



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00234

(22) Data de depozit: 06/05/2022

(41) Data publicării cererii:  
29/11/2023 BOPI nr. 11/2023

(71) Solicitant:  
• ONCO TEAM DIAGNOSTIC SA,  
CALEA GRIVIȚEI, NR.365, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• INVENTATORI NEDECLARAȚI, \*, RO

(74) Mandatar:  
ROMPATENT DESIGN S.R.L., STR.ȚEPEȘ  
VODĂ NR.130, ET.1, AP.C1, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI

(54) **MODEL DE DETERMINARE A PROFILULUI MOLECULAR  
TUMORAL DIN SÂNGELE PERIFERIC AL PACIENȚILOR  
ONCOLOGICI ÎN STADII AVANSATE PENTRU  
PERSONALIZAREA ȘI MODULAREA ABORDĂRII  
TERAPEUTICE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de determinare a profilului molecular tumoral din sângele periferic al pacienților oncologici în stadii avansate pentru dezvoltarea unei scheme terapeutice adecvate în timp real. Metoda, conform invenției, constă în:

(I) analiza prin tehnica de secvențiere de nouă generație (NGS) a unui anumit set de gene din materialul genetic liber circulant în sângele periferic al pacienților cu cancer pulmonar tip NSCLC și cu cancer colorectal în stadii avansate și

(II) compararea acestui profil molecular cu cel obținut în urma analizei NGS a unui set de gene din materialul genetic extras din țesut tumoral prin biopsie simultan cu prelevarea probei de sânge, fiind identificate 41 de mutații în țesut tumoral, din care 23 au fost detectate și în plasmă, cu rate de detecție semnificativ crescute în plasmă la pacienții în stadiul IV comparativ cu Stadiul I.

Revendicări: 1  
Figuri: 5



## MODEL DE DETERMINARE A PROFILULUI MOLECULAR TUMORAL DIN SANGELE PERIFERIC AL PACIENTILOR ONCOLOGICI IN STADII AVANSATE PENTRU PERSONALIZAREA SI MODULAREA ABORDARII TERAPEUTICE

### 1. INTRODUCERE

Din totalitatea cazurilor de cancer diagnosticate anual în România, cancerul pulmonar și cancerul colorectal sunt cele mai frecvente tipuri de cancer. Mai mult, datorită progresiei asimptomatice a acestor patologii maligne, peste 50% din totalitatea pacienților diagnosticați cu cancer colorectal, și respectiv peste 70% din totalitatea pacienților cu cancer pulmonar se află în stadii avansate (III – IV) ale bolii în momentul diagnosticului [1]. Acești pacienți prezintă opțiuni terapeutice limitate, dezvoltarea unei scheme de tratament eficientă fiind crucială pentru prelungirea speranței de viață și îmbunătățirea calității vieții. În acest context, cea mai mare provocare actuală în managementul clinic oncologic al pacienților aflați în stadii avansate de cancer este personalizarea schemei de tratament în funcție de particularitățile moleculare identificate la nivelul tumorilor.

În momentul de față, dezvoltarea unei scheme de tratament și modularea terapiei se bazează pe analiza biopsiei de țesut [2], însă această abordare clasică prezintă numeroase dezavantaje printre care: i) uneori situs-ul tumoral nu este accesibil prelevării piesei de țesut; ii) cantitatea de țesut prelevată este limitată, fiind insuficientă în cele mai multe cazuri pentru testări moleculare; iii) repetarea biopsiei este uneori imposibilă datorită stării pacientului sau abordării dificile; iv) biopsia clasică este o tehnică minim invazivă sau invazivă care nu permite prelevări succesive; v) imposibilitatea efectuării biopsiei tisulare în cazul leziunilor maligne secundare și limitarea deciziilor terapeutice doar pe baza informațiilor obținute ca urmare a analizei leziunii primare; vi) prezența unor artefacte din etapa preanalitică care determină degradarea acizilor nucleici (electroexcizia, ischemia rece). Astfel, biopsia de țesut oferă o imagine limitată asupra profilului molecular complex al tumorii primare și al metastazelor, care caracterizează momentul prelevării și nu permite abordarea heterogenității intratumorale și a evoluției clonale în dinamică, parametrii cheie în modularea răspunsului la tratament și dezvoltarea unor mecanisme de rezistență la schema de tratament administrată [3,4,5].

