

Rigor and Reproducibility for Liquid Biopsy

Matthew Young, PhD

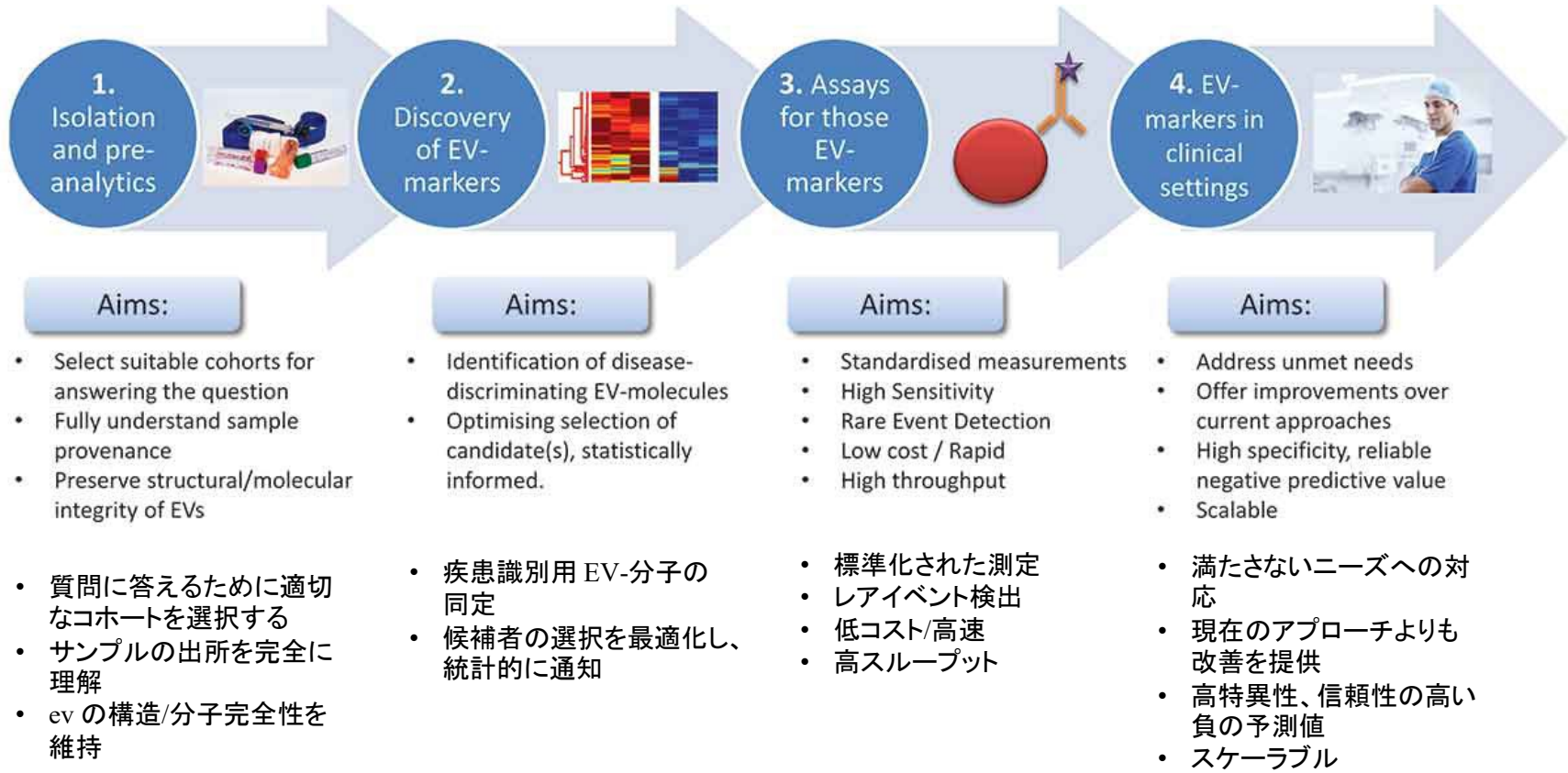
**Cancer Biomarkers Research Group (CBRG)
Division Of Cancer Prevention**

Rigor and Reproducibility for Liquid Biopsy

1. Early Detection Research Network (EDRN)
2. Liquid Biopsy Consortium
3. Rigor and Reproducibility for Exosome-Derived Analytes for Cancer Detection
4. Reference Material from National Institute of Standards and Technology (NIST)
5. Blood Profiling Atlas in Cancer (BloodPAC)

1. 早期発見研究ネットワーク (EDRN)
2. リキッドバイオプシーコンソーシアム
3. がん検出のためのエクソソーム由来分析物の厳密性と再現性
4. 国立標準技術研究所 (NIST) の参考資料
5. 癌における血液プロファイリングアトラス (BloodPAC)

