

DNA tumorale circolante come biopsia liquida per il cancro

Ellen Heitzer, Peter Ulz, Jochen B. Geigl

Institute of Human Genetics, Medical University of Graz, Graz, Austria

Traduzione a cura di Rossella Tomaiuolo

ABSTRACT

Targeted therapies have markedly changed the treatment of cancer over the past 10 years. However, almost all tumors acquire resistance to systemic treatment as a result of tumor heterogeneity, clonal evolution, and selection. Although genotyping is the most currently used method for categorizing tumors for clinical decisions, tumor tissues provide only a snapshot, or are often difficult to obtain. To overcome these issues, methods are needed for a rapid, cost-effective and noninvasive identification of biomarkers at various time points during the course of disease. Because cell-free circulating tumor DNA (ctDNA) is a potential surrogate for the entire tumor genome, the use of ctDNA as a liquid biopsy may help to obtain the genetic follow-up data that are urgently needed. This review includes recent studies exploring the diagnostic, prognostic and predictive potential of ctDNA as a liquid biopsy in cancer. In addition, it covers biological and technical aspects, including recent advances in the analytical sensitivity and accuracy of DNA analysis as well as hurdles that have to be overcome before implementation into clinical routine. Although the analysis of ctDNA is a promising area, and despite all efforts to develop suitable tools for a comprehensive analysis of tumor genomes from plasma DNA, the liquid biopsy is not yet routinely used as a clinical application. Harmonization of preanalytical and analytical procedures is needed to provide clinical standards to validate the liquid biopsy as a clinical biomarker in well-designed and sufficiently powered multicenter studies.

INTRODUZIONE

L'“outcome” clinico per molti tumori è migliorato grazie all'identificazione degli eventi molecolari che sottendono alla loro patogenesi. L'analisi di specifici biomarcatori permette la somministrazione di terapie su misura, definite in base al genotipo tumorale. La genotipizzazione del tumore ha il potenziale di classificare i tumori per pianificare le strategie cliniche e per identificare i pazienti che rispondono ai diversi farmaci.

Recentemente, ci sono stati notevoli progressi nella scoperta di nuovi biomarcatori, come ad esempio le mutazioni a carico del gene del recettore del fattore di crescita epidermico (*EGFR*) o del gene *KRAS* (“kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog”), l'amplificazione di *ERBB2* (“v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2”) e il gene fusione *EML4-ALK* (“echinoderm microtubule-associated protein like 4-

anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase”). Tumori che presentano queste mutazioni sono sensibili a specifici inibitori (1). Il numero di biomarcatori è destinato ad aumentare grazie agli studi di sequenziamento del genoma del cancro, che mostrano a un ritmo senza precedenti la presenza di nuove mutazioni associate ai tumori, e alle conoscenze sulle conseguenze funzionali di tali alterazioni genetiche.

Anche se le terapie mirate hanno notevolmente cambiato il trattamento del cancro negli ultimi 10 anni, sono stati messi in luce diversi nuovi problemi e sfide, tra cui l'eterogeneità del tumore e l'evoluzione molecolare, i costi e la potenziale morbilità delle biopsie, la mancanza di farmaci efficaci contro la maggior parte delle alterazioni genomiche, i limiti tecnici dei test molecolari, l'eventuale rimborso di queste indagini e gli ostacoli di carattere normativo (2). Oggi, uno dei temi biologici più importanti è l'eterogeneità intratumorale. Quasi tutti i tumori trattati acquisiscono resistenza alla terapia, come

**Questo articolo è stato tradotto con il permesso dell'American Association for Clinical Chemistry (AACC). AACC non è responsabile della correttezza della traduzione. Le opinioni presentate sono esclusivamente quelle degli Autori e non necessariamente quelle dell'AACC o di Clinical Chemistry. Tradotto da Clin Chem 2015;61:112-23 su permesso dell'Editore. Copyright originale © 2014 American Association for Clinical Chemistry, Inc. In caso di citazione dell'articolo, riferirsi alla pubblicazione originale in Clinical Chemistry.*

risultato dell'eterogeneità tumorale, dell'evoluzione clonale e della selezione. Gerlinger et al. hanno osservato un'enorme eterogeneità in molti geni oncosoppressori (3), che potrebbero avere un impatto, soprattutto nei pazienti con cancro metastatizzato, per il fatto che, nella maggior parte dei casi, sono analizzate solo biopsie e le decisioni terapeutiche sono prese considerando solo il risultato della singola biopsia del tumore. Di conseguenza, altre lesioni importanti potrebbero essere trascurate (Figura 1). Inoltre, nella maggior parte dei casi le biopsie sono difficili da ottenere e non è disponibile alcuna informazione sulla genetica delle metastasi. Pertanto, le decisioni terapeutiche spesso sono prese senza alcuna conoscenza della

genetica del tumore (Figura 1). Per di più, i tumori evolvono e durante la loro progressione possono presentarsi dei subcloni, con alterazioni molecolari differenti tra il tumore primario e le metastasi o le recidive (4). E' stato inoltre dimostrato che le metastasi non sono necessariamente più complesse rispetto al tumore primario; ad es., alterazioni che sono presenti nella lesione primaria possono essere perse nelle metastasi (Figura 1) (5). L'enorme eterogeneità e la mancanza di conoscenza circa la composizione genetica del tumore fanno sì che spesso le ragioni della resistenza primaria o lo sviluppo di resistenza secondaria non sono spiegabili. Quindi, poiché i marcatori correlati alla terapia possono variare durante la progressione del tumore,

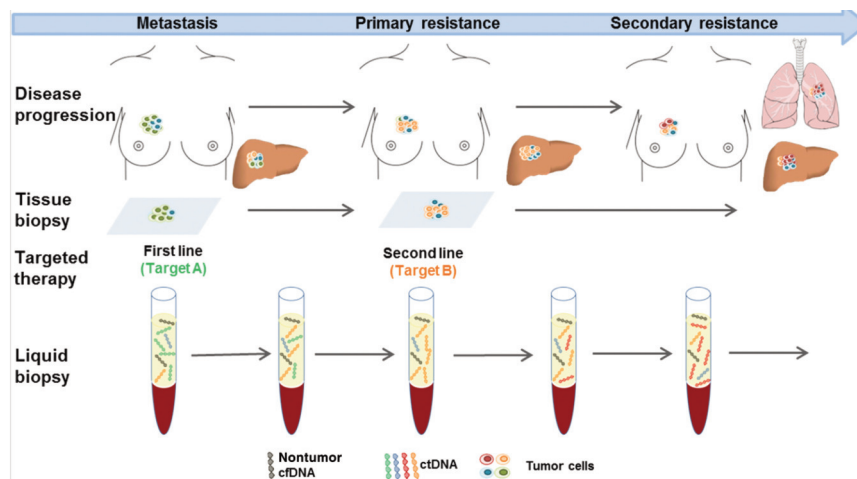


Figura 1

La biopsia liquida per monitorare risposte terapeutiche e resistenza.

Scenario ipotetico del decorso della malattia di una paziente con cancro mammario metastatizzato. La terapia di prima linea si basa su una biopsia del tumore primario e i cambiamenti rilevanti nella metastasi potrebbero essere persi, portando quindi alla resistenza primaria. Dopo il passaggio a una terapia di seconda linea, si presenta una resistenza secondaria. I cambiamenti genetici di cloni resistenti possono essere analizzati utilizzando una biopsia liquida e quindi i meccanismi di resistenza potrebbero essere riconosciuti prima che la progressione della malattia diventi clinicamente evidente.