Biopsia lichidă depășește limitările impuse de biopsia clasică, fiind o tehnică non – invazivă care poate fi realizată în mod repetat și care oferă informații în timp real asupra dinamicii tumorale pe baza analizei markerilor tumorali circulanți (celule circulante tumorale, ADN circulant tumoral, exozomi) [6]. Astfel, biopsia lichidă este un instrument modern și important în evaluarea heretogenității intratumorale. În mod special, ADN circulant tumoral (ADNct) prezintă un imens potențial ca biomarker în terapia personalizată a pacienților cu cancere avansate deoarece poartă semnătura genetică a celulelor tumorale din care provine. Astfel, analiza ADNct permite identificarea cu ușurință și în timp real a mutațiilor prezente la nivelul tumorii primare și a metastazelor asociate, fiind astfel un analit adecvat pentru modularea terapiei în cancer [7]. Fragmentele de ADN eliberate în fluide biologice (ADNc) prin diferite procese fiziologice pot fi identificate și la persoane sănătoase. Din totalul fragmentelor ADNc, 0.01% - 90% sunt reprezentate de ADNct, concentrația acestora fiind direct dependentă de stadiul bolii. Principalul mecanism de eliberare a ADNct este apoptoza sau necroza celulelor tumorale aflate fie la nivelul tumorii primare, fie la nivelul leziunilor metastatice [8]. ADNct este caracterizat printr-un grad înalt de fragmentare (180 – 200 pb), un timp de înjumătățire scurt (15 minute – 1.5 ore) și cel mai important, este purtător al defectelor genetice prezente în celulele tumorale din care provine [9]. Astfel, investigarea alterărilor moleculare la nivelul ADNct poate fi utilizată pentru realizarea unui profil molecular complet și actualizat al tumorii, extrem de valoros pentru dezvoltarea unei scheme terapeutice adecvate. Datorită ușurinței cu care poate fi realizată această analiză, ea contribuie la evaluarea în timp real a răspunsului la tratament și la monitorizarea dezvoltării rezistenței la tratament, fiind un instrument valoros în modularea și personalizarea terapiei în cancer [10,11].

Astfel, modularea terapiei în timp real, în conformitate cu profilul molecular al tumorii este absolut necesară pentru îmbunătățirea prognosticului cu potențial de prelungire a vieții. Realizarea unui profil molecular bazat pe secvențierea de nouă generație (NGS) a ADNct izolat din sângele pacienților aflați în stadii avansate de cancer pulmonar și colorectal va conduce la creșterea eficienței schemelor de tratament administrate pacienților din România. Avantajul major al analizei ADNct prin secvențiere de nouă generație (NGS) constă în complexitatea datelor furnizate ca urmare a tehnologiei ultra moderne care permite screeningul a numeroase alterări moleculare, printr-o singură analiză, utilizând o singură probă. În concluzie, rezultatele obținute în urma analizei datelor de secvențiere are un imens impact asupra modulării

tratamentului pacienților, oferind posibilitatea de adaptare în timp real a terapiei pe baza dinamicii modificărilor moleculare identificate.

În literatura se cunosc câteva brevete în care este abordată problema biopsiei lichide:

**Brevetul US20200370123A1** prezintă o metodă de monitorizare a diseminării tumorale, care cuprinde: măsurarea într-o probă de sânge sau de scaun a unui pacient cu cancer a numărului de copii ale unei gene care are o mutație patologică ce este prezentă și în țesutul tumoral al pacientului, iar numărul de copii identificat este un indice al "încărcăturii" tumorale la pacient.

**Brevetul US20180087114A1** prezintă o metodă de cuantificare a unei mutații patologice în ADNct dintr-o varietate de fluide corporale prelevate de la un pacient, la diferite momente după inițierea terapiei.

**Problema tehnică** pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unui model care servește la determinarea profilului molecular tumoral din sângele periferic al pacienților oncologici în stadii avansate ale bolii. Conform invenției, modelul constă în: (i) analiza prin tehnica de secvențiere de nouă generație (NGS - *next generation sequencing*) a unui anumit set de gene din materialul genetic tumoral liber circulant în sângele periferic al pacienților cu cancer pulmonar tip NSCLC (*Non Small Cells Lung Carcinoma*) și cu cancer colorectal în stadii avansate și (ii) compararea acestui profil molecular cu cel obținut în urma analizei prin aceeași metodă, a unui set de gene din materialul genetic extras din țesutul tumoral (biopsie) simultan cu prelevarea probei de sânge.

