

<https://medicinaprecisionandalucia.iavante.es> | #PANMEP

PANMEP

PROGRAMA ANDALUZ DE FORMACIÓN EN MEDICINA PERSONALIZADA Y DE PRECISIÓN

EXPERTO UNIVERSITARIO EN MEDICINA PERSONALIZADA Y DE PRECISIÓN

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

ORGANIZAN:

- **Consejería de Salud y Consumo**, Fundación Progreso y Salud - IAVANTE
- **Universidad Internacional de Andalucía**

FORMACIÓN
IAVANTE
Fundación
Progreso y Salud

COLABORA

Johnson & Johnson

ORGANIZAN

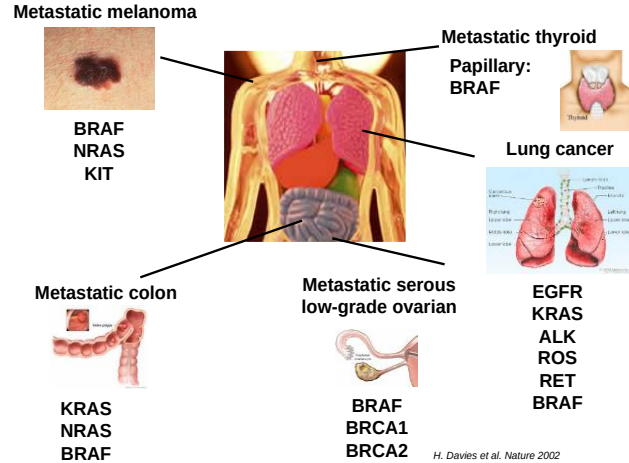
un
i Universidad
Internacional
de Andalucía
A

A
Junta de Andalucía
Consejería de Salud y Consumo

CASOS CLINICOS

Beatriz Bellosillo, Hospital del Mar

Estudio de biomarcadores en oncología de precisión



Estudio de biomarcadores en oncología de precisión

Detection Capability
(mutant DNA/ total DNA)

100%

10%

2-5%

1%

1-0.1%

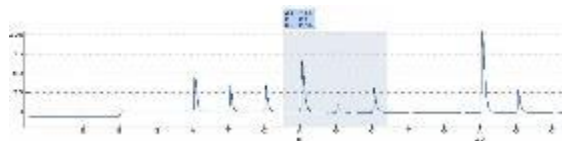
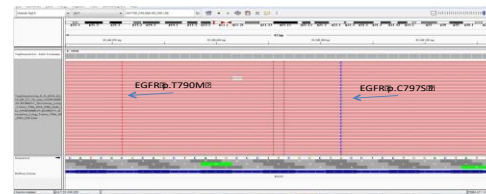
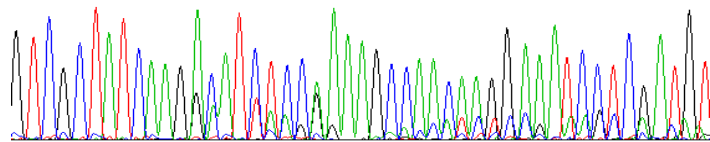
Sanger Sequencing

NGS

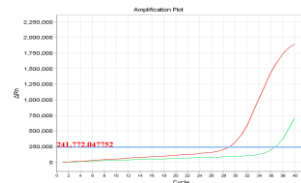
Pyrosequencing

Real-Time PCR

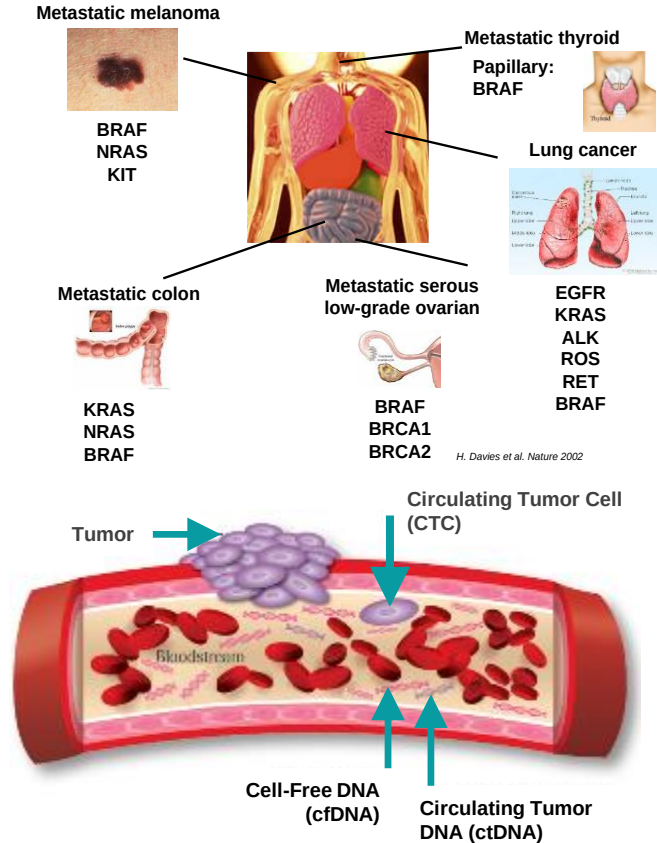
G T C G C T A T C A A G R M A T C T C C R A A A G C C A A C A A G G A A A T C C T C G A T G T



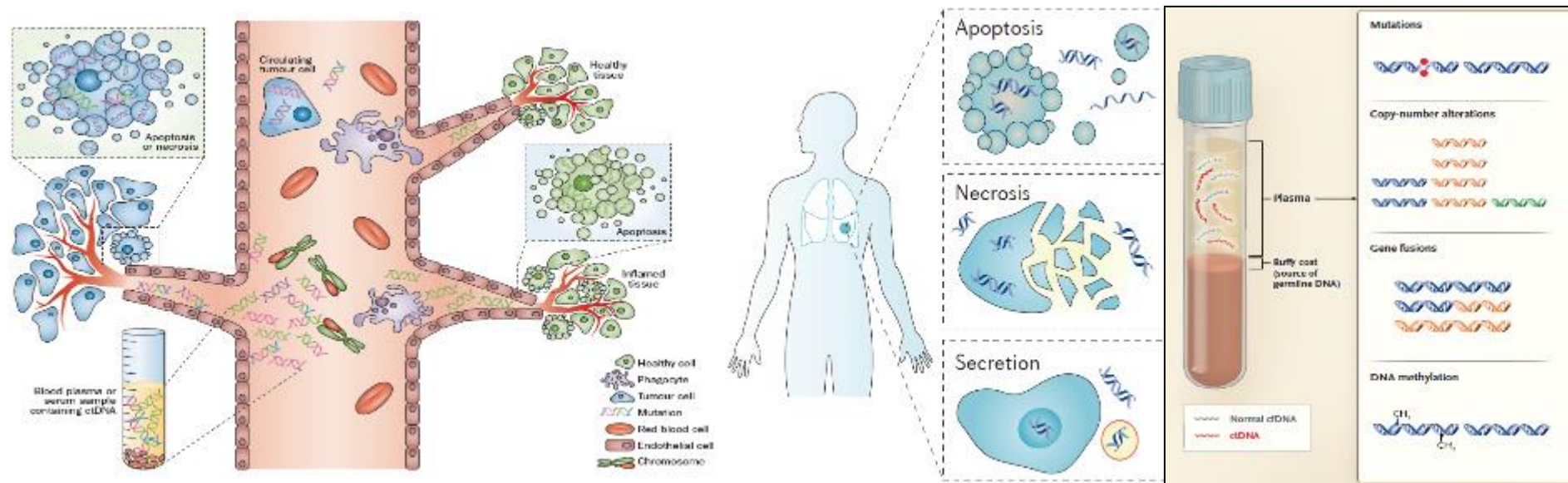
KRAS p.A146T



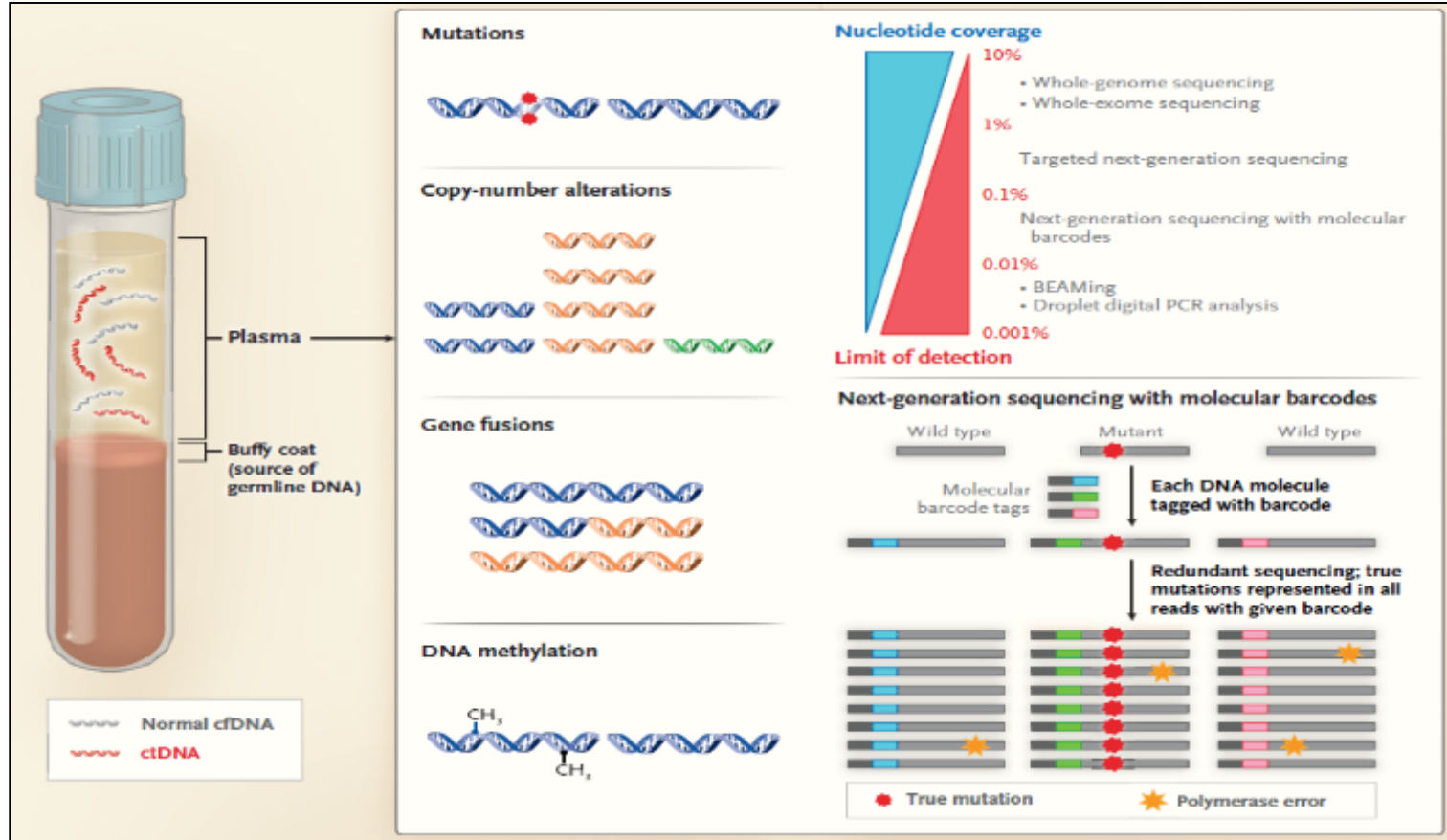
Estudio de biomarcadores en oncología de precisión



Estudio de biomarcadores en oncología de precisión- biopsia líquida



Estudio de biomarcadores en oncología de precisión- biopsia líquida



Estudio de biomarcadores en oncología de precisión

Detection Capability
(mutant DNA/ total DNA)

100%

10%

2-5%

1%

1-0.1%

0.5-0.1%

0.01%

Sanger Sequencing

NGS

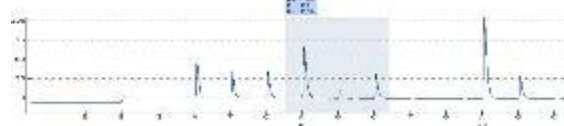
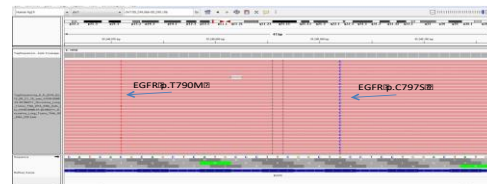
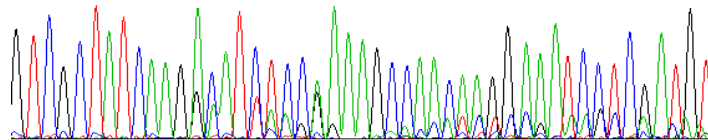
Pyrosequencing

Real-Time PCR

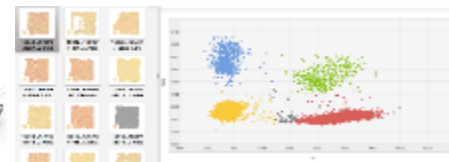
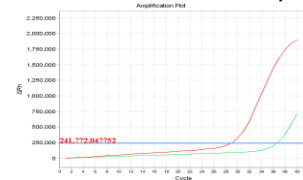
UMI- NGS

BEAMing/PCR digital

G T C G C T A T C A A G R M A T C T C C R A A A G C C A A C A A G G A A A T C C T C G A T G T



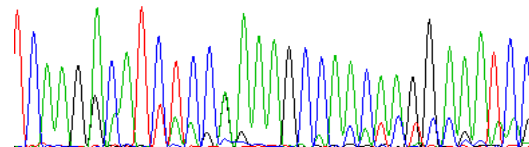
KRAS p.A146T



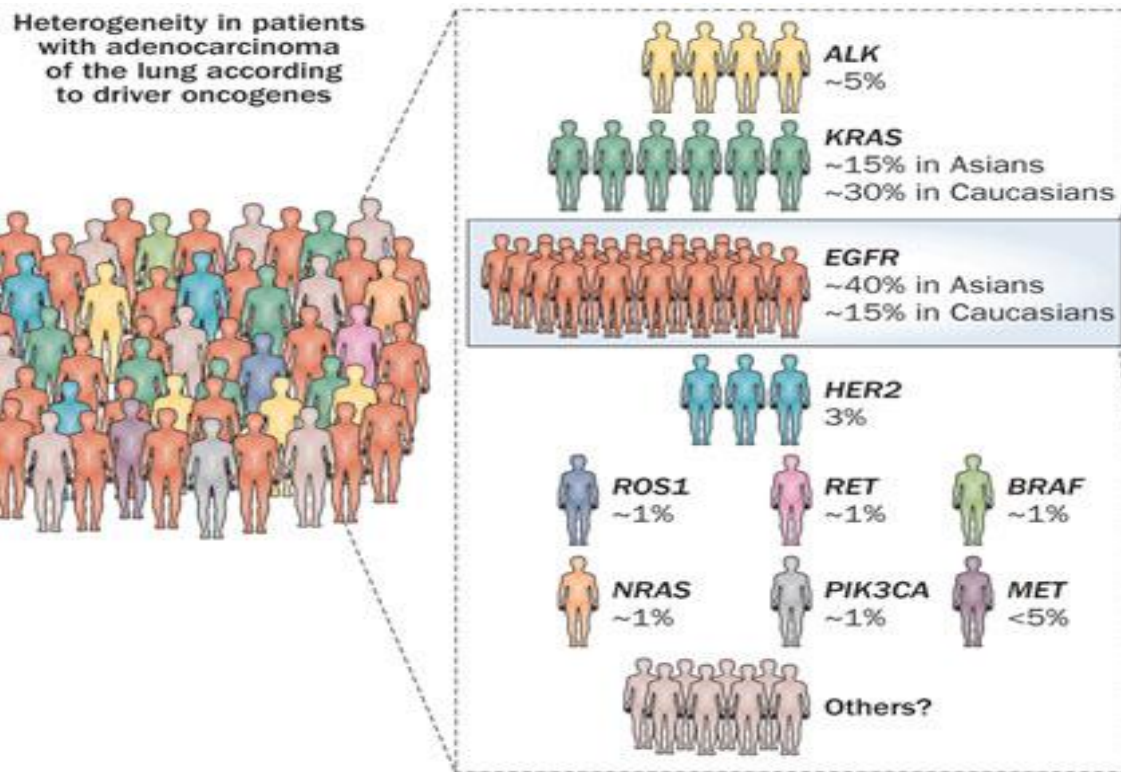
Caso 1

- Mujer de 62 años
- Septiembre 2015 – diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón T2aN3M1b (M1 -CNS)
- EGFR* mutado (deleción en el exón 19)

T C A A G R M A T Y T C C R A A A G C C A A C A A G G A A A T C C



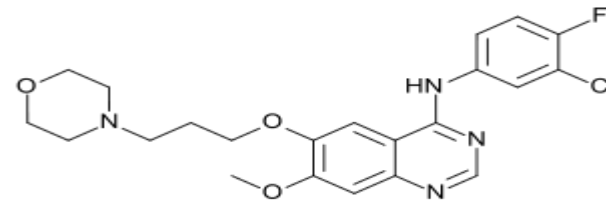
Alteraciones moleculares en pacientes con adenocarcinoma de pulmón



