clonal evolution monitoring

Longitudinal cfDNA genotyping allows real time recovery of treatment-associated clonal evolution

La biopsia liquida nei **linfomi**: il monitoraggio (ctDNA)



Mutations are cleared from plasma cfDNA in responding patients but not in refractory patients

La biopsia liquida nei **linfomi**: gli esosomi

Research Paper

mRNA in exosomas as a liquid biopsy in non-Hodgkin Lymphoma: a multicentric study by the Spanish Lymphoma Oncology Group

Mariano Provencio^{1,*}, Marta Rodríguez¹, Blanca Cantos¹, Pilar Sabín², Cristina Quero³, Francisco R. García-Arroyo⁴, Antonio Rueda⁵, Constanza Maximiano¹, Delvys Rodríguez-Abreu⁶, Antonio Sánchez¹, Javier Silva¹ and Vanesa García^{1,7,*}, on behalf of GOTEL (Spanish Lymphoma Oncology Group)

60 DLBCL

38 FL

68 Healthy Controls



Exosomes fraction
isolation from
plasma for mRNA
evaluation.

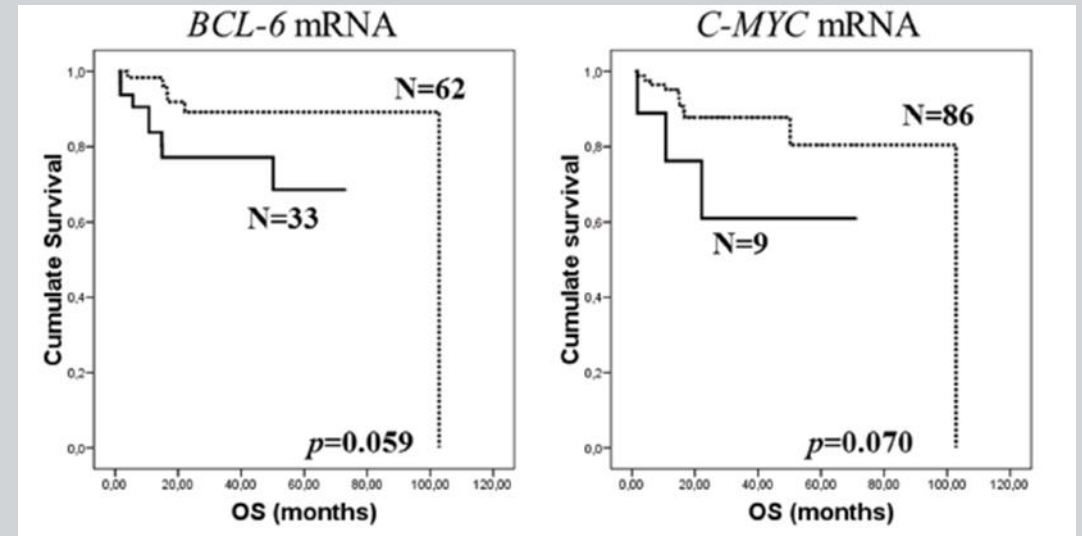


Correlation between
mRNA composition and:

- OS
- PFS
- Response to treatment

La biopsia liquida nei **linfomi** (gli esosomi)

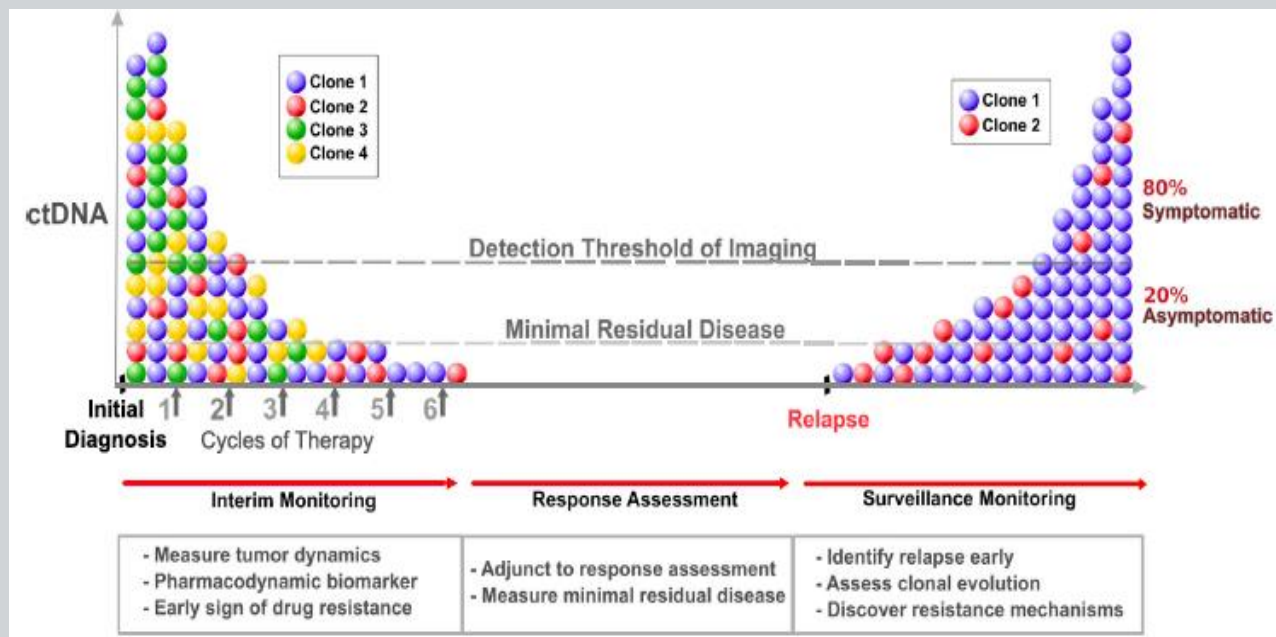
- **BCL-6** and **c-MYC** transcript positivity in pretreatment samples resulted as statistically significant predictor of worsened PFS.
- **c-MYC** mRNA positivity was also linked to inability to obtain CR with first-line therapy and with a short PFS in FL setting.
- The presence of **BCL-6** mRNA was associated with a high death rate.