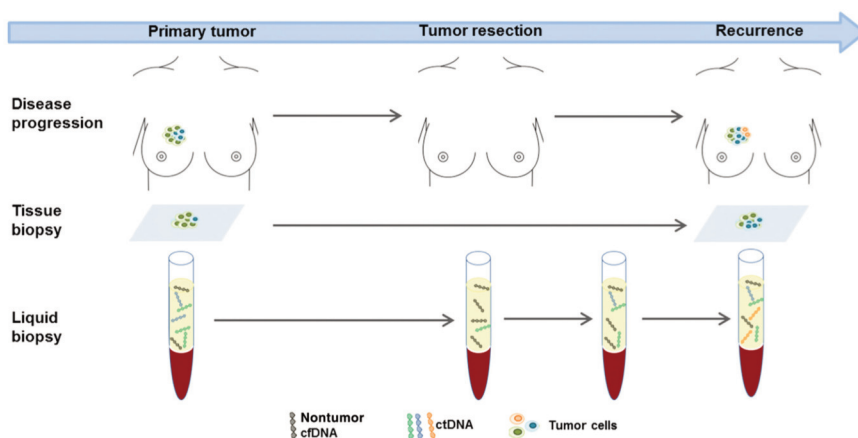


Figura 2

La biopsia liquida per monitorare le alterazioni tumore-specifiche per rilevare le recidive.

Scenario ipotetico del decorso della malattia di una paziente con cancro mammario. Dopo la resezione curativa del tumore primario, per un lungo periodo di tempo può non esserci evidenza clinica della malattia. Tuttavia, il DNA tumore-specifico può essere rilevato in circolo molto prima che la recidiva del tumore si evidenzii clinicamente. Inoltre, le modifiche tumore-specifiche possono essere utilizzate per identificare le pazienti ad alto rischio di recidiva.

l'identificazione di marcatori in diversi momenti temporali può fornire informazioni fondamentali per la corretta gestione clinica del paziente (Figure 1 e 2). L'analisi del genoma tumorale su campioni in serie dovrebbe rappresentare un prerequisito per la terapia personalizzata per monitorare la risposta alla terapia. Tuttavia, attualmente questo è quasi impossibile poiché, data l'invasività della procedura, è gravoso per il paziente sottoporsi a biopsie consecutive. In più, sembrerebbe che alcune biopsie possano favorire la disseminazione tumorale, anche se questo è considerato un evento molto raro (6). In sintesi, anche se le procedure invasive sono potenzialmente rischiose, l'attuale regime terapeutico alternativo comporta un livello inaccettabile di tossicità e i parametri (ad es., l'"imaging" radiologico e/o le analisi del sangue) valutati per stabilire la progressione della malattia sono spesso inaccurati.

Per superare questi problemi, sono necessari metodi per l'identificazione poco costosa, non invasiva e rapida di marcatori in vari momenti temporali durante il corso della malattia, al momento della diagnosi e a intervalli definiti durante il trattamento. Un'alternativa per superare i limiti del campionamento ripetuto è l'analisi delle cellule tumorali circolanti (CTC) e/o del DNA tumorale circolante privo di cellule (ctDNA). I recenti progressi nell'analisi di ctDNA e CTC ora consentono di studiare i genomi tumorali con mezzi non invasivi. Diversi studi hanno dimostrato che è possibile distinguere i genomi tumorali studiando il DNA estratto dal plasma (7-11). Le cellule tumorali rilasciano frammenti di DNA in circolo, che si trovano nella frazione del sangue priva di cellule, frammenti ai frammenti di DNA appartenenti alle cellule sane. Poiché il ctDNA è un potenziale surrogato dell'intero genoma tumorale, è spesso indicato come "biopsia liquida". Dato che la tendenza per la gestione ottimale della terapia è quella di prendere decisioni basate sullo stato attuale dell'intero genoma tumorale, l'uso del ctDNA come biopsia liquida potrebbe aiutare a ottenere velocemente i dati relativi al "follow-up" genetico. Questa rassegna tocca gli aspetti biologici e tecnici così come le sfide per l'uso clinico del cfDNA ("cell-free circulating DNA") nella diagnosi del cancro. Poiché si tratta di un campo in forte espansione e i dati sul cfDNA sono molti, non è stato possibile includere tutti gli studi esistenti su questo argomento.

ASPETTI BIOLOGICI

Il cfDNA è stato inizialmente identificato da Mandel e Métais nel sangue dei soggetti sani (12). Tuttavia, il loro lavoro pionieristico non ha suscitato molto interesse e ci sono voluti 30 anni fino a quando Leon et al. hanno riscontrato aumentate concentrazioni di cfDNA nel sangue periferico di pazienti affetti da tumore (13). Ce ne sono voluti altri 10 perché Stroun et al. dimostrassero che nel sangue periferico potesse essere riscontrato qualcosa con caratteristiche neoplastiche (14). Questi risultati sono stati poi confermati da diversi altri gruppi e negli anni seguenti sono state identificate alterazioni

tumore-specifiche, tra cui mutazioni in soppressori tumorali e oncogeni (15), l'instabilità dei microsatelliti (MSI) (16) e la metilazione del DNA (17), che hanno fornito la prova concreta che il cfDNA viene rilasciato in circolo dai tumori (Figura 3).

Ci sono pochi dati disponibili sulla cinetica reale del rilascio di cfDNA in circolo e quello che si sa della sua origine, del meccanismo e del tasso di rilascio è spesso contraddittorio. Si pensa che il cfDNA provenga da diverse fonti, tra cui le cellule apoptotiche e necrotiche (Figura 3) (18). Sembra che la malignità del tumore porti a un più alto grado di necrosi, che corrisponde a un aumento del DNA tumorale in circolo. Diehl et al. hanno suggerito che i frammenti di DNA trovati in circolo derivano da cellule neoplastiche necrotiche, precedentemente fagocitate dai macrofagi (19). In un recente studio condotto da Sikora et al. sono stati rilevati grandi frammenti di DNA derivati dalla necrosi cellulare in pazienti con adenocarcinoma pancreatico duttale, tumore neuroendocrino del pancreas o con pancreatite cronica (20). In alternativa, è stato suggerito che tutte le cellule viventi rilasciano attivamente DNA in circolo (21). Tuttavia, sequenziando il genoma del DNA nel plasma delle donne in gravidanza, Lo et al. hanno dimostrato che molecole di DNA nel plasma hanno un modello di frammentazione prevedibile che ricorda quello dei nucleosomi tagliati dalla nucleasi (22). Ciò è stato confermato anche dalla valutazione delle dimensioni dei cfDNA in individui sani e in pazienti oncologici, che ha rivelato una maggiore presenza di frammenti delle dimensioni dei complessi nucleoproteici singoli o multipli e suggerito che il principale fattore di rilascio possa essere l'apoptosi (Figura 4) (23). Ulteriori prove che l'apoptosi sia la principale fonte di cfDNA vengono da esperimenti sui topi che dimostrano che i frammenti più presenti nel plasma degli animali xenotrapiantati derivano dai mononucleosomi (24). Gli autori hanno dimostrato che le caratteristiche del ctDNA variano durante lo sviluppo del cancro coloretale (CRC) in topi nudi xenotrapiantati con linee cellulari umane CRC HT29 o SW620 (24). Sebbene il ctDNA fosse già rilevabile nella fase iniziale, la dimensione del tumore non era significativamente correlata con la concentrazione di cfDNA rilevabile. Un'indagine approfondita della distribuzione delle dimensioni del cfDNA, condotta da Mouliere et al., ha dimostrato che il ctDNA tumore-derivato in campioni di plasma di topi xenotrapiantati mostra un profilo specifico in base alle dimensioni del ctDNA, con una notevolmente maggiore frammentazione (25). Ciò è stato confermato anche da uno studio di Garcia-Olmo et al. in cui è stato dimostrato che il rilascio di DNA normale e tumorale nel plasma sembra essere correlato a fattori individuali specifici e che il contributo del DNA tumorale alle concentrazioni del DNA mutato e non mutato oscilla nel tempo (26). Lo stesso gruppo ha proposto che il cfDNA nel plasma possa partecipare alla genesi del tumore e allo sviluppo delle metastasi con un meccanismo simile alla transfezione, che porta all'assorbimento di tali acidi nucleici da parte di cellule suscettibili. La supplementazione di plasma da pazienti

