

*Научный медицинский
исследовательский центр
онкологии им. Н.Н. Петрова
(Санкт-Петербург, Россия)*

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ ОНКОЛОГИЯ В 2020 ГОДУ: ОБЗОР НАИБОЛЕЕ ИНТЕРЕСНЫХ ОТКРЫТИЙ*

Е.Н. Имянитов

ADVANCES IN FUNDAMENTAL ONCOLOGY: THE YEAR 2020 UPDATE

Е.Н. Имянитов

*Доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент
РАН, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России,
197758, Россия, Санкт-Петербург,
пос. Песочный, Ленинградская ул., 68.*

E.N. Imyanitov

*Doctor of Medicine, Professor, Corresponding Member
of the Russian Academy of Sciences,
N.N. Petrov Institute of Oncology,
197758, Russia, St. Petersburg, Pesochny, Leningradskaya ul., 68.*

Данная статья является обзором наиболее примечательных событий 2020 года в фундаментальной и трансляционной онкологии.

Ключевые слова: *гены, мутации, экспрессия генов, предиктивные маркеры.*

This paper describes the most remarkable advances in fundamental and translational oncology occurred within the year 2020.

Keywords: *Genes, mutations, gene expression, predictive markers.*

Ранняя диагностика рака

Хорошо известно, что опухоль возникает вследствие накопления нескольких мутаций в онкогенах и супрессорных генах. Соответственно, сверхчувствительный анализ циркулирующей ДНК, присутствующей в плазме, позволяет выявлять единичные копии мутированных генов и потенциально может использоваться в качестве одного из подходов к ранней диагностике рака [1]. Poore et al. [2] предложили несколько иной остроумный подход: они обратили внимание на тот факт, что для некоторых опухолей характерна облигатная персистенция определённых микроорганизмов. Например, карциномы шейки матки практически всегда содержат нуклеотидные последовательности папилломавирусов [3]. Существенно, что, в отличие от мутированных генов, число которых, как правило, составляет лишь одну копию на клетку, для многих инфекций характерно присутствие достаточно большого количества копий возбудителя в каждой трансформированной клетке. Соответственно, геномы микроорганизмов могут выступать в качестве «мишени» для «жидкостной биопсии». Анализ «опухолевых» геномов, доступных в различных базах данных, выявил достаточно частое присутствие нуклеотидных последовательностей микробного происхождения в ДНК, изолированной из злокачественных клеток. Более того, сравнительный

* Данная работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 17-00-00171 и 19-515-25001).

анализ ДНК плазмы, полученной от онкологических пациентов и здоровых контролей, подтвердил возможность использования бактериальных и вирусных последовательностей в качестве инструмента для раннего обнаружения рака [2].

Lennon et al. [4] использовали для ранней диагностики рака разработанную ранее панель CancerSeek, состоящую из комбинации генов, которые наиболее часто мутированы при раке, а также набора опухолевых специфических белковых маркеров [5]. В качестве испытуемых были выбраны женщины в возрасте 65–75 лет; на данный возрастной интервал приходится очень высокая вероятность возникновения рака, при этом ожидаемая продолжительность жизни у людей этой возрастной группы остаётся достаточно высокой. Предпочтение в пользу женщин было связано с тем, что панель CancerSeek включает маркеры рака молочной железы и рака яичника. В случае обнаружения в плазме молекул, ассоциированных с возможным присутствием опухоли, пациентки подвергались обследованию при помощи ПЭТ-КТ. При необходимости выполнялась биопсия подозрительных очагов с последующим морфологическим исследованием. Если у испытуемых с «позитивным» молекулярным тестом не обнаруживалось признаков рака в течение 12-месячного наблюдения, результат жидкостной биопсии считали ложноположительным. Всего в исследование было включено 10006 женщин. При помощи «биохимического» скрининга было обнаружено 26 случаев рака. Ещё 24 случая злокачественного заболевания были выявлены посредством стандартного клинического наблюдения за пациентками; в этой группе преобладали разновидности опухолей, которые относительно легко выявляются на ранних стадиях, но при этом не включены в упомянутую выше панель CancerSeek (например, рак шейки матки). У 46 участниц исследования в течение года возникло злокачественное новообразование, которое не было своевременно выявлено посредством биохимического или клинического скрининга. 1% женщин подверглись ПЭТ-КТ по результатам ложно-позитивного биохимического теста; частота ненужных биопсий составила 0,22%.

Персонализированный подбор терапии на основе результатов молекулярного профилирования

Чрезвычайно популярным направлением современной персонализированной медицины является индивидуальный подбор противоопухолевых препаратов на основе результатов геномного профилирования. Суть подхода заключается в мультигенном анализе, который направлен на выявление всех потенциально значимых мутаций в опухолевых клетках, с последующим назначением тех лекарственных субстанций, эффективность которых ассоциирована с присутствием обнаруженного генетического события.

Проведение объективных клинических испытаний, направленных на оценку истинной клинической эффективности геномного профилирования, сопряжено с вполне объяснимыми трудностями: подобные исследования, по определению, включают достаточно разнородные группы онкологических пациентов, у которых уже исчерпан потенциал стандартной терапии и которые получают самые разнообразные лекарственные препараты. К настоящему моменту опубликовано несколько исследований подобного рода: в целом, они демонстрируют достаточно умеренную эффективность геномного профилирования, хотя, несомненно, каждая из таких работ отмечает случаи выраженного противоопухолевого ответа у отдельных пациентов [6–8].

Исследование, представленное Pishvaian et al. [9], представляет интерес с той точки зрения, что в него включалась достаточно однородная группа больных – пациенты с раком поджелудочной железы. Существенно, что именно эта группа новообразований характеризуется крайне агрессивным течением и низкой эффективностью стандартных схем терапии. Всего в исследование было включено 1856 индивидуумов, из которых результаты геномного профилирования удалось получить для 1082 (58%) человек. Для 677 пациентов на момент оценки результатов имелись сведения об ответе на терапию, из них в 189 случаях были обнаружены мутации, которые могут быть ассоциированы с чувствительностью к определённым видам лекарственного лечения. Для 46 участников данного клинического испытания, которым удалось назначить терапию, подобранную по результатам геномного профилирования, продолжительность жизни составила 2,58 года; в «контрольной» группе из оставшихся 143 человек этот показатель был существенно ниже и составлял 1,51 года. Авторы исследования сделали заключение о потенциальной целесообразности геномного профилирования для пациентов с раком поджелудочной железы.