Concret, acest model constă într-un protocol de validare al profilului molecular tumoral din sângele periferic al pacienților cu cancer în stadii avansate prin compararea cu profilul molecular tumoral obținut prin analiza biopsiei de țesut tumoral provenit de la același pacient (fig.1).

În continuare vor fi descrise materialele utilizate în studiul experimental cât și metodele necesare pentru obținerea rezultatelor descrise în cererea de brevet.

## 2. MATERIALE SI METODE

### 2.1. Înrolare pacienți

Toate studiile au fost realizate în conformitate cu normele europene în vigoare, conform Declarației de la Helsinki, și cu avizul comisiilor de etică ale instituțiilor partenere: aviz Comisie de Etică OncoTeam Diagnostic SA: 30/10.10.2019 și aviz Comisie de Etica a Universității din București: 74/09.10.2019. Toți pacienții înrolați în studiu au fost anterior diagnosticați fie cu cancer pulmonar de tip NSCLC, fie cu cancer colorectal în stadii avansate și și-au dat consimțământul scris pentru participarea la studiu.

### 2.2. Izolare ADN circulant tumoral

Izolarea ADNct s-a realizat cu ajutorul kitului *MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation Kit - A36716* (AppliedBioSystems). Acest kit este conceput pentru izolarea cfNA din probele de plasmă umană. Kitul utilizează tehnologia și chimia de extracție *Dynabeads™ MyOne™ SILANE*, asigurând recuperarea reproductibilă a cfNA, incluzând cfADN, cfARN și cf miARN, adecvat pentru o gamă largă de aplicații, inclusiv secvențierea NGS, genotiparea, qPCR și dPCR.

Probele biologice cuprinse în loturile de pacienți au fost prelucrate manual pentru extracția cfNA astfel:

- Pregătirea plasmei fără celule
  - sângele a fost centrifugat la 2000 x g, timp de 10 minute, la 4 °C;
  - plasma a fost transferată într-un tub nou fără a se agita fracția de monocite (buffy coat);
  - plasma a fost centrifugată la 16000 x g, timp de 10 minute, la 4 °C;
  - supernatantul a fost transferat într-un tub nou pentru digestia cu Proteinaza K
- Digestia cu Proteinaza K
  - procedura a fost realizată într-un tub de 50 ml în care au fost introduce componentele din tabelul de mai jos:

Componente pentru digestia cu Proteinaza K	Volum de plasmă	
	2 ml	4 ml
MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Proteinase K (20 mg/mL)	30 µL	60 µL
Plasma	2 ml	4 ml
MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Lysis/Binding Solution	1 ml	2 ml
<b>VOLUM TOTAL</b>	<b>3,03 ml</b>	<b>6,06 ml</b>

- incubare 30 minute la 65 °C cu agitare 1000 rpm;
- probele au fost răcite pe gheață timp de 5 minute

- Legarea cfNA la bile magnetice:

- se adaugă soluția MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Lysis/Binding la plasma obținută în urma digestiei cu Proteinaza K, conform tabelului de mai jos:

Volum inițial de plasmă	Soluția Lysis/Binding
2 ml	1,5 ml
4 ml	3 ml

- se adaugă conform tabelului de mai jos soluția MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid de bile magnetice după ce a fost foarte bine vortexată:

Volum inițial de plasmă	Soluția de bile magnetice
2 ml	60 µl
4 ml	120 µl

- se asigură o agitare de 10 minute la 1000 rpm pentru amestecarea și legarea cfNA la bilele magnetice
- se așează tubul în magnetul DynaMag™ – 50 pentru 5 minute
- se aruncă supernatantul
- Spălarea bilelor magnetice:
  - se resuspendă bilele magnetice în 1 ml soluție de spălare 1 din kit și se amestecă prin pipetare;