EGFR inhibitors

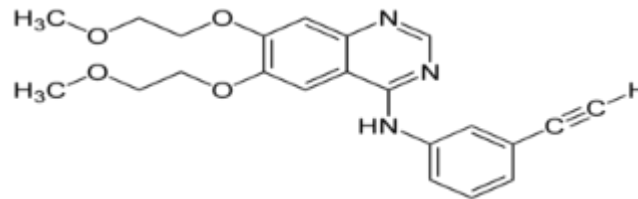
GEFITINIB

Reversible EGFR inhibitor



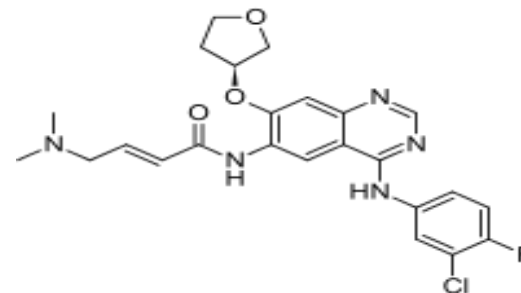
ERLOTINIB

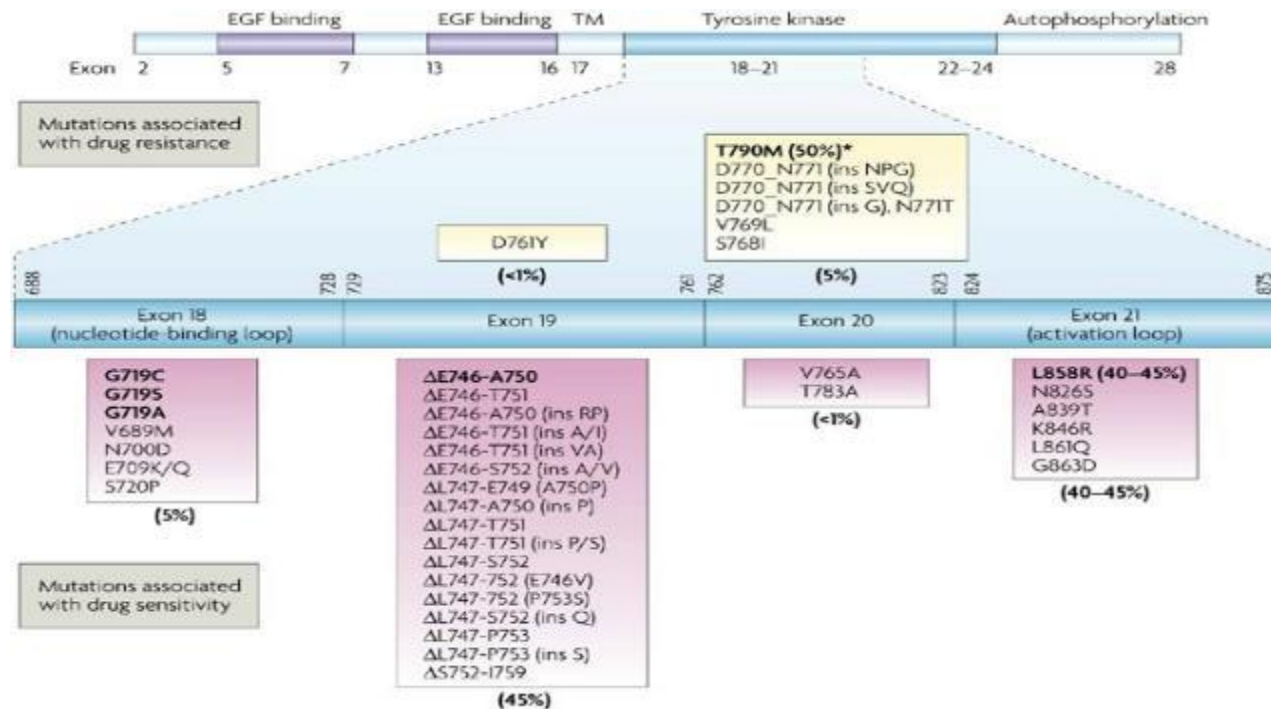
Reversible EGFR inhibitor



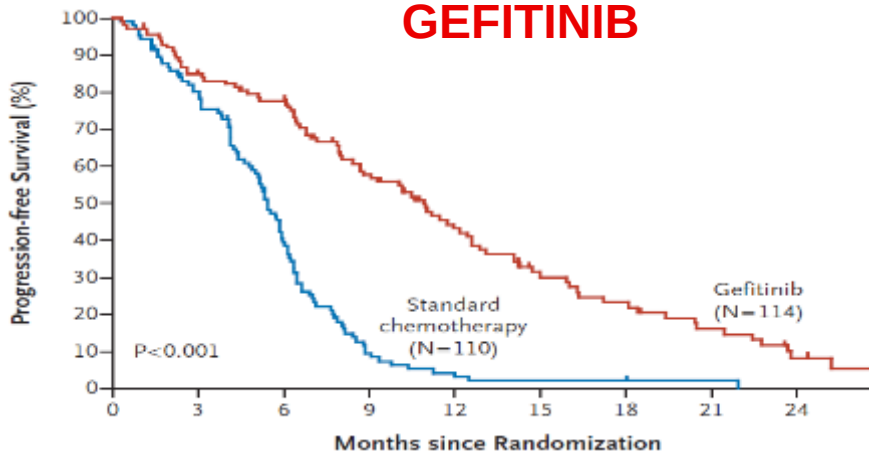
AFATINIB

Irreversible EGFR, HER2, ErbB4 inhibitor

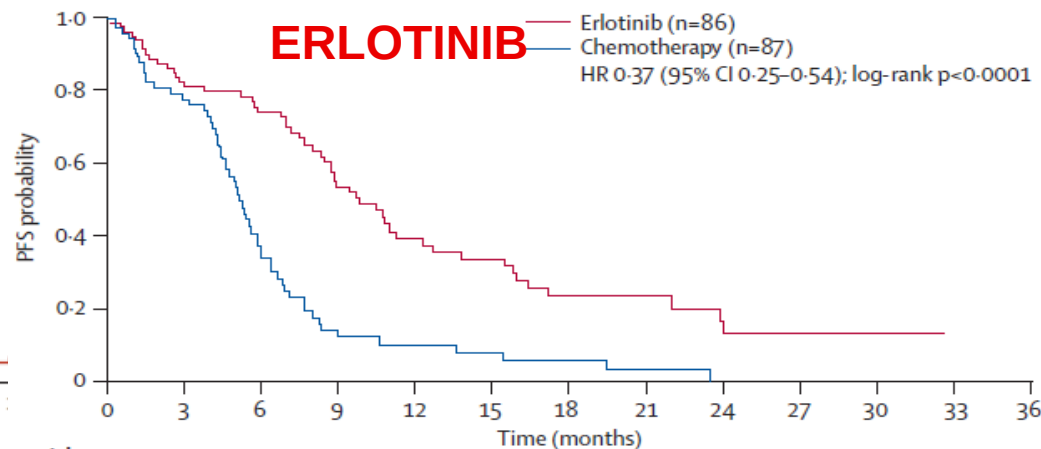




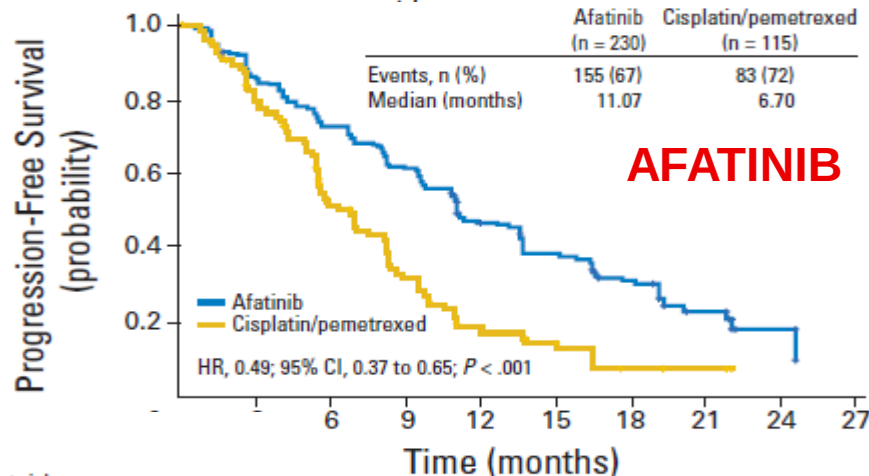
GEFITINIB



ERLOTINIB



AFATINIB



Maemondo. NEJM2010

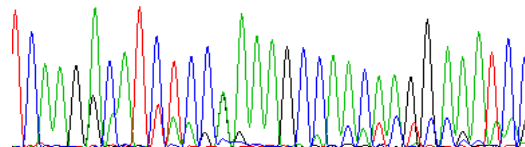
Rosell. Lancet 2012

Sequist. JCO 2013

Caso 1

- Mujer de 62 años
- Septiembre 2015 – diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón T2aN3M1b (M1 -CNS)
- EGFR* mutado (deleción en el exón 19)
- Tratamiento con TKI –Afatinib
- Nov 2015- Cambio a gefitinib por toxicidad
- Respuesta parcial - torácica y SNC (50%)
- Febrero 2017 – progresión lenta

T C A A G R M A T Y T C C R A A A G C C A A C A A G G A A A T C C



AVENIO ctDNA Targeted Kit

Includes genes in NC

AVENIO ctDNA Analysis Software

Variant Report



SNVs 		Indels*
ALK	KRAS	ALK
APC	MET	APC
BRAF	NRAS	BRAF
BRCA1	PDGFRA	EGFR
BRCA2	RET	ERBB2
DPYD	ROS1	KIT
EGFR	TP53	MET
ERBB2	UGT1A1**	
KIT		

SAMPLE ID D52993	ANALYSIS START DATE Feb 22, 2018 15:27:08 UTC
ANALYSIS WORKFLOW DefaultTargetedPanelWorkflow	PANEL Targeted
ADAPTER SA 4	FILTERSET DefaultFilterSet*
ISOLATED DNA MASS 40.05 ng	SAMPLE VOLUME 4.20 mL

Results Summary

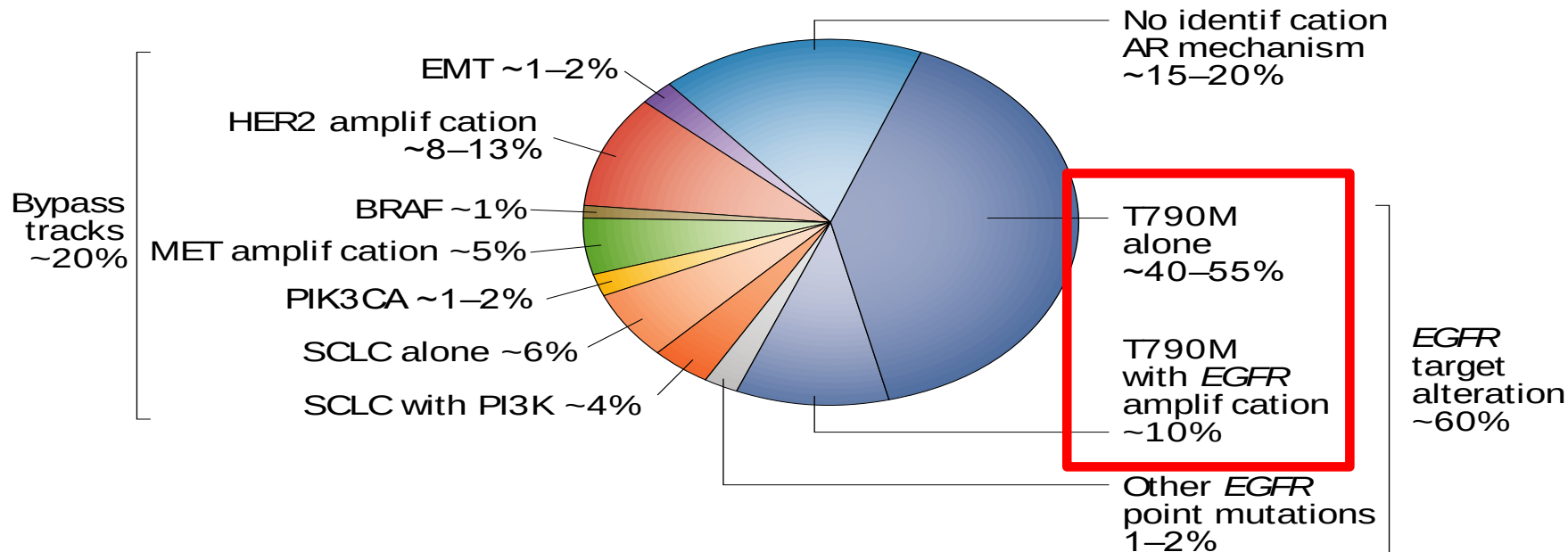
SNVS (2)				
Gene	Variant	Variant Description	Allele	No. of Mutant
TP53	p.Arg273Cys	Missense variant	0.82%	25.7
EGFR	p.Arg262Cys	Missense variant	0.55%	17.4
	p.Thr790Met	Missense variant		
INDELS (1)				
Gene	Variant	Variant Description	Fraction	Molecules per mL
EGFR	p.Glu746_Ala750del	Disruptive inframe deletion	1.00%	31.5
CNV AMPLIFICATIONS (1)				
Gene				
MET				
FUSIONS (0)				

Run Details

RUN NAME 20180220_AVENIO_RUN2	NUMBER OF SAMPLES 13
RUN ID AQ1158UML1LQYHE_GZVx0h	FLOWCELL ID AHL3VFBGX5
SEQUENCER NAME NS500644	SEQUENCER STARTED Feb 19, 2018
OPERATOR Admin	REPORT GENERATION DATE Feb 23, 2018 01:35:42 UTC
SEQUENCER FILE DATA PATH mount:rs-sas/runs/20180220_AVENIO_RUN2/180220_NS500644_0112_AHL3VFBGX5	

Confirmation by digital PCR
for T790M

Mechanisms of secondary resistance

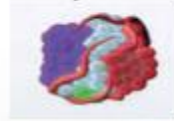





Sensitive
Clone



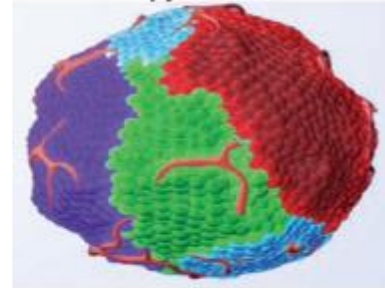
Response



  
Resistant
Clones



Progression

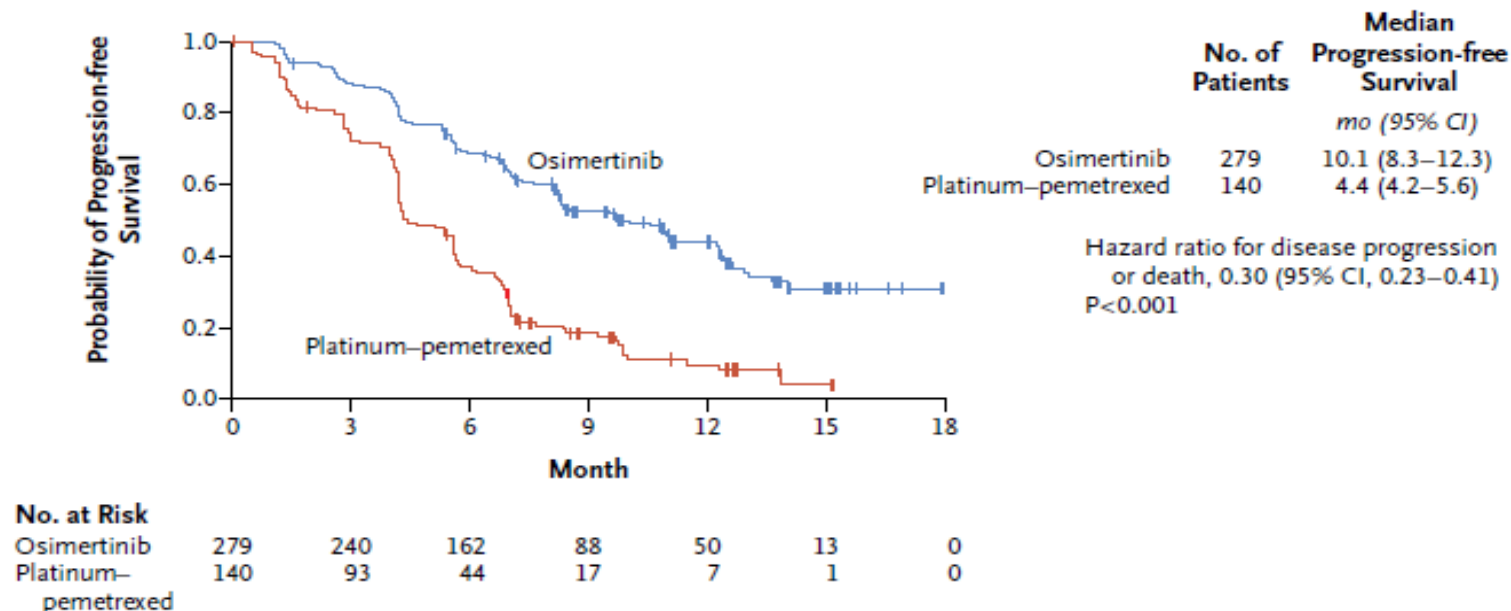


December 6, 2016

Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer

T.S. Mok, Y.-L. Wu, M.-J. Ahn, M.C. Garassino, H.R. Kim, S.S. Ramalingam, F.A. Shepherd, Y. He, H. Akamatsu, W.S.M.E. Theelen, C.K. Lee, M. Sebastian, A. Templeton, H. Mann, M. Marotti, S. Ghiorghiu, and V.A. Papadimitrakopoulou, for the AURA3 Investigators*

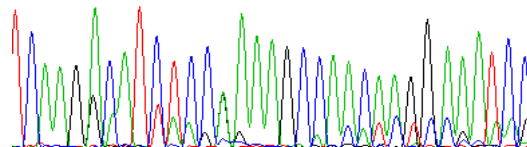
Patients in Intention-to-Treat Population



Caso 1

- Mujer de 62 años
- Septiembre 2015 – diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón T2aN3M1b (M1 -CNS)
- EGFR mutado (deleción en el exón 19)
- Tratamiento con TKI –Afatinib
- Nov 2015- Cambio a gefitinib por toxicidad
- Respuesta parcial - torácica y SNC (50%)
- Febrero 2017 – progresión lenta
 - Liquid biopsy : EGFR del 19 + p.T790M
- Abril 2017 – Progresión ósea
- Junio 2017 – cambio a Osimertinib

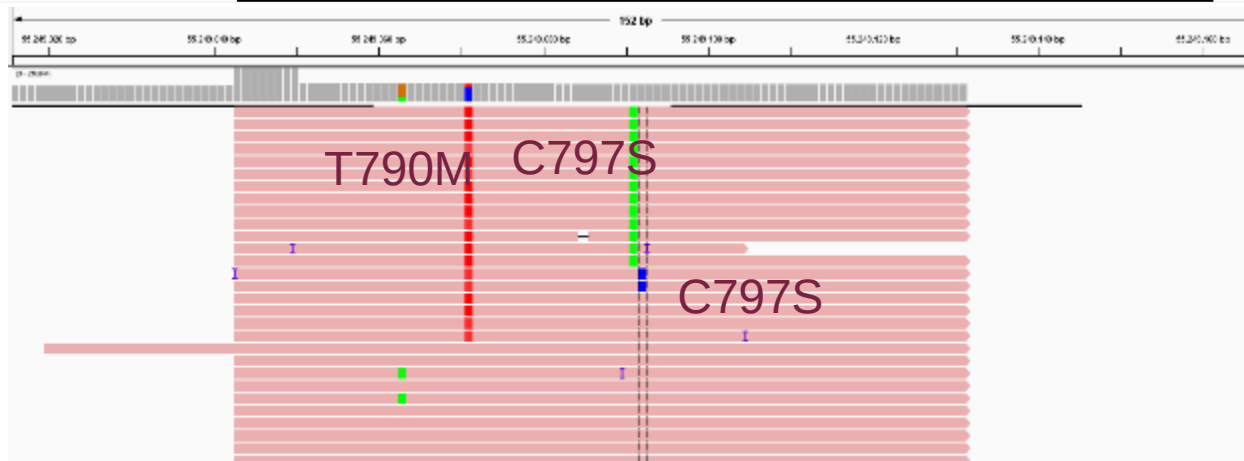
T C A A G R M A T Y T C C R A A A G C C A A C A A G G A A A T C C



Caso 1

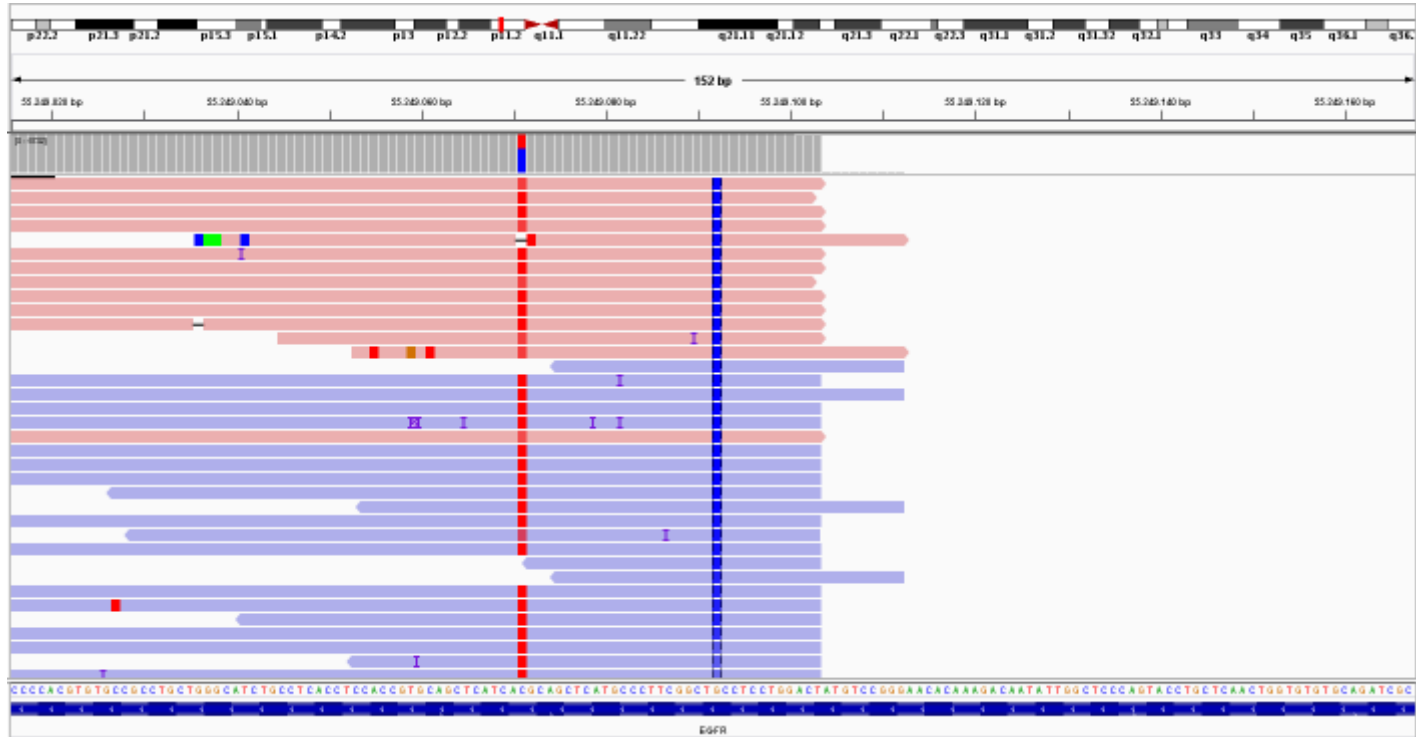
- Junio 2017 – cambio a Osimertinib
- Noviembre 2018 – progresión – nódulos pulmonares: Biopsia líquida: NGS (Oncomine TNA)

SNV / Indel			
Gene	MAF %	AA Chg	QC Test (LOD) %
EGFR	40.2197	p.Glu746_Ala...	5.0E-4
EGFR ... (2)	20.5913	p.T790M	0.001
EGFR ... (2)	1.4433	p.C797S	0.001