Другой интересной работой в данном направлении представляется исследование, посвящённое персонализированному подбору терапии рака лёгкого (MATRIX trial) [10]. Оно подразумевало назначение экспериментальных препаратов по результатам геномного профилирования; разумеется, пациенты с зарегистрированными для назначения лечения биомаркерами (мутации EGFR, транслокации ALK, мутации BRAF) получали стандартное лечение и не включались в обработку данных. Из 5467 пациентов, привлечённых к исследованию, только 274 смогли получить экспериментальное лечение в соответствии с заранее утверждённым протоколом; при этом 232 больных прекратили терапию сразу после её начала из-за прогрессирования заболевания, побочных эффектов и т.д. Наибольшая частота эффектов наблюдалась в тех случаях, когда опухоль содержала хорошо известную мутацию, которая на момент на-

чала исследования ещё не была включена в стандарты обследования и лечения (например, активирующие события в генах ROS1 и MET для кризотиниба или мутация EGFR790M для осимертиниба). В целом, эффективность экспериментальной терапии отмечалась преимущественно у некурящих пациентов с неплоскоклеточными карциномами.

Новые подходы к терапии PIK3CA-мутированных опухолей

Ген PIK3CA кодирует каталитическую субъединицу фосфатидил-инозитол-3-киназы (PI3K) – фермента, вовлечённого в поддержание жизнеспособности клеток. Это ген активирован вследствие мутации примерно в 40% карцином молочной железы, экспрессирующих рецепторы стероидных гормонов; значительная частота мутаций PIK3CA также характерна для других категорий новообразований. Ингибиторы PIK3CA могут обладать противоопухолевым эффектом; в частности, один из препаратов этого класса, алпелисиб (alpelisib), зарегистрирован для лечения рецептор-позитивного рака молочной железы (РМЖ) в комбинации с эндокринной терапией [11].

Недавнее исследование, выполненное Koundouros et al. [12], установило, что участие PIK3CA в формировании злокачественного фенотипа не ограничивается влиянием на жизнеспособность трансформированных клеток. Активация PIK3CA сопровождается метаболическими изменениями, в частности, увеличением внутриклеточной концентрации арахидоновой кислоты – представительницы класса т.н. «жирных кислот», участвующей в регуляции целого ряда биологических процессов. Причиной повышения содержания арахидоновой кислоты является PIK3CA-зависимая активация кальций-зависимой фосфолипазы A2 (calcium-dependent phospholipase A2 (cPLA2)). Примечательно, что арахидоновая кислота обладает паракринным действием, т.е. стимулирует пролиферацию окружающих клеток. Использование ингибиторов cPLA2 в сочетании с диетой, предусматривающей ограничение содержания жирных кислот, сопровождалось активацией противоопухолевого иммунитета и демонстрировало терапевтический эффект в отношении РМЖ в условиях эксперимента. Данная работа открывает новые возможности для лечения PIK3CA-мутированных новообразований.

Неoadъювантная терапия демонстрирует эффективность по отношению к колоректальным карциномам со стабильными микросателлитами

Микросателлитная нестабильность (microsatellite instability, MSI) – особый признак опухолевого генотипа, который связан с дефектом репарации неспаренных оснований ДНК (mismatch DNA repair, MMR). MSI характерна для опухолей, возникающих у пациентов

с синдромом Линча, а также для пожилых пациентов с раком толстой кишки (РТК). Карциномы с MSI содержат в десятки-сотни раз больше мутаций, чем обычные опухоли [13]. Как следствие, они характеризуются избыточным количеством антигенов и очень хорошим ответом на терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа [14]. В то же время, применение иммунотерапии у пациентов с метастатическим раком толстой кишки, опухоли которых не демонстрировали признаков MSI, не привело к получению значимых клинических результатов. Chalabi et al. [15] предположили, что раннее назначение иммунотерапии может позволить получать лучшие результаты. Они применяли комбинацию ниволумаба (анти-PD1) и ипилимумаба (анти-CTLA1) у пациентов с раком толстой кишки в качестве неoadъювантной терапии. В соответствии с ожиданиями, все без исключения 20 РТК с MSI продемонстрировали выраженный патологический ответ на данное лечение. Неожиданным наблюдением является тот факт, что признаки патологического ответа были также обнаружены в 4 из 15 случаев РТК со стабильным статусом микросателлитов. Данное исследование позволяет пересмотреть представления об отсутствии детерминант иммуногенности в РТК без MSI и открывает новые перспективы для лечения данного заболевания.

Новые подходы к иммунотерапии опухолей

Разработка технологии полногеномного (полноэкзомного) секвенирования позволяет получить сведения о полном спектре мутаций в каждой опухоли в течение нескольких дней после забора материала. Эти данные могут использоваться для создания перечня антигенов, продуцируемых новообразованием (т.н. неоантигенов). Идентификация неоантигенов представляет из себя нетривиальную биоинформатическую задачу: необходимо понимать, что потенциальная иммуногенность неоплазмы определяется не только спектром опухоль-специфических мутаций, но и индивидуальным набором пептидов, продуцируемых генами главного комплекса гистосовместимости (МНС (major histocompatibility complex) или HLA (human leukocyte antigens)) [16].

Ott et al. [17] выполнили масштабное исследование фазы 1b, включавшее 82 предлеченных пациента с меланомой, раком лёгкого и мочевого пузыря. В рамках этого клинического испытания для каждого больного проводился полноэкзомный анализ ДНК, полученной из опухолевых клеток. На основании сведений об индивидуальном спектре мутаций синтезировалась пептидная вакцина. Особенностью исследования являлась попытка усилить действие вакцины введением ингибитора контрольных точек иммунного ответа – в данном клиническом испытании в качестве такого препарата использовался ниволумаб. Ott et al. [17] установили, что предложенная схема отличается хорошим уровнем безопасности. Существенно, что у

многих пациентов, включённых в исследование, наблюдались ответы опухоли на лечение: эти показатели составили 59%, 39% и 27% для меланомы, рака лёгкого и мочевого пузыря, соответственно.