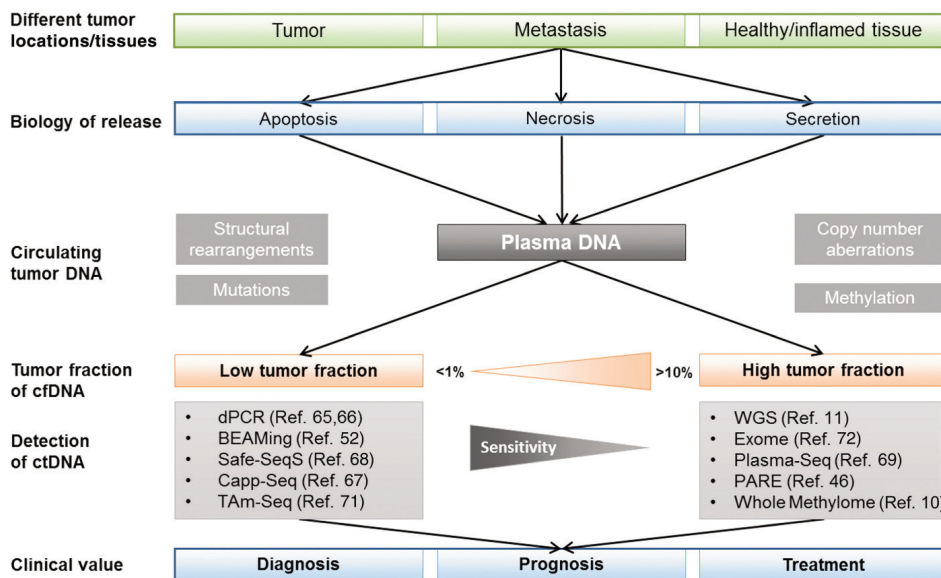


Figura 3

Rappresentazione schematica della biopsia liquida come strumento per monitorare il cancro. Il DNA libero da cellule ("cell-free DNA", cfDNA) viene rilasciato, attraverso molteplici meccanismi, dalle cellule in fase di apoptosi o necrosi che provengono da diverse sedi tumorali e da tessuti sani o infiammati. Il DNA derivato da tumore ("tumor-derived DNA", ctDNA) può essere estratto dal plasma e permette di evidenziare una varietà di mutazioni genetiche tumore-specifiche. Tuttavia, la quantità di DNA tumore-specifico può variare notevolmente (da <1% a >90%) e sono state proposte numerose tecniche per la sua analisi. La biopsia liquida può trovare applicazione in diversi contesti clinici, tra cui la diagnosi del cancro, l'individuazione della malattia minima residua, la prognosi e il monitoraggio della terapia.

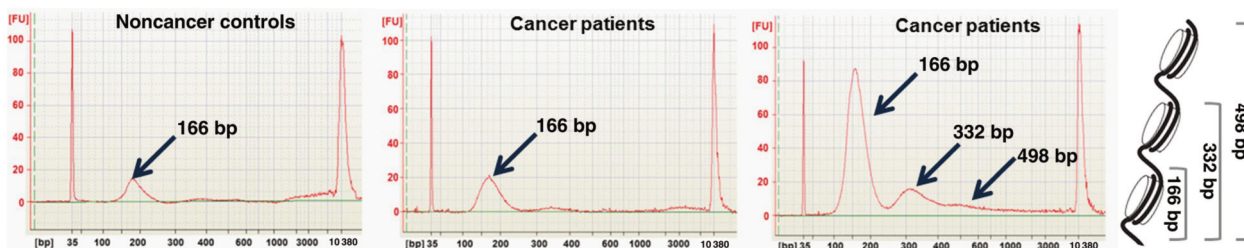


Figura 4

Distribuzione dimensionale di campioni di DNA nel plasma di individui sani e pazienti affetti da cancro. In tutti i campioni è presente una maggiore quantità di frammenti di 166 bp corrispondente a DNA nucleosomale, indicando che l'apoptosi è il meccanismo principale per il rilascio di DNA in circolo. In un sottogruppo di pazienti (grafico a destra) possono essere osservati anche frammenti più grandi.

con mutazioni di *KRAS* ha portato alla trasformazione oncogenica di topi NIH-3T3, un processo chiamato genomestasi (27). In uno studio recente è stata mostrata per la prima volta un'immagine del cfDNA ottenuta con microscopia a forza atomica da campioni di plasma di pazienti con CRC e di donatori sani, e ancora una volta oltre 80% dei frammenti di cfDNA nel plasma di pazienti con CRC era al di sotto delle 145 bp, confermando l'elevato grado di frammentazione attraverso meccanismi apoptotici (28).

Al contrario ci sono pochi dati disponibili sulla stabilità del cfDNA; i meccanismi di eliminazione sembrano essere rapidi e milza, fegato e reni potrebbero esserne responsabili (10, 29). L'emivita del DNA libero di

origine fetale (cffDNA) è stata stimata di 16 min (30); tuttavia, uno studio recente condotto dallo stesso gruppo ha studiato la cinetica del cffDNA con il sequenziamento massivo parallelo (MPS), rivelando una "clearance" bifasica con un'emivita di ~1 ora per la fase rapida e di 13 ore nella seconda fase (29). L'utilizzo di MPS è vantaggioso per la valutazione del rilascio e delle dinamiche di "clearance" del cfDNA per due motivi: può essere utilizzato sull'intero genoma e quindi il risultato non dipende dalla presenza di specifici frammenti di DNA; inoltre, MPS permette il rilevamento di tutti i frammenti del DNA circolante indipendentemente dalle dimensioni (29). Ciò nonostante, nei pazienti con tumore il meccanismo di eliminazione del DNA dal plasma è

poco conosciuto e non si sa se altri fattori, come il ritmo circadiano, l'infiammazione o particolari terapie, influenzino i meccanismi di fuoriuscita dalle cellule e di eliminazione dal circolo. La prima prova di meccanismi simili è stata fornita da studi condotti sul DNA circolante del virus Epstein-Barr (EBV) (31, 32).

ASPETTI TECNICI

L'elevato grado di frammentazione e la bassa concentrazione in circolo rendono il cfDNA un analita difficile da misurare. Il plasma è una fonte migliore rispetto al siero per l'analisi del cfDNA, sebbene la quantità di cfDNA nel siero possa essere da due a 24 volte superiore che nel plasma (33). Questo potrebbe essere determinato dalla contaminazione delle cellule durante il processo di coagulazione, e per questo molti laboratori consigliano l'uso del plasma per l'analisi del DNA tumore-specifico per le più basse concentrazioni di DNA comune presenti come "background". Sebbene la maggior parte degli studi riportano concentrazioni più elevate di cfDNA nel cancro, non è ancora possibile valutare in quale misura il cfDNA in circolo in un paziente è cancro-specifico, per il fatto che concentrazioni aumentate di cfDNA sono state anche descritte in condizioni fisiologiche e patologiche non tumorali. Tuttavia, quando si confrontano i dati da campioni di plasma e di siero, c'è una maggiore sovrapposizione tra individui sani e pazienti oncologici (34).