	BCL-6 (FL)		
	positive	negative	<i>p</i>
Response to treatment			
Response	14,3	78,6	0.047
Non-response	7,1	0	

La biopsia liquida per il monitoraggio della **MRD** nei pazienti con linfoma

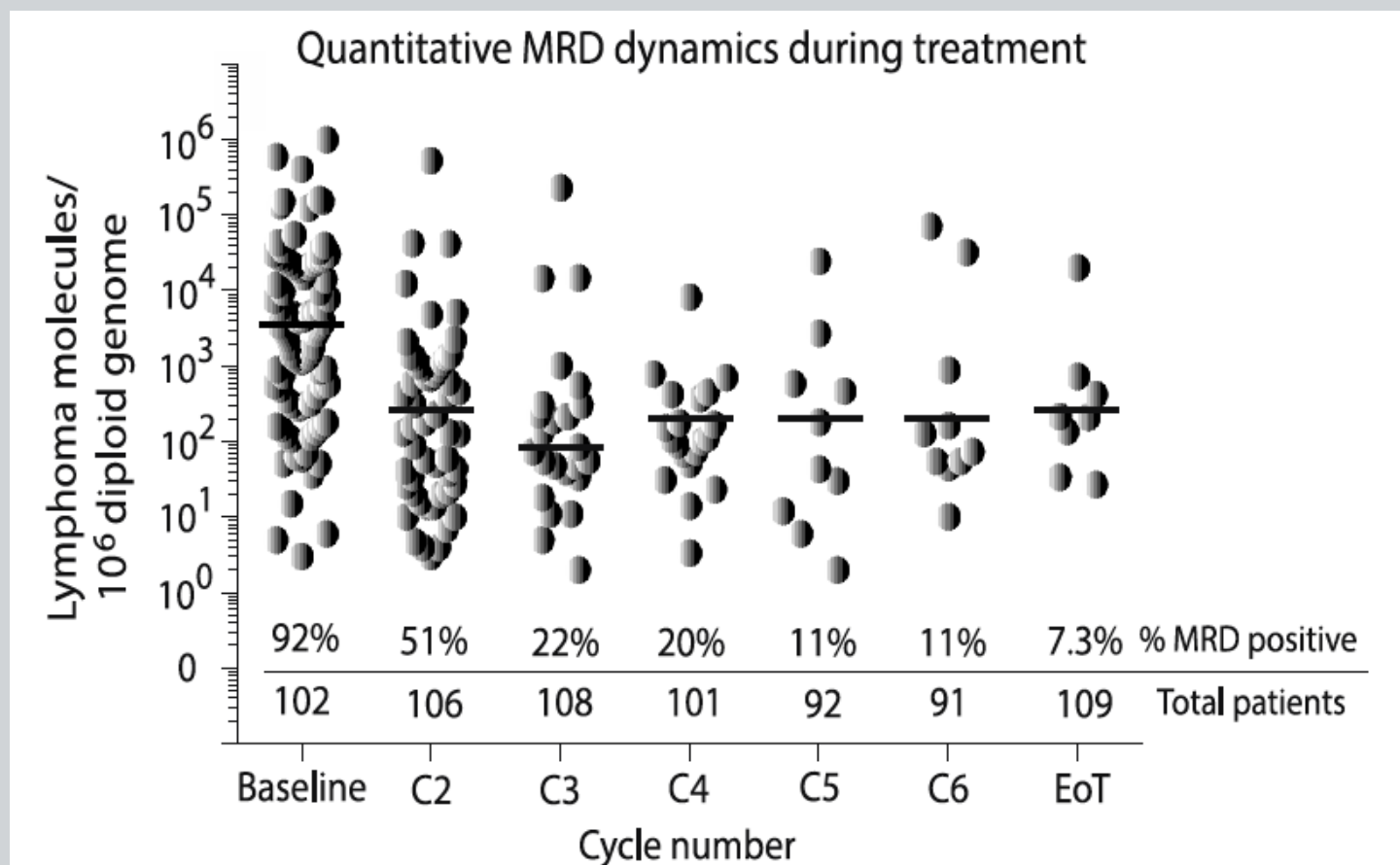
La detection molecolare VDJ sembra essere il miglior metodo per il monitoraggio della MRD mediante LB



- Monitoraggio del ctDNA mediante NGS: durante la terapia (**interim monitoring**); per definire la categoria di remissione molecolare al termine della terapia (**response assesment**); per detectare precocemente la ricaduta (**surveillance monitoring**).
- Non sono tuttavia ancora stati riscontrati impatti clinici, quindi sono necessari studi clinici per approfondire quest'aspetto.

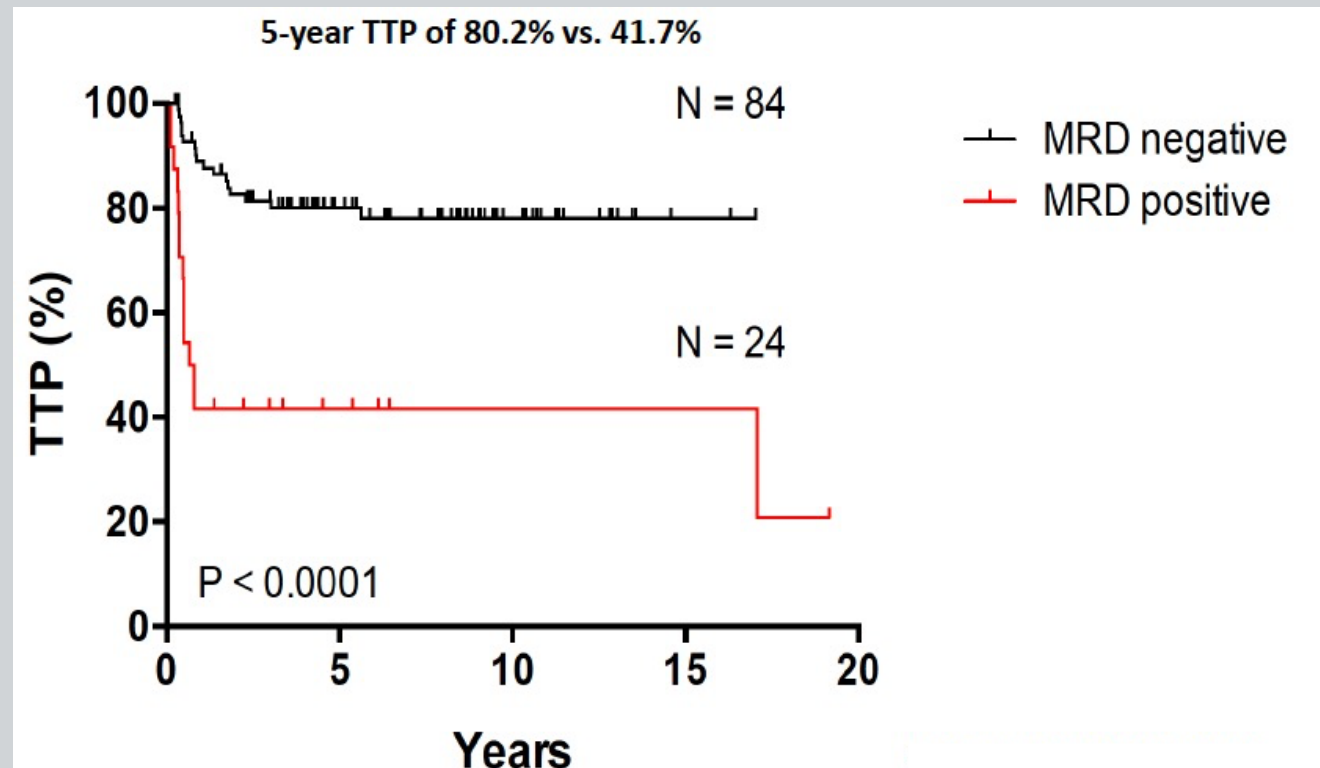
Kwok M et al., Curr. Treat. Options in Oncol. (2016)