- se transferă întreg conținutul tubului într-un nou tub de 1,5 ml care se plasează în magnetul DynaMag™ – 2 pentru 20 secunde;
- supernatantul obținut se preia pentru a se spăla cu el tubul initial de 50 ml și apoi se introduce în tubul nou de 1,5 ml din magnet;
- tubul de 1,5 ml se lasă 2 minute în magnet, după care supernatantul este aruncat;
- se adaugă 1 ml etanol 80%;
- se vortexează și se centrifughează scurt;
- tubul se re poziționează în magnetul DynaMag™ – 2 timp de 2 minute
- se aruncă supernatantul și se repeat procedura de spălare cu etanol;
- Eluarea cfNA:
  - bilele magnetice se usucă în aer timp de 5 minute și apoi se elimină orice urmă de etanol cu o micropipetă;
  - se resuspendă bilele în 400 μl soluție MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Elution și se vortexează 5 minute la viteză mare;
  - se centrifughează scurt și apoi se introduce tubul în magnetul DynaMag™ – 2 pentru 2 minute;
  - supernatantul se transferă într-un tub nou de 1,5 ml.
- Concentrarea și spălarea cfNA:
  - se adaugă 500 μl soluție MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Lysis/Binding;
  - se adaugă 10 μl soluție foarte bine vortexată de MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Magnetic Beads;
  - se vortexează 5 minute la viteză mare;
  - se centrifughează scurt și apoi se introduce tubul în magnetul DynaMag™ – 2 pentru 5 minute;
  - se aruncă supernatantul;
  - se adaugă 1 ml soluție de spălare 1 din kit;
  - se vortexează și se centrifughează scurt;
  - se introduce tubul în magnetul DynaMag™ – 2 pentru 2 minute;
  - se aruncă supernatantul;
  - se adaugă 1 ml etanol 80%;
  - se vortexează și se centrifughează scurt;
  - se introduce tubul în magnetul DynaMag™ – 2 pentru 2 minute;
  - se aruncă supernatantul;
  - se repeat etapa de spălare cu etanol 80%.

- Eluarea cfNA concentrat:
  - o se usucă bilele magnetice în magnetul DynaMag™ – 2 timp de 3 minute;
  - o se adaugă 15 µl soluție MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Elution și se vortexează 5 minute la viteză mare;
  - o se centrifughează scurt și apoi se introduce tubul în magnetul DynaMag™ – 2 pentru 2 minute;
  - o supernatantul se transferă într-un tub nou de 1,5 ml.

!Probele astfel prelucrate se păstrează pe gheață în cazul utilizării imediate sau se stochează la -20 °C sau -80 °C pe termen îndelungat.

### 2.3. Analiza NGS pentru determinarea profilului molecular tumoral din sângele periferic al pacienților oncologici

Materialul genetic extras conform protocolului de extracție descris în raportul etapei 1 folosind kit-ul *MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation Kit - A36716 (AppliedBioSystems)*, a fost supus următoarei proceduri (fig.2):

1. Revers transcrierea cfNA
2. Amplificare
3. Purificarea ampliconilor
4. Amplificarea ampliconilor țintă cu primeri marcați cu cod de bare
5. Purificarea librăriei marcate cu coduri de bare
6. Selectarea dimensiunii librăriei marcate cu coduri de bare
7. Cuantificarea librăriei prin qPCR

Pentru analiza NGS a fost optimizat un protocol de lucru cu un panel alcătuit din 52 gene care include:

- regiuni hotspot (SNVs) și scurte indel (insertii-deletii) - AKT1, ALK, AR, ARAF, BRAF, CHEK2, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, NRAS, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, RET, ROS1, SF3B1, SMAD4, SMO;
- fuziuni genice - ALK, BRAF, ERG, ETV1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, NTRK1, NTRK3, RET, ROS1;
- MET exon 14 skipping;
- variații ale numărului de copii (CNVs – copy number variations) - CCND1, CCND2, CCND3, CDK4, CDK6, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, MYC;
- gene supresoare tumorale - APC, FBXW7, PTEN, TP53.



Aceste gene prezinta frecvent mutatii in numeroase tipuri de cancer: creier si sistem nervos central, vezica, cervix, san, colorectal, endometru, esofag, stomac, cap si gat, rinichi, ficat, plaman, melanom, ovar, pancreas, prostata, sarcom, tiroida. Secventierea a fost efectuata utilizand platforma Next-Generation Sequencing Ion S5 (Thermo Fisher Scientific) si Ion Torrent. Analiza rezultatelor pentru investigarea mutatiilor s-a realizat cu ajutorul softului Ion Reporter si OncoPrint Knowledge Database.

Limita de detectie:

- SNVs/scurte indels: pana la 0.1% frecventa alelica cu o sensibilitate de >80% si o specificitate >98%;
- TP53 SNVs/indels: 0.5% frecventa alelica;
- Fuziuni genice si MET exon skipping: limita de detectie pana la 1%;
- CNVs: detectia unei modificari de pana la 1.4 ori.