Sembra comunque che una maggiore quantità di cfDNA rifletta la situazione *in vivo* dei pazienti affetti da cancro. Prima di considerare le elevate concentrazioni di cfDNA come un biomarcatore diagnostico informativo, devono però essere chiariti alcuni punti. In primo luogo, le procedure preanalitiche devono essere standardizzate. Ci sono vari studi sui metodi di trattamento del sangue, incluso il tempo trascorso tra la ricezione del campione e l'inizio della procedura di isolamento, le condizioni di centrifugazione e se sia più appropriato l'uso del siero o del plasma (35). La scelta del metodo di isolamento, che assicuri l'estrazione di una quantità sufficiente di DNA di alta qualità, è critica ed è stato dimostrato che i fattori preanalitici di campionamento del sangue possono influenzare fortemente la resa di DNA (36). Poiché molti metodi convenzionali per l'isolamento di cfDNA sono costosi, lunghi e complessi, Sonnenberg et al. hanno sviluppato una nuova tecnica elettrocinetica che consente l'isolamento rapido di cfDNA direttamente dal sangue (37). In secondo luogo, una delle questioni più importanti è la mancanza di armonizzazione dei metodi di quantizzazione. I metodi di quantizzazione, tra cui i metodi spettrofotometrici, quelli a base di coloranti fluorescenti o quelli basati sulla reazione polimerasica a catena (PCR) quantitativa, danno risultati diversi, perché possono misurare il DNA totale o solo quello amplificabile (38). Recentemente, Devonshire et al. hanno confrontato le quantizzazioni mediante PCR di 7 diversi geni di riferimento e hanno osservato che i loci adiacenti al telomeri erano più abbondanti rispetto a

quelli con una posizione più centromerica, dimostrando che la valutazione del *locus* del singolo gene era incline a "bias". Ciò è particolarmente vero per la quantizzazione del ctDNA, perché nel tumore si verificano cambiamenti nel numero di copie di tratti del gene (38). Altri approcci si basano sulla quantizzazione del cfDNA direttamente dal plasma senza isolare il DNA (39). In terzo luogo, si sa poco circa l'origine e il meccanismo dettagliato del rilascio di cfDNA e nella maggior parte degli studi non sono stati presi in considerazione eventi confondenti che potrebbero pure contribuire al rilascio del cfDNA, come le malattie non maligne, l'abitudine al fumo, la gravidanza, l'esercizio fisico e la disfunzione cardiaca.

Pertanto, è essenziale un consenso su metodi affidabili ed efficienti per la quantizzazione e l'analisi del cfDNA al fine della valutazione dell'impiego della biopsia liquida nella pratica clinica per ottenere dati più coerenti che possono essere trasferiti nei diversi laboratori.

IMPIEGO CLINICO DELLA BIOPSIA LIQUIDA

Gli impieghi della biopsia liquida nella pratica clinica sono molteplici perché concettualmente la biopsia liquida su sangue è uno strumento promettente per identificare variazioni tumore-specifiche durante l'intero corso della malattia (Figura 3, Tabella 1). La biopsia liquida può essere utilizzata per identificare indicatori surrogati di recidiva così come la progressione della malattia e può coadiuvare nella scelta della terapia (se può essere applicata una specifica terapia o se ridurrà il rischio di recidiva o progressione).

cfDNA come marcatore diagnostico

I primi passi verso l'uso clinico del cfDNA come biopsia liquida si sono basati sulla semplice valutazione quantitativa delle concentrazioni di DNA presenti in circolo, mettendo in luce differenze significative tra le quantità di DNA nel plasma isolato da individui sani, da pazienti con malattie benigne e da pazienti affetti da cancro. Anche se alcuni studi hanno rivelato la presenza di concentrazioni significativamente più elevate di cfDNA in pazienti affetti da cancro e che la semplice quantizzazione del cfDNA può confermare la presenza di cancro, lo stato "libero da malattia" e la recidiva dopo la chirurgia curativa (40, 41), numerosi altri studi dimostrano che valutare solo la quantità di cfDNA non è uno strumento diagnostico utile e che l'utilità del cfDNA è limitata senza la conoscenza delle mutazioni del tumore (42, 43). Uno studio in cui sono state analizzate sia le concentrazioni totali del DNA nel plasma sia le mutazioni *KRAS* tumore-specifiche in pazienti con CRC ha mostrato che una maggiore quantità di frammenti tumore-specifici e che un maggior numero di CTC seguono la distribuzione bifasica dei frammenti di DNA nel plasma (Figura 4). Tuttavia, in presenza di uno stadio tumorale avanzato non tutti i pazienti presentavano concentrazioni rilevabili di ctDNA in circolo (23). Ciò è stato confermato in un recente studio da Bettegowda et

Tabella 1*Impiego clinico della biopsia liquida*

Approccio	Applicazione	Riferimenti bibliografici
Diagnostico	Identificazione precoce	40-45
	Monitoraggio della malattia minima residua	11, 47, 48, 73
Predittivo	Definizione dell'etogeneità molecolare della malattia	10, 11, 46
	Monitoraggio delle dinamiche tumorali	52, 54, 69, 73
	Identificazione degli aspetti genetici per le terapie "target"	57, 58
	Valutazione precoce della risposta alla terapia	8, 61
	Definizione dell'evoluzione della resistenza in tempo reale	60-62
Prognostico	Identificazione di rischio di ricorrenza elevato	51, 73
	Correlazione con i cambiamenti nella crescita tumorale	48, 53, 61, 74

al. (7). Madhavan et al. hanno valutato l'integrità del cfDNA in un'ampia coorte di pazienti con cancro al seno (n=383) e in una serie di controlli sani (n=100), osservando una diminuzione proporzionale nell'integrità del cfDNA e un aumento della concentrazione del cfDNA passando dai controlli sani a pazienti con malattie localizzate fino a pazienti con carcinoma metastatico della mammella (44). Un altro studio ha mostrato alte concentrazioni di cfDNA sia nel plasma che nel siero al momento della chirurgia in tutti i pazienti con CRC analizzati, con valori di antigene carcinoembrionario alterati solo nel 37% dei casi (45).

Anche se la sola quantizzazione del cfDNA non sembra utile per la diagnosi e la stima della prognosi, il monitoraggio dei cambiamenti tumore-specifici può essere utilizzato come strumento per la diagnosi precoce del cancro e/o la valutazione prognostica. Tuttavia, il fatto che la frazione di DNA circolante derivato dal tumore può variare tra 0,01% e più del 90% rappresenta un'ulteriore sfida (7, 8, 23, 46). Ci sono situazioni cliniche in cui le concentrazioni del cfDNA sono al di sotto delle quantità ottimali per l'identificazione delle mutazioni. Pertanto, l'uso del ctDNA come strumento diagnostico e per la rilevazione della malattia residua minima richiede marcatori altamente specifici e tecniche analiticamente sensibili.