La biopsia liquida nei **linfomi**: l'MRD (ctDNA)



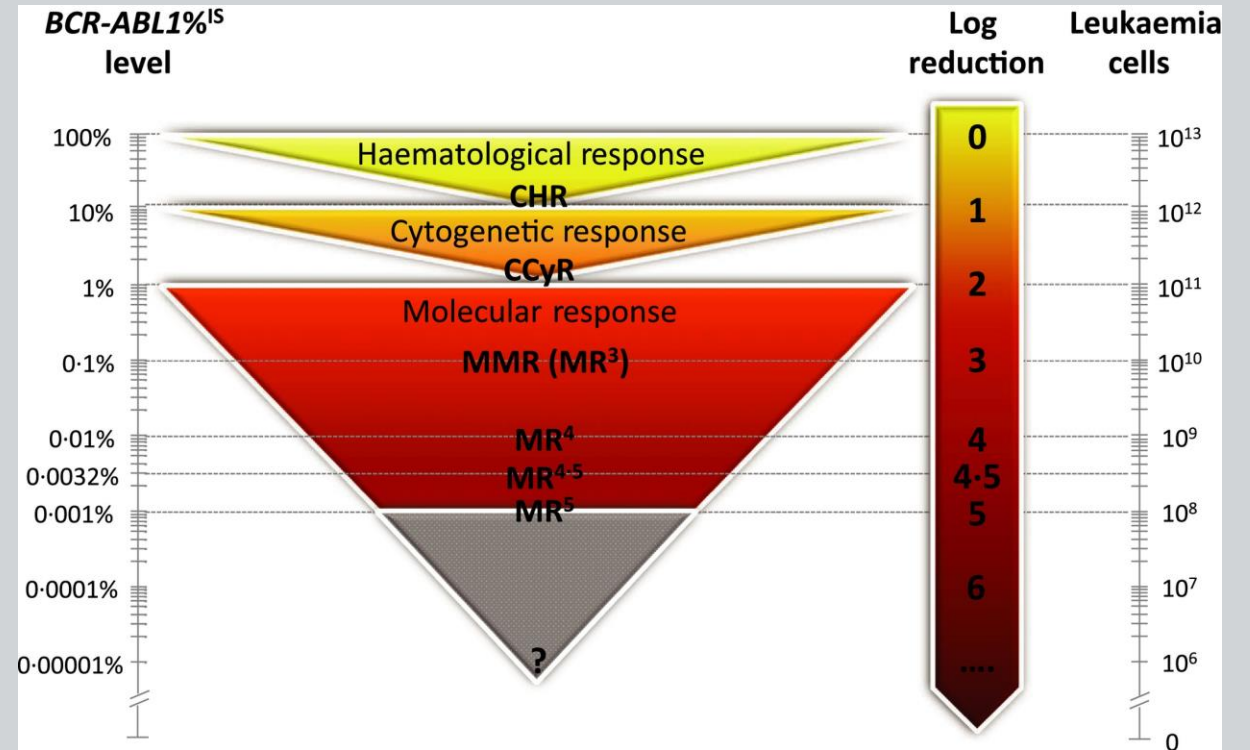
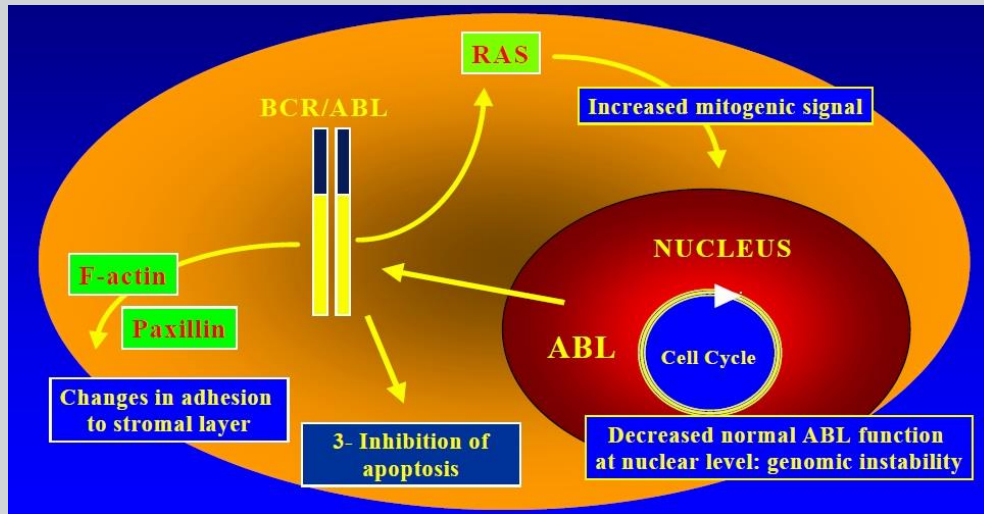
MRD clearance during treatment by Ig-HTS from the liquid biopsy

La biopsia liquida nei **linfomi**: l'MRD (ctDNA)