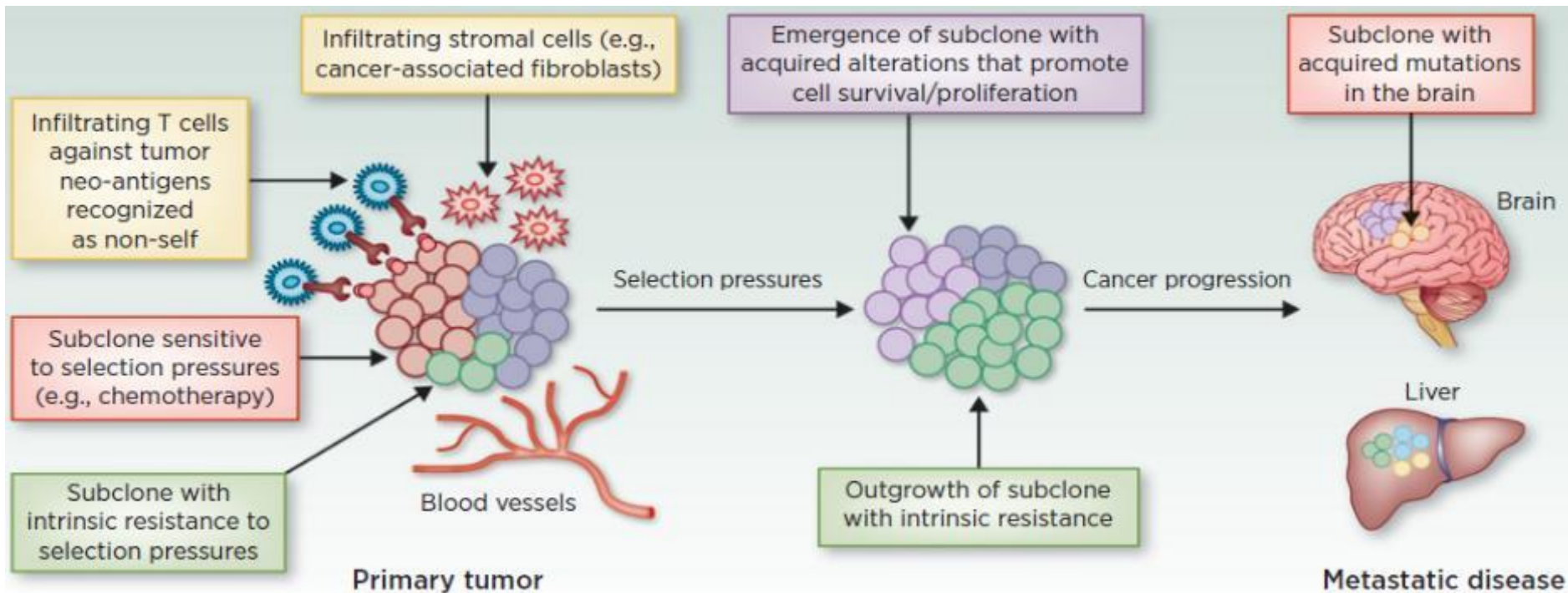


Estudio paralelo en la biopsia pulmonar por NGS

Caso 1



BX : OST EGFR p.Thr790Met 39,7% // p.Cys797Ser c.2390G>C 16,7%



Caso 2

Mujer de 59 años

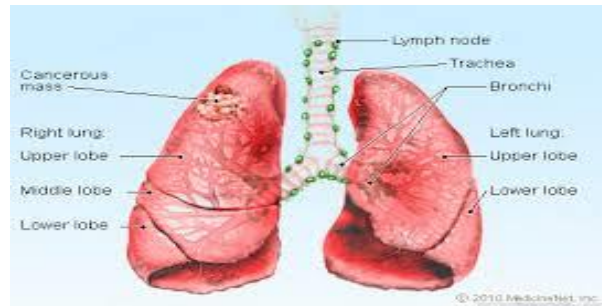
Septiembre 2016 - diagnóstico de
adenocarcinoma de pulmón estadio IV (M1
–hueso+hígado)

EGFR mutado (delección en el exón 19-
(p.E746_A750del))

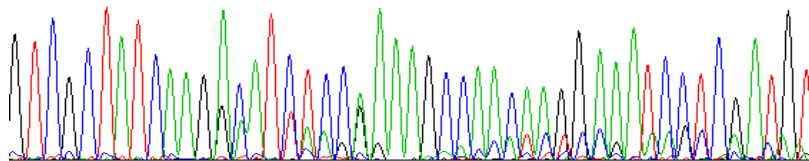
Tratamiento con TKI –gefitinib

Respuesta parcial

Lung cancer



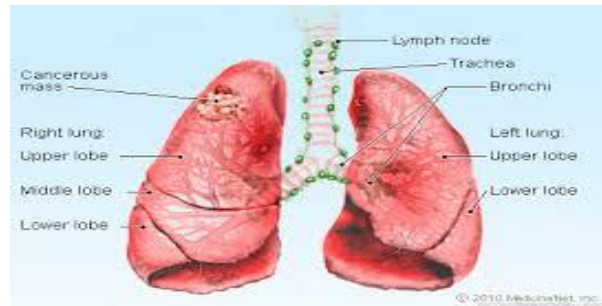
G T C G C T A T C A A G R M A T C T C C R A A A G C C A A C A A G G A A A T C C T C G A T G T



Caso 2

- Septiembre 2017 –progresión pulmonar
 - Biopsia líquida: EGFR del 19
 - Rebiopsia : EGFR del 19 + p.T790M
- Octubre 2017 – cambio a Osimertinib
- Respuesta casi completa
- Octubre 2018: progresión pulmonar
 - Biopsia líquida: NGS (Oncomine TNA)

Lung cancer

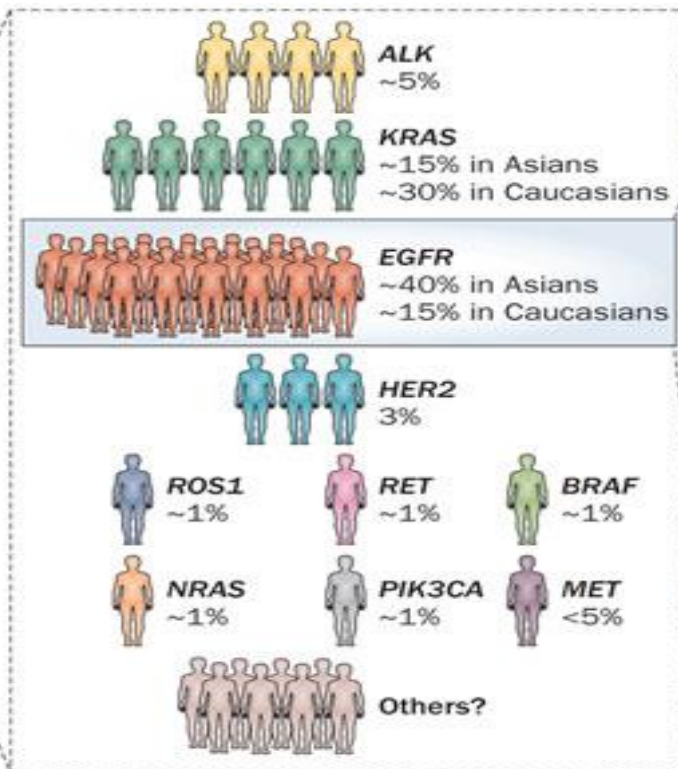
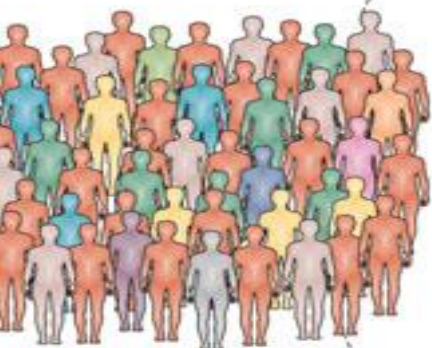


SNV / Indel				CNV			Fusion		
Gene	MAF %	AA Chg	QC Test (LOD) %	Gene	Gain / Loss	CNV Ratio	QC Test	Variant (exons)	Mol Cov. Mutant
EGFR	18.9306	p.Glu746_Ala...	5.0E-4	MET	↑	2.67	✓	not determined	✗

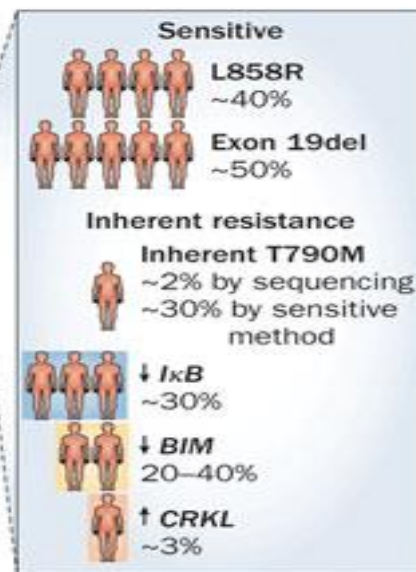
- ctDNA: C797S negativo. del19 + (20%), pérdida T790M. Amplificación *MET*



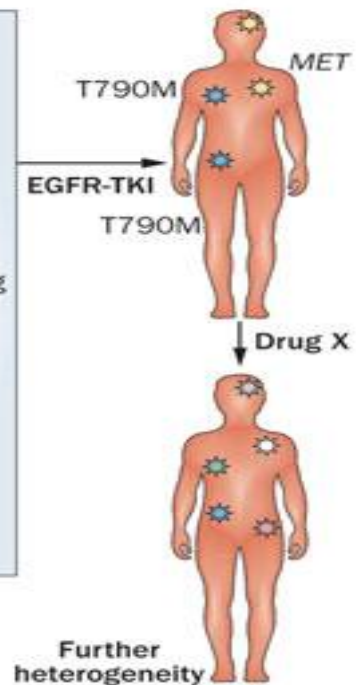
Heterogeneity in patients with adenocarcinoma of the lung according to driver oncogenes

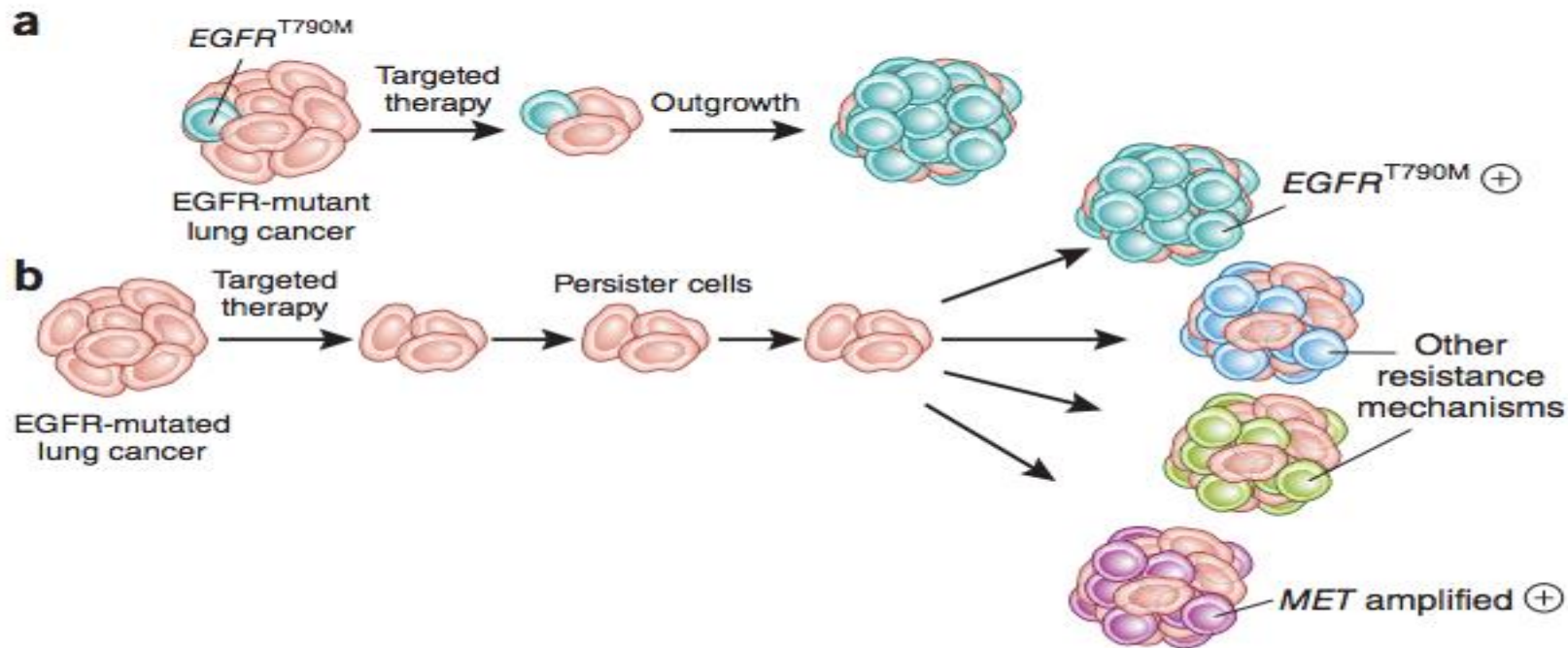


b Heterogeneity within patients with EGFR mutation

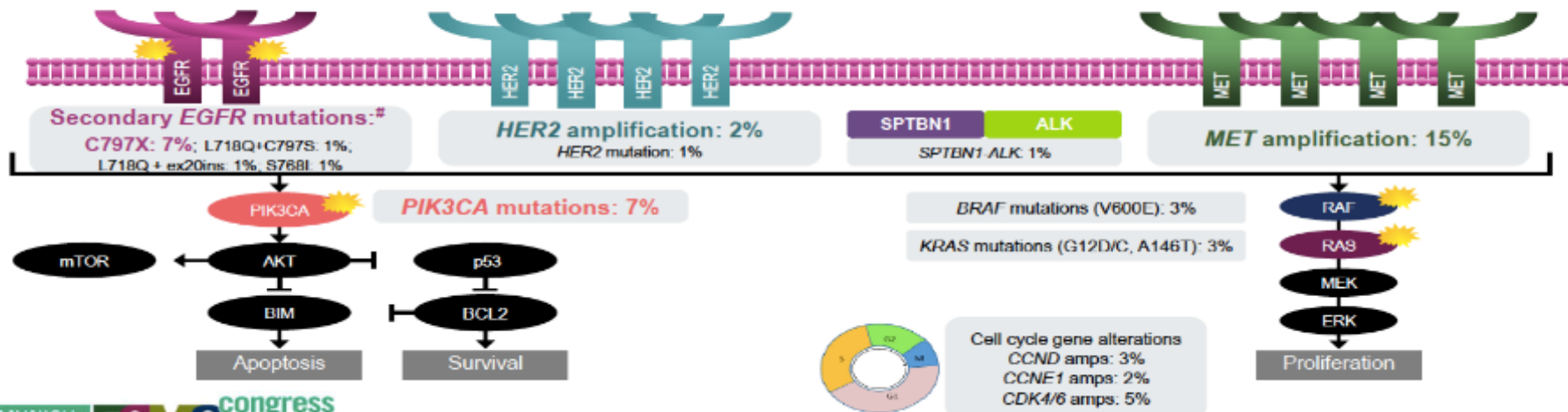


c Heterogeneity in resistance mechanism in one patient





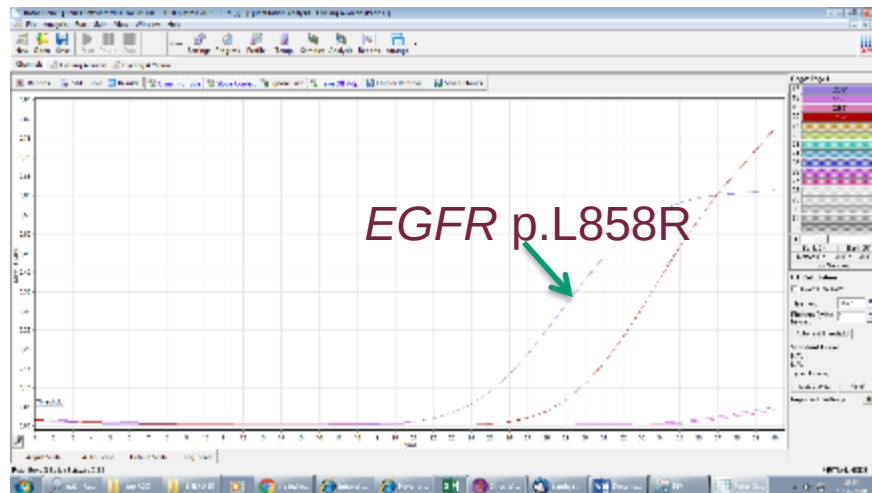
- No evidence of acquired EGFR T790M
- The most common resistance mechanisms were **MET** amplification and EGFR C797S mutation
 - Other mechanisms included **HER2** amplification, **PIK3CA** and **RAS** mutations



*Resistance mechanism reported may overlap with another; *Two patients had *de novo* T790M mutations at baseline of whom one acquired C797S at progression

Caso 3

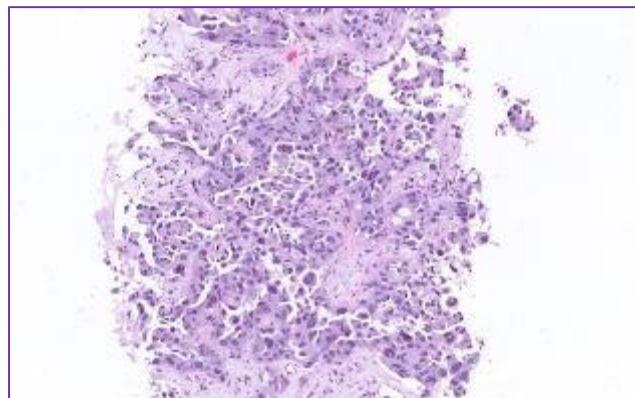
- Hombre 59 años
- Enero 2018 : UCI - disnea
- TAC: lesion 7cm lobulo pulmonar superior derecho - se realiza biopsia
- Biopsia líquida



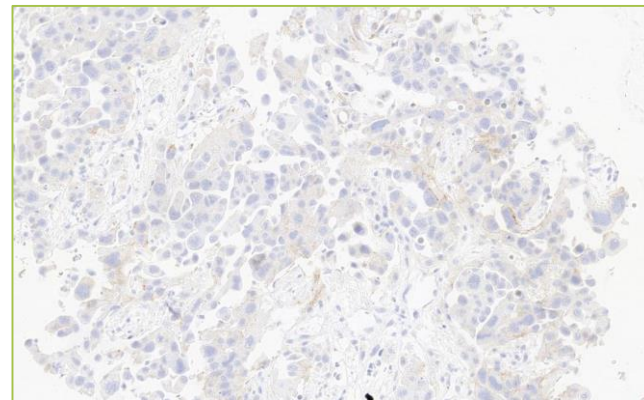
Caso 3



PD-L1
FISH ALK
FISH ROS1
FISH MET
EGFR
ONCOMINE



% células tumorales para estudios
moleculares : 90 %.



PD-L1 40 % TC (28-8
clone)

Caso 3

Oncomine™ Solid Tumour DNA Kit (Thermo Fisher)

Analysis Results

Analysis Name

Summary Functional Population Ontologies Pharmacogenomics Somatic QC

Search Go Preferences

		Classification	Type	Locus	Genes	Amino Acid Change	Coding	Coverage	% Frequency
☐	☐	Unclassified	SNV	chr17:7570457	TP53	p.Arg150Leu	c.473G>T	3937	AG=70.86, GG=0.00, TG=0.00, C=0.00
☐	☐	Unclassified	SNV	chr7:55259515	EGFR	p.Leu858Arg	c.2573T>G	3984	GG=37.37, GT=0.00

Oncomine™ DNA Focus Assay (Thermo Fisher)

Analysis Results

Analysis Name: 52653_v2_c1061_2018-05-16-11-55-726 MAPD: 0.337

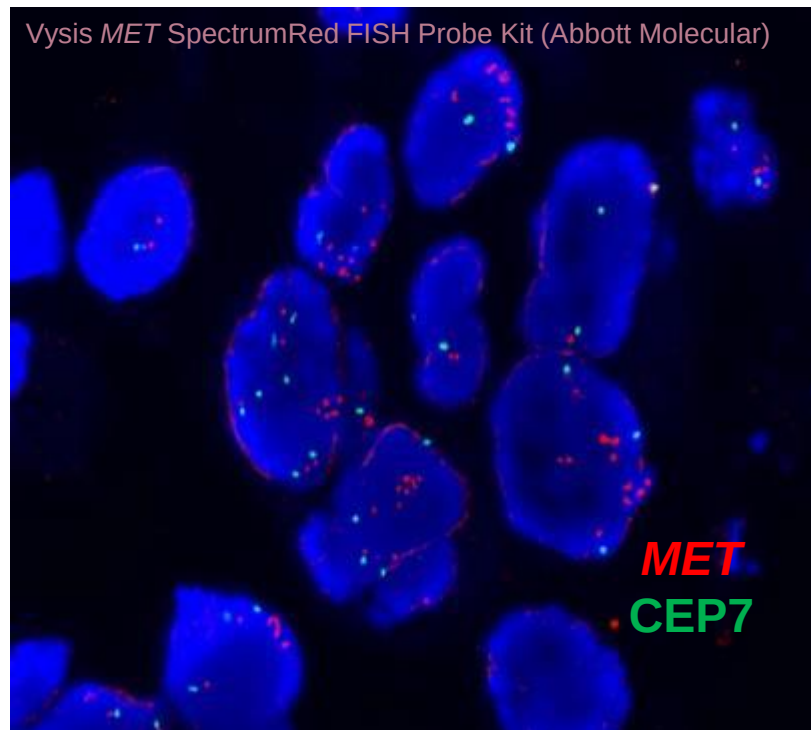
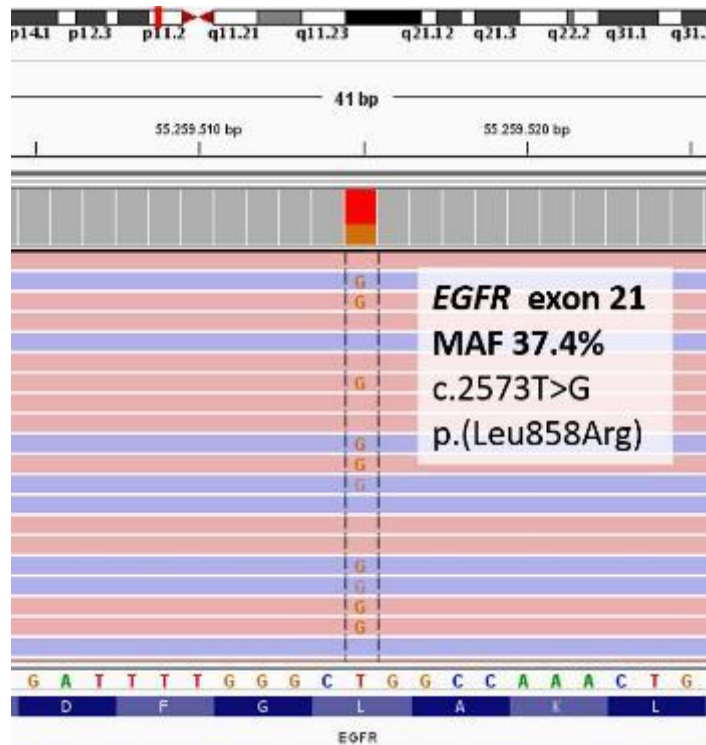
Summary **Oncomine** Functional Population Ontologies Pharmacogenomics Somatic QC