Vaguch et al. [18] выполнили пилотное исследование, посвящённое изучению перспективности использования фекальной микробиоты для усиления ответа на терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа. Клиническое испытание включало пациентов с метастатической меланомой, у которых наблюдалась прогрессия на иммунотерапии. В качестве доноров микробиоты использовали пациентов с меланомой, у которых как минимум в течение года наблюдался полный клинический ответ опухоли на терапевтические антитела к PD1. Для лечения пациентов использовался ниволумаб. У 3 из 10 включённых в исследование больных наблюдался объективный ответ на лечение, причём в 1 случае был зарегистрирован полный регресс опухоли.

Новые функции гена p53

Ген p53 – один из наиболее изученных генов-супрессоров. Он принимает участие в контроле клеточного цикла и регуляции апоптоза. Мутации p53 являются самым частым генетическим событием для новообразований – они наблюдаются примерно в 50% опухолей. До недавнего времени предполагалось, что вклад p53 в патогенез рака ограничивается исключительно формированием «автономного» фенотипа трансформированных клеток. В последнее время появляется достаточно много сведений о том, что у p53 могут наблюдаться и другие, достаточно неожиданные биологические свойства. Например, утрата p53 может сопровождаться активацией процессов воспаления, и, как следствие, созданием благоприятных условий для роста опухолей [19].

Исследование, опубликованное Amit et al. [20], было направлено на изучение причастности p53 к иннервации новообразований. В частности, анализ больших массивов данных продемонстрировал, что степень иннервации карцином головы и шеи коррелирует как с плотностью нервных окончаний, так и с присутствием мутации в гене p53. Модельные эксперименты установили, что опухоли, формирующиеся у мышей, характеризуются большей степенью иннервации в случае утраты p53. Опыты по ко-культивированию клеток нейронального происхождения и эпителиальных клеток выявили, что p53-дефицитные эпителиальные клетки секретируют факторы нейрогенеза. Было установлено, что поддержание роста новообразований осуществляется за счёт функционирования адренергической нервной системы; соответственно, фармакологическое ингибирование адренергических рецепторов сопровождалось приостановкой прогрессии карцином у экспериментальных животных. В целом, функциональная модуляция иннервации новообразований может иметь определённые перспективы для противоопухолевой терапии.

Комплексные мутации в онкогенах

Большинство активирующих мутаций, затрагивающих онкогены, предусматривают нарушения нуклеотидной последовательности в 1 фрагменте гена. Известны также т.н. комплексные мутации, которые вовлекают два различных участка одного и того же гена. Наиболее подробно подобные двойные мутации описаны для гена EGFR – это связано с тем, что EGFR-тестирование является рутинной процедурой для диагностики рака лёгкого, а многие из существующих тест-систем, предназначенных для поиска мутаций, способны выявлять достаточно широкий спектр молекулярных событий в рамках единой лабораторной процедуры [21]. Saito et al. [22] систематически проанализировали масштабный массив данных полногеномного (полноэкзомного) секвенирования и установили, что присутствие двойных мутаций характерно для целого ряда генов, в первую очередь, для PIK3CA и EGFR. Комплексные мутации, как правило, обнаруживаются на одной и той же копии гена, т.е. присутствуют в cis-позиции. Мутации, обнаруживаемые в парах, характеризуются меньшим индивидуальным онкогенным эффектом, т.е. они способны эффективно поддерживать опухолевый рост только в комбинации друг с другом. Аналогичное по своим выводам исследование было недавно опубликовано для комплексных мутаций гена PIK3CA в карциномах молочной железы [23].

Новые представления о механизмах метастазирования

Лимфогенное и гематогенное метастазирование длительное время рассматривались как стадии единого процесса – «классические» представления о прогрессии опухолей подразумевают, что сначала трансформированные клетки закрепляются в лимфатических узлах, и только после этого формируются метастазы в отдалённых органах и тканях. Появление методов геномного профилирования, позволяющих получить исчерпывающую информацию о полном спектре генетических повреждений опухолевых очагов, представило достаточно убедительные данные об относительной независимости этих процессов [24]. Reiter et al. [25] анализировали мутационные портреты метастатических поражений лимфатических узлов, а также отдалённых метастазов, полученных от одних и тех же пациентов с колоректальным раком. Оказалось, что регионарные лимфогенные метастазы характеризуются значительной молекулярной гетерогенностью, как при сравнении опухолевых образцов, полученных из разных лимфатических узлов, так и при анализе различных участков опухолевой ткани, извлечённых из одного и того же узла. В то же время, анализ множественных гематогенных метастазов выявил значительно меньшую степень молекулярной гете-

рогенности. Исследователи сделали вывод от том, что формирование отдалённых метастазов сопровождается значительно большим «эволюционным» давлением по сравнению с процессами образования метастатических конгломератов в лимфатических узлах. По-видимому, множественные субклоны той или иной опухоли обладают способностью закрепляться в лимфатических узлах, в то время как гематогенные метастазы формируются, как правило, из единого клона трансформированных клеток.

Результаты исследования Hu et al. [26] также свидетельствуют о том, что метастатическая диссеминация опухоли происходит за 2–4 года до появления клинически различимого новообразования. Интересно, что мутации, характерные именно для метастатических отсеков, наблюдаются только у тех пациентов, которые подвергались системной терапии. Таким образом, события, которые отличают метастазы от первичной

опухоли, не являются драйверными мутациями, а ассоциированы с приобретением резистентности опухоли к лекарственному воздействию.

Разумеется, ни один обзор не может включить полный перечень наиболее интересных событий в фундаментальной и трансляционной онкологии, произошедших в прошедшем году. Помимо этого, несомненно, отбор исследований для обсуждения связан со значительной долей субъективности. Тем не менее, можно выделить основные тенденции, характерные для развития современной онкологии. Во-первых, наблюдается колоссальный прогресс, связанный с повсеместным использованием секвенирования нового поколения. Во-вторых, открываются всё новые и новые перспективы использования иммунной терапии рака. И, наконец, обращает на себя внимание направление, связанное с изучением особенностей метаболизма опухолей.