Interim MRD after 2 cycles predicts progression

La biopsia liquida nella **leucemia mieloide cronica**: gli esosomi



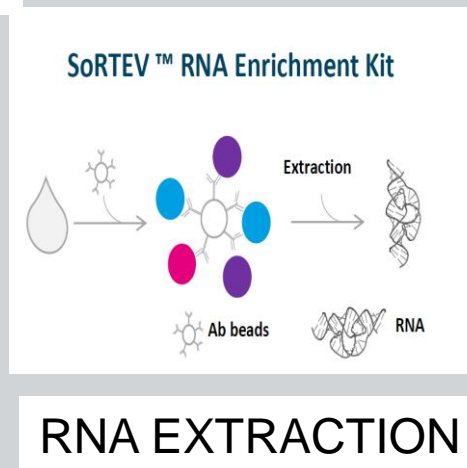
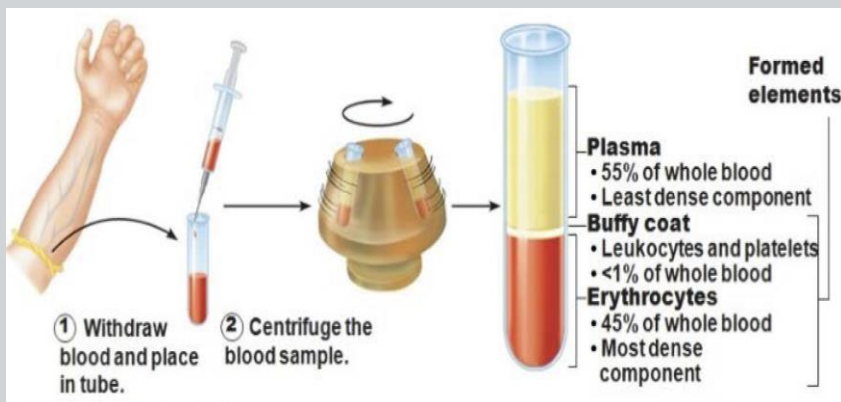
La biopsia liquida nella **leucemia mieloide cronica**: gli esosomi

Feasibility of tumor-derived exosome enrichment in the onco-hematology leukemic model of chronic myeloid leukemia

SIMONA BERNARDI^{1,2*}, CHIARA FORONI^{1,2*}, CAMILLA ZANAGLIO^{1,2}, FEDERICA RE^{1,2}, NICOLA POLVERELLI¹, ALESSANDRO TURRA¹, ENRICO MORELLO¹, MIRKO FARINA¹, FEDERICA CATTINA¹, LISA GANDOLFI¹, TATIANA ZOLLNER¹, EUGENIA ACCORSI BUTTINI¹, MICHELE MALAGOLA¹ and DOMENICO RUSSO¹

Two approaches:

- Digital PCR
- Tumor-exosomes enrichment



CDNA

BCR-ABL1 and Y4



BCR-ABL1

La biopsia liquida nella **leucemia mieloide cronica**: pazienti e controlli

- 10 Chronic Myeloid Leukemia Patients
- 10 Healthy Controls
- 4 Pathologic Controls

Variables	Median (range)
No. of Ph ⁺ CML patients	10
Sex (M/F)	6/4
Age at study (median and range in years)	70 (33-85)
BCR-ABL transcript at diagnosis	
B3A2	7
B2A2	3
TKI current treatment	
IM	7
DAS	3
DMR duration (months)	57 (33-81)
MR at study	
MR ^{4.0} total/undetectable	1/0
MR ^{4.5} total/undetectable	3/1
MR ^{5.0} total/undetectable	6/5

CML, chronic myeloid leukemia; BCR-ABL1, breakpoint cluster region-proto-oncogene 1 tyrosine-protein kinase; IM, imatinib; DAS, dasatinib; MR, molecular response.

	Ph 1	Ph 2	Ph 3	Ph 4
Sex	M	F	F	M
Diagnosis	Acute lymphoblastic leukemia B	Acute myeloid leukemia	Myelofibrosis	Multiple myeloma
Age (years)	38	67	64	49
Disease phase	Diagnosis	CR after consolidation therapy	CR at 3 months post allo-HSCT	Relapse

Ph⁻, Philadelphia-negative; CR, complete remission; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation.

La biopsia liquida nella **leucemia mieloide cronica**: i risultati

Case no.	RT-qPCR <i>BCR-ABL1/ABL1</i>		dPCR PB cells <i>BCR-ABL1</i>		dPCR EXO <i>BCR-ABL1</i>			dPCR EXO <i>Y4</i>		
	MR	IS	DOTS	Copies/ μ l of reaction	DOTS	Copies/ μ l of reaction	Copies/ml plasma	DOTS	Copies/ μ l of reaction	Copies/ml plasma
1	4.5	0.0013	2	0.161	3	0.256	6.67	294	28.239	1,058.9
2	4.5	0	1	0.0857	1	0.091	4.74	100	10.579	661.18
3	4.5	0.0031	3	0.226	2	0.158	8.23	251	22.711	1,419.44
4	5.0	0	5	0.439	4	0.324	20.25	2	0.299	37.37
5	5.0	0	0	0	2	0.226	14.12	11	0.848	35.3
6	5.0	0	2	0.188	3	0.219	13.69	6	0.432	54.0
7	5.0	0	1	0.0773	1	0.072	4.5	30	2.39	298.75
8	5.0	0	1	0.0781	5	0.407	12.72	11	0.915	57.19
9	5.0	0.0008	1	0.0853	4	0.329	10.28	8	0.613	38.31
10	4.0	0.0053	5	0.441	5	0.378	14.76	76	5.945	928.9
1a	0.0	19.528	49	3.014	8	0.645	80.625	97	9.146	1,143.25
1b	2.0	0.1021	11	0.905	5	0.381	47.625	58	4.973	621.625
1c	3.0	0.0112	3	0.250	5	0.377	47.125	18	1.288	161
1d	3.0	0.0707	3	0.234	3	0.241	15.0625	24	1.734	108.375
1e	4.0	0.0054	1	0.0725	3	0.228	14.25	11	0.909	56.813

Quantification was performed on PB cells and tumor exosome fraction. In the column entitled 'dPCR EXO Y4' the results of the quantification of Y4 performed by dPCR on the tumor exosome fraction are reported. Case nos. 1a, 1b, 1c and 1d and 1e refer to CML case no. 1 monitored at different disease phases. CML, chronic myeloid leukemia; BCR-ABL1, breakpoint cluster region-*proto-oncogene 1* tyrosine-protein kinase; MR, molecular response; IS, international scale.