Una strategia per i tumori solidi può essere quella di identificare i riarrangiamenti somatici ricorrenti, come precedentemente indicato per il monitoraggio della malattia residua nella leucemia (47). McBride et al. hanno mappato riarrangiamenti genomici in 3 tipi di cancro e dimostrato che, nel caso dei riarrangiamenti, la PCR è in grado di rilevare una singola copia del genoma tumorale nel plasma senza false positività (48). Bisogna sottolineare che non tutti i riarrangiamenti presenti in un tumore sono implicati nella formazione o nella progressione del tumore e che alcuni di questi riarrangiamenti non sono stabili e potrebbero essere persi in un clone recidivante o nelle metastasi. Inoltre, recentemente, in alcuni approcci diagnostici è stato utilizzato il test di screening per CRC su sangue utilizzando il biomarcatore *SEPT9* ("septin 9"), che rileva specificamente la maggior parte di CRC in tutte le fasi e

le sedi colon-rettali (49) o l'analisi di EBV DNA su plasma per il rilevamento precoce del carcinoma nasofaringeo in individui senza sospetto clinico di malattia (50).

cfDNA come marcatore prognostico

Uno studio condotto da Lecomte et al., focalizzato sugli hotspot mutazionali di *KRAS* e sull'ipermetilazione dell'inibitore della chinasi 2A ciclina-dipendente (*CDKN2A*, "cyclin-dependent kinase inhibitor 2A") nei pazienti con CRC, ha dimostrato che il tasso di sopravvivenza a due anni era del 100% nei pazienti senza evidenza di ctDNA con mutazioni di *KRAS* o ipermetilazione del promotore del gene *CDKN2A*, che possono essere trovate rispettivamente nel 40% o nel 20-50% dei pazienti con CRC, suggerendo un valore prognostico per questi marcatori. Pertanto, la presenza di ctDNA nel plasma sembra essere un marcatore prognostico rilevante per i pazienti con CRC e può essere utilizzato per identificare i pazienti ad alto rischio di recidiva (Figura 2) (51). Ciò è stato confermato anche da uno studio nel quale i pazienti in cui ctDNA era misurabile dopo l'intervento chirurgico avevano ricadute entro un anno (52). Inoltre, è stato dimostrato che alte concentrazioni di cfDNA e *KRAS* mutato erano chiari indicatori di un esito sfavorevole per i pazienti con CRC metastatico (53). Dati simili sono stati riportati per una serie di pazienti con carcinoma mammario (54). Per di più, recenti studi indicano che il ctDNA sembra essere un miglior marcatore prognostico rispetto alle CTC, quando era eseguita l'analisi combinata delle mutazioni tumore-specifiche nel ctDNA e nelle CTC (55). Risultati simili sono stati ottenuti in uno studio effettuato su pazienti con cancro del polmone non a piccole cellule in stadio avanzato, in cui l'analisi del ctDNA ha identificato con maggiore sensibilità rispetto alle CTC le mutazioni e dimostrato che queste concordavano fortemente con lo stato mutazionale del tumore corrispondente (56).

cfDNA come marcatore predittivo

Una delle applicazioni più diffuse e importanti della biopsia liquida è il monitoraggio della risposta alla

terapia, in particolare riguardo alle terapie con meccanismi di resistenza noti. I CRC "wild-type" per *KRAS* sono spesso sensibili al blocco EGFR, ma quasi tutti i pazienti sviluppano resistenza nel giro di pochi mesi (57). La biopsia liquida risolve il problema del campionamento ripetuto del tessuto tumorale dopo il trattamento e può fornire un quadro completo delle lesioni intratumorali e tra lesioni tumorali diverse.

Un recente studio ha suggerito che il cfDNA fornisce una migliore rappresentazione globale della malattia maligna e potrebbe essere una fonte affidabile di DNA per la diagnostica, che potrebbe sostituire l'uso del tessuto tumorale (58). Nel 2012, Diaz et al. hanno testato se il DNA mutato di *KRAS* potesse essere rilevato nel circolo di pazienti con CRC trattati con panitumumab in regime di monoterapia. Mutazioni in *KRAS* erano presenti nel siero del 38% dei pazienti nei 5-6 mesi successivi al trattamento (59). Un altro studio, analizzando pazienti con CRC metastatico prima della terapia mirata, ha mostrato il 100% di specificità e sensibilità diagnostiche per la mutazione V600E del proto-oncogene B-Raf (*BRAF*) ("B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase") e 98% di specificità e 92% di sensibilità per 7 mutazioni puntiformi di *KRAS* valutate. È interessante notare che la quantità di alleli mutati era molto variabile (0,5%-64,1%; mediana, 10,5%) tra i campioni mutati (8). In diversi studi lo sviluppo della resistenza alle terapie anti-EGFR era associato a mutazioni di *KRAS* (60, 61) e i cloni resistenti erano rilevabili in circolo mesi prima che la progressione fosse clinicamente evidente (60, 62). Inoltre, è stato recentemente dimostrato che amplificazioni focali di altri geni, come il *MET* proto-oncogene, tirosin-chinasi recettore (*MET*) e *ERBB2* sono coinvolte nella resistenza acquisita alle terapie anti-EGFR (60-63). La sovraespressione del gene *EGFR* è stata associata alla buona efficacia iniziale della terapia anti-EGFR (60).

ASPETTI METODOLOGICI

Generalmente, ci sono due approcci per l'analisi del DNA plasmatico (Figura 3). Il primo è un approccio mirato che comprende l'analisi delle mutazioni note dal tumore primario in un piccolo pannello di mutazioni "driver" che si verificano frequentemente e che possono influenzare le decisioni terapeutiche, come le mutazioni nei geni *KRAS* o *EGFR*. Il secondo è un approccio non mirato, ossia senza la conoscenza di eventuali modifiche specifiche presenti nel tumore primario. L'analisi dell'intero genoma del ctDNA può essere utilizzata per identificare le alterazioni tumore-specifiche per il monitoraggio della malattia, la diagnosi della resistenza molecolare e l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici. Un approccio più conveniente rispetto al sequenziamento dell'intero genoma è il sequenziamento dell'esoma, che inoltre non richiede la conoscenza *a priori* dello spettro genetico/mutazionale del tumore.

Approcci mirati

L'identificazione di mutazioni somatiche puntiformi nel cfDNA è stata pubblicata nel 1994 (64). Da allora, numerosi studi hanno analizzato le mutazioni tumore-specifiche note nel plasma e nel siero. Grazie ai progressi tecnologici, la sensibilità analitica è migliorata notevolmente negli ultimi anni e le nuove tecnologie, compreso l'ARMS (sistema di amplificazione refrattario alle mutazioni) (53), la dPCR (PCR digitale) (65, 66) e il BEAMing ("beads, emulsions, amplification and magnetics") (52), consentono l'identificazione di alleli mutati anche se presenti a frequenze molto basse. Newman et al. hanno introdotto il sequenziamento di profili personalizzati per tipologia di cancro (CAPP-Seq, "cancer personalized profiling by deep sequencing"), un metodo economico e ultrasensibile per quantizzare il ctDNA (67). Questo metodo combina metodi ottimizzati di preparazione delle librerie per una bassa quantità di DNA di partenza con un approccio bioinformatico multifase per la progettazione di un "selector" composto da oligonucleotidi biotinilati che identificano le regioni con una più alta frequenza di mutazioni nel cancro di interesse (67). Il ctDNA è stato rilevato nel 100% dei pazienti in stadio II-IV di carcinoma del polmone non a piccole cellule e nel 50% dei pazienti con stadio I, con una specificità diagnostica del 96% per gli alleli mutanti fino a ~0,02% per le mutazioni note. Le concentrazioni di ctDNA erano altamente correlate con il volume del tumore e in grado di distinguere tra malattia residua e le variazioni nell'"imaging" dovute alla terapia. Inoltre, la concentrazione del ctDNA ha evidenziato più precocemente la risposta alla terapia rispetto all'approccio radiografico. In un recente studio condotto da Bettsgowda et al. sono stati analizzati numerosi pazienti affetti da diversi tipi di cancro e in diversi stadi tumorali (7). La sensibilità diagnostica del ctDNA per l'identificazione di mutazioni clinicamente rilevanti del gene *KRAS* è stata del 87,2%, con una specificità del 99,2%. Sono stati usati metodi analitici altamente sensibili, tra cui dPCR e il metodo Safe-SeqS ("safe-sequencing system"), messi a punto precedentemente dallo stesso gruppo (68). Questo approccio è un metodo efficace per identificare mutazioni tumore-specifiche anche a livelli molto bassi e permette di distinguere chiaramente i segnali dai rumori di fondo riducendo i potenziali errori di sequenziamento di almeno 70 volte. Secondo Bettsgowda et al. il Safe-SeqS è in grado di rilevare una mutazione di DNA in 5 mL di plasma (7). Inoltre, gli autori hanno ricercato traslocazioni altamente tumore-specifiche che potrebbero essere utilizzate per rilevare i cambiamenti tumore-specifici a livelli molto bassi o per identificare la malattia minima residua.