Список литературы

1. Pinzani P., D'Argenio V., Del Re M., Pellegrini C., Cucchiara F., Salvianti F., Galbiati S. Updates on liquid biopsy: current trends and future perspectives for clinical application in solid tumors // *Clin Chem Lab Med.* – 2021, Feb 4.
2. Poore G.D., Kopylova E., Zhu Q., Carpenter C., Fraraccio S., Wandro S., Kosciolk T., Janssen S., Metcalf J., Song S.J., Kanbar J., Miller-Montgomery S., Heaton R., McKay R., Patel S.P., Swafford A.D., Knight R. Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach // *Nature.* – 2020, Mar. – Vol. 579, № 7800. – P. 567–574; Epub. – 2020, Mar 11.
3. Dias T.C., Longatto-Filho A., Campanella N.C. Human papillomavirus genotyping as a tool for cervical cancer prevention: from commercially available human papillomavirus DNA test to next-generation sequencing // *Future Sci OA.* – 2020, Jul 30. – Vol. 6, № 9. – FSO603.
4. Lennon A.M., Buchanan A.H., Kinde I., Warren A., Honushefsky A., Cobain A.T., Ledbetter D.H., Sanfilippo F., Sheridan K., Rosica D., Adonizio C.S., Hwang H.J., Labouel K., Cohen J.D., Douville C., Patel A.A., Hagmann L.N., Roston D.D., Malani N., Zhou S., Bettegowda C., Diehl D.L., Urban B., Still C.D., Kann L., Woods J.I., Salvati Z.M., Vadakara J., Leeming R., Bhattacharya P., Walter C., Parker A., Lengauer C., Klein A., Tomasetti C., Fishman E.K., Hruban R.H., Kinzler K.W., Vogelstein B., Papadopoulos N. Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention // *Science.* – 2020, Jul 3. – Vol. 369, № 6499. – eabb9601; Epub. – 2020, Apr 28.
5. Cohen J.D., Li L., Wang Y., Thoburn C., Afsari B., Danilova L., Douville C., Javed A.A., Wong F., Mattox A., Hruban R.H., Wolfgang C.L., Goggins M.G., Dal Molin M., Wang T.L., Roden R., Klein A.P., Ptak J., Dobbyn L., Schaefer J., Silliman N., Popoli M., Vogelstein J.T., Browne J.D., Schoen R.E., Brand R.E., Tie J., Gibbs P., Wong H.L., Mansfield A.S., Jen J., Hanash S.M., Falconi M., Allen P.J., Zhou S., Bettegowda C., Diaz L.A. Jr, Tomasetti C., Kinzler K.W., Vogelstein B., Lennon A.M., Papadopoulos N. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test // *Science.* – 2018, Feb 23. – Vol. 359, № 6378. – P. 926–930. Epub. – 2018, Jan 18.
6. Massard C., Michiels S., Ferte C., Le Deley M.C., Lacroix L., Hollebecque A., Verlingue L., Ileana E., Rosellini S., Ammari S., Ngo-Camus M., Bableda R., Gazzab A., Varga A., Postel-Vinay S., Lorient Y., Even C., Breuskin I., Auger N., Job B., De Baere T., Deschamps F., Vielh P., Scoazec J.Y., Lazar V., Richon C., Ribrag V., Deutsch E., Angevin E., Vassal G., Eggermont A., Andre F., Soria J.C. High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial // *Cancer Discov.* – 2017, Jun. – Vol. 7, № 6. – P. 586–595. Epub. – 2017, Apr 1.
7. Rodon J., Soria J.C., Berger R., Miller W.H., Rubin E., Kugel A., Tsimberidou A., Saintigny P., Ackerstein A., Braña I., Lorient Y., Afsbar M., Miller V., Wunder F., Bresson C., Martini J.F., Raynaud J., Mendelsohn J., Batist G., Onn A., Tabernero J., Schilsky R.L., Lazar V., Lee J.J., Kurzrock R. Genomic and transcriptomic profiling expands precision cancer medicine: the WINTHER trial // *Nat Med.* – 2019, May. – Vol. 25, № 5. – P. 751–758. Epub. – 2019 Apr 22.
8. Sicklick J.K., Kato S., Okamura R., Schwaederle M., Hahn M.E., Williams C.B., De P., Krie A., Piccioni D.E., Miller V.A., Ross J.S., Benson A., Webster J., Stephens P.J., Lee J.J., Fanta P.T., Lippman S.M., Leyland-Jones B., Kurzrock R. Molecular profiling of cancer patients enables personalized combination therapy: the I-PREDICT study // *Nat Med.* – 2019, May. – Vol. 25, № 5. – P. 744–750. Epub. – 2019, Apr 22.
9. Pishvaian M.J., Blais E.M., Brody J.R., Lyons E., DeArbeloa P., Hendifar A., Mikhail S., Chung V., Sabai V., Sobal D.P.S., Bellakbira S., Thach D., Rabib L., Madhavan S., Matrisian L.M., Petricoin E.F. 3rd. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial // *Lancet Oncol.* – 2020, Apr–Vol. 21, № 4. – P. 508–518. Epub. – 2020, Mar 2. Erratum in: *Lancet Oncol.* – 2020, Apr. – Vol. 21(4). – P. e182.