Liquid Biopsy from Bench to Bedside



National Biomarker Development Alliance top ten reasons for the failure in developing effective biomarkers

NBDA * 効果的なバイオマーカーの開発に失敗したトップ10の理由

- | | | | |
|----|---|----|---|
| 1 | Poor access to rigorously annotated, fit-for-purpose biospecimens from stringently phenotyped sources | 1 | 嚴重 phenotyped ソースからの厳密に注釈された、適合する目的の分担への貧弱なアクセス |
| 2 | Insufficient control of pre-analytical parameters | 2 | 分析前パラメータの制御が不十分 |
| 3 | Low reproducibility of academic publications | 3 | 学術刊行物の再現性が低い |
| 4 | Incomplete understanding of physiology | 4 | 生理学の不完全な理解 |
| 5 | Variable analytical standards | 5 | 可変分析標準 |
| 6 | Idiosyncratic laboratory-specific analytical methods | 6 | 特有研究室固有の分析方法 |
| 7 | Small studies lacking statistical power | 7 | 統計的な力を欠いた小さな研究 |
| 8 | Chaotic data reporting formats and poor database interoperability | 8 | 混沌としたデータ・レポート形式とデータベースの相互運用性の低下 |
| 9 | Poor compliance on reporting standards by scientific journals | 9 | 科学雑誌による報告基準への不十分なコンプライアンス |
| 10 | Poor to non-existent quality management systems | 10 | 非存在の品質管理システムに乏しい |

*National Biomarker Development Alliance (NBDA) (Arizona State University, USA)

Summary of the ISEV workshop on extracellular vesicles as disease biomarkers, December 2017,

Journal of Extracellular Vesicles, 7:1

The Early Detection Research Network (EDRN)

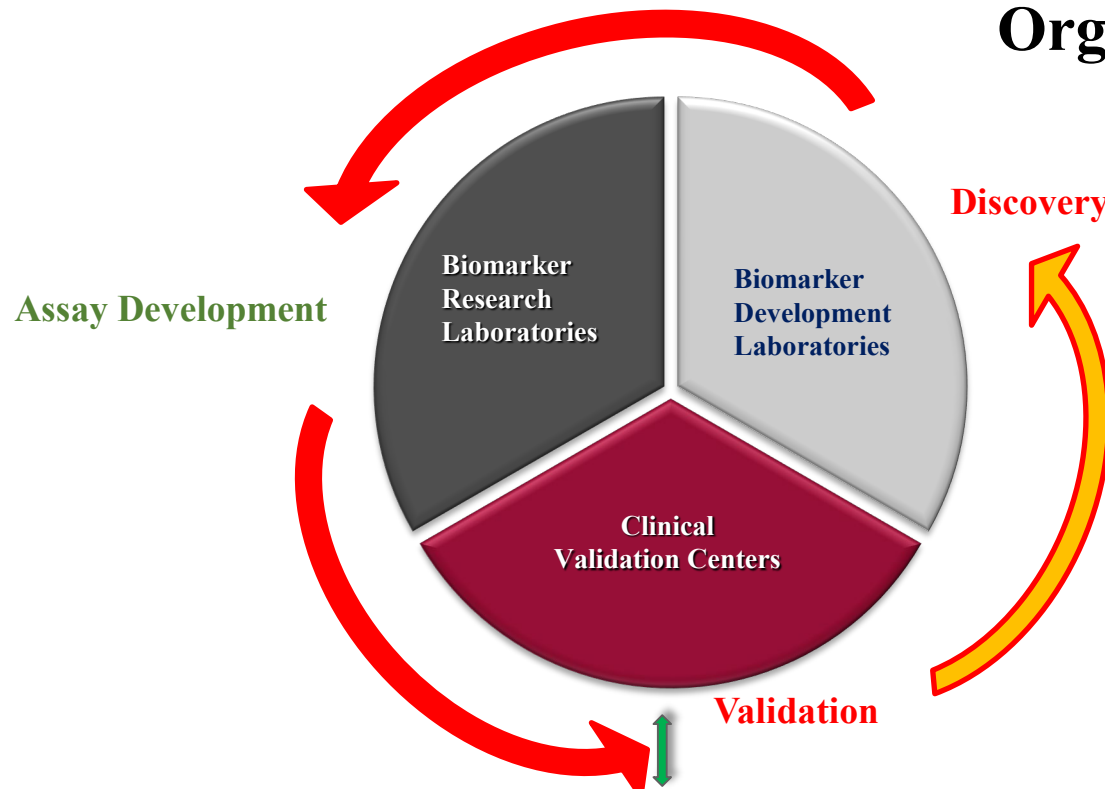
早期発見研究ネットワーク (EDRN)