Tuttavia, la maggior parte di questi metodi permette di analizzare solo pochi loci e le mutazioni nei geni che non presentano "hotspots" mutazionali, come i "tumor suppressors", non sono evidenziate. Una possibilità di includere i geni "driver" che non presentano "hotspot" è il "resequencing" mirato di geni selezionati che sono noti per essere associati con la tumorigenesi e la

progressione della malattia. In uno studio del nostro gruppo, sono stati identificati riarrangiamenti strutturali direttamente nel plasma dopo un arricchimento mirato delle regioni cromosomiche che sono spesso coinvolte nelle traslocazioni (69). Un'analisi di più di 4000 campioni di tumore, tra cui oltre 3600 dati provenienti dal "The Cancer Genome Atlas" (TCGA) e da una coorte indipendente non proveniente dal TCGA, ha rivelato che nel 76% di tutti i casi riscontrati in 10 tipi tumorali potrebbe essere identificata almeno una mutazione in un pannello di 25 geni selezionati (70). Al contrario, è stata più impegnativa l'identificazione di mutazioni a basse frequenze alleliche in regioni genomiche definite o in pochi nanogrammi di cfDNA frammentato. Per evidenziare mutazioni specifiche del tumore nel plasma, Forsheo et al. hanno sviluppato un metodo di sequenziamento chiamato "tag-amplicon" (TAm-Seq, "tagged-amplicon deep sequencing") (71). Usando questo approccio, i ricercatori hanno identificato mutazioni cancro-specifiche presenti a frequenze alleliche a partire da 2%, con una sensibilità e specificità diagnostica >97%. Lo screening di un insieme ridotto di mutazioni note potrebbe raggiungere un limite di rilevazione di ~0,2%.

Approcci non mirati

Il vantaggio principale dell'analisi dell'intero genoma nella biopsia liquida è che questo approccio è applicabile a tutti i pazienti perché non si basa su mutazioni genetiche ricorrenti. Anche se il nostro gruppo ha dimostrato che è possibile ottenere profili di "copy number" in tutto il genoma mediante "array-CGH" su plasma (23), gli approcci basati su "next generation sequencing" (NGS) sono stati in grado di aumentare la risoluzione dell'analisi del "copy number" da cfDNA. Il gruppo di Dennis Lo è stato tra i primi a stabilire i profili "genome-wide" dal plasma (11) e in seguito questi autori hanno ulteriormente sviluppato questa tecnica con la valutazione combinata dell'ipometilazione e delle alterazioni del "copy number" correlate ai tumori (10). Essi hanno dimostrato che le alterazioni del "copy number" correlate ai tumori (CNA, "copy number aberration") potrebbero essere stabilite anche dai dati di sequenziamento del DNA con il bisolfito ed essere utilizzate per identificare i casi di cancro non metastatici. L'ipometilazione del plasma forniva una sensibilità e specificità diagnostica del 74% e 94%, rispettivamente. Una riduzione del sequenziamento a 10 milioni di "reads" non presenta alcun effetto negativo sulla sensibilità e specificità. Il nostro gruppo ha dimostrato che le CNA possono anche essere rilevate in maniera attendibile con ~4 milioni di "reads" generate con il sequenziatore MiSeq (Illumina) (69). Leary et al. hanno messo a punto un metodo basato sul sequenziamento dell'intero genoma chiamato analisi personalizzata dei riarrangiati fini (PARE) per identificare le traslocazioni nei tumori solidi e hanno applicato questo approccio per l'analisi del DNA plasmatico, con la quale hanno identificato

numerose "copy number" cromosomiche e riarrangiamenti, compreso l'amplificazione di geni "driver" quali *ERBB2* e la chinasi 6 ciclina-dipendente (*CDK6*) (46). Poiché la maggior parte dei tumori presenta alterazioni cromosomiche molteplici che è improbabile riscontrare nelle cellule sane, questo può essere considerato un approccio altamente specifico. Tuttavia, come per uno studio di Thierry et al. (8) in cui gli alleli mutati erano tra 0,5% e 64,1%, le concentrazioni di DNA tumorale circolante in questo studio variavano notevolmente (da 1,4% al 47,9%) (46). Murtaza et al. hanno sequenziato l'esoma di campioni di DNA plasmatico e seguito molteplici cicli di trattamento (72). La quantizzazione delle frazioni alleliche nel plasma ha identificato una maggiore presenza di alleli mutanti in associazione alla comparsa di resistenza alla terapia. Gli autori hanno concluso che l'analisi dell'intero esoma del DNA tumorale circolante potrebbe integrare le informazioni ottenute con la biopsia invasiva nell'identificazione di mutazioni associate alla resistenza ai farmaci acquisite negli stadi tumorali avanzati (72).

Dawson et al. hanno descritto l'uso del sequenziamento dell'intero genoma in combinazione con l'analisi personalizzata per quantizzare il DNA tumorale circolante in campioni di plasma raccolti in serie nel carcinoma mammario metastatico (54); il sequenziamento di tutto il genoma identifica le mutazioni specifiche del paziente, quindi queste sono usate per valutare le concentrazioni di ctDNA nei campioni raccolti in serie. I ricercatori hanno osservato che le concentrazioni di ctDNA mutato mostravano una più ampia gamma dinamica e una maggiore correlazione con i cambiamenti nella massa tumorale rispetto al dosaggio dell'antigene carboidratico (CA) 15-3 o alle CTC. Come in altri studi, il principale limite di questo approccio è la necessità di una conoscenza precedente delle alterazioni strutturali o nucleotidiche per poter progettare un'analisi molecolare personalizzata. Un altro gruppo ha utilizzato lo SNP array 6,0 Affymetrix per i profili di CNA e la perdita di eterozigotà (LOH) in un gruppo di 65 pazienti affette da cancro al seno, identificando un'amplificazione del DNA altamente focalizzata associata al tumore e cfDNA in regioni cromosomiche, alcune delle quali ospitavano geni con potenziale oncogenico. Sorprendentemente, nei campioni del "follow-up" di 50 pazienti, specifici CNA già presenti nel tumore primario sono stati rilevati nel cfDNA, nonostante non ci sia stata nessun'altra evidenza di malattia nei 12 anni successivi alla diagnosi (73). Ciò indica che potrebbe essere utilizzato un approccio non invasivo per rilevare uno stato di dormienza o la malattia minima residua durante il "follow-up" dei pazienti.