10. Middleton G., Fletcher P., Popat S., Savage J., Summers Y., Greystoke A., Gilligan D., Cave J., O'Rourke N., Brewster A., Toy E., Spicer J., Jain P., Dangoor A., Mackean M., Forster M., Farley A., Wherton D., Mehmi M., Sharpe R., Mills T.C., Cerone M.A., Yap T.A., Watkins T.B.K., Lim E., Swanton C., Billingham L. Publisher Correction: The National Lung Matrix Trial of personalized therapy in lung cancer // *Nature*. – 2020, Sep. – Vol. 585, № 7826. – P. E21. Erratum for: *Nature*. – 2020, Jul. – Vol. 583, № 7818. – P. 807–812.
11. André F., Ciruelos E., Rubovszky G., Campone M., Loibl S., Rugo H.S., Iwata H., Conte P., Mayer I.A., Kaufman B., Yamashita T., Lu Y.S., Inoue K., Takahashi M., Pápai Z., Longin A.S., Mills D., Wilke C., Hirawat S., Juric D.; SOLAR-1 Study Group. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer // *N Engl J Med*. – 2019, May 16. – Vol. 380, № 20. – P. 1929–1940.
12. Koundouros N., Karali E., Tripp A., Valle A., Inglese P., Perry N.J.S., Magee D.J., Anjomani Virmouni S., Elder G.A., Tyson A.L., Dória M.L., van Weterwijk A., Soares R.F., Isacke C.M., Nicholson J.K., Glen R.C., Takats Z., Poulogiannis G. Metabolic Fingerprinting Links Oncogenic PIK3CA with Enhanced Arachidonic Acid-Derived Eicosanoids // *Cell*. – 2020, Jun 25. – Vol. 181, № 7. – P. 1596–1611.e27. Epub. – 2020, Jun 18.
13. Vilar E., Gruber S.B. Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence // *Nat Rev Clin Oncol*. – 2010, Mar. – Vol. 7, № 3. – P. 153–62. Epub. – 2010, Feb 9.
14. André T., Shiu K.K., Kim T.W., Jensen B.V., Jensen L.H., Punt C., Smith D., Garcia-Carbonero R., Benavides M., Gibbs P., de la Fouchardiere C., Rivera F., Elez E., Bendell J., Le D.T., Yoshino T., Van Cutsem E., Yang P., Farooqui M.Z.H., Marinello P., Diaz L.A. Jr; KEYNOTE-177 Investigators. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer // *N Engl J Med*. – 2020, Dec 3. – Vol. 383, № 23. – P. 2207–2218.
15. Chalabi M., Fanchi L.F., Dijkstra K.K., Van den Berg J.G., Aalbers A.G., Sikorska K., Lopez-Yurda M., Grootscholten C., Beets G.L., Snaebjornsson P., Maas M., Mertz M., Veninga V., Bounova G., Broeks A., Beets-Tan R.G., de Wijkerslooth T.R., van Lent A.U., Marsman H.A., Nuijten E., Kok N.F., Kuiper M., Verbeek W.H., Kok M., Van Leerdam M.E., Schumacher T.N., Voest E.E., Haanen J.B. Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers // *Nat Med*. – 2020, Apr. – Vol. 26, № 4. – P. 566–576. Epub. – 2020, Apr 6.
16. Ott P.A., Hu Z., Keskin D.B., Shukla S.A., Sun J., Bozym D.J., Zhang W., Luoma A., Giobbie-Hurder A., Peter L., Chen C., Olive O., Carter T.A., Li S., Lieb D.J., Eisenbaure T., Gjini E., Stevens J., Lane W.J., Javeri I., Nellaiappan K., Salazar A.M., Daley H., Seaman M., Buchbinder E.L., Yoon C.H., Harden M., Lennon N., Gabriel S., Rodig S.J., Barouch D.H., Aster J.C., Getz G., Wucherpfennig K., Neuberg D., Ritz J., Lander E.S., Fritsch E.F., Hacohen N., Wu C.J. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma // *Nature*. – 2017, Jul 13. – Vol. 547, № 7662. – P. 217–221; Epub. – 2017, Jul 5. Erratum in: *Nature*. – 2018, Mar 14. – Vol. 555, № 7696. – P. 402.
17. Ott P.A., Hu-Lieskovan S., Chmielowski B., Govindan R., Naing A., Bhardwaj N., Margolin K., Awad M.M., Hellmann M.D., Lin J.J., Friedlander T., Bushway M.E., Balogh K.N., Sciuto T.E., Kobler V., Turnbull S.J., Besada R., Curran R.R., Trapp B., Scherer J., Poran A., Harjanto D., Barbelme D., Ting Y.S., Dong J.Z., Ware Y., Huang Y., Huang Z., Wanamaker A., Cleary L.D., Moles M.A., Manson K., Greshock J., Khondker Z.S., Fritsch E., Rooney M.S., DeMario M., Gaynor R.B., Srinivasan L. A Phase Ib Trial of Personalized Neoantigen Therapy Plus Anti-PD-1 in Patients with Advanced Melanoma, Non-small Cell Lung Cancer, or Bladder Cancer // *Cell*. – 2020, Oct 15. – Vol. 183, № 2. – P. 347–362.e24.
18. Baruch E.N., Youngster I., Ben-Betzalel G., Ortenberg R., Labat A., Katz L., Adler K., Dick-Necula D., Raskin S., Bloch N., Rotin D., Anafi L., Avivi C., Melnichenko J., Steinberg-Silman Y., Mamtani R., Harati H., Asber N., Shapira-Frommer R., Brosh-Nissimov T., Esbet Y., Ben-Simon S., Ziv O., Khan M.A.W., Amit M., Ajami N.J., Barsback I., Schachter J., Wargo J.A., Koren O., Markel G., Boursi B. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients // *Science*. – 2021, Feb 5. – Vol. 371, № 6529. – P. 602–609. Epub. – 2020, Dec 10.
19. Wellenstein M.D., Coffelt S.B., Duits D.E.M., van Miltenburg M.H., Slagter M., de Rink I., Henneman L., Kas S.M., Prekovic S., Hau C.S., Vrijland K., Drenth A.P., de Korte-Grimmerink R., Schut E., van der Heijden I., Zwart W., Wessels L.F.A., Schumacher T.N., Jonkers J., de Visser K.E. Loss of p53 triggers WNT-dependent systemic inflammation to drive breast cancer metastasis // *Nature*. – 2019, Aug. – Vol. 572, № 7770. – P. 538–542. Epub. – 2019, Jul 31.
20. Amit M., Takahashi H., Dragomir M.P., Lindemann A., Gleber-Netto F.O., Pickering C.R., Anfossi S., Osman A.A., Cai Y., Wang R., Knutsen E., Shimizu M., Ivan C., Rao X., Wang J., Silverman D.A., Tam S., Zhao M., Caulin C., Zinger A., Tasciotti E., Dougherty P.M., El-Naggar A., Calin G.A., Myers J.N. Loss of p53 drives neuron reprogramming in head and neck cancer // *Nature*. – 2020, Feb. – Vol. 578, № 7795. – P. 449–454. Epub. – 2020, Feb 12.
21. Harrison P.T., Vyse S., Huang P.H. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer // *Semin Cancer Biol*. – 2020, Apr. – Vol. 61. – P. 167–179. Epub. – 2019, Sep 25.
22. Saito Y., Koya J., Araki M., Kogure Y., Shingaki S., Tabata M., McClure M.B., Yoshifuji K., Matsumoto S., Isaka Y., Tanaka H., Kanai T., Miyano S., Shiraiishi Y., Okuno Y., Kataoka K. Landscape and function of multiple mutations within individual oncogenes // *Nature*. – 2020, Jun. – Vol. 582, № 7810. – P. 95–99. Epub. – 2020, Apr 8.
23. Vasan N., Razavi P., Johnson J.L., Shao H., Shab H., Antoine A., Ladewig E., Gorelick A., Lin T.Y., Toska E., Xu G., Kazmi A., Chang M.T., Taylor B.S., Dickler M.N., Jhaveri K., Chandrarapaty S., Rabadan R., Reznik E., Smith M.L., Sebra R., Schimmoller F., Wilson T.R., Friedman L.S., Cantley L.C., Scaltriti M., Baselga J. Double PIK3CA mutations in cis increase oncogenicity and sensitivity to PI3Kα inhibitors // *Science*. – 2019, Nov 8. – Vol. 366, № 6466. – P. 714–723.
24. Naxerova K., Reiter J.G., Brachtel E., Lennerz J.K., van de Wetering M., Rowan A., Cai T., Clevers H., Swanton C., Nowak M.A., Elledge S.J., Jain R.K. Origins of lymphatic and distant metastases in human colorectal cancer // *Science*. – 2017, Jul 7. – Vol. 357, № 6346. – P. 55–60.