#### 2.4. Determinarea profilului molecular tumoral din țesut tumoral

Demonstrarea funcționalității modelului s-a realizat prin analiza NGS a biopsiilor din parafină cu kitul IVD OncoPrint Solid Tumor, aprobat FDA. Pentru aceasta, în cadrul laboratorului de Biologie Moleculară al OncoPrint Diagnostic există deja un protocol standardizat de lucru care include următoarele etape:

1. Izolarea ADN cu ajutorul kitului RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific)
2. Cuantificarea ADN folosind Qubit Fluorometer 4.0
3. Amplificarea tintelor ADN
4. Digestia partial a primerilor
5. Ligarea adaptorilor la ampliconi
6. Purificarea librariilor
7. Amplificarea librăriei purificate
8. Adaugarea LIB Beads si spalarea librăriei
9. Eluarea librăriei
10. Combinarea librariilor
11. Efectuarea templating si incarcarea librariilor pe cip folosind Ion Chef
12. Secventierea ampliconilor librariilor specifice Ion S5 Gene Studio

Detectia mutatiilor specifice cu ajutorul softului Ion Reporter si OncoPrint Knowledge Database.

#### 2.5. Analiza statistică

Datele brute au fost organizate în Excel și GraphPad Prism 5 și Python 3 (folosind bibliotecile matplotlib și Seaborn) și au fost folosite pentru analiza și vizualizarea rezultatelor. Frecvența alelelor plasmatice a urmat o distribuție log-normală. Deoarece rezultatele frecvenței alelelor tumorale au trecut de verificarea

normalității, aceste rezultate au fost utilizate ca atare. Corelația dintre parametrii de plasmă și tumori a fost testată prin corelația de rang Spearman, testul de rang Wilcoxon (utilizat pentru analiza coloanei) și testul exact Fisher pentru analiza datelor non numerice.

### 3. REZULTATE OBTINUTE IN CADRUL CERERII DE BREVET DE INVENTIE

Grupul țintă al studiului a fost descris în tabelul de mai jos (tabel 1):

**Tabel 1: Descrierea grupului țintă de pacienți luați în studiu**

<b>Număr de pacienți</b>	<b>27</b>
<b>Vârsta (media <math>\pm</math> deviația standard)</b>	<b>65.1 <math>\pm</math> 9.7</b>
<b>Sex</b>	
<b>Feminin</b>	<b>9 (33%)</b>
<b>Masculin</b>	<b>18 (66%)</b>
<b>Grad de diferențiere</b>	
<b>Bine diferențiat (G1 și G1/G2)</b>	<b>1 (3.7%)</b>
<b>Moderat diferențiat (G2)</b>	<b>14 (51.9%)</b>
<b>Slab diferențiat (G3)</b>	<b>9 (33.3%)</b>
<b>N/A</b>	<b>3 (11.1%)</b>
<b>Stadializare TNM</b>	
<b>Stadiul I</b>	<b>2 (7.4%)</b>
<b>Stadiul II</b>	<b>2 (7.4%)</b>
<b>Stadiul III/IV</b>	<b>10 (37%)</b>
<b>Stadiul IV</b>	<b>13 (48.1%)</b>

Comparând profilul molecular obținut din țesutul tumoral cu cel obținut din sângele periferic al pacienților, s-a observat că cele mai frecvente mutații au fost: KRAS identificată la 11 din 27 pacienți (40.7%), P53 identificată în 10 din 27 pacienți (37%) și PIK3Ca identificată în 6 din 27 pacienți (22.2%) (fig.3).

Din cele 41 de mutații care au fost identificate în țesutul tumoral, 23 au putut fi detectate și în plasmă, obținându-se o rată de detecție de 56,1%. Mai mult, 5 mutații de la 5 pacienți diferiți au fost detectate doar în plasmă, lăsând incertă sursa acestui

ADN circulant mutant. Aceasta observație ar putea fi totuși explicate fie prin heterogenitatea tumorii primare, fie prin evoluția tumorii în situsurile metastatice (2 dintre acești pacienți aveau metastaze cunoscute) (fig. 3).