Uno svantaggio dei metodi "genome-wide" è la mancanza di sensibilità analitica e, nonostante i notevoli sforzi per ridurre il tasso di errore del MPS e migliorare i limiti di rilevazione, esemplificati dal metodo "duplex" recentemente proposto (74), nessuno di questi metodi è stato già applicato per l'analisi completa dei genomi tumorali su plasma (Figura 3). Tuttavia, ci sono numerosi

approcci per analizzare i tumori in modo non invasivo, ma non è ancora chiaro quale metodo sarà il migliore. Metodi basati sul sequenziamento "low-coverage" per l'analisi del "copy number" possono da un lato fornire informazioni clinicamente rilevanti in modo economico e veloce (10, 60, 69); dall'altro, questi approcci hanno scarsa sensibilità analitica e non possono rilevare mutazioni nucleotidiche. Al momento, tuttavia, aumentare la profondità del sequenziamento comporta ancora l'incremento dei costi e dei tempi, che rappresenta un ostacolo per il trasferimento in clinica. Considerando il recente calo dei costi di sequenziamento da 108.065 dollari per genoma del 2009 a 4.920 dollari nel 2014 (queste cifre includono operatività, amministrazione, gestione, servizi di pubblica utilità, reagenti e materiali di consumo) e il miglioramento della velocità, il sequenziamento dell'intero genoma per cfDNA sarà probabilmente disponibile per scopi clinici in tempi brevi. Inoltre, stanno iniziando a emergere nuove tecnologie di sequenziamento, come il "nanopore", che potrebbero fornire una migliore accuratezza e affidabilità senza la necessità di amplificare, migliorando così la sensibilità mediante l'eliminazione di una delle principali fonti di "bias".

LA BIOPSIA LIQUIDA IN CLINICA

A oggi sono disponibili solo alcuni studi ampi e controllati in cui è stata applicata l'analisi di ctDNA a scopo clinico. In uno studio effettuato su 105 pazienti con tumori solidi, in fase I di sperimentazione con farmaci a bersaglio molecolare, effettuato utilizzando il sistema Sequenom MassArray e il pannello OncoCarta per il "profiling" delle mutazioni somatiche, è stato dimostrato che la biopsia liquida era utile nei pazienti con cancro in stadio avanzato quando non sarebbe stato facile ripetere la biopsia del tumore e l'analisi genomica delle biopsie tumorali archiviate non era stata ritenuta adeguata (75). Schwarzenbach et al. hanno condotto uno studio multicentrico su una coorte di 388 pazienti con carcinoma mammario primario prima della chemioterapia, analizzando la LOH in un pannello di 8 geni (76). In un altro studio, 108 pazienti affetti da CRC metastatico sono stati monitorati per l'elevata numerosità di alleli mutati dei geni *KRAS/BRAF* nel plasma al momento iniziale e prima di ogni ciclo di trattamento di terza linea con cetuximab e irinotecan (77). Le concentrazioni di cfDNA e *KRAS* diminuivano dal momento iniziale fino al terzo ciclo e aumentavano in fase di progressione, e la perdita di mutazioni era associata ai benefici della terapia, mentre la comparsa di mutazioni durante la terapia poteva essere stata responsabile della resistenza acquisita dalla malattia primaria (77). Lo stesso gruppo ha studiato il cfDNA totale in pazienti affetti da CRC durante il trattamento con chemioterapia di seconda linea e il cfDNA in controlli sani e in pazienti con differenti patologie concomitanti (78). Le concentrazioni del cfDNA erano significativamente più elevate nei pazienti con CRC

rispetto ai controlli, e nei pazienti con concentrazioni elevate è stata riscontrata una sopravvivenza più breve rispetto ai pazienti con concentrazioni più basse (78). Inoltre, la combinazione dell'analisi del cfDNA con le mutazioni di *KRAS* su plasma ha aggiunto un ulteriore valore prognostico (78).

Il potenziale della biopsia liquida nel campo della ricerca clinica sul cancro è riconosciuto, tanto che oggi viene spesso inserita nel disegno di numerosi studi clinici. Tuttavia, per l'implementazione della biopsia liquida nella pratica clinica è necessario standardizzare la fase preanalitica e analitica, in particolare il prelievo del sangue, la sua processazione e il suo stoccaggio, l'estrazione del DNA, la quantizzazione e la validazione in ampi studi clinici prospettici. Il campionamento è facilitato da un punto di vista logistico solo nel corso di studi controllati, fornendo così un numero di campioni statisticamente importante sia in fase di pretrattamento che di "follow-up". I progressi nell'applicazione clinica possono essere ottenuti solo se vengono eseguiti studi a lungo termine con campioni di numerosità adeguata e se i risultati ottenuti sono correlati con la sopravvivenza libera da malattia/sopravvivenza globale e altri dati clinici. Inoltre, poiché la dinamica del rilascio del ctDNA non è stata completamente chiarita e, di conseguenza, i tempi di analisi del ctDNA in relazione alla terapia potrebbero essere importanti, dagli stessi pazienti devono essere raccolti più campioni in momenti diversi. Per esempio, il monitoraggio del ctDNA poco dopo e durante la somministrazione del farmaco potrebbe rivelare varie frazioni alleliche di ctDNA e fornire informazioni preziose sulla cinetica di rilascio del ctDNA.

PROSPETTIVE FUTURE

Numerosi dati hanno dimostrato che l'analisi del ctDNA fornisce uno strumento complementare nella diagnosi, nella prognosi e nella gestione dei pazienti affetti da cancro. Pertanto, il ctDNA può essere utilizzato come biomarcatore non invasivo di neoplasia. Anche se l'identificazione dei biomarcatori è in grande sviluppo, molti tumori non presentano mutazioni genetiche ricorrenti; è quindi evidente la necessità di identificare caratteristiche molecolari cancro-specifiche e migliorare la sensibilità analitica e diagnostica delle analisi "genome-wide". Inoltre, vi è la necessità di porre maggiore attenzione alla complessità dell'eterogeneità intratumorale. Non è chiaro ancora se il ctDNA è rappresentativo di tutti i cloni di cellule metastatiche presenti nei diversi siti o se il ctDNA rappresenta il DNA di specifici subcloni che possono promuovere la progressione clinica e/o la resistenza terapeutica. Pertanto, sono necessarie ulteriori valutazioni cliniche, il confronto dei dati del sequenziamento del DNA su plasma e la valutazione combinata delle biopsie con studi di "imaging" e studi funzionali per valutare nel dettaglio la progressione clinica e/o la resistenza terapeutica. Recenti studi hanno dimostrato che non possiamo certo pensare che l'eterogeneità intratumorale si basi esclusivamente su cambiamenti genetici (79), ma

che bisogna anche prendere in considerazione le modificazioni epigenetiche, aggiungendo così un altro livello di complessità. Le modificazioni epigenetiche, in generale, sono considerate come un evento precoce nella carcinogenesi e, quindi, potrebbero essere un marcatore adatto per la diagnosi precoce. Inoltre, l'identificazione delle modificazioni epigenetiche in modo non invasivo potrebbe fornire un approccio efficace e di valore per la chemioterapia e la chemioprevenzione del cancro.

Nel loro insieme, nonostante tutti gli sforzi per sviluppare strumenti adatti per un'analisi completa del genoma del tumore dal DNA nel plasma, la maggior parte dei processi di laboratorio sono oggi troppo lunghi e costosi per essere applicati in diagnostica. Tuttavia, i costi di sequenziamento scenderanno ulteriormente, data la continua evoluzione tecnologica. Quindi, è solo questione di tempo perché i progressi tecnici e la riduzione di costi consentiranno che l'approccio "genome-wide" ad alta risoluzione possa essere usato come strumento clinico in medicina di laboratorio. La sensibilità analitica delle metodologie è condizionata dalla enorme variabilità e dall'abbondanza dei frammenti mutati in circolo. Questo è un fattore particolarmente cruciale considerando che nel campione analizzato la quantità di DNA specifico per ogni tumore è troppo bassa per le tecniche attualmente disponibili, in particolare nelle fasi iniziali o per stabilire la malattia minima residua. A oggi, tutti i metodi utilizzati basati sul NGS hanno una sensibilità limitata dal tasso di errore della DNA polimerasi, che è generalmente considerato pari a 0,01%. Tuttavia, i metodi di sequenziamento di terza generazione ridurranno al minimo i problemi legati ai "bias" introdotti dall'amplificazione in PCR.