25. Reiter J.G., Hung W.T., Lee I.H., Nagpal S., Giunta P., Degner S., Liu G., Wassenaar E.C.E., Jeck W.R., Taylor M.S., Farabani A.A., Marble H.D., Knott S., Kranenburg O., Lennerz J.K., Naxerova K. Lymph node metastases develop through a wider evolutionary bottleneck than distant metastases // *Nat Genet.* – 2020 Jul. – Vol. 52(7). – P. 692–700. Epub. – 2020, May 25.

26. Hu Z., Li Z., Ma Z., Curtis C. Multi-cancer analysis of clonality and the timing of systemic spread in paired primary tumors and metastases // *Nat Genet.* – 2020, Jul. – Vol. 52, № 7. – P. 701–708. Epub. – 2020, May 18.

References

1. Pinzani P., D'Argenio V., Del Re M., Pellegrini C., Cucchiara F., Salvianti F., Galbiati S. Updates on liquid biopsy: current trends and future perspectives for clinical application in solid tumors. *Clin Chem Lab Med.* 2021 Feb 4. doi: 10.1515/cclm-2020-1685. Epub ahead of print. PMID: 33544478.

2. Poore G.D., Kopylova E., Zhu Q., Carpenter C., Fraraccio S., Wandro S., Kosciolk T., Janssen S., Metcalf J., Song S.J., Kanbar J., Miller-Montgomery S., Heaton R., McKay R., Patel S.P., Swafford A.D., Knight R. Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach. *Nature.* 2020 Mar; 579(7800): 567-574. doi: 10.1038/s41586-020-2095-1. Epub. 2020 Mar 11. PMID: 32214244; PMCID: PMC7500457.

3. Dias T.C., Longatto-Filho A., Campanella N.C. Human papillomavirus genotyping as a tool for cervical cancer prevention: from commercially available human papillomavirus DNA test to next-generation sequencing. *Future Sci OA.* 2020 Jul 30; 6(9): FSO603. doi: 10.2144/fsoa-2019-0159. PMID: 33235804; PMCID: PMC7668120.

4. Lennon A.M., Buchanan A.H., Kinde I., Warren A., Honushefsky A., Cobain A.T., Ledbetter D.H., Sanfilippo F., Sheridan K., Rosica D., Adonizio C.S., Hwang H.J., Labouel K., Cohen J.D., Douville C., Patel A.A., Hagmann L.N., Rolston D.D., Malani N., Zhou S., Bettegowda C., Diehl D.L., Urban B., Still C.D., Kann L., Woods J.I., Salvati Z.M., Vadakara J., Leeming R., Bhattacharya P., Walter C., Parker A., Lengauer C., Klein A., Tomasetti C., Fishman E.K., Hruban R.H., Kinzler K.W., Vogelstein B., Papadopoulos N. Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention. *Science.* 2020 Jul 3; 369(6499): eabb9601. doi: 10.1126/science.abb9601. Epub 2020 Apr 28. PMID: 32345712; PMCID: PMC7509949.

5. Cohen J.D., Li L., Wang Y., Thoburn C., Afsari B., Danilova L., Douville C., Javed A.A., Wong F., Mattox A., Hruban R.H., Wolfgang C.L., Goggins M.G., Dal Molin M., Wang T.L., Roden R., Klein A.P., Ptak J., Dobbyn L., Schaefer J., Silliman N., Popoli M., Vogelstein J.T., Browne J.D., Schoen R.E., Brand R.E., Tie J., Gibbs P., Wong H.L., Mansfield A.S., Jen J., Hanash S.M., Falconi M., Allen P.J., Zhou S., Bettegowda C., Diaz L.A. Jr, Tomasetti C., Kinzler K.W., Vogelstein B., Lennon A.M., Papadopoulos N. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science.* 2018 Feb 23; 359(6378): 926-930. doi: 10.1126/science.aar3247. Epub 2018 Jan 18. PMID: 29348365; PMCID: PMC6080308.

6. Massard C., Michiels S., Ferte C., Le Deley M.C., Lacroix L., Hollebecque A., Verlingue L., Ileana E., Rosellini S., Amari S., Ngo-Camus M., Bableda R., Gazzab A., Varga A., Postel-Vinay S., Lorient Y., Even C., Breuskin I., Auger N., Job B., De Baere T., Deschamps F., Viel P., Scoazec J.Y., Lazar V., Richon C., Ribrag V., Deutsch E., Angevin E., Vassal G., Eggermont A., Andre F., Soria J.C. High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. *Cancer Discov.* 2017 Jun; 7(6): 586-595. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1396. Epub. 2017 Apr 1. PMID: 28365644.