Sudhir Srivastava,
PhD, MPH
Chief

-
- EDRN established in 2000
 - Focused solely on biomarker research for early detection and risk prediction
 - Provides guidelines on validation, reference samples, study designs
 - Unparallel fully operational, open-access network
 - Strong scientific collaborations, e.g., Associate Membership Program for translational research
 - 2000に設立された EDRN
 - 早期発見とリスク予測のためのバイオマーカー研究のみに注力
 - バリデーション、リファレンスサンプル、スタディデザインに関するガイドラインを提供します。
 - 比類完全に動作可能なオープンアクセスネットワーク
 - トランスレーショナルリサーチのためのアソシエイト・メンバーシップ・プログラムなどの強力な科学的コラボレーション

Organization of EDRN



Network Consulting Team
Chair: Larry Norton

Steering Committee
Chair: Joshua LaBaer
Co-Chair: Arul Chinnaiyan

Data Management & Coordinating Center
Director: Ziding Feng

An “infrastructure” for supporting collaborative research on molecular, genetic and other biomarkers in human cancer detection and risk assessment.

EDRN Program Objectives

EDRN プログラムの目的

- Establish an investigator-initiated infrastructure to support development and validation of early detection biomarkers and biomarkers of progression
- Foster interaction between academic, clinical and industrial leaders
- Standardize biomarker validation criteria
- Develop a quality assurance program
- Bring biomarkers to clinical use
- 早期発見バイオマーカーと進行のバイオマーカーの開発と検証を支援するために、医師主導のインフラを確立する
- 学術、臨床、産業界のリーダーとの交流を深める
- バイオマーカー検証基準の標準化
- 品質保証プログラムの開発
- バイオマーカーを臨床に活用

EDRN Building Resources for Clinical Studies

EDRN 臨床研究のための建築資源の開発

- Platform for multi-center biomarker validation studies
- Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)-approved laboratories to develop and test assays using Good Laboratory Practices (GLP) and Good Manufacturing Practices (GMP)
- Mechanism for biomarker triaging prior to large, expensive validation studies (use of biospecimen reference sets)
- >100,000 clinically-annotated biospecimens using common data elements (CDEs)
- Centralized statistical center for data analysis and informatics infrastructure for sharing data
- マルチセンターバイオマーカーバリデーション研究のプラットフォーム
- 臨床検査の改善の修正 (CLIA)-よい実験室の練習 (GLP) およびよい製造の練習 (GMP) を使用して試金を開発し、テストするために承認された実験室)
- 大規模で高価なバリデーション研究の前のバイオマーカートリアージのメカニズム (生体試料支援参照セットの使用)
- > 10万共通データ要素 (CDEs) を用いた臨床的に注釈を付けた分担
- データ共有のためのデータ分析・情報基盤の一元化された統計センター

Available EDRN Standard Reference Sets

Reference Samples are sets of cases and controls statistically powered to allow rapid, cross-sectional assessment of technologies and biomarkers discovered through a wide variety of technology platforms.

リファレンス・サンプルは、さまざまなテクノロジー・プラットフォームを通じて発見されたテクノロジーとバイオマーカーの迅速な断面評価を可能にするために、統計的に電力を供給するケースとコントロールのセットです。

Available Reference Sets

Breast Cancer	Cancer in Women
Colon Cancer	Liver Cancer
Lung Cancer	Pancreatic Cancer
Prostate	

使用可能な参照セット

乳がん	女性のがん
結腸癌	肝癌
肺癌	膵癌
前立腺	

Obtain application form from EDRN public portal (<http://edrn.nci.nih.gov/resources/sample-reference-sets>).