A prescindere dai limiti tecnici, gli sviluppi futuri dovranno fornire standard clinici per validare la biopsia liquida come biomarcatore clinico attraverso studi multicentrici ben progettati e con un numero sufficientemente elevato di campioni.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia Federica Cariati per il contributo alla traduzione.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Schilsky RL. Implementing personalized cancer care. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:432–8.
- Meric-Bernstam F, Mills GB. Overcoming implementation challenges of personalized cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:542–8.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883–92.
- Kleppe M, Levine RL. Tumor heterogeneity confounds and illuminates: assessing the implications. *Nat Med* 2014;20:342–4.
- Amir E, Ooi WS, Simmons C, et al. Discordance between receptor status in primary and metastatic breast cancer: an exploratory study of bone and bone marrow biopsies. *Clin Oncol* 2008;20:763–8.
- Robertson EG, Baxter G. Tumour seeding following percutaneous needle biopsy: the real story! *Clin Radiol* 2011;66:1007–14.
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014;6:224ra24.
- Thierry AR, Moulriere F, El Messaoudi S, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 2014;20:430–5.
- Heitzer E, Auer M, Ulz P, et. Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies. *Genome Med* 2013;5:73.
- Chan KC, Jiang P, Chan CW, et al. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:18761–8.
- Chan KC, Jiang P, Zheng YW, et al. Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. *Clin Chem* 2013;59:211–24.
- Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948;142:241–3.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646–50.
- Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989;46:318–22.
- Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, et al. Molecular detection of APC, K-ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg* 2004;28:721–6.
- Shaw JA, Smith BM, Walsh T, et al. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000;6:1119–24.
- Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:1219–25.
- 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.
- 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;102:16368–73.
- Sikora K, Bedin C, Vicentini C, et al. Evaluation of cell-free DNA as a biomarker for pancreatic malignancies. *Int J Biol Markers* 2015;30:e136–41.
- Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, et al. Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for a preferential release from viable cells? *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:258–64.
- Lo YM, Chan KC, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* 2010;2:61ra91.
- Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA

- of patients with cancer. *Int J Cancer* 2013;133:346–56.
24. Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, et al. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res* 2010;38:6159–75.
 25. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* 2011;6:e23418.
 26. Garcia-Olmo DC, Picazo MG, Toboso I, et al. Quantitation of cell-free DNA and RNA in plasma during tumor progression in rats. *Mol Cancer* 2013;12:8.
 27. Garcia-Olmo DC, Domínguez C, García-Arranz M, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res* 2010;70:560–7.
 28. Mouliere F, El Messaoudi S, Pang D, et al. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol Oncol* 2014;8:927–41.
 29. Yu SC, Lee SW, Jiang P, et al. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clin Chem* 2013;59:1228–37.
 30. Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218–24.
 31. Lo YM, Leung SF, Chan LY, et al. Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:2351–5.
 32. To EW, Chan KC, Leung SF, et al. Rapid clearance of plasma Epstein-Barr virus DNA after surgical treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:3254–9.
 33. Jung M, Klotzke S, Lewandowski M, et al. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem* 2003;49:1028–9.
 34. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem* 2006;52:1062–9.
 35. Chan KC, Yeung SW, Lui WB, et al. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem* 2005;51:781–4.
 36. Swinkels DW, Wiegeler E, Steegers EA, et al. Effects of blood-processing protocols on cell-free DNA quantification in plasma. *Clin Chem* 2003;49:525–6.
 37. Sonnenberg A, Marciniak JY, Rassenti L, et al. Rapid electrokinetic isolation of cancer-related circulating cell-free DNA directly from blood. *Clin Chem* 2014;60:500–9.
 38. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem* 2014;406:6499–512.
 39. Breitbach S, Tug S, Helmig S, et al. Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *PLoS One* 2014;9:e87838.
 40. Sozzi G, Conte D, Leon M, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:3902–8.
 41. Kim K, Shin DG, Park MK, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res* 2014;86:136–42.
 42. Chen X, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, et al. Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:2297–303.
 43. Sozzi G, Conte D, Mariani L, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:4675–8.
 44. Madhavan D, Wallwiener M, Bents K, et al. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Breast Cancer Res Treat* 2014;146:163–74.
 45. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett* 2008;263:170–81.
 46. Leary RJ, Sausen M, Kinde I, et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med* 2012;4:162ra54.
 47. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2008;22:771–82.
 48. McBride DJ, Orpana AK, Sotiropoulos C, et al. Use of cancer-specific genomic rearrangements to quantify disease burden in plasma from patients with solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:1062–9.
 49. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut* 2014;63:317–25.
 50. Chan KC, Hung EC, Woo JK, et al. Early detection of nasopharyngeal carcinoma by plasma Epstein-Barr virus DNA analysis in a surveillance program. *Cancer* 2013;119:1838–44.
 51. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoue F, et al. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer* 2002;100:542–8.
 52. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008;14:985–90.
 53. Spindler KL, Pallisgaard N, Vogelius I, et al. 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;18:1177–85.
 54. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013;368:1199–209.
 55. Bidard FC, Madic J, Mariani P, et al. Detection rate and prognostic value of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. *Int J Cancer* 2014;134:1207–13.
 56. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res* 2012;18:2391–401.
 57. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1757–65.
 58. Kuo YB, Chen JS, Li YS, et al. Comparison of KRAS mutation analysis of primary tumors and matched circulating cell-free DNA in plasmas of patients with colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 2014;433:284–9.
 59. Diaz LA Jr., Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486:537–40.
 60. 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 Genetic* 2014;10:e1004271.
 61. 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;133:1259–65.
62. Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012;486:532–6.
63. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov* 2013;3:658–73.
64. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994;86:774–9.
65. Taly V, Pekin D, Benhaim L, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem* 2013;59:1722–31.
66. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9236–41.
67. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 2014;20:548–54.
68. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, et al. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:9530–5.
69. Heitzer E, Ulz P, Belic J, et al. Tumor associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. *Genome Med* 2013;5:30.
70. Martinez P, McGranahan N, Birkbak NJ, et al. Computational optimisation of targeted DNA sequencing for cancer detection. *Sci Rep* 2013;3:3309.
71. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* 2012;4:136ra68.
72. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013;497:108–12.
73. Shaw JA, Page K, Blighe K, et al. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. *Genome Res* 2012;22:220–31.
74. Schmitt MW, Kennedy SR, Salk JJ, et al. Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:14508–13.
75. Perkins G, Yap TA, Pope L, et al. Multi-purpose utility of circulating plasma DNA testing in patients with advanced cancers. *PloS One* 2012;7:e47020.
76. Schwarzenbach H, Eichelsler C, Kropidowski J, et al. Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2012;18:5719–30.
77. Spindler KL, Pallisgaard N, Andersen RF, et al. Changes in mutational status during third-line treatment for metastatic colorectal cancer—results of consecutive measurement of cell free DNA, KRAS and BRAF in the plasma. *Int J Cancer* 2014;135:2215–22.
78. Spindler KL, Appelt AL, Pallisgaard N, et al. Cell-free DNA in healthy individuals, non-cancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2014;135:2984–91.
79. Kreso A, O'Brien CA, van Galen P, et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science* 2013;339:543–8.