7. Rodon J., Soria J.C., Berger R., Miller W.H., Rubin E., Kugel A., Tsimberidou A., Saintigny P., Ackerstein A., Braña I., Lorient Y., Afshar M., Miller V., Wunder F., Bresson C., Martini J.F., Raynaud J., Mendelsohn J., Batist G., Onn A., Tabernero J., Schilsky R.L., Lazar V., Lee J.J., Kurzrock R. Genomic and transcriptomic profiling expands precision cancer medicine: the WINTHER trial. *Nat Med.* 2019 May; 25(5): 751-758. doi: 10.1038/s41591-019-0424-4. Epub. 2019 Apr 22. PMID: 31011205; PMCID: PMC6599610.

8. Sicklick J.K., Kato S., Okamura R., Schwaederle M., Hahn M.E., Williams C.B., De P., Krie A., Piccioni D.E., Miller V.A., Ross J.S., Benson A., Webster J., Stephens P.J., Lee J.J., Fanta P.T., Lippman S.M., Leyland-Jones B., Kurzrock R. Molecular profiling of cancer patients enables personalized combination therapy: the i-PREDICT study. *Nat Med.* 2019 May; 25(5): 744-750. doi: 10.1038/s41591-019-0407-5. Epub. 2019 Apr 22. PMID: 31011206; PMCID: PMC6553618.

9. Pishvaian M.J., Blais E.M., Brody J.R., Lyons E., DeArbello P., Hendifar A., Mikhail S., Chung V., Sabai V., Sobal D.P.S., Bellakbira S., Thach D., Rabib L., Madhavan S., Matrisian L.M., Petricoin E.F. 3rd. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol.* 2020 Apr; 21(4): 508-518. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30074-7. Epub. 2020 Mar 2. Erratum in: *Lancet Oncol.* 2020 Apr; 21(4): e182. PMID: 32135080; PMCID: PMC7453743.

10. Middleton G., Fletcher P., Popat S., Savage J., Summers Y., Greystoke A., Gilligan D., Cave J., O'Rourke N., Breuster A., Toy E., Spicer J., Jain P., Dangoor A., Mackean M., Forster M., Farley A., Wherton D., Mehmi M., Sharpe R., Mills T.C., Cerone M.A., Yap T.A., Watkins T.B.K., Lim E., Swanton C., Billingham L. Publisher Correction: The National Lung Matrix Trial of personalized therapy in lung cancer. *Nature.* 2020 Sep; 585(7826): E21. doi: 10.1038/s41586-020-2656-3. Erratum for: *Nature.* 2020 Jul; 583(7818): 807-812. PMID: 32887973.

11. Andre F., Ciruelos E., Rubovszky G., Campone M., Loibl S., Rugo H.S., Iwata H., Conte P., Mayer I.A., Kaufman B., Yamashita T., Lu Y.S., Inoue K., Takahashi M., Pápai Z., Longin A.S., Mills D., Wilke C., Hirawat S., Juric D.; SOLAR-1 Study Group. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2019 May 16; 380(20): 1929-1940. doi: 10.1056/NEJMoa1813904. PMID: 31091374.

12. Koundouros N., Karali E., Tripp A., Valle A., Inglese P., Perry N.J.S., Magee D.J., Anjomani Virumouni S., Elder G.A., Tyson A.L., Dória M.L., van Weverwijk A., Soares R.F., Isacke C.M., Nicholson J.K., Glen R.C., Takats Z., Poulogiannis G. Metabolic

Fingerprinting Links Oncogenic PIK3CA with Enhanced Arachidonic Acid-Derived Eicosanoids. *Cell*. 2020 Jun 25; 181(7): 1596-1611.e27. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.053. Epub. 2020 Jun 18. PMID: 32559461; PMCID: PMC7339148.

13. Vilar E., Gruber S.B. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Mar; 7(3): 153-62. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.237. Epub. 2010 Feb 9. PMID: 20142816; PMCID: PMC3427139.

14. André T., Shiu K.K., Kim T.W., Jensen B.V., Jensen L.H., Punt C., Smith D., Garcia-Carbonero R., Benavides M., Gibbs P., de la Fouchardiere C., Rivera F., Elez E., Bendell J., Le D.T., Yoshino T., Van Cutsem E., Yang P., Farooqui M.Z.H., Marinello P., Diaz L.A. Jr; KEYNOTE-177 Investigators. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Dec 3; 383(23): 2207-2218. doi: 10.1056/NEJMoa2017699. PMID: 33264544.

15. Chalabi M., Fanchi L.F., Dijkstra K.K., Van den Berg J.G., Aalbers A.G., Sikorska K., Lopez-Yurda M., Grootsholten C., Beets G.L., Snaebjornsson P., Maas M., Mertz M., Veninga V., Bounova G., Broeks A., Beets-Tan R.G., de Wijkerslooth T.R., van Lent A.U., Marsman H.A., Nuijten E., Kok N.F., Kuiper M., Verbeek W.H., Kok M., Van Leerdam M.E., Schumacher T.N., Voest E.E., Haanen J.B. Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers. *Nat Med*. 2020 Apr; 26(4): 566-576. doi: 10.1038/s41591-020-0805-8. Epub. 2020 Apr 6. PMID: 32251400.

16. Ott P.A., Hu Z., Keskin D.B., Shukla S.A., Sun J., Bozym D.J., Zhang W., Luoma A., Giobbie-Hurder A., Peter L., Chen C., Olive O., Carter T.A., Li S., Lieb D.J., Eisenbaure T., Gjini E., Stevens J., Lane W.J., Javeri I., Nellaippan K., Salazar A.M., Daley H., Seaman M., Buchbinder E.I., Yoon C.H., Harden M., Lennon N., Gabriel S., Rodig S.J., Barouch D.H., Aster J.C., Getz G., Wucherpfennig K., Neuberg D., Ritz J., Lander E.S., Fritsch E.F., Hacohen N., Wu C.J. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature*. 2017 Jul 13; 547(7662): 217-221. doi: 10.1038/nature22991. Epub. 2017 Jul 5. Erratum in: *Nature*. 2018 Mar 14; 555(7696): 402. PMID: 28678778; PMCID: PMC5577644.