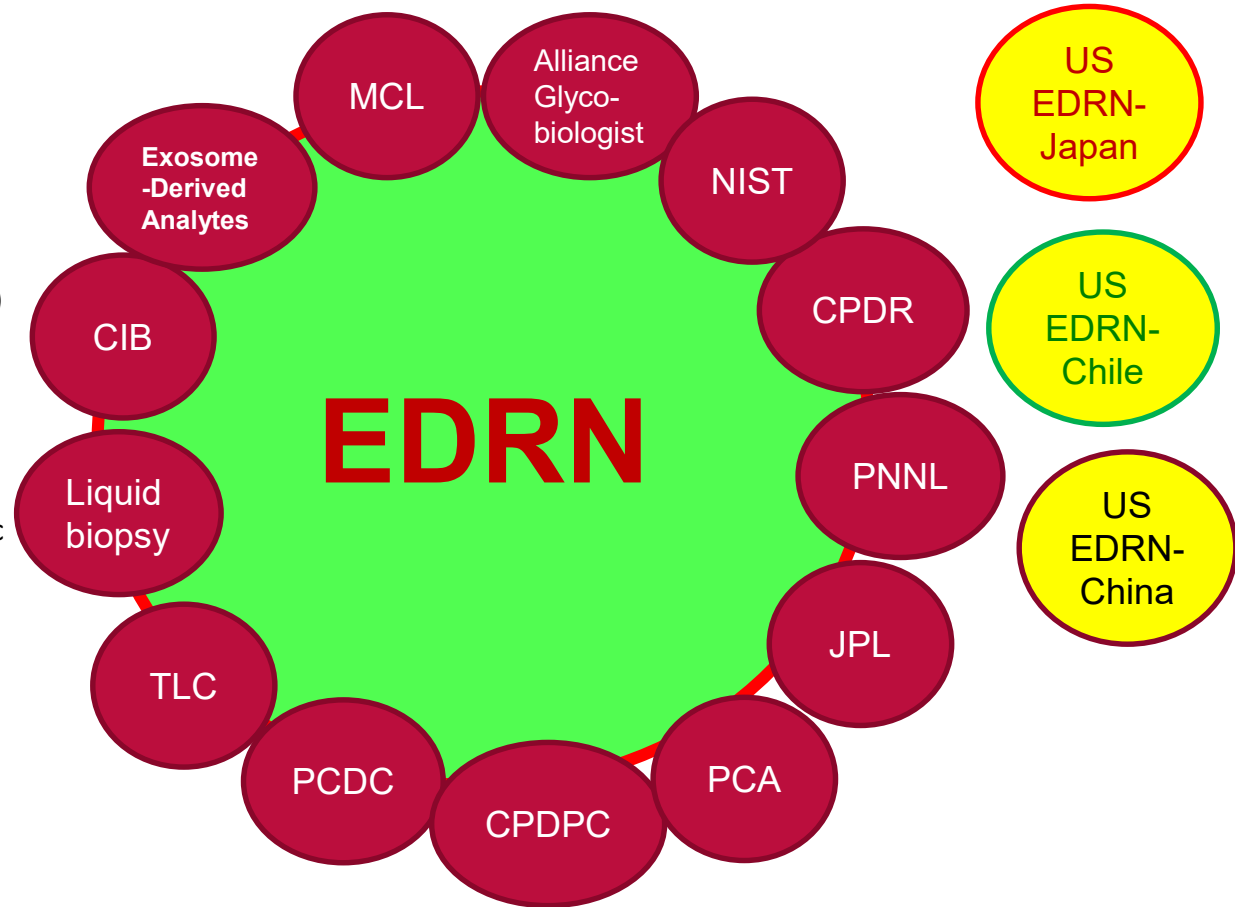
EDRN Serves as HUB to Many Sister Programs (Spokes)

Programs

- *Early Detection Research Network (EDRN)*
- Molecular and Cellular Characterization of Screen-Detected Lesions (MCL)
- Alliance of Glycobiologists for Cancer
- Exosome-Derived Analytes for Cancer
- Consortium for Imaging and Biomarkers (CIB)
- Liquid Biopsy for Early Cancer Assessment
- Consortium on Translational Research for Liver Cancer (TCL)
- Pancreatic Cancer Detection Consortium (PCDC)
- Chronic Pancreatitis, Diabetes and Pancreatic Cancer (CPDPC)
- Pre-Cancer Atlas (PCA)

Inert Agency Agreements (IAA)

- National Institute of Standards and Technology (NIST)
- Pacific Northwest National Laboratory (PNNL)
- Center for Prostate Disease Research (CPDR)



**Precompetitive Collaboration on Liquid Biopsy
for Early Cancer Assessment**

RFA-CA-17-028

早期癌評価のための液体生検に Precompetitive 共同研究

Lynn Sorbara, Ph.D., Sudhir Srivastava, MPH, Ph.D.

Division of Cancer Prevention

Cancer Biomarkers Research Group

リン・ソルバーラ博士, スディール・スリヴァスタヴァ, 博士号取得

がん予防研究部門

がんバイオマーカー研究グループ

Purpose of this Consortium 本コンソーシアムの目的

- 1) Establish a Public-Private Partnership Program
- 2) Develop new and/or validate existing liquid biopsy technologies, methods, and assays:
 - *to capture and quantify tumor associated cells, DNA, RNA, or exosomes in body fluids of patients with early stage disease or those at high risk.*

Precompetitive alliances with industry will help harmonize and validate liquid biopsy technologies, methods and assays and facilitate the translation of these technologies into clinical practice.