Pentru mutațiile identificate atât în plasmă, cât și în țesutul tumoral, valorile procentuale ale variației alelice detectate în plasmă au fost în toate cazurile mai mici decât cele măsurate în țesut ( $p < 0,0001^{***}$ , testul de rang Wilcoxon), totuși, cu cât variația alelică a fost mai mare în țesutul tumoral, cu atât valoarea corespunzătoare în plasmă tinde să fie mai mare (Spearman  $r = 0,466$ , valoarea  $p = 0,0063^{**}$ ) (fig. 4).

Rata de detectare a mutațiilor în plasmă depinde de stadiul bolii, cu 0% detecție la pacienții în stadiul I (0/3 mutații tisulare detectate în plasmă), 50% detecție în stadiul II (3/6 mutații), 37,5% detecție în stadiul III (6 /16 mutații) și 85,71% detecție în Stadiul IV (12/14 mutații), cu rate semnificativ crescute de detecție la pacienții în Stadiul IV comparativ cu Stadiul I ( $p = 0,0103^*$ , Testul Fisher Exact) și Stadiul III ( $p = 0,0046^{**}$ ) (fig. 5).

## CONCLUZII

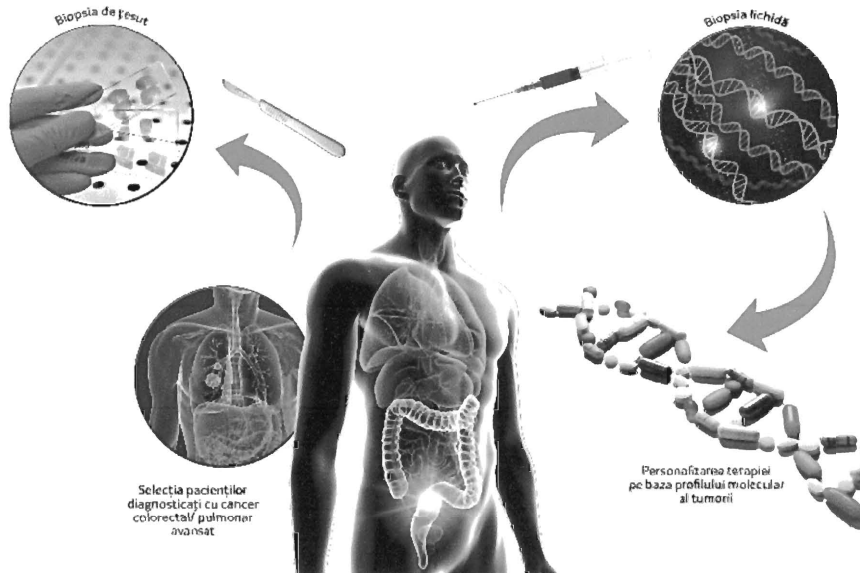
- Din cele 41 de mutații care au fost identificate în țesutul tumoral, 23 au putut fi detectate și în plasmă, obținându-se o rată de detecție de 56,1%.
- Rata de detectare a mutațiilor în plasmă depinde de stadiul bolii, cu rate statistic semnificativ crescute de detecție la pacienții în Stadiul IV comparativ cu Stadiul I