Search Go Preferences

		Locus	Oncomine Variant Class	Oncomine Gene Class	Genes	Amino Acid Change	Copy Number
☐	☐	chr7:55259514	Hotspot	Gain-of-function	EGFR	p.Leu858Arg	
☐	☐	chr7:118313479	Amplification	Gain-of-function	MET		5.87

Caso 3

Biopsia



Caso 3

SAMPLE ID 18M355	ANALYSIS START DATE Sep 12, 2018 13:26:06 UTC
ANALYSIS WORKFLOW DefaultExpandedPanelWorkflow	PANEL Expanded
ADAPTER SA 1	FILTERSET DefaultFilterSet*
ISOLATED DNA MASS 50.00 ng	SAMPLE VOLUME 4.50 mL



Results Summary

SNVS (3)				
Gene	Variant	Variant Description	Allele Fraction	No. of Mutant Molecules per mL
TP53	p.Arg158Leu p.Arg147Leu	Missense variant Missense variant	3.61%	133
EGFR	p.Leu858Arg	Missense variant	3.02%	111
BRAF	p.Leu597Gln	Missense variant	0.05%	1.95

INDELS (0)

CNV AMPLIFICATIONS (1)

Gene
MET

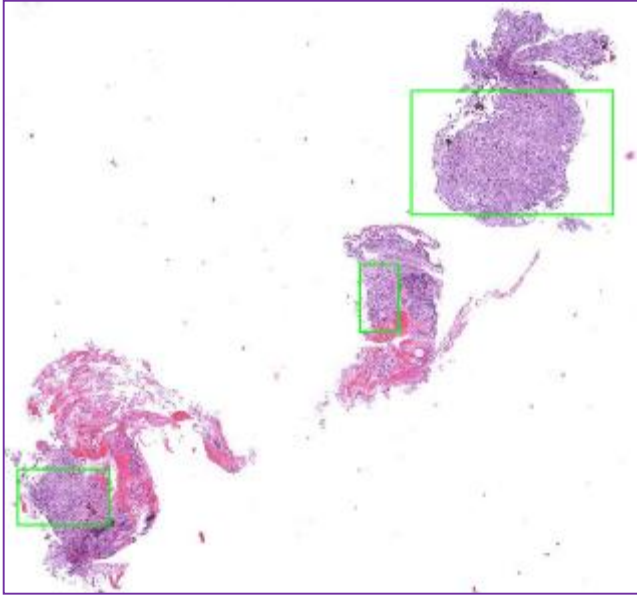
Caso 4

- Mujer de 58 años
- Diagnosticada en Abril 2018 de adenocarcinoma de pulmón

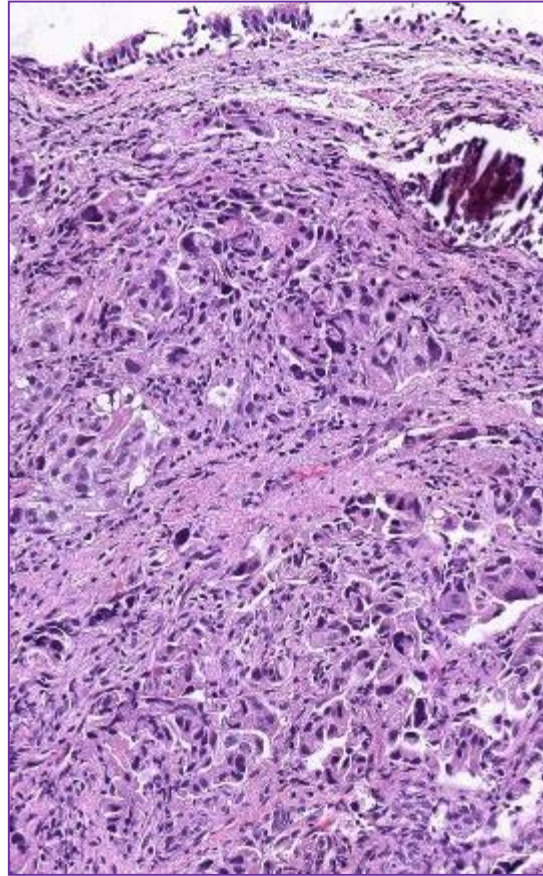
Lung cancer



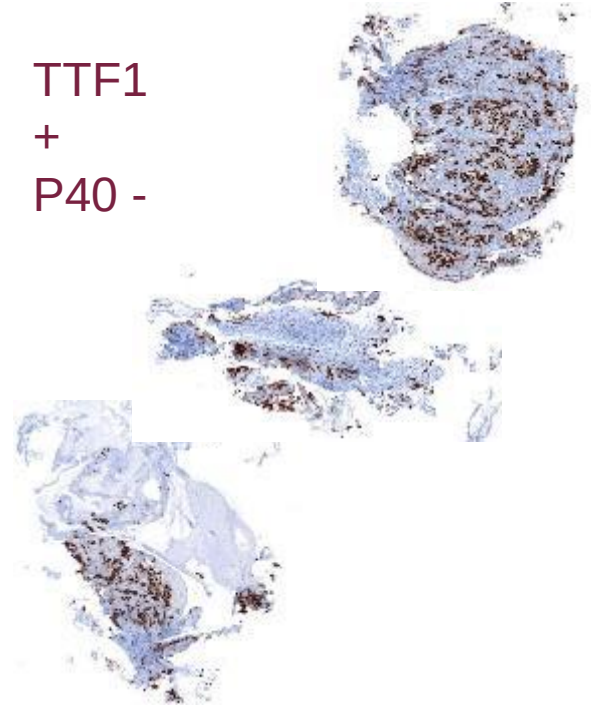
Caso 4



NSLSC, probable
adenocarcinoma después de IHQ



TTF1
+
P40 -



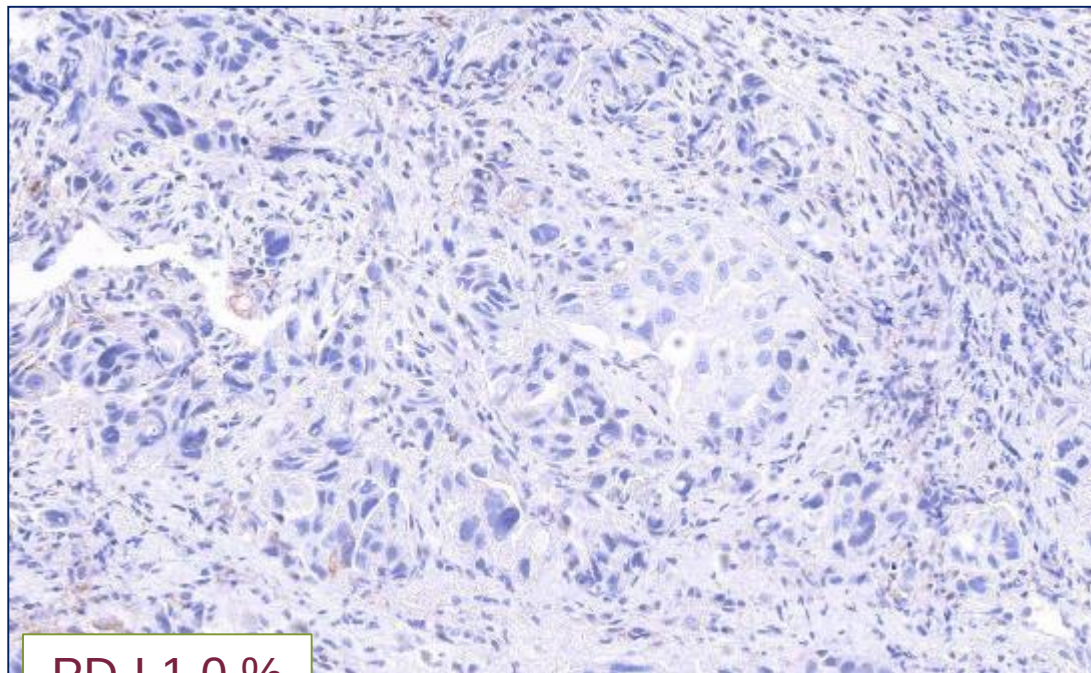
Porcentaje células tumorales:
30 %

Caso 4

PD-L1
FISH ALK
FISH ROS1
FISH MET
ONCOMINE



NEG



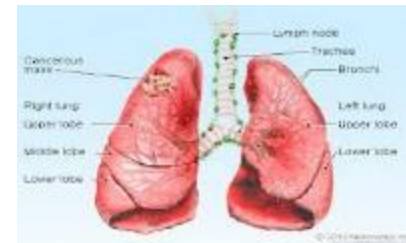
PD-L1 0 %

IHQ for PD-L1 (Ab 28-8, Dako, automatized Link 48 platform)
Resultado : NEGATIVO (0 % células tumorales)

Caso 4

- Mujer de 58 años
- Diagnosticada en Abril 2018 de adenocarcinoma de pulmón
- Sin biomarcadores positivos para terapia dirigida(EGFR-ALK-ROS1)
- Expresión PDL1 : 0%
- Quimioterapia Estandar

Lung cancer



Caso 4

- Mujer de 58 años
- Diagnosticada en Abril 2018 de adenocarcinoma de pulmón
- Quimioterapia estandar
- Progresion clínica en Agosto 2018



Screening NGS en plasma (biopsia líquida)

Oncomine Lung Cell free Total Nucleic Acid Assay (ADN+ARN circulante)

Caso 4

Detecta SNVs, indels + FUSIONS

Assay	Configuration	SNVs	CNVs	TP53 coverage	Fusion (RNA)	Exon Skipping (RNA)
Lung cfTNA	DNA + RNA	36 amplicons	10 (target CNVs) + 12 (ref CNVs)		49 assays	3 assays

	Hotspot Genes	Full-Length Genes	Copy Number Genes	Gene Fusions	Exon Skipping
Lung cfTNA	ALK BRAF EGFR ERBB2 KRAS MAP2K1 MET NRAS PIK3CA ROS1 TP53	-	MET	ALK RET ROS1	MET

Oncomine Lung cell-free Total Nucleic Acid Assay Result



Ion Reporter

Home Samples Analyses Workflows

Overview Launch My Variants

Analysis Visualization

cDNA IRGV

Summary SNV / Indel CNV Fusion

Analysis Name : Sample Name/Barcode Id

Gene	MAF
TP53	4.73%
TP53	0.05%

51902_v1_01147_2017-11-27-13-35-551 : 51902_v190mCodeTag_0105

1 - 1 of 1 items

Fusion

Variant (exons)	Mol Cov. Mutant	QC Test
KIF5B-RET.K15R12.COSF1232	16	✓

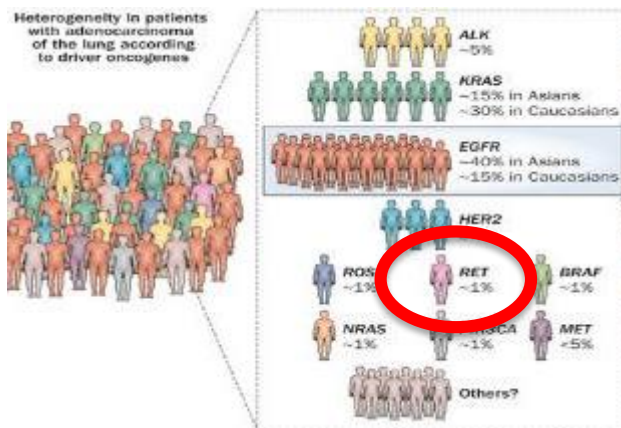
1 - 1 of 1 items

Download Generate Report

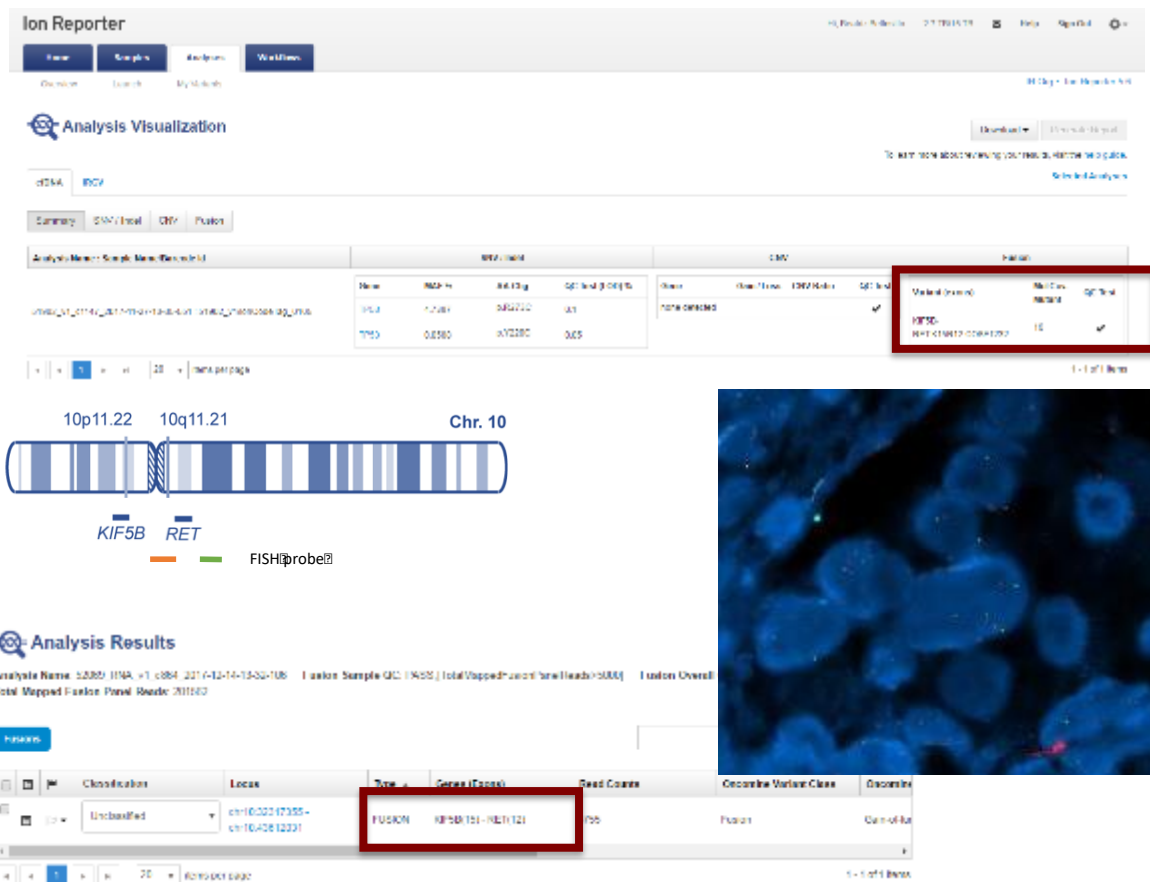
Reviewing your results, visit the [help guide](#)

[Selected Analyses](#)

1 - 1 of 1 items



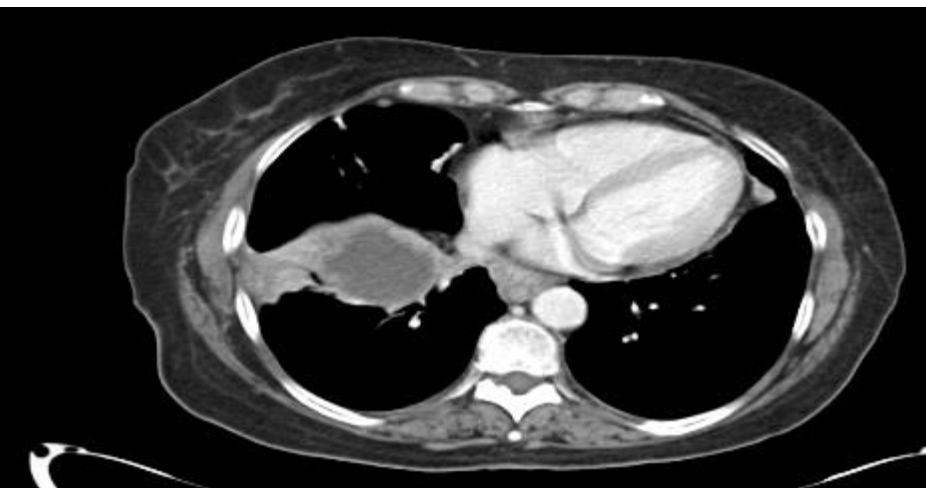
Caso 4



Oncomine solid tumor CE-IVD

Caso 4

Basal



C5D1

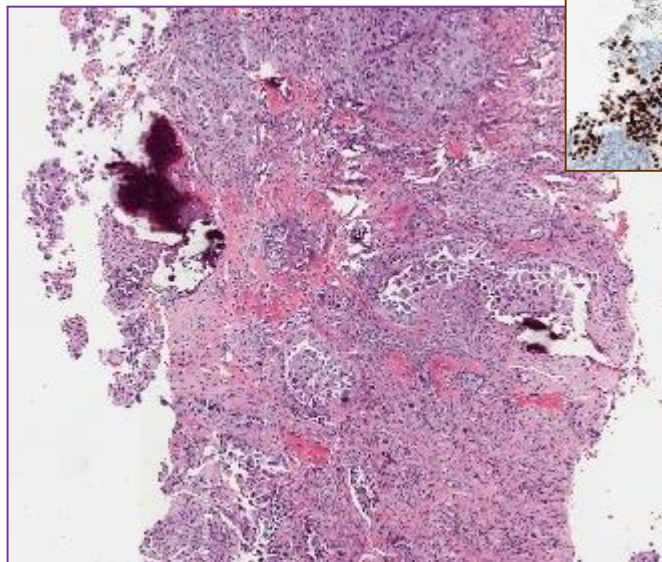


LOXO 292
120 mg BID

Caso 5

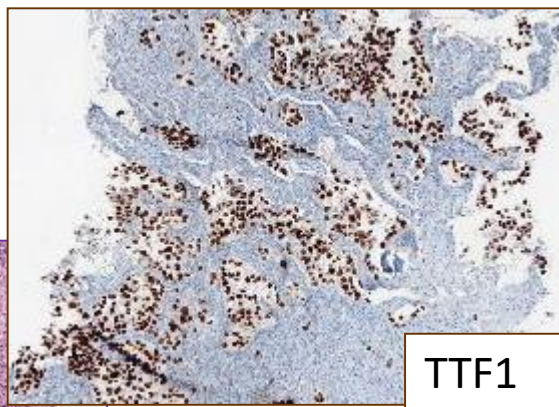
Hombre de 58 años, fumador (IA: 40 paq/año)

- Marzo 2018: Adenocarcinoma pulmón T4N2M1c (óseas)



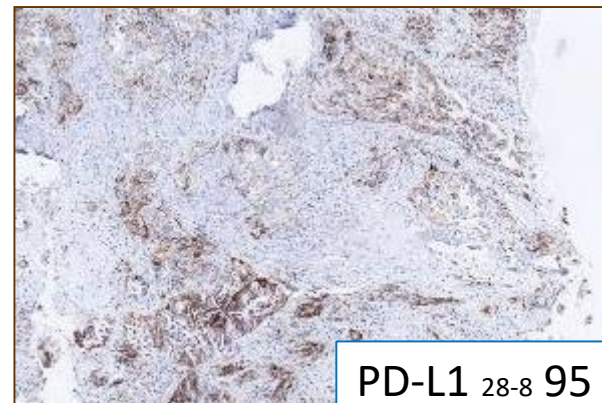
Marzo 2018: Biopsia ósea: M1
adenocarcinoma

El porcentaje de células tumorales seleccionadas para
los estudios moleculares y citogenéticos es del 80 %



TTF1

Estudio de
Biomarcadores
PD-L1



PD-L1 28-8 95 %

ONCOMINE SOLID TUMOR
DNA



***EGFR* L858R y *TP53*
L132R**

FISH ALK
FISH ROS:
FISH MET



NEG

Caso 5

Hombre de 58 años, fumador (IA: 40 paq/año)

Marzo 2018: ADC pulmón T4N2M1c (óseas). EGFR mutado L858R exón 21. PDL1: 95%. Afatinib. Respuesta parcial