- 1) 官民連携プログラムの確立
- 2) 既存の液体バイオプシーの技術、方法および試金を新規作成するか、または確認しなさい:
 - 早期病または高リスクの患者の体液中の腫瘍関連細胞、DNA、RNA、またはエクソソームを捕捉および定量化すること。

業界との Precompetitive アライアンスは、リキッドバイオプシー技術、方法、アッセイの調和と検証を支援し、これらの技術の臨床への翻訳を促進します。

Program to Assess the Rigor and Reproducibility of Exosome-Derived Analytes for Cancer Detection

(PAR16-276, PAR16-277)

癌の検出のためのエクソソーム由来の分析物の厳格さと再現性を評価するプログラム

Matthew Young, Ph.D., Sudhir Srivastava, MPH, Ph.D.

Division of Cancer Prevention

Cancer Biomarkers Research Group

マシュー・ヤング博士 (スディール・スリヴァスタヴァ)

がん予防研究部門

がんバイオマーカー研究グループ

Extracellular Vesicles for Cancer Detection

癌の検出のための細胞外小胞

Extracellular vesicles (EVs) have great potential for the development of non-invasive markers for early detection of various cancers due to their unique properties including

- stability in biological fluids
- potential to be efficiently isolated
- analytes may mirror the altered state of the cell of origin,

細胞外小胞 (ev) は、そのユニークな特性に起因する様々な癌の早期発見のための非侵襲性マーカーの開発のための大きな可能性を持っています

- 生物学的液体の安定性
- 効率的に分離される可能性
- 検体は、起源の細胞の変化した状態を反映することができ、
-

Extracellular Vesicles for Cancer Detection

More research including case-control and prospective studies is needed to be conducted to develop new biomarkers for early detection, diagnosis and prognosis.

EVs and their cargo may have potential to be multiplexed with other molecular markers or screening modalities to develop integrated molecular-based computational tools for the early detection of cancer.

Therefore, the development of biologically relevant sensitive biomarker-based assays that accurately detect cancer at an early stage will increase the effectiveness of intervention strategies.

早期発見、診断および予後のための新しいバイオマーカーを開発するために、症例対照および前向き研究を含むより多くの研究が行われる必要がある。

ev とその貨物は、がんの早期発見のための統合分子ベースの計算ツールを開発するために、他の分子マーカーまたはスクリーニングモダリティと多重化される可能性があります。

したがって、早期に癌を正確に検出する生物学的に関連性の高い高感度バイオマーカーベースのアッセイの開発は、介入戦略の有効性を高めます。

Program to Assess the Rigor and Reproducibility of Exosome-Derived Analytes for Cancer Detection

(PAR16-276, PAR16-277)

- Determination of the utility of EVs and their cargo for developing reproducible noninvasive assays for early detection
- Development of rigorous and reproducible assays for purification of exosomes
- Determination of cancer-specific markers within EV
- Development of computational tools to integrate the data on the EV cargo to identify novel biomarkers signatures
- Determination of the sensitivity and specificity of biomarkers signatures using cohort or completed trial specimens
- Evaluation of longitudinal screening protocols using cohort specimens
- 早期発見のための再生可能な非侵襲性アッセイを開発するための ev およびその貨物の有用性の決定
- エキソソーム精製のための厳格で再現性のあるアッセイの開発
- EV 内のがん特異的マーカーの測定
- 新規バイオマーカーの同定のための EV 貨物データ統合のための計算ツールの開発
- コホートまたは完成した試験標本を用いたバイオマーカーシグネチャーの感受性と特異性の決定
- コホート標本を用いた縦方向スクリーニングプロトコールの評価

Next Application Due Date: June 13, 2019

EDRN/NIST

Development of Reference Material for Liquid Biopsy

リキッドバイオプシー用標準物質の開発

National Institute of Standards and Technology Reference Laboratory is developing reference material for

1. Measurements of Tumor DNA
2. Measurements of Methylated DNA
3. Measurements of Gene Copy Number Variants
4. Measurements of miRNA
5. Measurements of exosomes

国立標準技術研究所の参考資料を開発しています。

1. 腫瘍 DNA の測定
2. メチル化 DNA の測定
3. 遺伝子コピー数の変異の測定
4. miRNA の測定
5. エクソソームの測定

Kenneth Cole: Group Leader

Hua-Jun He: Research Scientist

Jamie Almeida: Research Biologist

Lili Wang: Flow Cytometry Project Leader

Multilab Assessment of ctDNA Measurements

ctDNA 測定 of Multilab 評価

- Allele Fractions (AF) from a 40-variant reference material (SeraCare) was diluted in a plasma simulant
- Evaluated by 7 expert labs with 4 different NGS methods and different subsets of the 40 alleles.
- Tested: extraction, DNA quantitation, variant measurement, and bioinformatic pipeline.
- 40変異型参照物質 (SeraCare) からの対立遺伝子画分 (AF) を血漿類似石で希釈した
- 4種類の NGS メソッドと40対立遺伝子の異なるサブセットを持つ7つのエキスパートラボによって評価されます。
- テスト済み: 抽出、DNA 定量、バリエーション測定、バイオ情報パイプライン。