**REFERINTE BIBLIOGRAFICE**

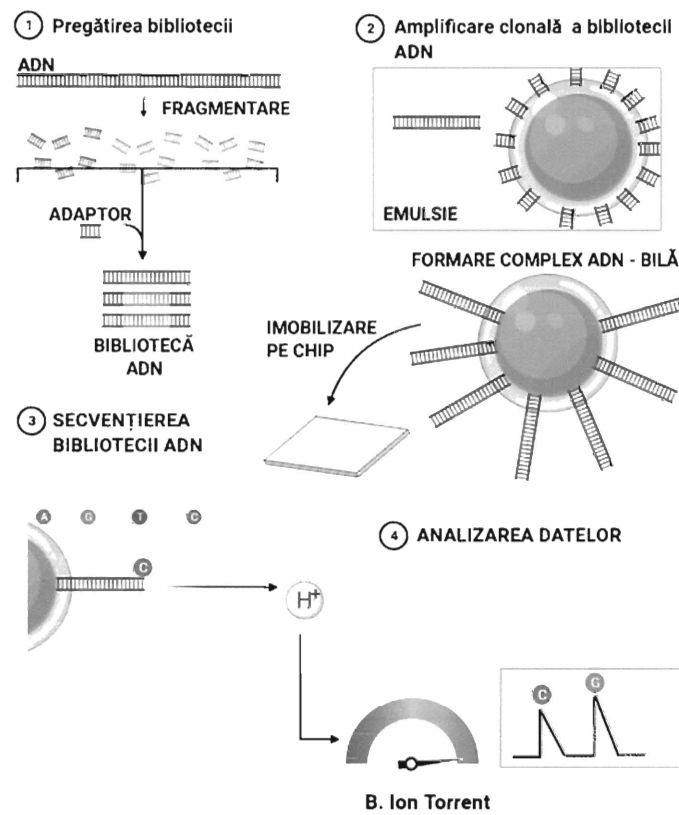
1. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
2. Domínguez-Vigil, I. G., Moreno-Martínez, A. K., Wang, J. Y., Roehrl, M. H., & Barrera-Saldaña, H. A. (2018). The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget*, 9(2), 2912.
3. Sholl, L. M., Aisner, D. L., Allen, T. C., Beasley, M. B., Cagle, P. T., Capelozzi, V. L., ... & Mino-Kenudson, M. (2016). Liquid biopsy in lung cancer: a perspective from members of the pulmonary pathology society. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 140(8), 825-829.
4. Bedard, P. L., Hansen, A. R., Ratain, M. J., & Siu, L. L. (2013). Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*, 501(7467), 355.
5. Cheung, A. H. K., Chow, C., & To, K. F. (2018). Latest development of liquid biopsy. *Journal of thoracic disease*, 10(Suppl 14), S1645.
6. Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 14(9), 531.
7. Diaz Jr, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology*, 32(6), 579.
8. Wang, J., & Bettegowda, C. (2017). Applications of DNA-based liquid biopsy for central nervous system neoplasms. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 19(1), 24-34.
9. Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M. A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., ... & Kinzler, K. W. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature medicine*, 14(9), 985.
10. Herbreteau, G., Vallée, A., Charpentier, S., Normanno, N., Hofman, P., & Denis, M. G. (2019). Circulating free tumor DNA in non-small cell lung cancer (NSCLC): clinical application and future perspectives. *Journal of thoracic disease*, 11(Suppl 1), S113.
11. Ulz, P., Heitzer, E., Geigl, J. B., & Speicher, M. R. (2017). Patient monitoring through liquid biopsies using circulating tumor DNA. *International journal of cancer*, 141(5), 887-896.

## REVEDICARI

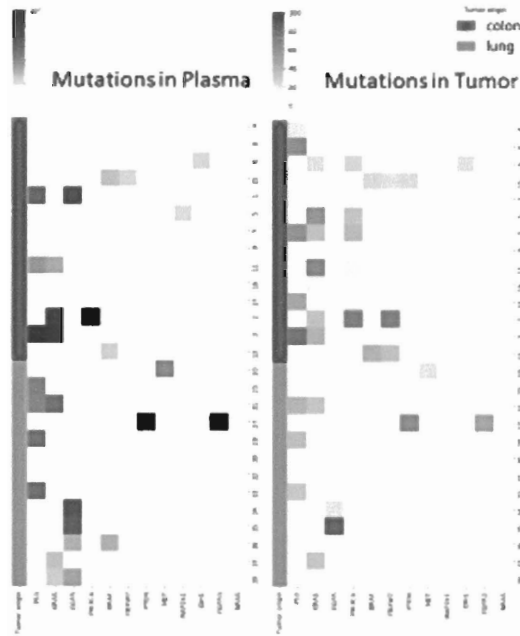
**1. Model de determinare al profilului molecular tumoral din sângele periferic al pacienților cu cancer pulmonar de tip NSCLC și colorectal, în stadii avansate ce constă în (i) analiza prin tehnica de secvențiere de nouă generație (NGS - *next generation sequencing*) a unui anumit set de gene din materialul genetic tumoral liber circulant în sângele periferic al pacienților cu cancer pulmonar tip NSCLC (*Non Small Cells Lung Carcinoma*) și cu cancer colorectal în stadii avansate și (ii) compararea acestui profil molecular cu cel obținut în urma analizei prin aceeași metodă, a unui set de gene din materialul genetic extras din țesutul tumoral (biopsie) simultan cu prelevarea probei de sânge.**