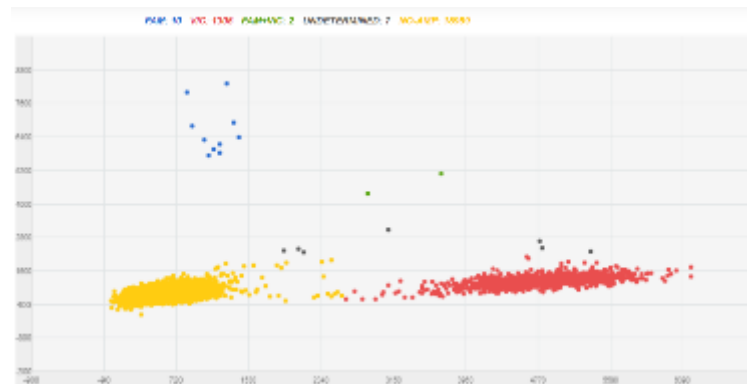
Abril 2019: Progresión cerebral y leptomenígea.

ctDNA: *EGFR* T790M. Osimertinib. Enfermedad estable

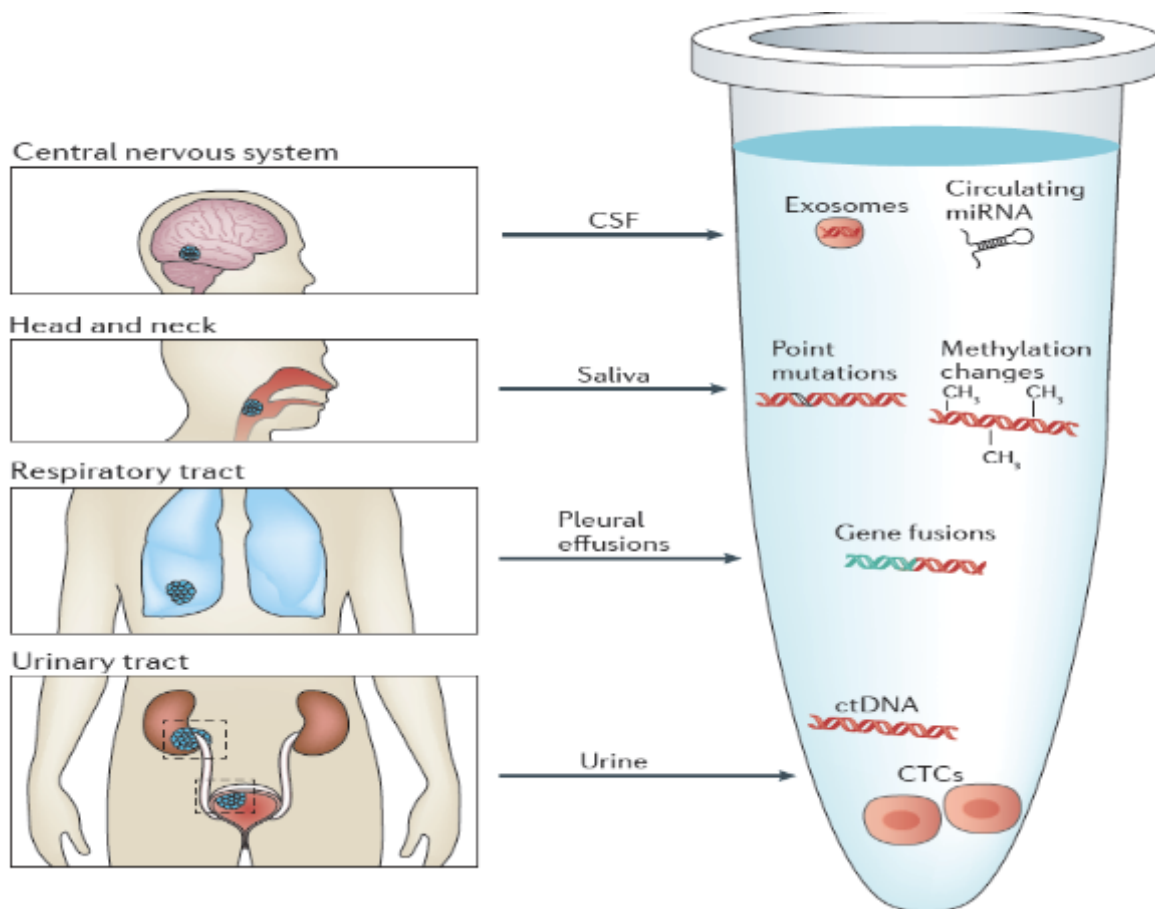


Plasma ctDNA PCR digital T790M 0,76%

Octubre 2019: Progresión pulmonar y leptomenígea



Liquid biopsy is not only peripheral blood



cfDNA CSF SAMPLE

(04/10/2019)

[cfDNA]= 6.9 ng/ml
plasma
Oncomine Lung
cfTOTAL

EGFR L858R 34%
TP53 L132R 49%

CSF PELLET SAMPLE

(04/10/2019)

Oncomine TML
Assay

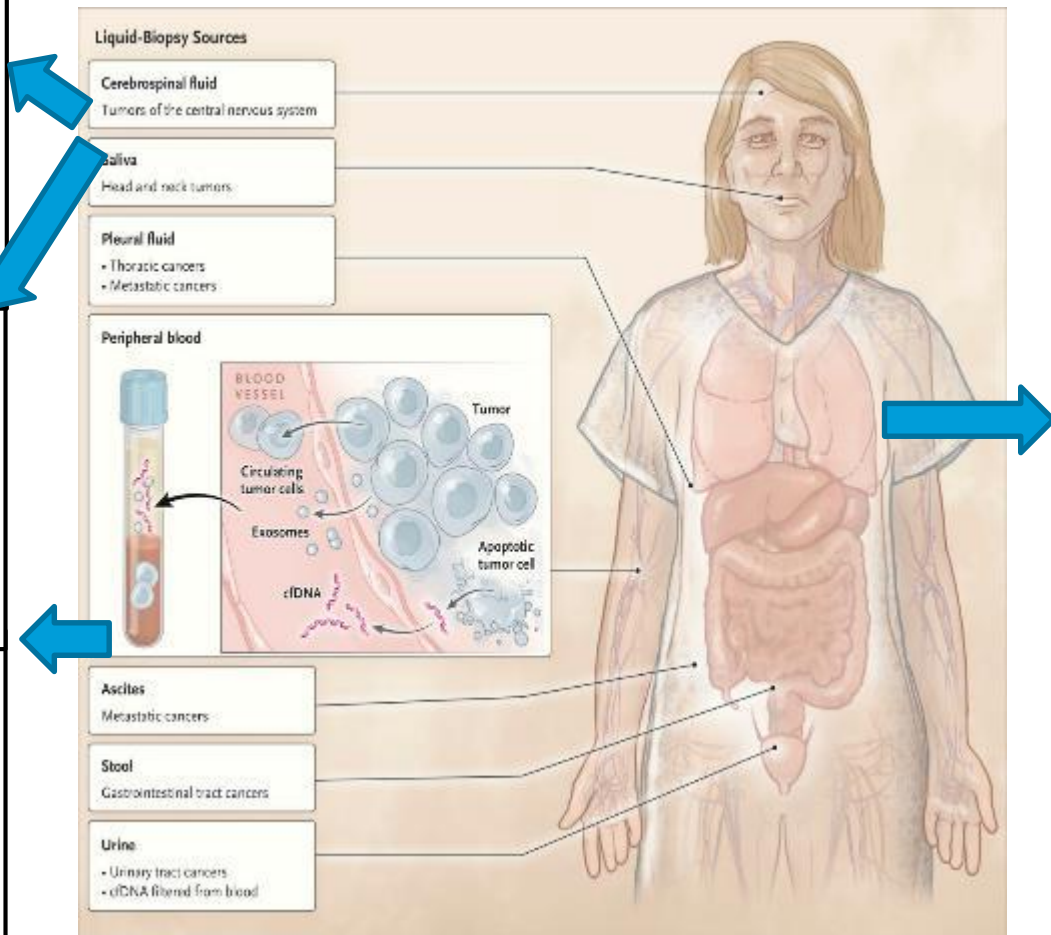
EGFR L858R 5.8%
TP53 L132R 8.3%
5.7 Muts/Mb

cfDNA PLASMA SAMPLE

(20/09/2019)

[cfDNA]= 10.4 ng/ml
plasma
Oncomine Lung
cfDNA Assay

NONE DETECTED



LUNG NODULE BIOPSY

(10/03/2018)

Oncomine Solid
Tumor DNA

**EGFR L858R
48%**
TP53 L132R 66%

Caso 5

Hombre de 58 años, fumador (IA: 40 paq/año)

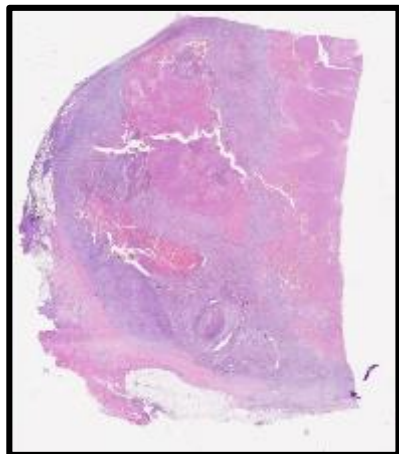
- Marzo 2018: ADC pulmón T4N2M1c (óseas). EGFR mutado L858R exón 21. PDL1: 95%. Afatinib. Respuesta parcial
- Abril 2019: Progresión cerebral y leptomenínea. ctDNA: *EGFR* T790M. Osimertinib. Enfermedad estable
- Octubre 2019: Progresión pulmonar y leptomenínea. ctDNA LCR: L858R + TP53. T790M negativa. Erlotinib
- Noviembre 2019: Progresión clínica carcinomatosis menínea. Metrotrexate intratecal x1 administración, STOP por deterioro clínico
- Diciembre 2019: Exitus

Caso 6

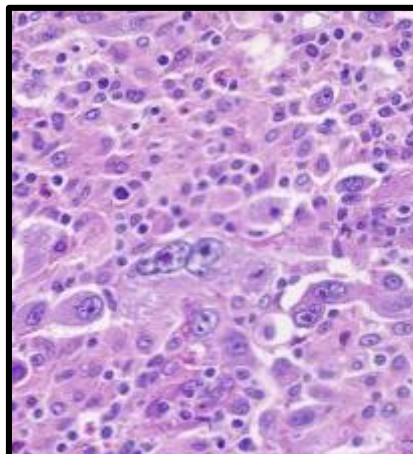
Hombre de 78 años, fumador (IA: 100 paq/año)

- Octubre 2020: ADC pulmón T4N1M1b (SR)
- Nos remiten la muestra para NGS

Caso 6



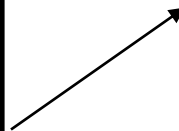
10/2020
Suprarenalectomía
derecha (caso
consulta)



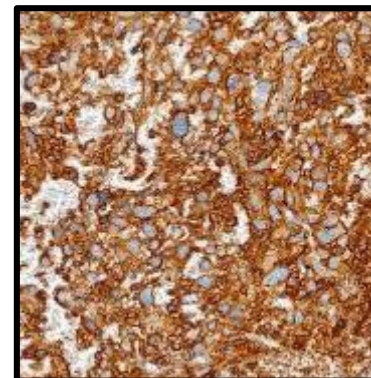
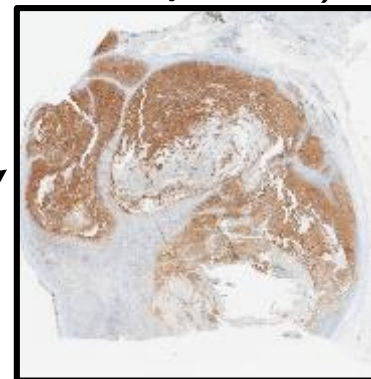
**Mx CPCNP
(ADK)**
(*70% celularidad
neoplásica)



NGS

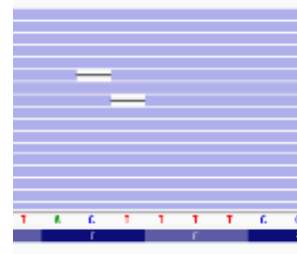
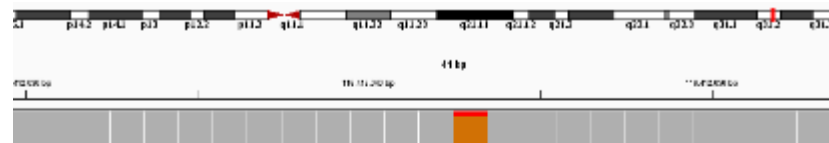


PDL1 (SP263)



**PDL1 POSITIVO
100% CÉLULAS
TUMORALES**

Resultado Oncomine Dx Target Test DNA



ANÁLISIS DE BIOMARCADORES PREDICTIVOS EN CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO

Mutaciones: **MET** c.3082G>T; p.(Asp1028Tyr) VAF%: 16,4

Amplificaciones: No detectadas

Fusiones: **MET(13) - MET(15)**

Interpretación: Se ha detectado la mutación patogénica D1028Y en el gen *MET* causante de pérdida del exón 14 del mismo gen, confirmada por el resultado de fusiones del panel RNA que detecta la presencia de fusión de los exones 13 y 15. La pérdida del exón 14 del gen *MET* detectada en la muestra está asociada a sensibilidad al tratamiento inhibidor tirosina quinasa anti-MET que actualmente se encuentra en fase de desarrollo clínico.

16%

Resultado Oncomine Dx Target Test RNA

Type	Filter	Genes (Exons)	Read Counts	Detection
RNAExonVariant	PASS	MET(13) - MET(15)	143	Present
EXPR_CONTROL	PASS	TBP	21769	Present

Present

Present

Present

Present

NoCall

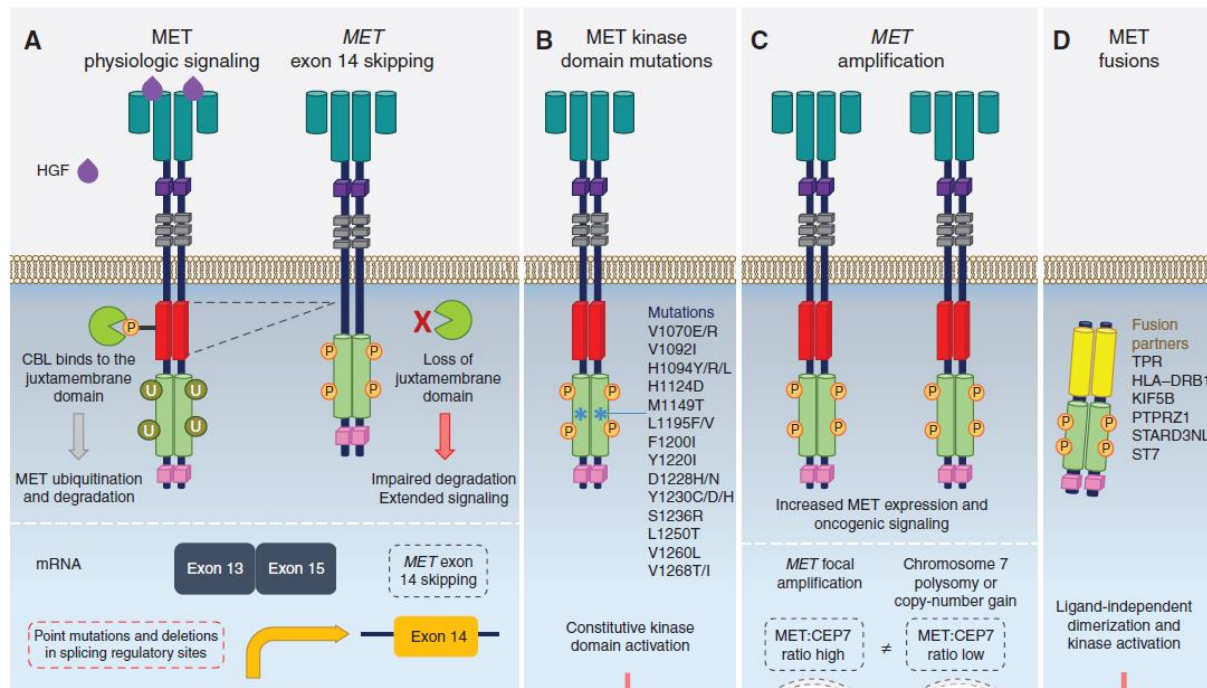
LOW_5P_3P_IMBALANCE_SCORE

LOW_5P_3P_IMBALANCE_SCORE

LOW_5P_3P_IMBALANCE_SCORE

Absent, READ_COUNT<=120

MET alterations and Downstream Signaling



All four classes of MET alterations lead to increase expression and activity
 MET expression is required but not sufficient for MET-dependent tumorigenesis
 Multiple mechanisms can be present together

Caso 6

Hombre de 78 años, fumador (IA: 100 paq/año)

- Octubre 2020: ADC pulmón T4N1M1b (SR)

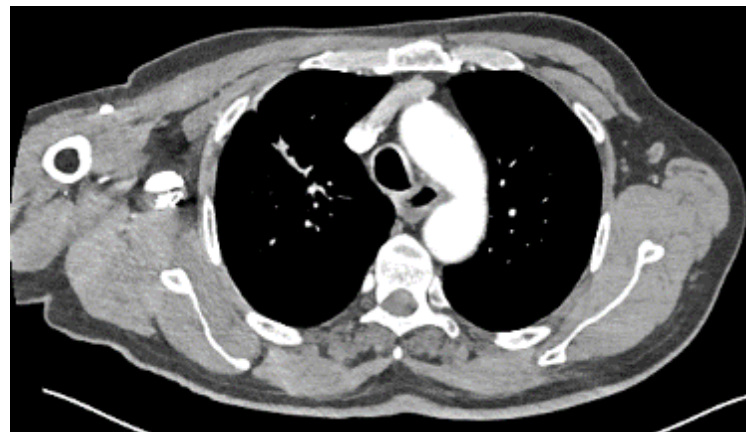
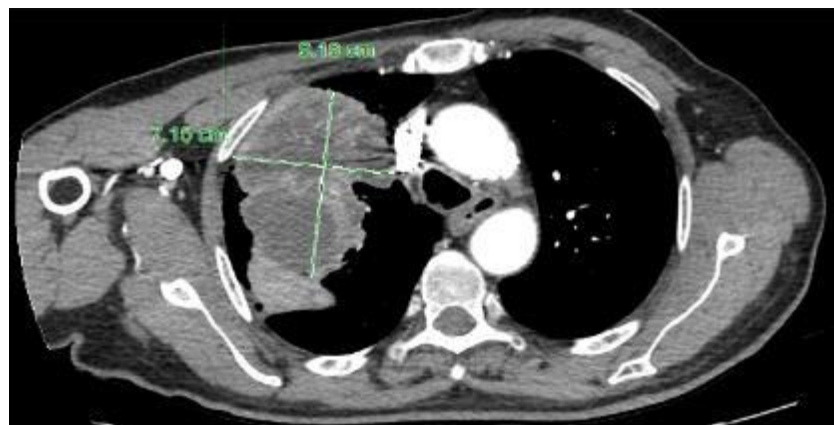
***MET* mutado D1028Y (exón 14 skipping mutation)**

- Diciembre 2020: Inicia tratamiento con Bozitinib (inhibidor de MET) dentro de ensayo clínico APL-101-01

23 Nov 2020



15 Sep 2021



Caso 7

Mujer de 71 años, no fumadora

- Septiembre 2019 (VISITA 2ª OPINIÓN): ADC pulmón EIV (cerebrales, pulmonares bilaterales, dudosa hepática)
- Diagnóstico AP externo **fusión de ALK** por IHQ
- Inicia Alectinib
- Noviembre 2019: Bloque consulta → Material insuficiente para el estudio NGS




SERVEI DE PATOLOGIA

Versió 2

Pg. Maritim, 25/29
08003 Barcelona
Tel. 93 248 30 32
Fax. 93 248 31 31

INFORME ADICIONAL

Nombre	Edad	Sexo	N.Historia	Obtención 27/11/2019	Registro 29/11/2019	Núm.Biopsia
--------	------	------	------------	-------------------------	------------------------	-------------

- BLOQUE CASO CONSULTA

- RESULTADO ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO PARA ALK CON SISTEMA OPTIVIEW Y ANTICUERPO DE Ventana anti-ALK D5F3: POSITIVO.