These results establish of this study have been submitted and the manuscript in currently in revision

これらの結果は、この研究の確立が提出されており、現在のリビジョンで原稿

Strategy for Methylation Assays and Reference Material Evaluation

メチル化アッセイの戦略と参考物質評価

- Characterize existing commercial reference materials
- Evaluate use of NIST Genome in a Bottle: human DNA reference materials highly annotated for sequence identity
- Implementing assay MethylLight digital PCR* assay for mir342/EVL (colon cancer risk)
- Implementing a NGS assay for CCNA1 plus VIM DNA methylation** for identifying DNA methylation biomarkers for non-endoscopic detection of Barrett's esophagus
- 既存の市販の参考資料を特徴付ける
- ボトル内の NIST ゲノムの使用を評価する: 配列同一性に対して高度に注釈を付けたヒト DNA 参照物質
- mir342/EVL (大腸癌リスク) に対するアッセイ MethylLight デジタル PCR * アッセイの実施
- CCNA1 と VIM dna メチル化のための NGS アッセイの実施 ** バレット食道の非内視鏡的検出のための dna メチル化バイオマーカーの同定

*Bill Grady et al., Fred Hutchison Cancer Center, Methods Mol Biol. 2018;1768:363-383

**Sandy Markowitz et al., Case Western University, Sci Transl Med. 2018 Jan 17; 10

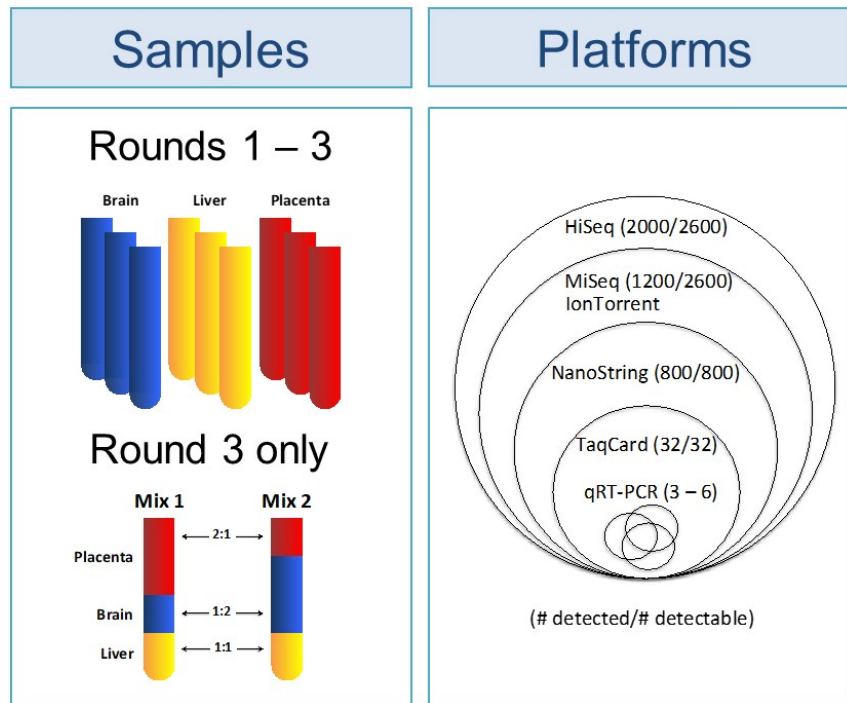
miRNA Reference Samples for Interlaboratory Study

A common set of samples shared among laboratories for profiling was used to provide a sense of measurement assurance for biomarker screening.

Three commercially available samples of human total RNA (brain, liver, and placenta) were selected for detectable differences in miRNA expression.

Blinded samples were then profiled using the standard workflows of each laboratory in three separate rounds of measurement.

ヒト全 RNA (脳、肝臓、胎盤) の市販サンプルを3つ選択し、miRNA 発現における検出可能な差異を発見した。



ブラインドサンプルは、3回の測定で各実験室の標準的なワークフローを使用してプロファイリングされました

miRNA Reference Samples for Interlaboratory Study

Metrics and visualizations derived from mixture samples are well suited for assessing performance of genome-scale measurement systems used to identify differentially regulated miRNAs.

Reference samples are made from biological materials similar and provide a sufficient number of differentially expressed miRNAs with predictable ratios to serve as benchmarks.