Linear correlation in case of high leukemic burden

CELLS

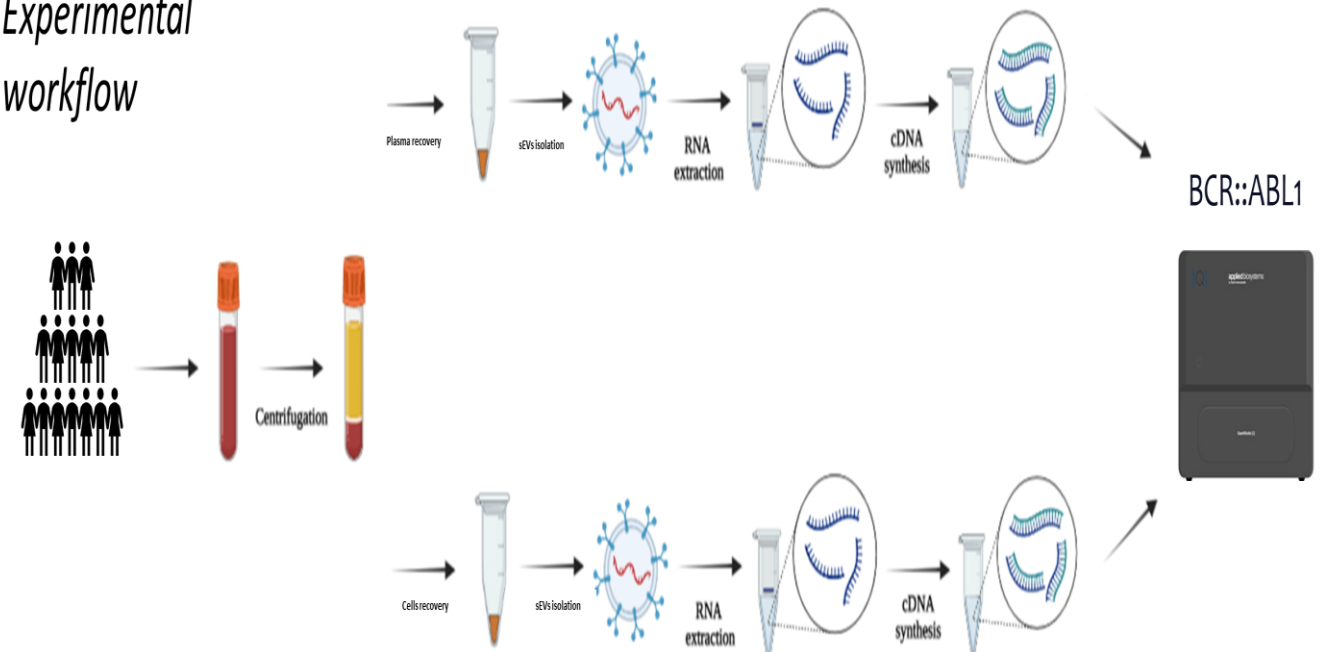
Improvement of sensitivity and detection

EXO

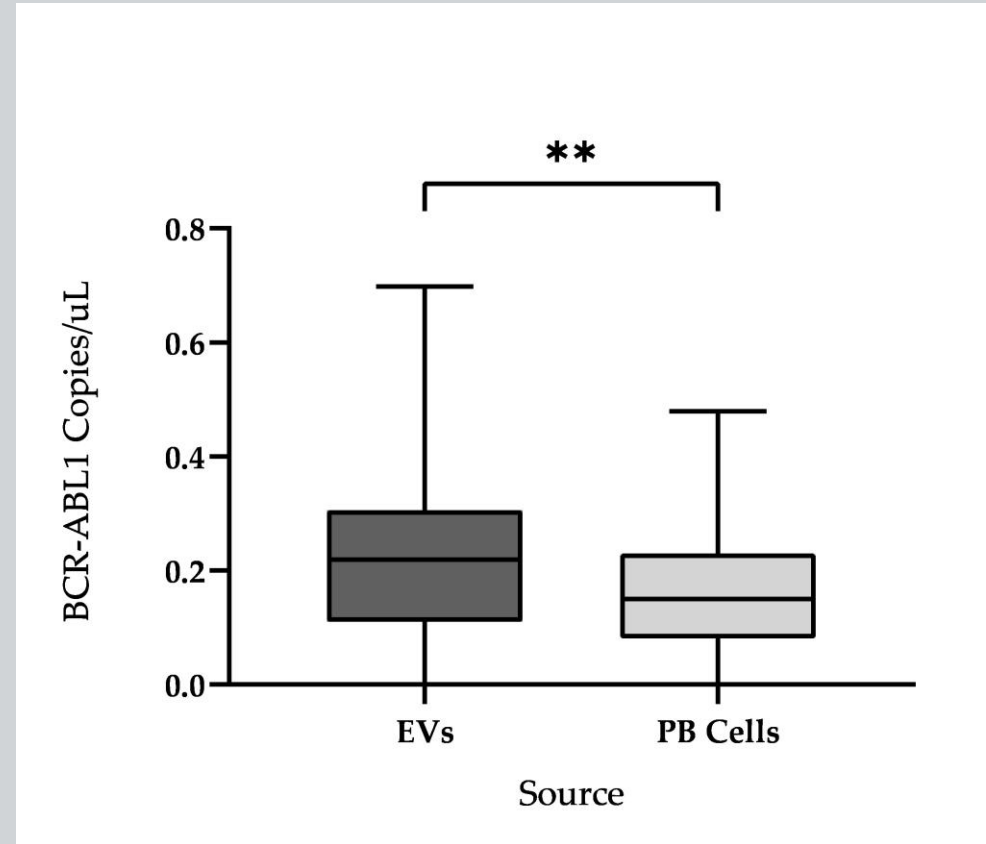
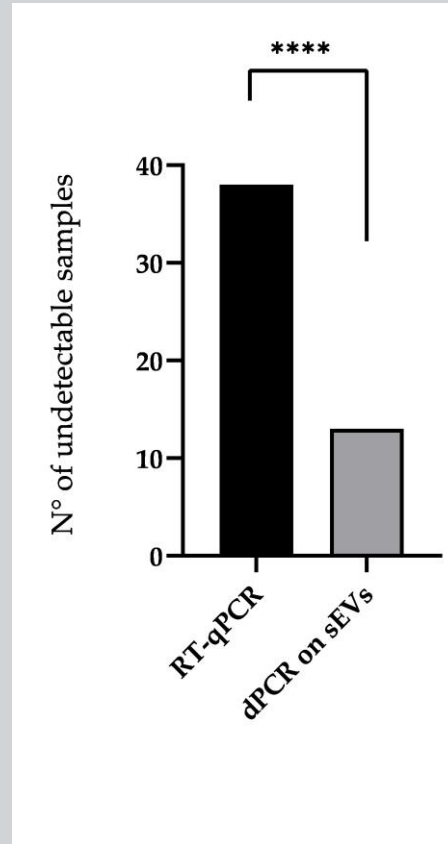
La biopsia liquida nella **leucemia mieloide cronica**