- Septiembre 2019: ADC pulmón EIV (cerebrales, pulmonares bilaterales, dudosa hepática). Fusión ALK (IHQ). Alectinib. Respuesta parcial
- Marzo 2021: Progresión local. Rápido crecimiento de la lesión pulmonar → Estudio de mecanismos de resistencia en ctDNA

Muestra sangre periférica (extracción 4 ml plasma → 104 ng/ml → Oncomine Lung Cell-Free Total Nucleic Acid Assay)

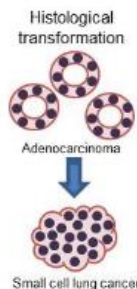
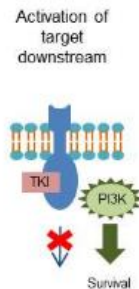
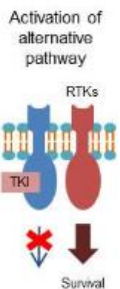
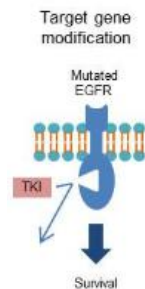
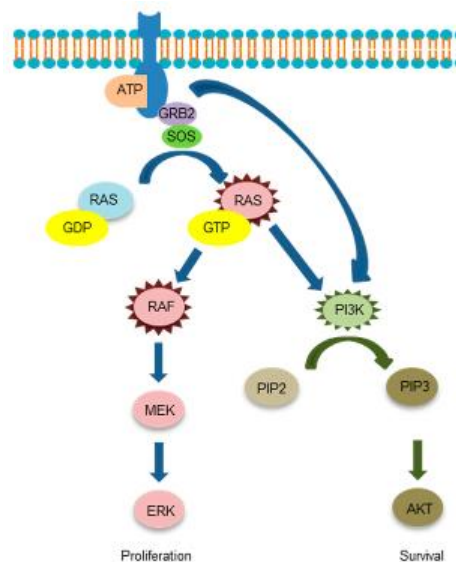
 **Analysis Results**

Analysis Name: MAPD: 0.133 Median Read Coverage: 151661.0 Median Molecular Coverage: 6270.0 Limits of Detection %: 0.0985 - 0.1138

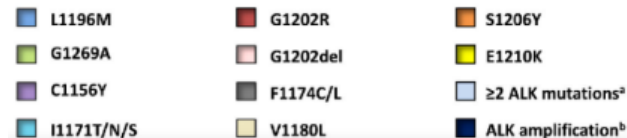
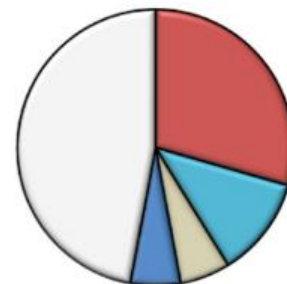
Summary LOD **Oncomine** Fusions Functional Population Ontologies Pharmacogenomics QC

☐			Locus	Genes	Amino Acid Change	Ref	Genotype	Coverage	Allele Ratio	Oncomine Gene Class
☐	+		chr2:29443679	ALK	p.V1180L	C	C/G	7336	C=0.9989, G=0.0011	Gain-of-function
☐	+		chr3:178936091	PIK3CA	p.E545K	G	G/A	6565	G=0.9968, A=0.0032	Gain-of-function
☐	+		chr12:25398284	KRAS	p.G12V	CC	CC/AC	6692	CC=0.9975, AA=0.0, AC=0.0025, GC=0.0, TC=0.0	Gain-of-function
☐	+		chr17:7577547	TP53	p.G245D	C	C/T	6513	C=0.9955, A=0.0, T=0.0045	Loss-of-function

			Locus	Genes	Amino Acid Change	Ref	Genotype	Coverage	Allele Ratio	Oncomine Gene Class
☐	+		chr2:29443679	ALK	p.V1180L	C	C/G	7336	C=0.9989, G=0.0011	Gain-of-function
☐	+		chr3:178936091	PIK3CA	p.E545K	G	G/A	6565	G=0.9968, A=0.0032	Gain-of-function
☐	+		chr12:25398284	KRAS	p.G12V	CC	CC/AC	6692	CC=0.9975, AA=0.0, AC=0.0025, GC=0.0, TC=0.0	Gain-of-function
☐	+		chr17:7577547	TP53	p.G245D	C	C/T	6513	C=0.9955, A=0.0, T=0.0045	Loss-of-function



C) Alectinib-Resistant Specimens
N=17



Gainor, Justin F. et al. "Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer." *Cancer discovery* 6 10 (2016): 1118-1133

Nagano T, Tachihara M, Nishimura Y. Mechanism of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors and a Potential Treatment Strategy. *Cells*. 2018 Nov 15;7(11):212

INFORME LABORATORI BIOLOGIA MOLECULAR

Nom	Edat	Sexe	N.Història	Obtenció	Registre	Num.Exploració
Centre Sol·licitant H. DEL MAR Servei ONCOLOGIA Sol·licitant ÀRRIOIA APERRIBAY EDURNE	72	M		11/03/2021	11/03/2021	
			N.Assist. N.Cas Data Sol·licitud Tècnica 11/03/2021			

Tipus de mostra: Sang perifèrica

Anàlisi d'alteracions genètiques mitjançant seqüenciació massiva amb panell Oncomine Lung Cell-Free Total Nucleic Acid Assay

Mutacions (SNVs/INDELs)				Amplificacions (CNVs)		Fusions	
ALK	MUTAT	MET	No detectat	MET	No detectat	ALK	Veure comentari
BRAF	No detectat	NRAS	No detectat			RET	No detectat
EGFR	No detectat	PIK3CA	MUTAT			ROS1	No detectat
ERBB2	No detectat	RET	No detectat				
KRAS	MUTAT	ROS1	No detectat				
MAP2K1	No detectat	TP53	MUTAT				

Comentaris: S'han detectat alteracions patogèniques als gens *ALK* c.3538G>C; p.(Val1180Leu) 0,11%, *KRAS* c.35G>T; p.(Gly12Val) 0,25%, *PIK3CA* c.1633G>A; p.(Glu545Lys) 0,32% i *TP53* c.734G>A; p.(Gly245Asp) 0,45%. Donat el context de progressió a tractament amb inhibidors d'ALK de la pacient, aquestes alteracions podrien explicar-se com a mecanismes de resistència a la fusió d'ALK donada l'afectació de la mateixa quinasa d'ALK (V1180L) i la situació down-stream en la mateixa via activada pel receptor tirosina quinasa oncogènica en el cas de les mutacions de *KRAS* i *PIK3CA*. Malgrat això, al no detectar-se la fusió d'ALK en aquesta mostra de sang perifèrica, l'assaig es considera no informatiu i es demana nova mostra. També es recomana l'anàlisi per NGS amb panell que inclouï les mutacions detectades en una mostra inicial de teixit diagnòstic de la pacient per a valorar la seva implicació com a mecanismes de resistència adquirits. La mostra està representada per 10,4 ng de DNA lliure circulant per ml de plasma i el límit de detecció conseguit amb l'anàlisi per NGS a estat de 0,09%.

Metodologia: L'ADN i ARN extrets de la mostra s'han amplificat conjuntament mitjançant el panell Oncomine Lung Cell-Free Total Nucleic Acid Assay (Thermo Fisher) generant una llibreria que permet l'estudi de mutacions als principals hotspots dels gens *ALK*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MET*, *NRAS*, *PIK3CA*, *RET*, *ROS1* i *TP53*; d'alteracions de número de còpies del gen *MET*; i de fusions dels gens *ALK*, *RET* i *ROS1*. La seqüenciació s'ha realitzat amb la plataforma de seqüenciació massiva Ion SS i les seqüències obtingudes s'han analitzat amb el programa Torrent Suite v5.10.1. La validació i interpretació dels resultats s'ha realitzat amb el software Ion Reporter 5.10.1.0.

Les seqüències de referència utilitzades són les següents: *ALK*: NM_004304.4, *BRAF*: NM_004333.4, *EGFR*: NM_005228.4, *ERBB2*: NM_004448.3, *KRAS*: NM_003360.3, *MAP2K1*: NM_002755.3, *MET*: NM_001127500.2, *NRAS*: NM_002524.4, *PIK3CA*: NM_006218.3, *RET*: NM_00975.8, *ROS1*: NM_002944.2 i *TP53*: NM_000546.5.

ALK c.3538G>C; p.(Val1180Leu) 0,11%

PIK3CA c.1633G>A; p.(Glu545Lys) 0,32%

KRAS c.35G>T; p.(Gly12Val) 0,25%

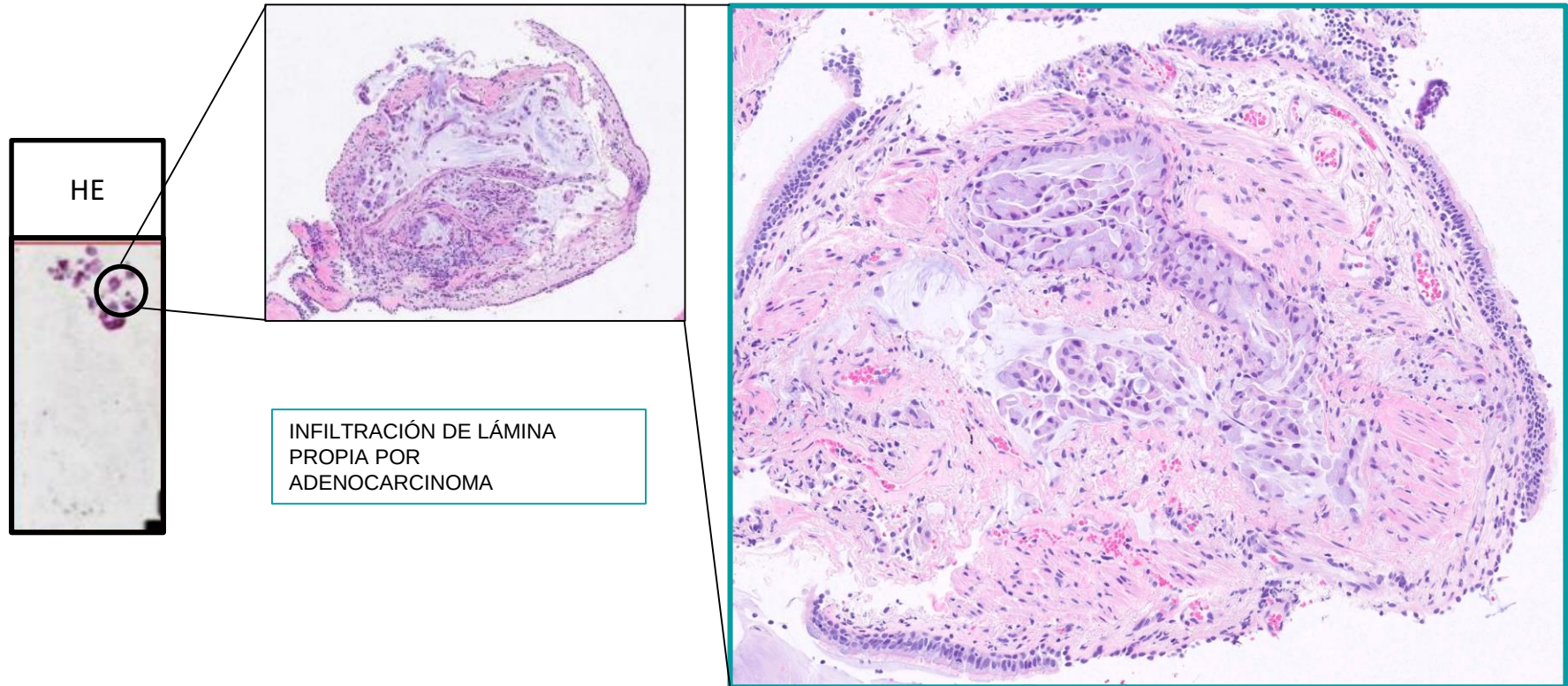
TP53 c.734G>A; p.(Gly245Asp) 0,45%

Se recomienda el estudio de estas mutaciones en muestra de tejido tumoral para valorar su implicación como mecanismos de resistencia adquiridos

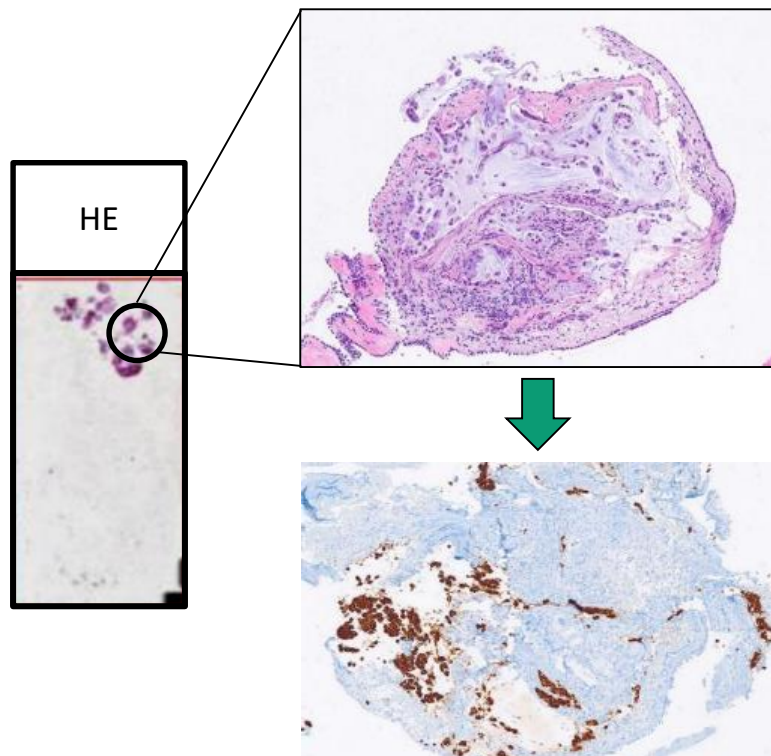
Locus	Type	Oncomine Driver Gene	Read Cov. Mut...	Mol Cov. Mut...	Detection	QC Test
chr6:170871321	ProcControl	TBP	8655	277	Present	✓
chr11:118960975	ProcControl	HMBS	14690	477	Present	✓
chr7:116395569	RNAExonVariant	MET	166	7	Present	✓
chr7:116403322	RNAExonVariant	MET	316	13	Present	✓
chr7:116411708 - chr7:116414935	RNAExonVariant	MET(13) - MET(15)	32	1	Absent, MOL_COUNT<=2	✓

La no detecció de la fusió de ALK concomitante a los posibles mecanismos de resistencia ALK-TKI, se recomienda repetir en nueva muestra de sangre periférica

- Marzo 2021: Biopsia bronquial LID



- Marzo 2021: Biopsia bronquial LID



ALK POSITIVO (Ventana anti-ALK D5F3)

INFORME FINAL

Nombre	Edad	Sexo	N.Historia	Obtención	Registro	Núm.Biopsia
				31/03/2021	31/03/2021	

Muestras remitidas y localización:

1 - BIOPSIA BRONQUIAL (BRONQUIO LOBAR INFERIOR DERECHO)

Centro Solicitante HOSPITAL DEL MAR Servicio: Pneumología N.Asist.: Solicitante: SANCHEZ FONT ALBERT Remitir resultados a: SANCHEZ FONT ALBERT	Residente: PUCHE GALLEGO, ADRIÁN Examen Macroscópico: AIRINE HERRERA GALERA Patólogo Responsable: PIJUAN ANDUJAR LARA Consulta Intraoperatoria:
---	--

BIOPSIA BRONQUIAL (BRONQUIO LOBAR INFERIOR DERECHO)

DESCRIPCION MACROSCOPICA

Se recibe en formol, cuatro fragmentos de tejido de morfología puntiforme, superficie rugosa, coloración blanquecina y consistencia friable que miden, en conjunto, 8x2x2mm.

Códigos Secciones
XX Biopsia bronquial 1/4

DIAGNOSTICO

BIOPSIA BRONQUIAL:

- CUATRO FRAGMENTOS DE MUCOSA BRONQUIAL, TRES DE ELLOS CON INFILTRACIÓN EN LA LÁMINA PROPIA POR ADENOCARCINOMA.

COMENTARIOS

Quedamos pendientes del estudio de biomarcadores mediante técnicas de biología molecular (NGS) así como estudio de ALK por inmunohistoquímica y de MET por FISH. El patrón de crecimiento del adenocarcinoma representado en la biopsia es sólido con vacuolas citoplasmáticas y el porcentaje de células tumorales seleccionadas para los estudios moleculares y citogenéticos es del 30 % en un área de 14 mm². Remitiremos un informe adicional con el resultado obtenido.

Material insuficiente para NGS



Variant	Crizotinib	Ceritinib	Alectinib	Brigatinib	Ensartinib	Lorlatinib
WT	205.62	124.27	49.72	23.02	27.75	5.31
G1123S	57.62	759.16	4.60	20.91	1.79	4.29
T1151Tins	583.55	293.45	>10000	26.92	109.39	37.04
L1152P	162.7	214.1	3.77	1.37	16.12	4.98
L1152R	376.2	348.8	8.21	1.48	29.03	9.75
C1156T	281.9	118.9	45.67	13.73	30.75	9.02
C1156Y	154.50	127.15	8.24	4.39	16.39	3.63
I1171N	287.2	182.7	341.7	21.63	21.5	34.8
I1171T	168.58	56.21	18.11	4.04	13.63	8.82
F1174C	400.06	344.63	238.92	50.72	70.9	15.51
F1174L	224.95	207.9	28.355	26.85	40.92	7.95
F1174V	612.4	578.23	221.83	70.70	82.51	23.09
V1180L	160.68	44.53	1375.85	10.49	15.434	5.34
L1196M	803.5	142.42	297.24	20.80	75.58	55.53
L1198F	41.95	1636.33	1122.25	108.28	3.072	68.66
G1202del	281.23	645.13	697.1	118.88	424.62	21.78
G1202R	420.36	441.6	>10000	85.07	453.43	33.59
D1203N	617.75	681.95	277.4	257.06	59.88	90.22
S1206C	299.3	236.25	215.6	59.2	41.81	6.67
S1206Y	156.59	74.65	8.477	17.66	45.25	3.67
E1210K	609.8	470.5	926.6	219.8	644	16.59
F1245C	377.16	316.23	262.58	58.94	70.46	19.5
G1269A	670.06	108.25	1549.78	13.65	170.50	58.85
G1269S	919.7	195.5	148.6	17.71	328	156.7

EML4-ALK V3 Average IC50 (nM)

IC50<50
nM50nM<IC50<20
nMIC50>20
nM

Heatmap of all 6 ALK inhibitors against ALK mutations

- The spectrum of ALK resistance mutations varies according to ALK inhibitor
- Majority are resistant to crizotinib

Slide courtesy of : Huan Qiao, MD, PhD,
Vincent Huang and Christine Lovly MD, PhD

Caso 7

Mujer de 71 años, no fumadora.

Septiembre 2019: ADC pulmón EIV (cerebrales, pulmonares bilaterales, dudosa hepática). **ALK+ (IHC)**.
Alectinib. Respuesta parcial

Marzo 2021: Progresión pulmonar. ctDNA: **Mutación resistencia ALK V1180L + TP53, KRAS, PIK3CA**

31/3/21: Inicia Lorlatinib → Respuesta parcial

Febrero 2023: progresión grasa cardiopulmonar, pleural y ganglionar supra e infradiaphragmática.

ALK c.3538G>C; p.(Val1180Leu) 0,9%

PIK3CA c.1633G>A; p.(Glu545Lys)

KRAS c.35G>T; p.(Gly12Val)

TP53 c.734G>A; p.(Gly245Asp) 2,2%

Carboplatino – pemetrexed x4c. Enfermedad estable. STOP por mala tolerancia.

Agosto 2023: Ensayo clínico Hospital Vall d'Hebrón NV655 (inh. ALK 4º gen.). Respuesta parcial.

Noviembre 2023: Progresión pulmonar. Carboplatino – paclitaxel semanal.

ALK c.3538G>C; p.(Val1180Leu) 1,2%

Febrero 2024: Progresión hepática.

TP53 c.734G>A; p.(Gly245Asp) 2,5%

ALK c.3538G>C; p.(Val1180Leu) 1,5 %

TP53 c.734G>A; p.(Gly245Asp) 3,3%

TP53 c.818G>T; p.(Arg273His) 0,4%



Variant	Crizotinib	Ceritinib	Alectinib	Brigatinib	Ensartinib	Lorlatinib
WT	205.62	124.27	49.72	23.02	27.75	5.31
G1123S	57.62	759.16	4.60	20.91	1.79	4.29
T1151Tins	583.55	293.45	>10000	26.92	109.39	37.04
L1152P	162.7	214.1	3.77	1.37	16.12	4.98
L1152R	376.2	348.8	8.21	1.48	29.03	9.75
C1156T	281.9	118.9	45.67	13.73	30.75	9.02
C1156Y	154.50	127.15	8.24	4.39	16.39	3.63
I1171N	287.2	182.7	341.7	21.63	21.5	34.8
I1171T	168.58	56.21	18.11	4.04	13.63	8.82
F1174C	400.06	344.63	238.92	50.72	70.9	15.51
F1174L	224.95	207.9	28.355	26.85	40.92	7.95
F1174V	612.4	578.23	221.83	70.70	82.51	23.09
V1180L	160.68	44.53	1375.85	10.49	15.434	5.34
L1196M	803.5	142.42	297.24	20.80	75.58	53.53
L1198F	41.95	1636.33	1122.25	108.28	3.072	68.66
G1202del	281.23	645.13	697.1	118.88	424.62	21.78
G1202R	420.36	441.6	>10000	85.07	453.43	33.59
D1203N	617.75	681.95	277.4	257.06	59.88	90.22
S1206C	299.3	236.25	215.6	59.2	41.81	6.67
S1206Y	156.59	74.65	8.477	17.66	45.25	3.67
E1210K	609.8	470.5	926.6	219.8	644	16.59
F1245C	377.16	316.23	262.58	58.94	70.46	19.5
G1269A	670.06	108.25	1549.78	13.65	170.50	58.85
G1269S	919.7	195.5	148.6	17.71	328	156.7

EML4-ALK V3 Average IC50 (nM)

IC50<50
nM50nM<IC50<20
0nMIC50>20
0nM

Heatmap of all 6 ALK inhibitors
against ALK mutations



Inicio tratamiento Brigatinib

- The spectrum of ALK resistance mutations varies according to ALK inhibitor
- Majority are resistant to crizotinib

Slide courtesy of : Huan Qiao, MD, PhD,
Vincent Huang and Christine Lovly MD, PhD

Caso 8

Noviembre 2005, mujer 54 años, carcinoma infiltrante lobulillar en mama derecha ; receptor hormonal positivo; HER2 negativo

6 ciclos de esquema TAC neoadyuvante

Se practicó mastectomía derecha con linfadenectomía ipsilateral (ypT4bN1M0) y se trató posteriormente con radioterapia adyuvante y hormonoterapia (Letrozol) durante 5 años.