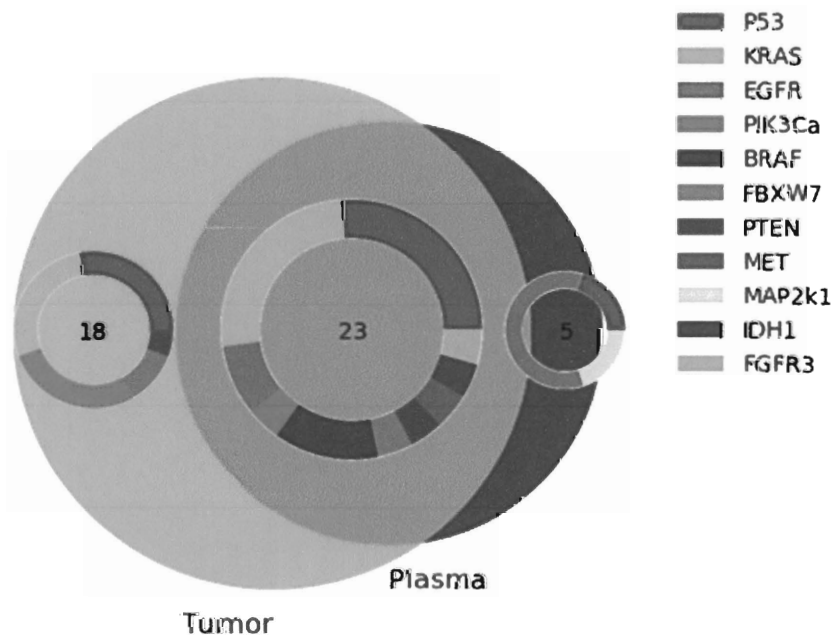
**Figura 1:** Reprezentare schematică a avantajelor utilizării biopsiei lichide



**Figura 2:** Secvențierea cu platforma Ion Torrent (ThermoFischer Scientific)



**Figura 3:** Heatmap ilustrând distribuția mutațiilor în plasma versus țesut pentru fiecare pacient luat în studiu, în funcție de patologie



**Figura 4:** Reprezentare grafică a numărului și tipului de mutații detectate doar în țesut (18 mutații), atât în țesut cât și în plasmă (23 de mutații) și doar în plasmă (5 mutații).

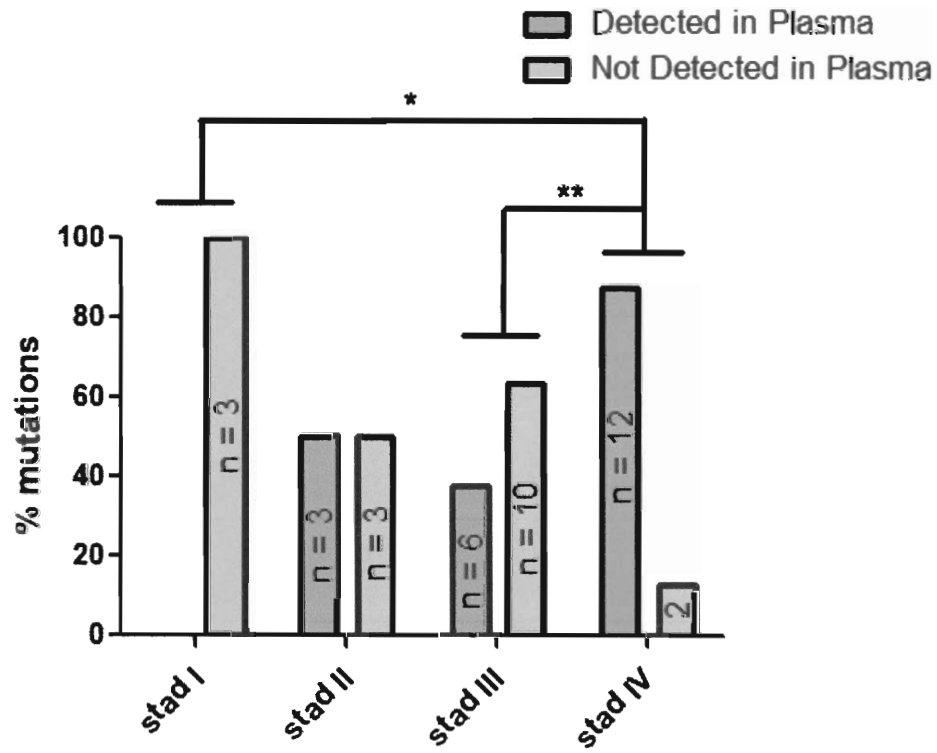


Figura 5: Grafic reprezentând corelația dintre rata de detectare a mutațiilor în sânge, în raport cu stadiul bolii