Variabile	Numero di campioni:104
Classe di MR	
MMR	18/104 (17%)
DMR	86/104 (83%)
Terapia in corso	
Imatinib	21/104 (20%)
Nilotinib	14/104 (13.5%)
Dasatinib	6/104 (5.5%)
Bosutinib	1/104 (1%)
Intermittent TKI therapy	27/104 (26%)
TFR	24/104 (23%)

Experimental workflow

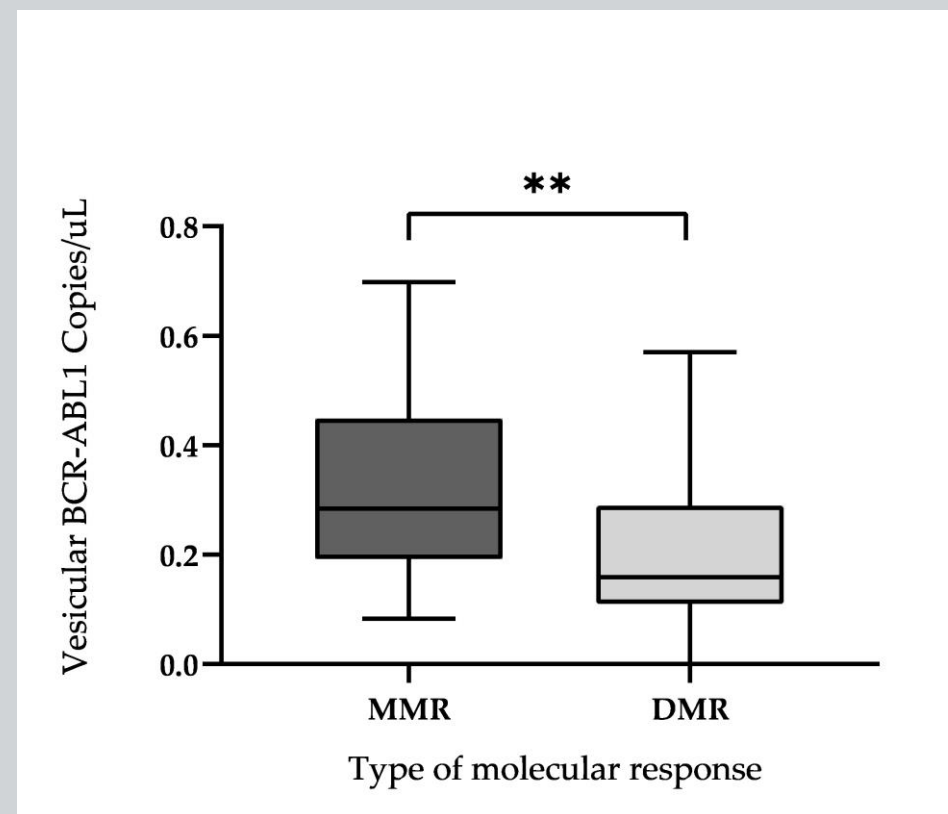
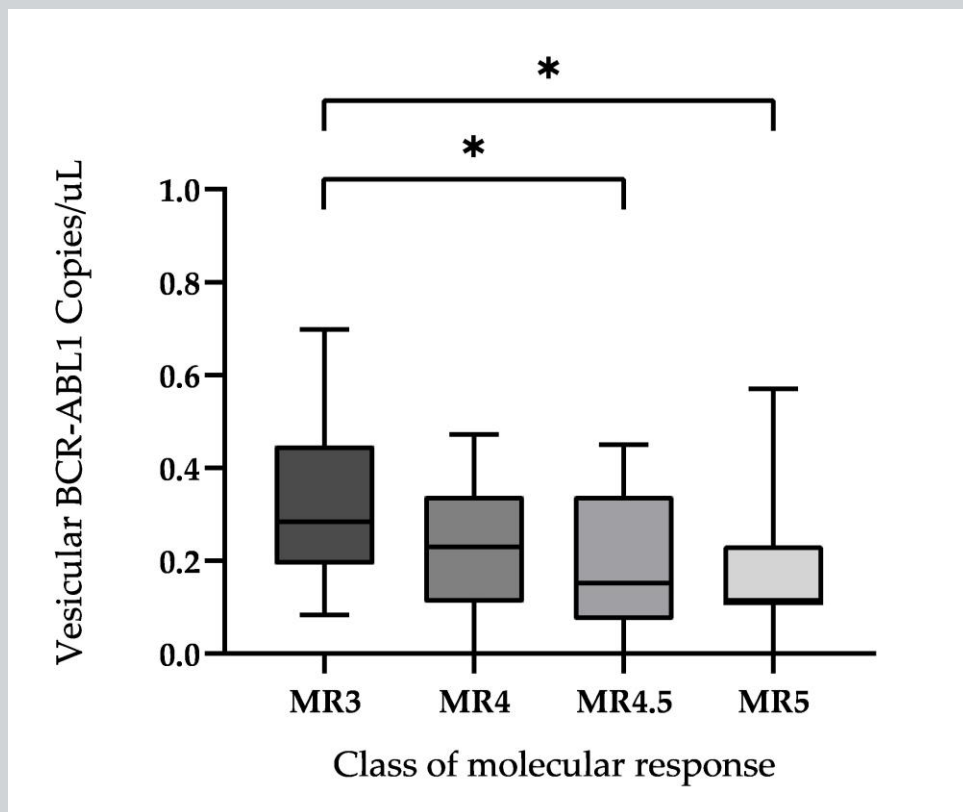