Un año después (Nov' 12) presentó recidiva bioquímica con lesiones óseas sospechosas, por lo que ingresó a ensayo clínico con Examestan y Everolimus (CRAD 001YIC04).

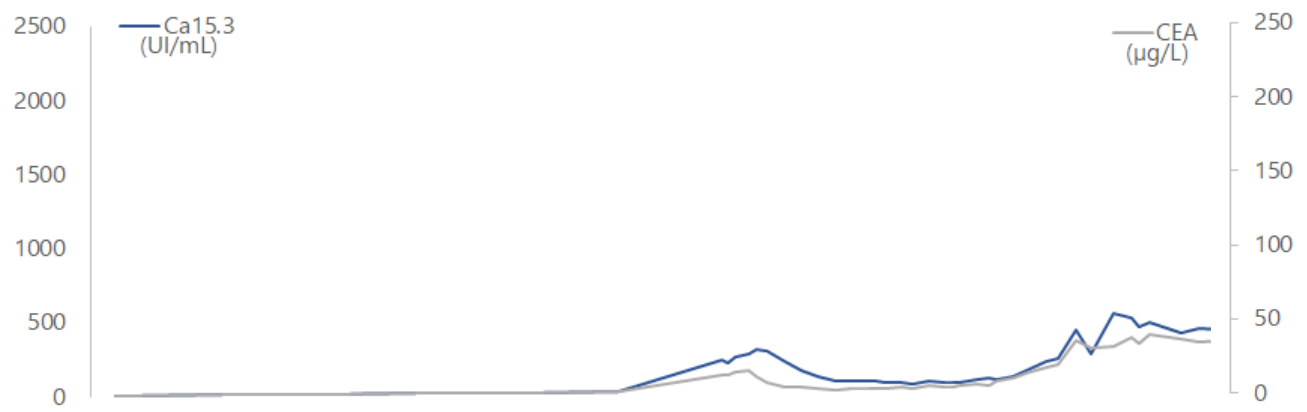
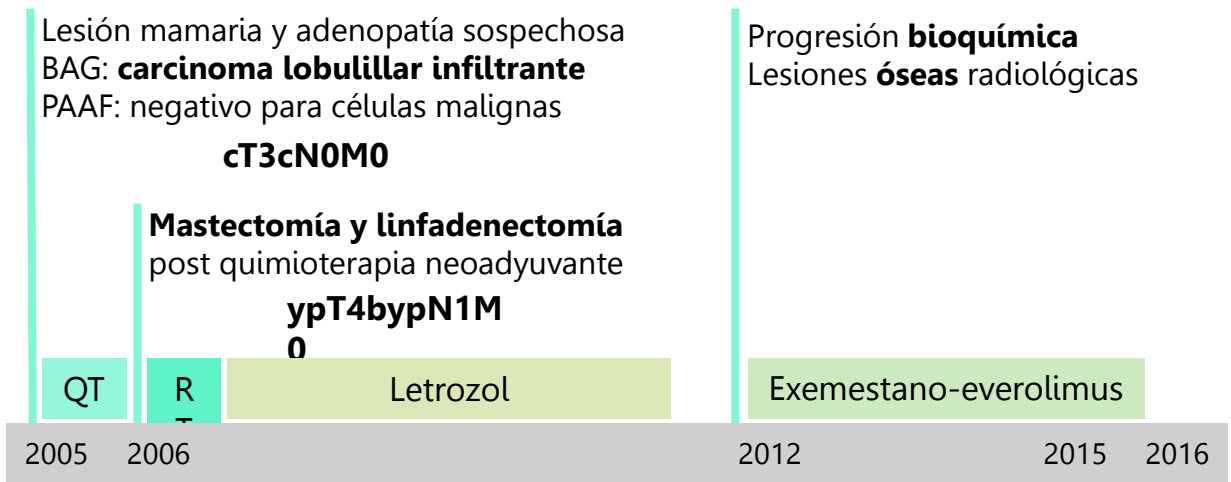
De 2015 a 2016 elevación progresiva de marcadores bioquímicos (CEA/Ca15.3) sin progresión radiológica,

Breast cancer

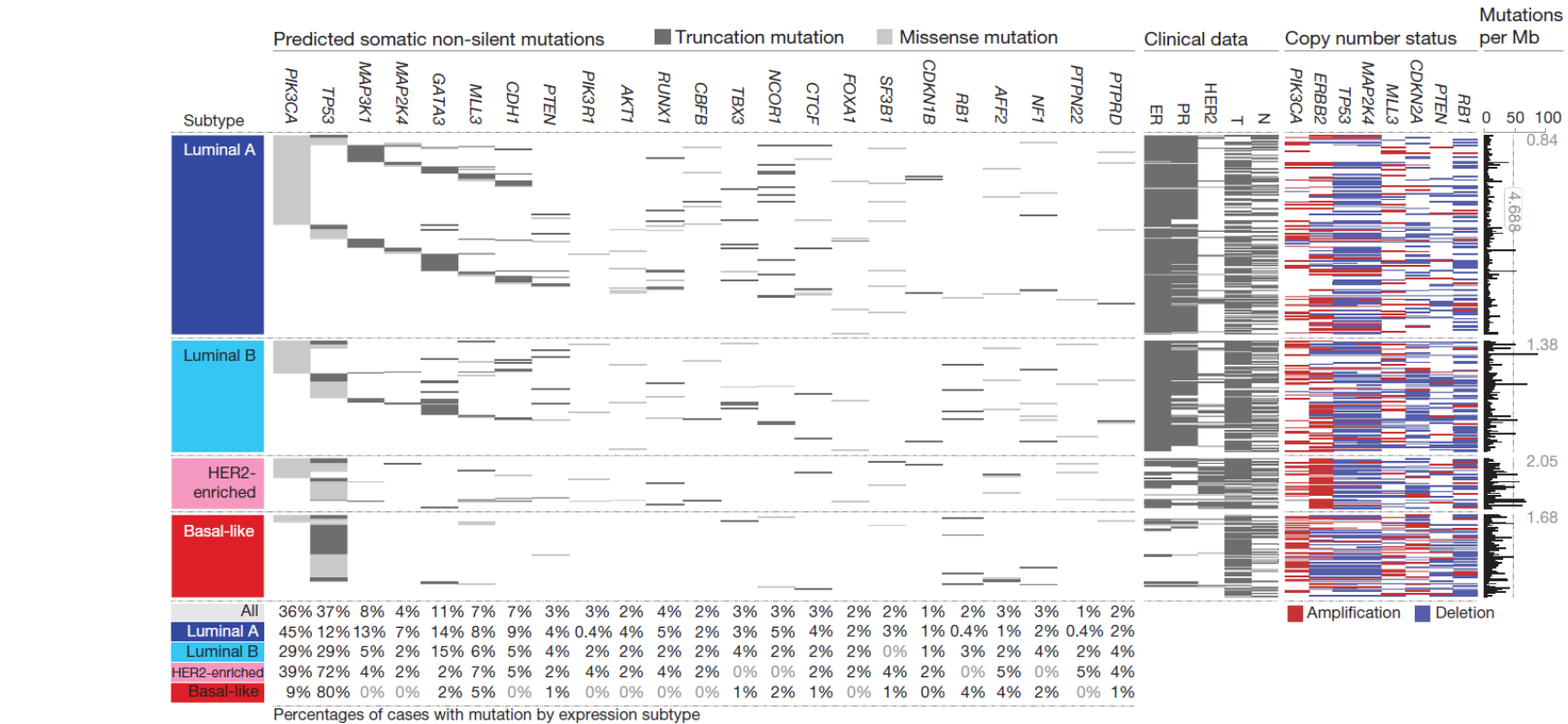


Historia oncológica

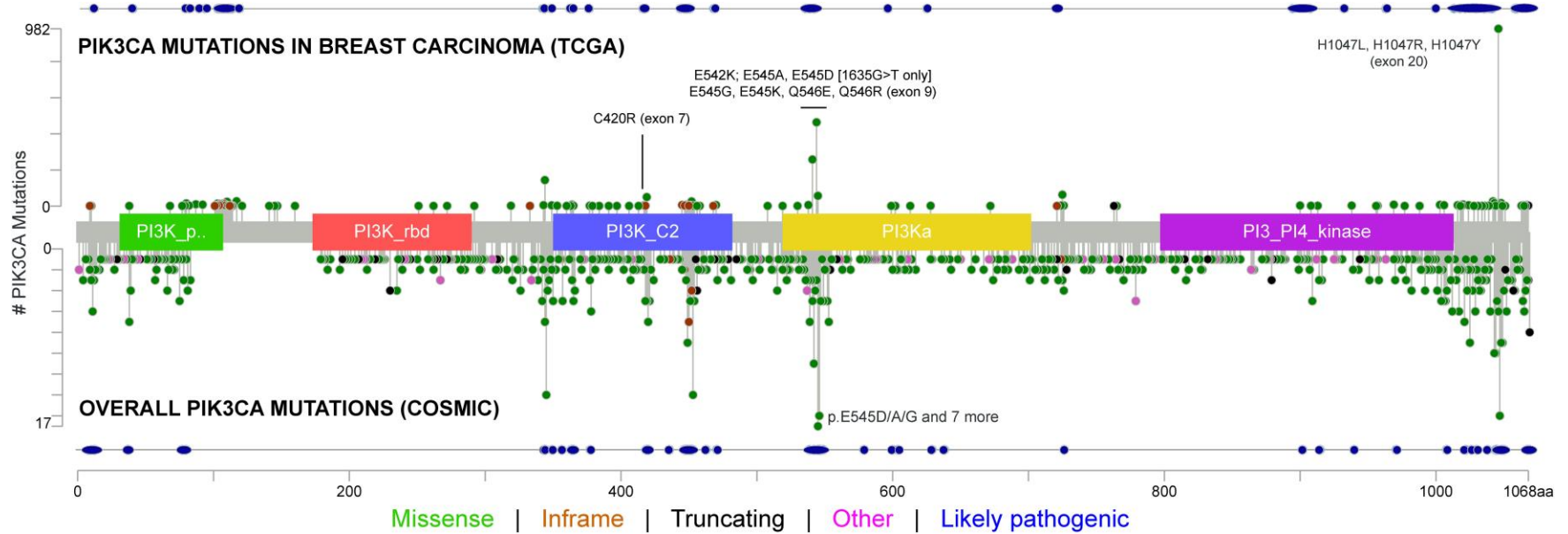
DIAGNÓSTICO MOLECULAR



Las mutaciones en *PIK3CA* son las más frecuentes en carcinomas de mama



Las mutaciones de *PIK3CA* más frecuentes se encuentran en los exones 9 y 20



Caso 8

Caracterización molecular gen *PIK3CA*

Tejido 2005 – calidad ácidos nucleicos – muy degradada

No amplificación fragmentos mayores de 200 pb

Secuenciación Sanger no valorable

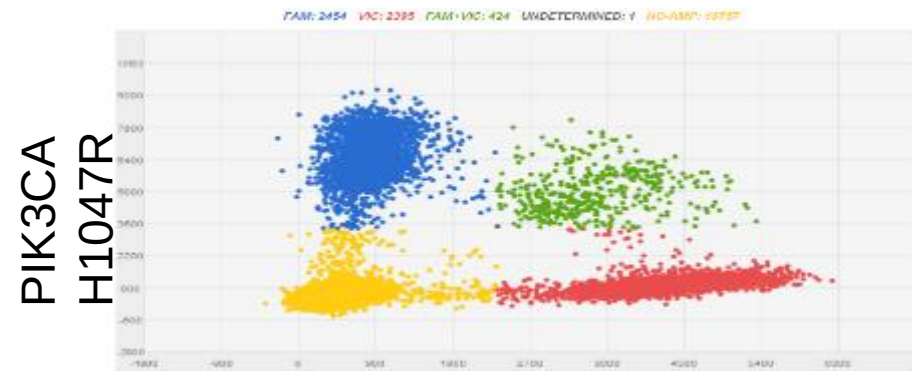
Estudio mediante PCR en tiempo real con cobas *PIK3CA*

Detección de mutación *PIK3CA* p.H1047R



Estudio de PIK3CA H1047R en tejido y plasma por PCR digital

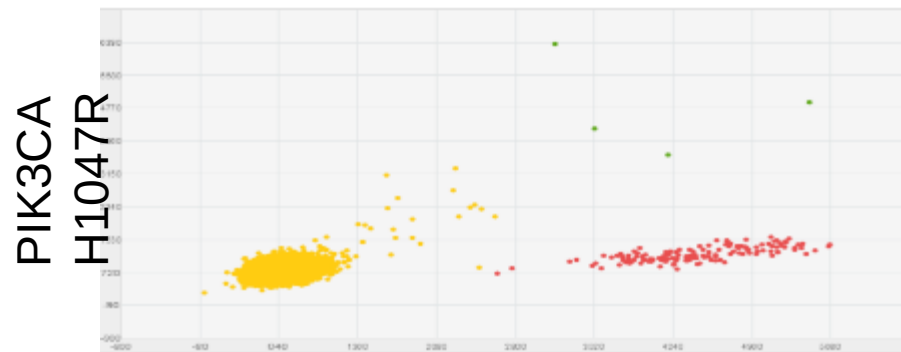
Tumor



PIK3CA WT

49% fracción alélica mutada

1ml of plasma



PIK3CA WT

0,5 % fracción alélica mutada

Noviembre 2005, mujer 54 años, carcinoma infiltrante lobulillar en mama derecha
receptor hormonal positivo; HER2 negativo
6 ciclos de esquema TAC neoadyuvante
Se practicó mastectomía derecha con linfadenectomía ipsilateral (ypT4bN1M0) y se trató posteriormente con radioterapia adyuvante y hormonoterapia (Letrozol) durante 5 años.

Un año después (Nov' 12) presentó recidiva bioquímica con lesiones óseas sospechosas, por lo que ingresó a ensayo clínico con Examestan y Everolimus (CRAD 001YIC04).

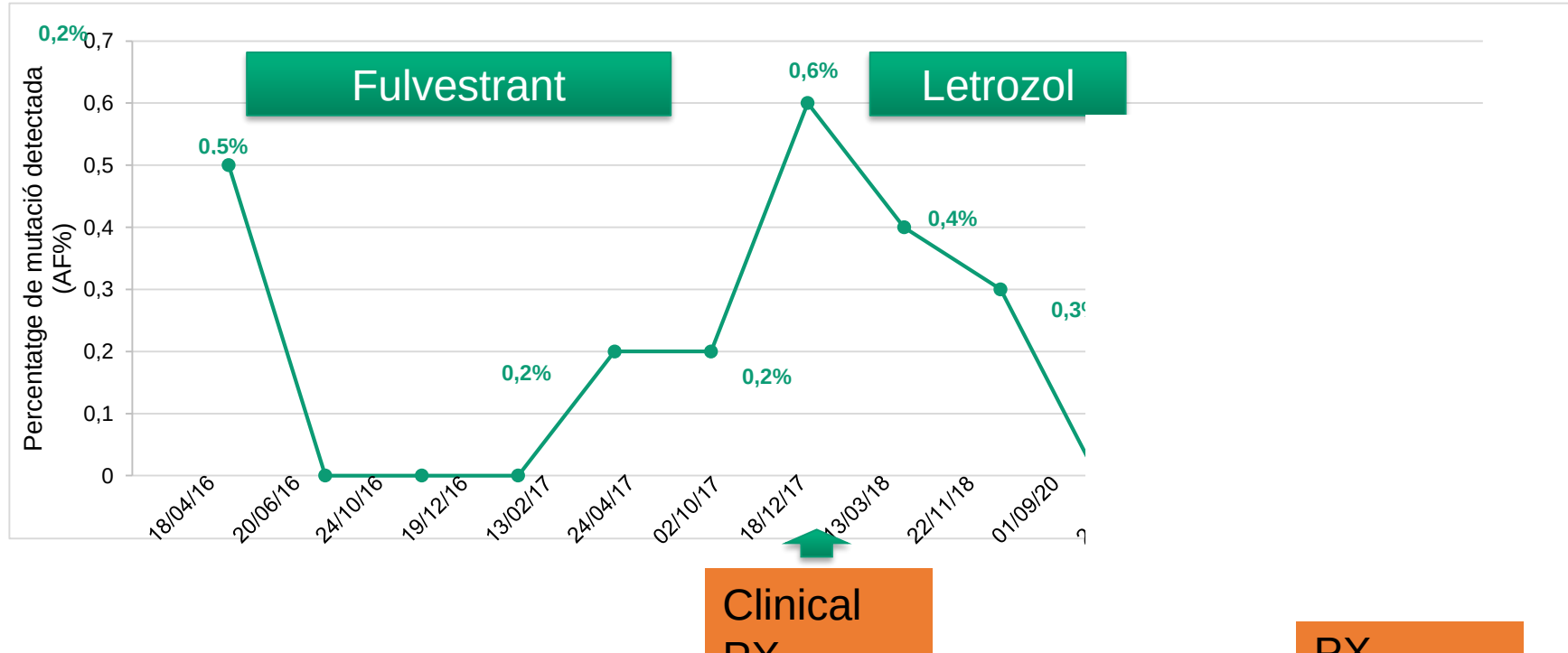
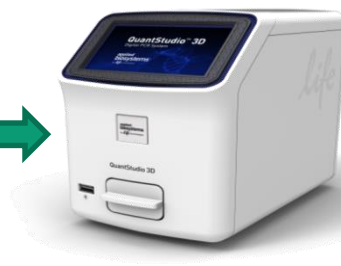
De 2015 a 2016 elevación progresiva de marcadores bioquímicos (CEA/Ca15.3) sin progresión radiológica,

Mutación PIK3CA (c.3140A>G, His1047Arg) detectable en plasma
Inicio Fulvestrant en Abril 2016.

En ese momento, no había otra técnica que la biopsia líquida para detectar este tipo de recurrencia, por lo que nunca se habría detectado de otra manera.