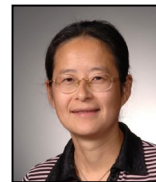
Implementing these metrics and visualizations as part of an online resource offers laboratories the opportunity to evaluate and optimize their discovery process.

混合物のサンプルから得られる総計値および視覚化は異なった調節された miRNAs を識別するのに使用するゲノムスケールの測定システムの性能を査定するためにうってつけである。

参考サンプルは、生物学的材料から作られており、ベンチマークとして機能するために、予測可能な比率を持つ十分な数の差動発現 miRNAs を提供します。

これらのメトリクスとビジュアライゼーションをオンラインリソースの一部として実装することで、ラボは検出プロセスを評価し、最適化する機会を提供します。

EXTRACELLULAR VESICLES



Lili Wang,
Project Leader,
Flow Cytometry

Strategies for Developing Reference Materials and Procedures for Reliable Exosome Measurement Using Quantitative Flow Cytometry

- Size, concentration, and fluorescence intensity calibration materials for characterizing scattering and fluorescence detection sensitivity of flow cytometers
- Exosome reference materials for fit-for-purpose applications (exosomes from various cancers)
- Building an ultra-sensitive quantum flow cytometer for exosome detection and enumeration.
- Development of reference methods/procedures for reliable flow analysis of exosomes that incorporate cytometer calibration, counting, and exosome reference materials.

定量フローサイトメトリーを用いた信頼性の高いエキソソーム測定のための標準物質および手順の開発戦略

- フローサイトメーターの散乱および蛍光検出感度を特徴付けるためのサイズ、濃度、および蛍光強度校正材料
- エキソソーム用途向けの参考資料 (各種がんのエクソソーム)
- エキソソーム検出と列挙のための超高感度量子フローサイトメーターの構築。
- サイトメーター校正、計数、エキソソームを組み込んだエキソソームの信頼性の高いフロー解析のための参照方法/手順の開発。

BloodPAC

BLOOD PROFILING  ATLAS IN CANCER

The Blood Profiling Atlas in Cancer (BloodPAC) Consortium was launched to accelerate the development and validation of liquid biopsy assays to improve the outcomes of patients with cancer.

BloodPAC will develop a collaborative infrastructure that enables sharing of information between stakeholders in industry, academia, and regulatory agencies.

BloodPAC is a consortium managed by the Center for Computational Science Research, Inc. (CCSR), which is an Illinois based not-for-profit corporation.

がん患者の転帰を改善するために、リキッドバイオプシーアッセイの開発と検証を加速するために、癌の血液プロファイリングアトラス (BloodPAC) コンソーシアムが発足しました。

BloodPAC は、産学官の関係者間で情報共有を可能にする共同インフラを構築する。

BloodPAC は、イリノイ州の非営利法人である計算科学研究センター (修士) が運営するコンソーシアムです。

<https://www.bloodpac.org/>

BloodPAC Goals

The goals of BloodPAC are: to aggregate, make freely available, and harmonize for further analysis:

- data from CTC, ctDNA, proteins including tumor associated autoantibodies, and exosome assays,
- associated clinical data, such as clinical diagnosis, treatment history and outcomes. and
- sample collection, preparation and handling protocols.

BloodPAC の目標は次のとおりです: 集約し、自由に利用可能にし、さらなる分析のために調和させる:

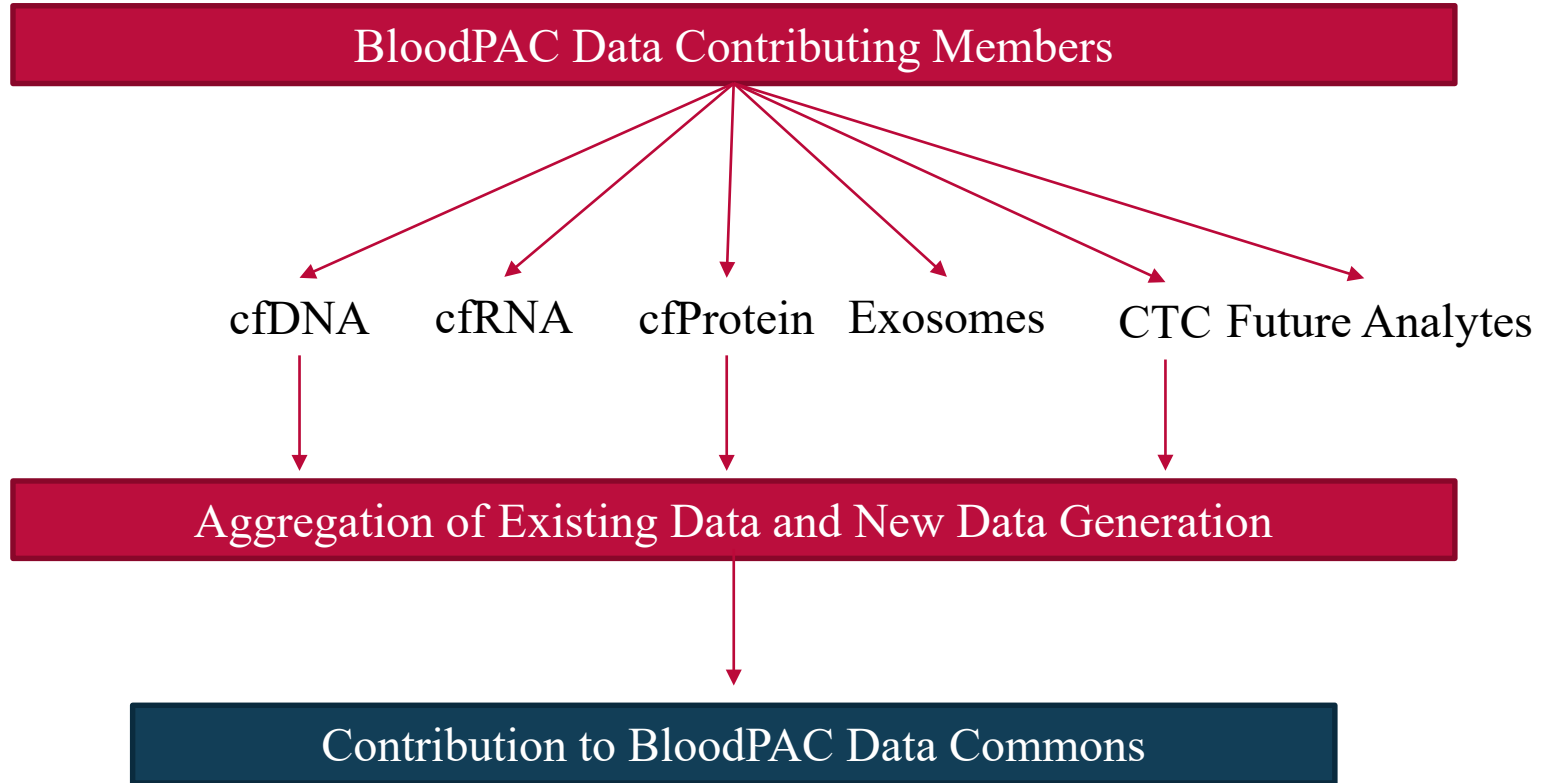
- CTC、ctDNA、腫瘍関連自己抗体を含むタンパク質、およびエキソソームアッセイからのデータは、
- 臨床診断、治療歴および転帰などの関連する臨床データ。And
- サンプル収集、準備および処理の議定書。

BloodPAC Goals

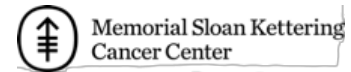
The BloodPAC Consortium includes representatives from academia, private foundations, industry and the government that are working to accelerate the exploration, implementation and assessment of potential clinical utility of liquid biopsies with the aim to understand the temporal evolution of a patient's disease.

BloodPAC コンソーシアムには、アカデミア、民間財団、産業、政府からの代表者が含まれており、液体バイオプシーの潜在的な臨床有用性の探査、実施および評価を促進することを目的としています。患者の病気の時間的な進化を理解する。

A Range of Assays are in Development for Different Tumor Products in Blood and other Fluids



BloodPAC Members



THE ARKANSAS BIOINFORMATICS CONSORTIUM (AR-BIC) . ASTRAZENECA . BIODESIX . BREAST CANCER RESEARCH FOUNDATION (BCRF) . CELGENE . CHOP . COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS (CAP) . CYTOLUMINA . DEPARTMENT OF DEFENSE (DOD) . EPIC SCIENCES . FDA . FOUNDATION MEDICINE . GENOMIC HEALTH . GUARDANT HEALTH . MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER . NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI) . NOVARTIS . OPEN COMMONS CONSORTIUM (OCC) . PCCTC . PERSONAL GENOME DIAGNOSTICS . PFIZER . PROSTATE CANCER FOUNDATION (PCF) . PROVISTA . SEVEN BRIDGES . STRECK . SYSMEX INOSTICS . THERMO FISHER SCIENTIFIC . UNIVERSITY OF CHICAGO . UNIVERSITY OF MICHIGAN . UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA . WEILL CORNELL MEDICINE.

summary

Thank You



**NATIONAL
CANCER
INSTITUTE**

www.cancer.gov

www.cancer.gov/espanol