La biopsia liquida nella **leucemia mieloide cronica**: dPCR vs RT-qPCR

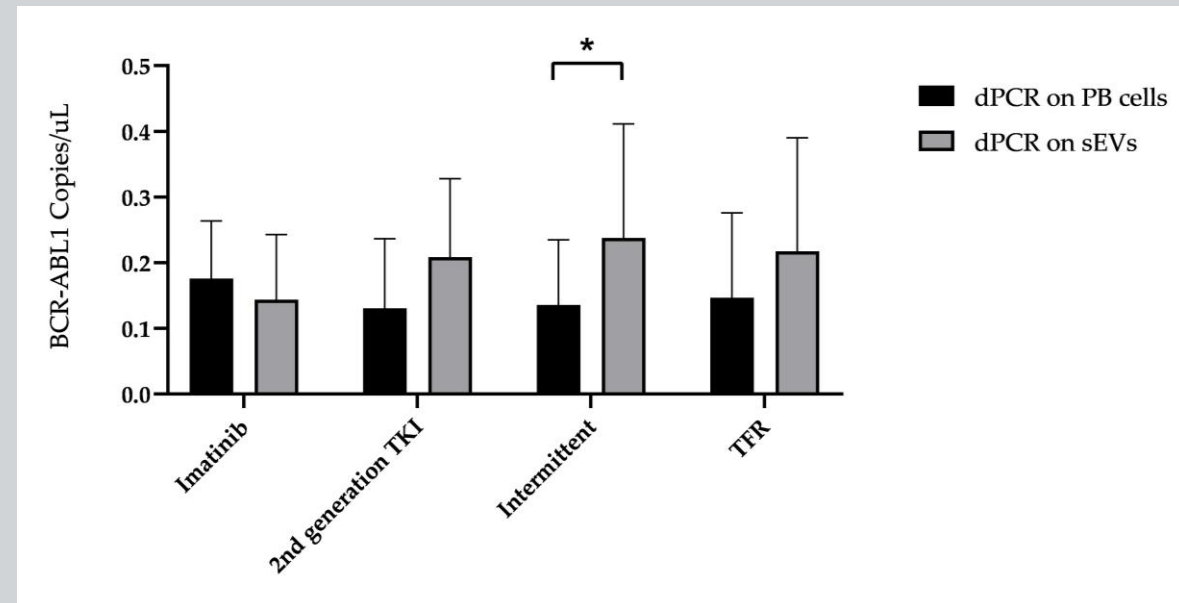
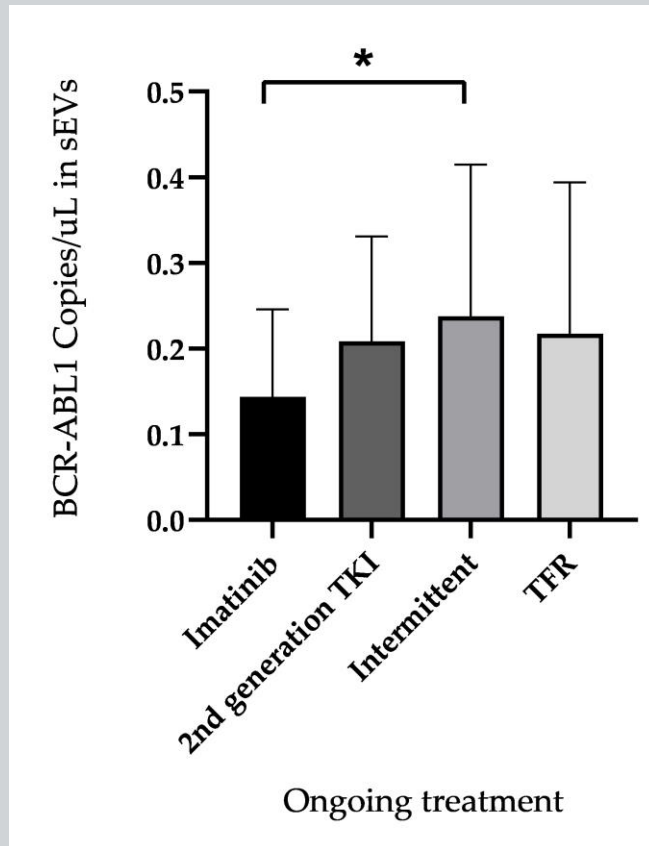


dPCR IS MORE SENSITIVE THAN RT-qPCR

La biopsia liquida nella **leucemia mieloide cronica**: monitoraggio vescicolare di BCR::ABL1 in diverse classi di risposta molecolare



La biopsia liquida nella **leucemia mieloide cronica**: monitoraggio vescicolare di BCR::ABL1 e terapia



VESICULAR BCR-ABL1 QUANTIFICATION IS INFLUENCED BY THE ONGOING THERAPY

La biopsia liquida nella **leucemia mieloide acuta**: gli esosomi

Article

Feasibility of Leukemia-Derived Exosome Enrichment and Co-isolated dsDNA Sequencing in Acute Myeloid Leukemia Patients: A Proof of Concept for New Leukemia Biomarkers Detection

Simona Bernardi ^{1,2,*} , Mirko Farina ¹, Katia Bosio ^{1,2}, Anna Di Lucanardo ^{1,2}, Alessandro Leoni ¹, Federica Re ^{1,2}, Nicola Polverelli ¹ , Alessandro Turra ¹, Enrico Morello ¹ , Eugenia Accorsi Buttini ¹, Tatiana Zollner ¹, Cristian Bonvicini ³ , Michele Malagola ¹ and Domenico Russo ¹

Identificazione di biomarkers molecolari di **Leucemia Mieloide Acuta** negli esosomi circolanti nel sangue periferico di pazienti adulti con AML