17. Ott P.A., Hu-Lieskovan S., Chmielowski B., Govindan R., Naing A., Bhardwaj N., Margolin K., Awad M.M., Hellmann M.D., Lin J.J., Friedlander T., Bushway M.E., Balogh K.N., Sciuto T.E., Kobler V., Turnbull S.J., Besada R., Curran R.R., Trapp B., Scherer J., Poran A., Harjanto D., Barthelme D., Ting Y.S., Dong J.Z., Ware Y., Huang Y., Huang Z., Wanamaker A., Cleary L.D., Moles M.A., Manson K., Greshock J., Kbondker Z.S., Fritsch E., Rooney M.S., DeMario M., Gaynor R.B., Srinivasan L. A Phase Ib Trial of Personalized Neoantigen Therapy Plus Anti-PD-1 in Patients with Advanced Melanoma, Non-small Cell Lung Cancer, or Bladder Cancer. *Cell*. 2020 Oct 15; 183(2): 347-362.e24. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.053. PMID: 33064988.

18. Baruch E.N., Youngster I., Ben-Betzalel G., Ortenberg R., Labat A., Katz L., Adler K., Dick-Necula D., Raskin S., Bloch N., Rotin D., Anafi L., Avivi C., Melnichenko J., Steinberg-Silman Y., Mamtani R., Harati H., Asber N., Shapira-Frommer R., Brosh-Nissimov T., Esbet Y., Ben-Simon S., Ziv O., Khan M.A.W., Amit M., Ajami N.J., Barshack I., Schachter J., Wargo J.A., Koren O., Markel G., Boursi B. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science*. 2021 Feb 5; 371(6529): 602-609. doi: 10.1126/science.abb5920. Epub. 2020 Dec 10. PMID: 33303685.

19. Wellenstein M.D., Coffelt S.B., Duits D.E.M., van Miltenburg M.H., Slagter M., de Rink I., Henneman L., Kas S.M., Prekovic S., Hau C.S., Vrijland K., Drenth A.P., de Korte-Grimmerink R., Schut E., van der Heijden I., Zwart W., Wessels L.F.A., Schumacher T.N., Jonkers J., de Visser K.E. Loss of p53 triggers WNT-dependent systemic inflammation to drive breast cancer metastasis. *Nature*. 2019 Aug; 572(7770): 538-542. doi: 10.1038/s41586-019-1450-6. Epub. 2019 Jul 31. PMID: 31367040; PMCID: PMC6707815.

20. Amit M., Takabashi H., Dragomir M.P., Lindemann A., Gleber-Netto F.O., Pickering C.R., Anfossi S., Osman A.A., Cai Y., Wang R., Knutsen E., Shimizu M., Ivan C., Rao X., Wang J., Silverman D.A., Tam S., Zhao M., Caulin C., Zinger A., Tasciotti E., Dougherty P.M., El-Naggar A., Calin G.A., Myers J.N. Loss of p53 drives neuron reprogramming in head and neck cancer. *Nature*. 2020 Feb; 578(7795): 449-454. doi: 10.1038/s41586-020-1996-3. Epub. 2020 Feb 12. PMID: 32051587.

21. Harrison P.T., Vyse S., Huang P.H. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol*. 2020 Apr; 61: 167-179. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.015. Epub 2019 Sep 25. PMID: 31562956; PMCID: PMC7083237.

22. Saito Y., Koya J., Araki M., Kogure Y., Shingaki S., Tabata M., McClure M.B., Yoshifuji K., Matsumoto S., Isaka Y., Tanaka H., Kanai T., Miyano S., Shiraiishi Y., Okumo Y., Kataoka K. Landscape and function of multiple mutations within individual oncogenes. *Nature*. 2020 Jun; 582(7810): 95-99. doi: 10.1038/s41586-020-2175-2. Epub. 2020 Apr 8. PMID: 32494066.

23. Vasan N., Razavi P., Johnson J.L., Shao H., Shab H., Antoine A., Ladewig E., Gorelick A., Lin T.Y., Toska E., Xu G., Kazmi A., Chang M.T., Taylor B.S., Dickler M.N., Jhaveri K., Chandarlapaty S., Rabadan R., Reznik E., Smith M.L., Sebra R., Schimmoller F., Wilson T.R., Friedman L.S., Cantley L.C., Scaltriti M., Baselga J. Double PIK3CA mutations in cis increase oncogenicity and sensitivity to PI3Ka inhibitors. *Science*. 2019 Nov 8; 366(6466): 714-723. doi: 10.1126/science.aaw9032. PMID: 31699932; PMCID: PMC7173400.

24. Naxerova K., Reiter J.G., Brachtel E., Lennerz J.K., van de Wetering M., Rowan A., Cai T., Clevers H., Swanton C., Nowak M.A., Elledge S.J., Jain R.K. Origins of lymphatic and distant metastases in human colorectal cancer. *Science*. 2017 Jul 7; 357(6346): 55-60. doi: 10.1126/science.aai8515. PMID: 28684519; PMCID: PMC5536201.

25. Reiter J.G., Hung W.T., Lee I.H., Nagpal S., Giunta P., Degner S., Liu G., Wassenaar E.C.E., Jeck W.R., Taylor M.S., Farabani A.A., Marble H.D., Knott S., Kranenburg O., Lennerz J.K., Naxerova K. Lymph node metastases develop through a wider evolutionary bottleneck than distant metastases. *Nat Genet*. 2020 Jul; 52(7): 692-700. doi: 10.1038/s41588-020-0633-2. Epub. 2020 May 25. PMID: 32451459; PMCID: PMC7343611.

26. Hu Z., Li Z., Ma Z., Curtis C. Multi-cancer analysis of clonality and the timing of systemic spread in paired primary tumors and metastases. *Nat Genet*. 2020 Jul; 52(7): 701-708. doi: 10.1038/s41588-020-0628-z. Epub. 2020 May 18. PMID: 32424352; PMCID: PMC7343625.