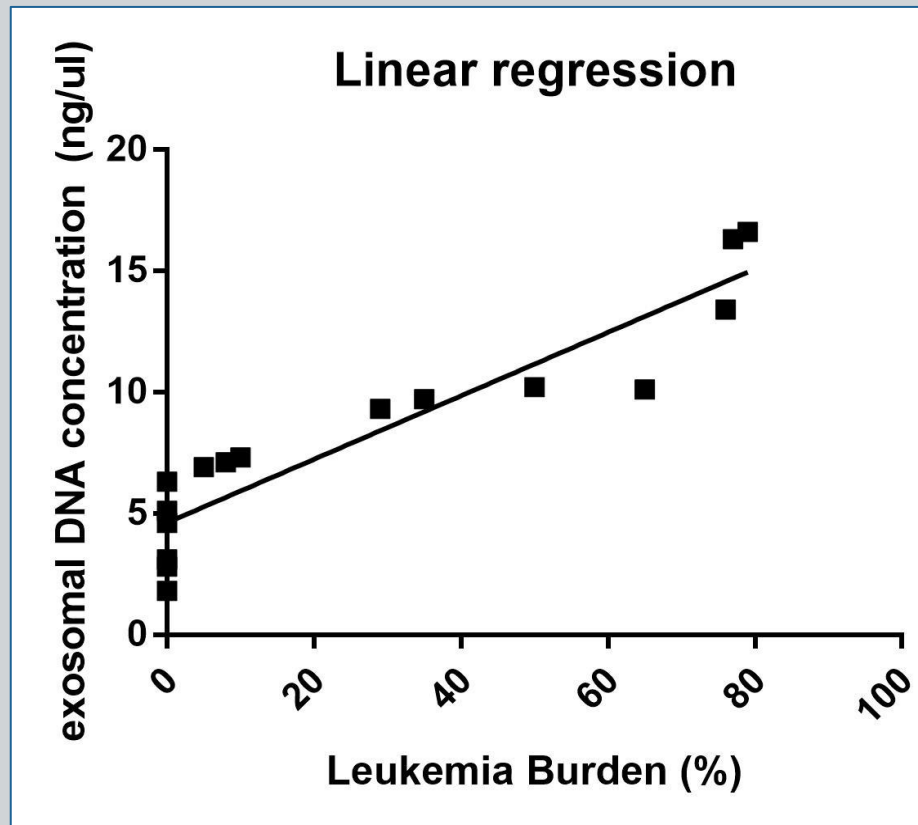
La biopsia liquida nella **leucemia mieloide acuta**: il disegno sperimentale

- 14 acute Myeloid Leukemia Patients
- 8 acute MYELOID LEUKEMIA PATIENTS monitored at different disease phases
- 3 Healthy Controls
- Two approaches: NGS; tumor-exosomes enrichment



- I. Valutazione della fattibilità dell'arricchimento degli esosomi da AML unitamente ad approcci di NGS e dPCR nella detection di marcatori molecolari conosciuti di AML per il monitoraggio della MRD e del rischio di recidiva.
- II. Confronto tra le mutazioni identificate sugli esosomi e sulle cellule leucemiche isolate da sangue periferico e midollo osseo.
- III. Identificazione del timing ottimale per l'analisi degli esosomi.

La biopsia liquida nella **leucemia mieloide acuta**: i risultati



DNA ESOSOMIALE CORRELA CON IL
“LEUKEMIA BURDEN”

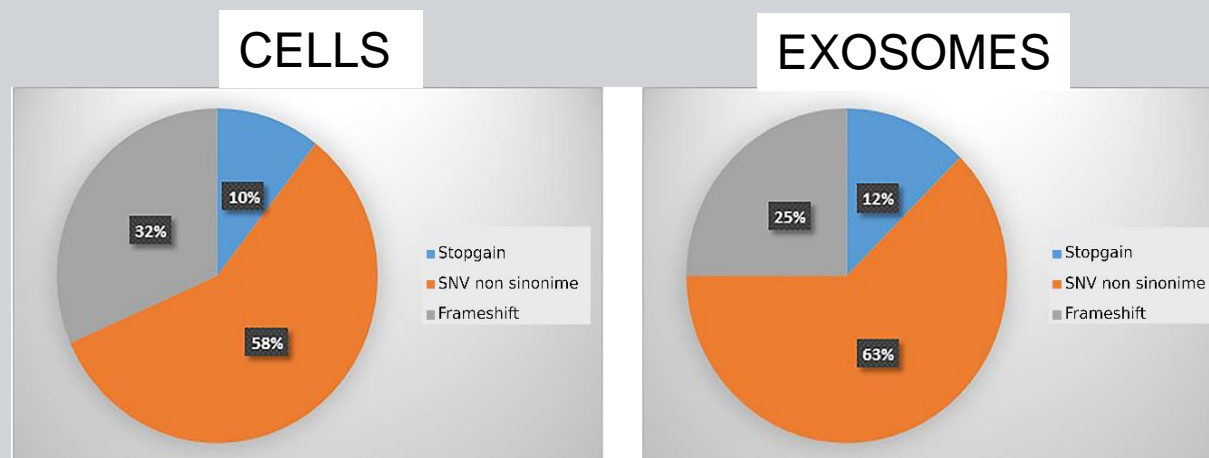
La biopsia liquida nella **leucemia mieloide acuta**: i risultati



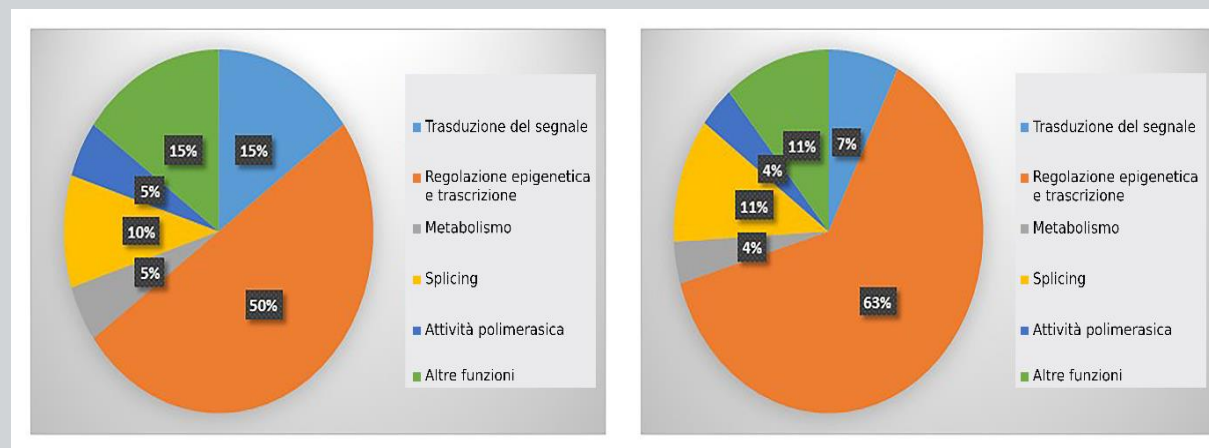
ESOSOMI COME
«SPECCHIO» DEL MIDOLLO
OSSEO: OMOLOGIA TRA LE
VARIANTI RILEVATE

La biopsia liquida nella **leucemia mieloide acuta**: omologia tra le varianti rilevate

Tipologia di mutazione



Tipo di geni mutati



Biopsia liquida in ematologia