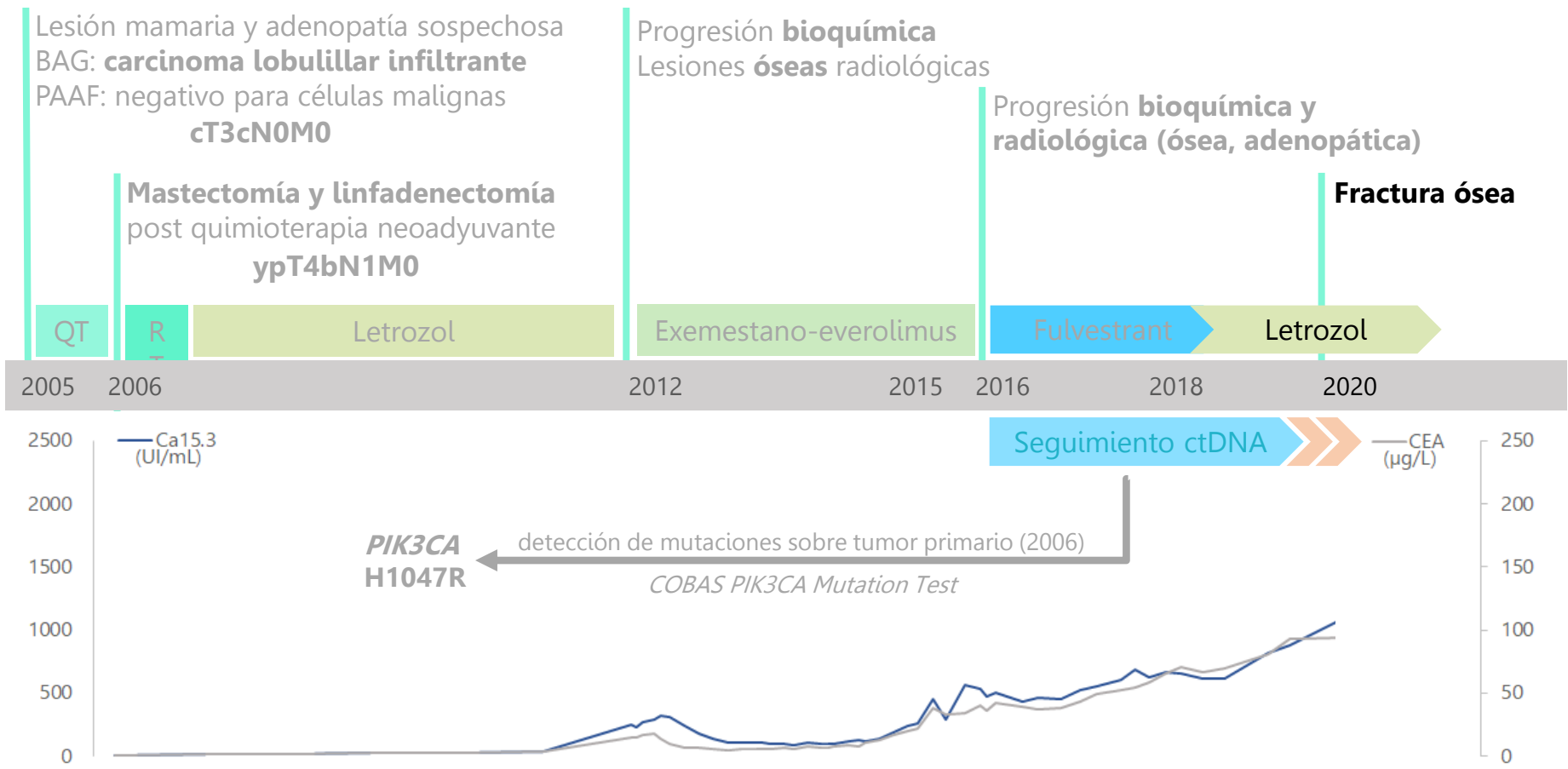
Breast cancer

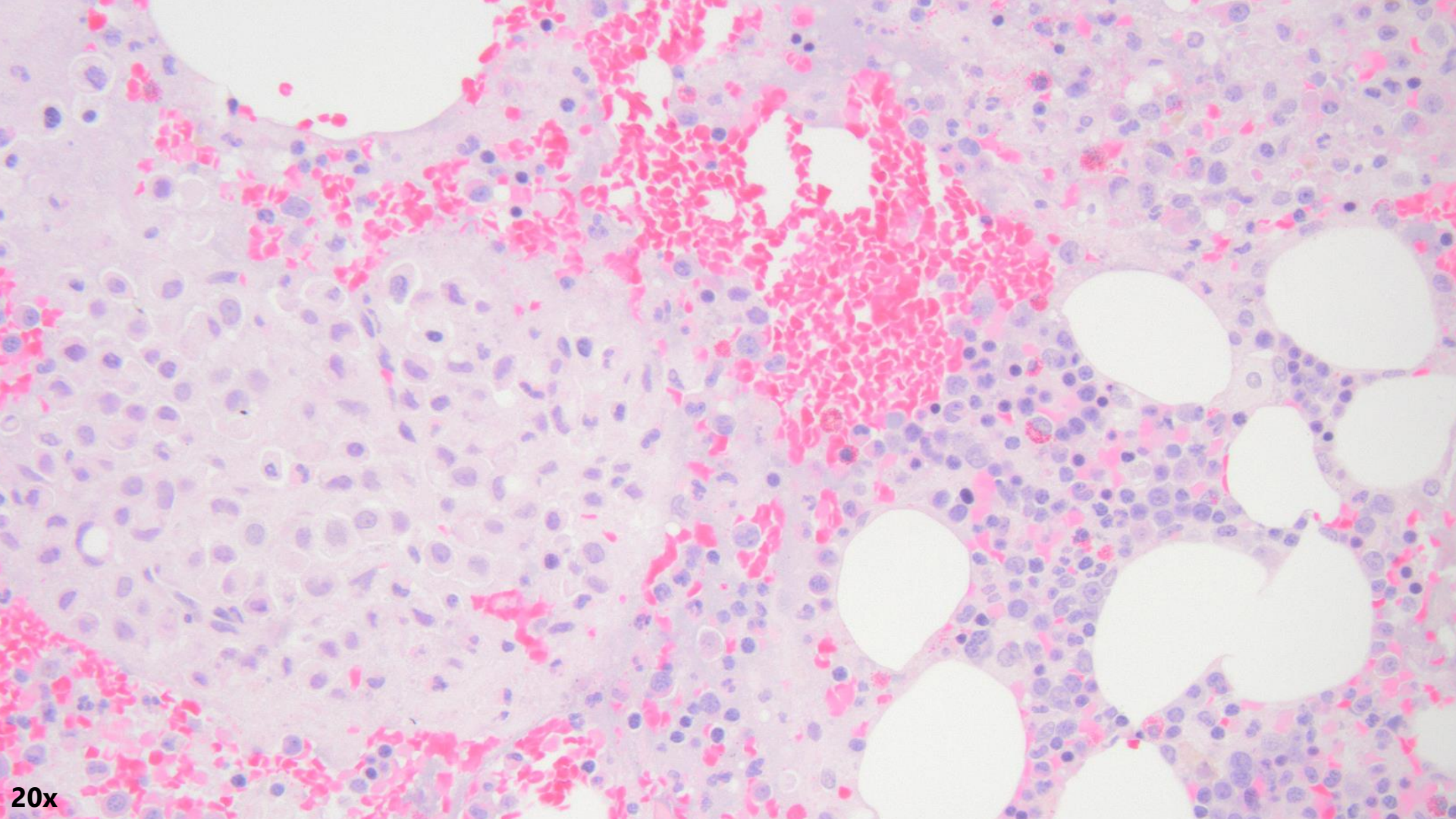


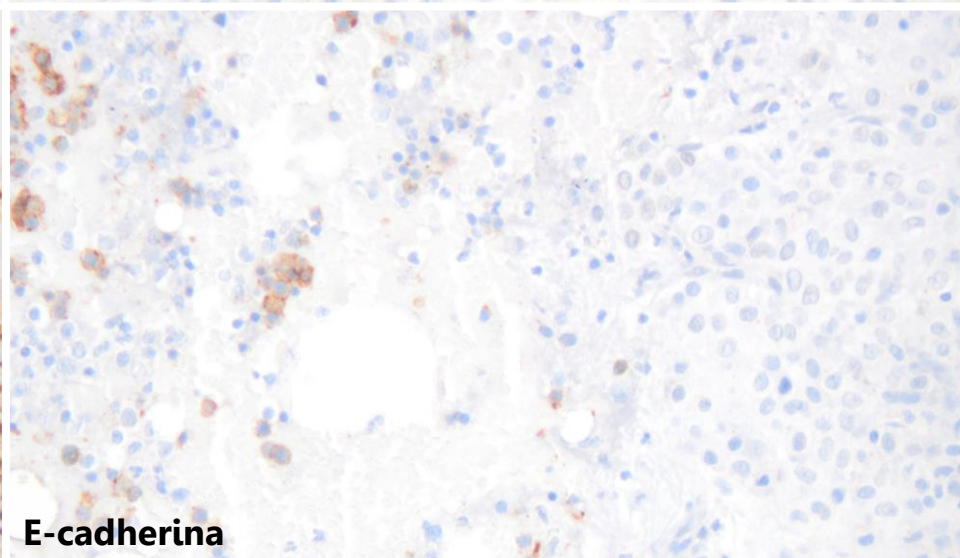
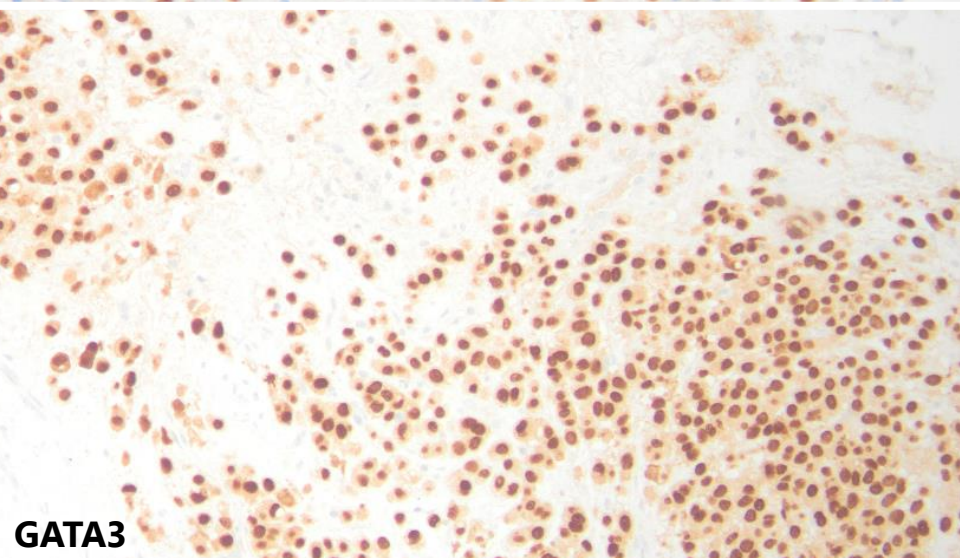
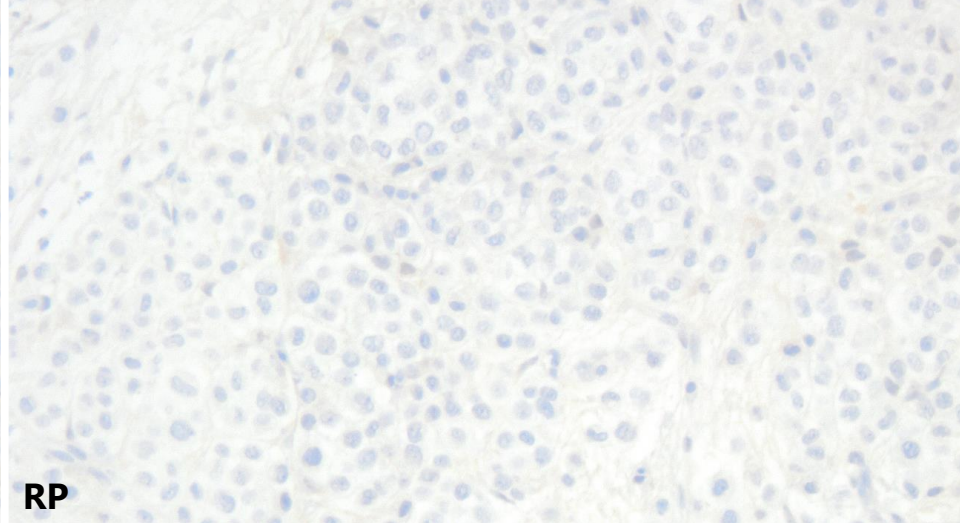
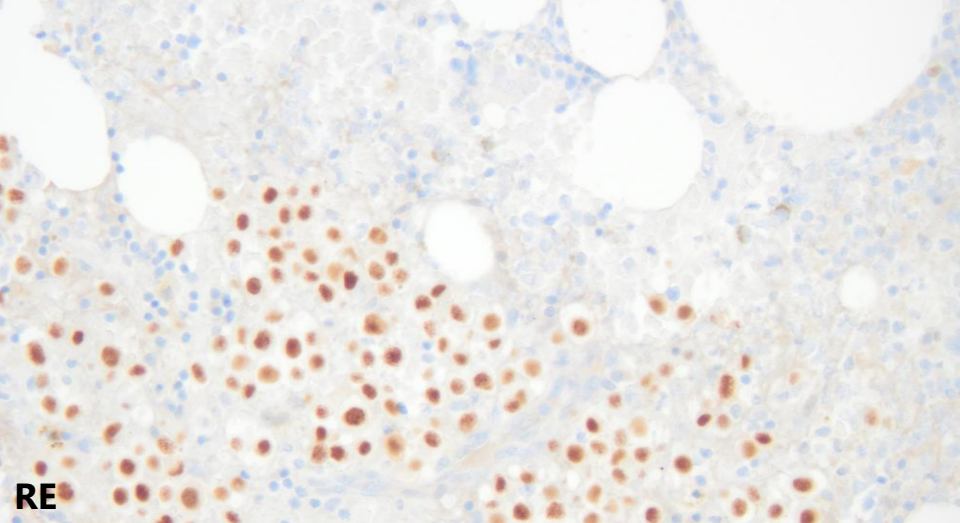


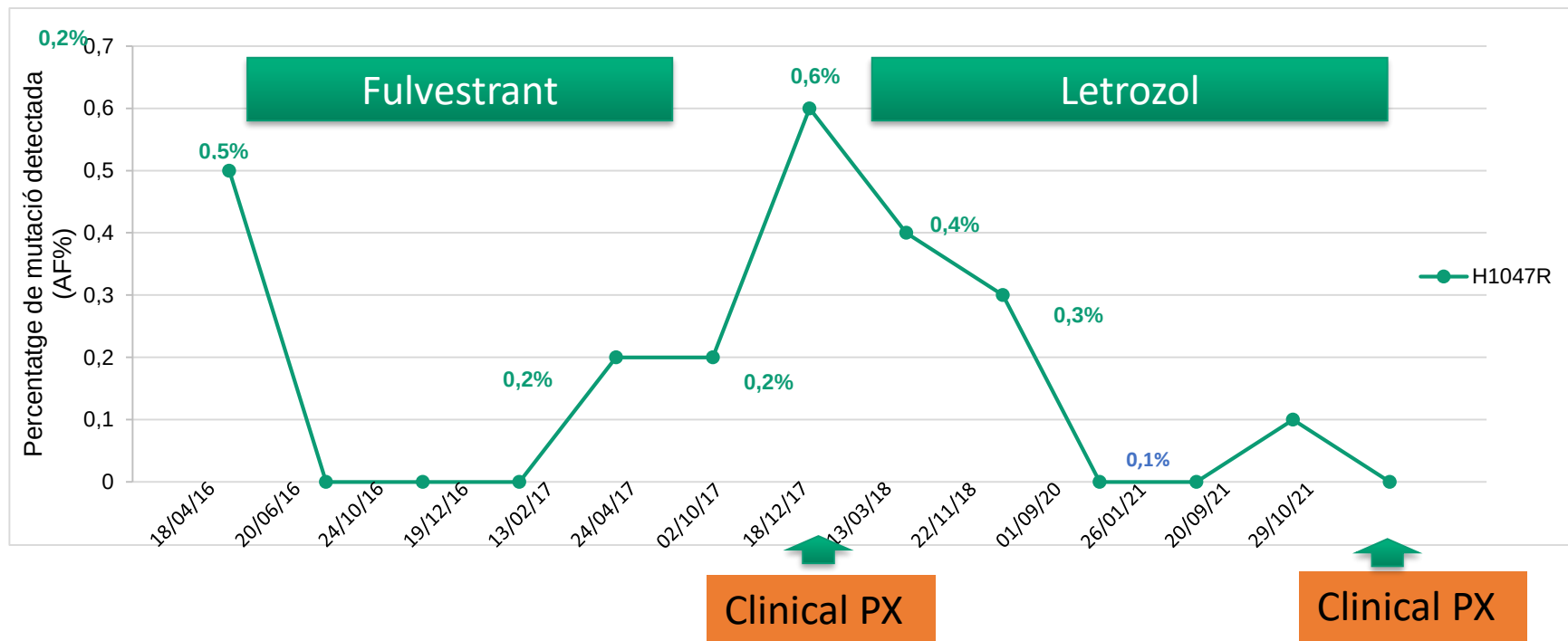
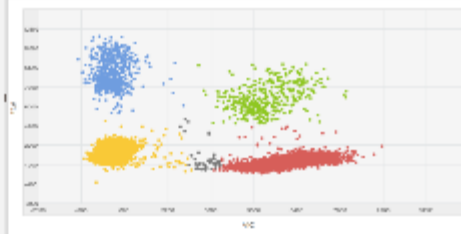
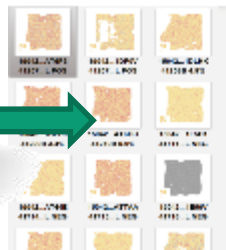
Historia oncológica

DIAGNÓSTICO MOLECULAR



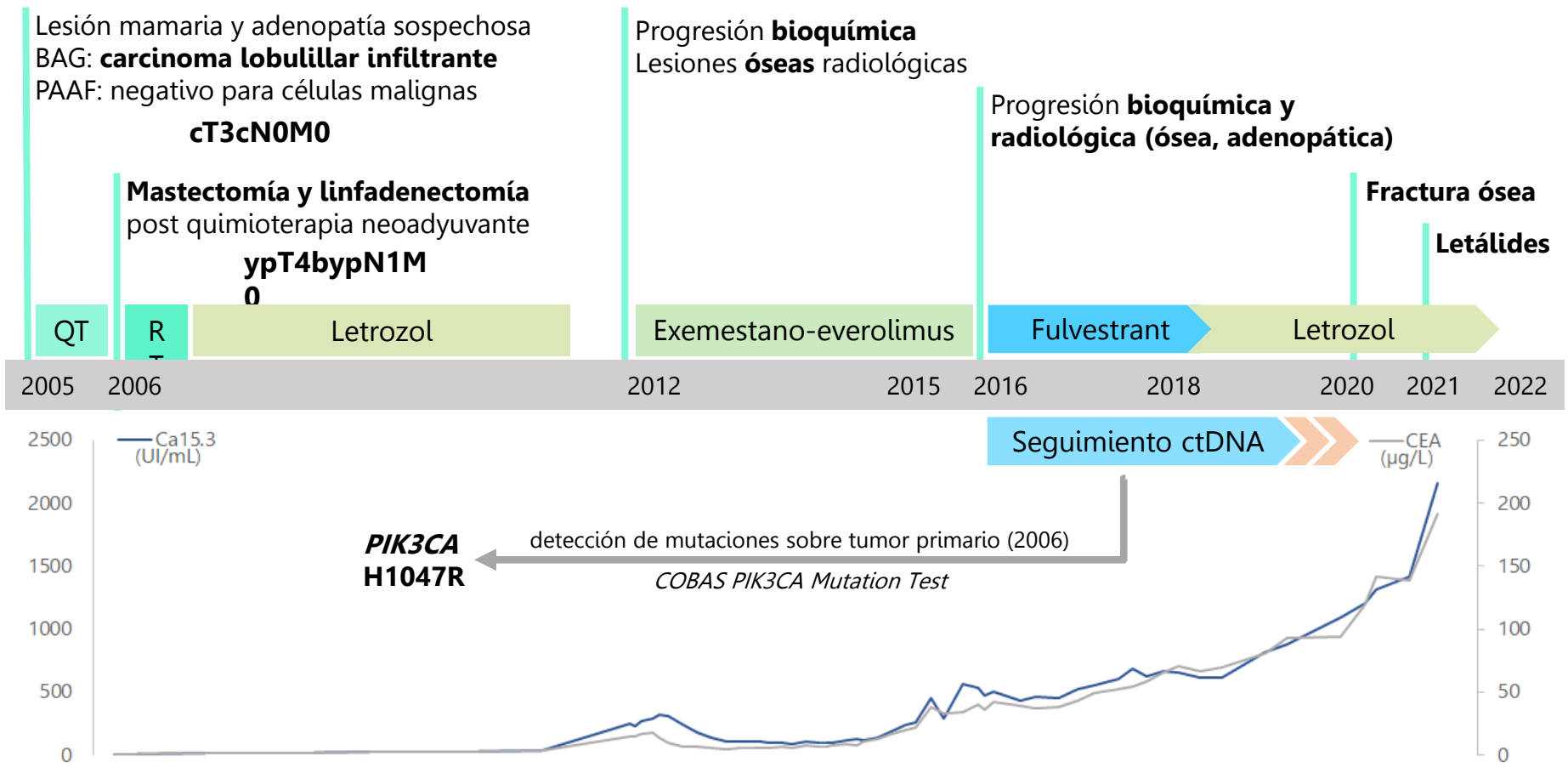


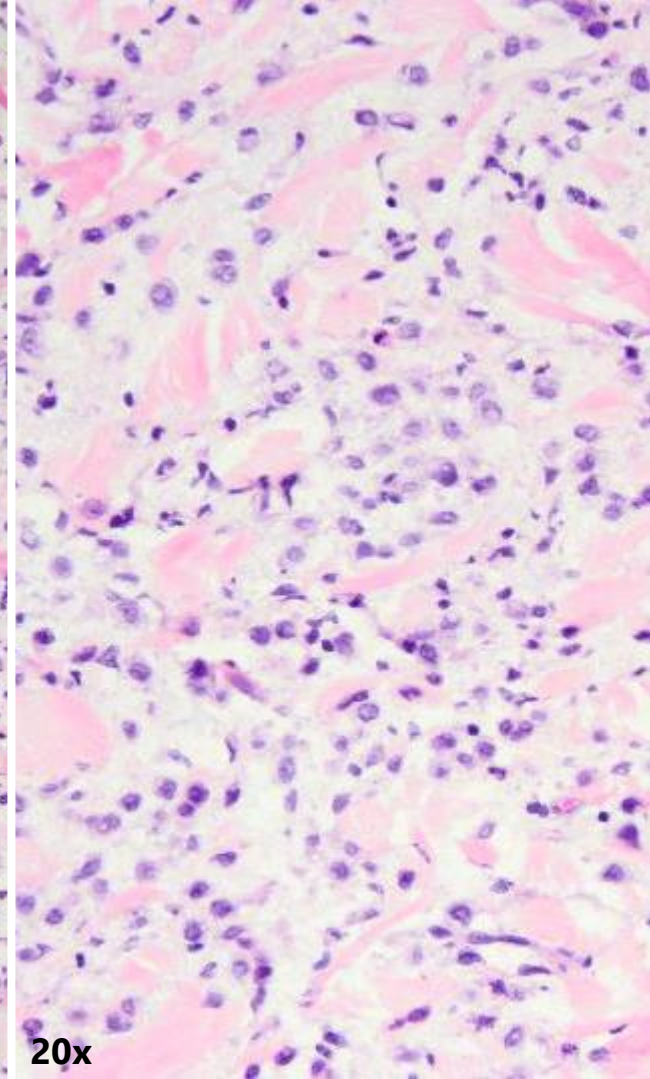
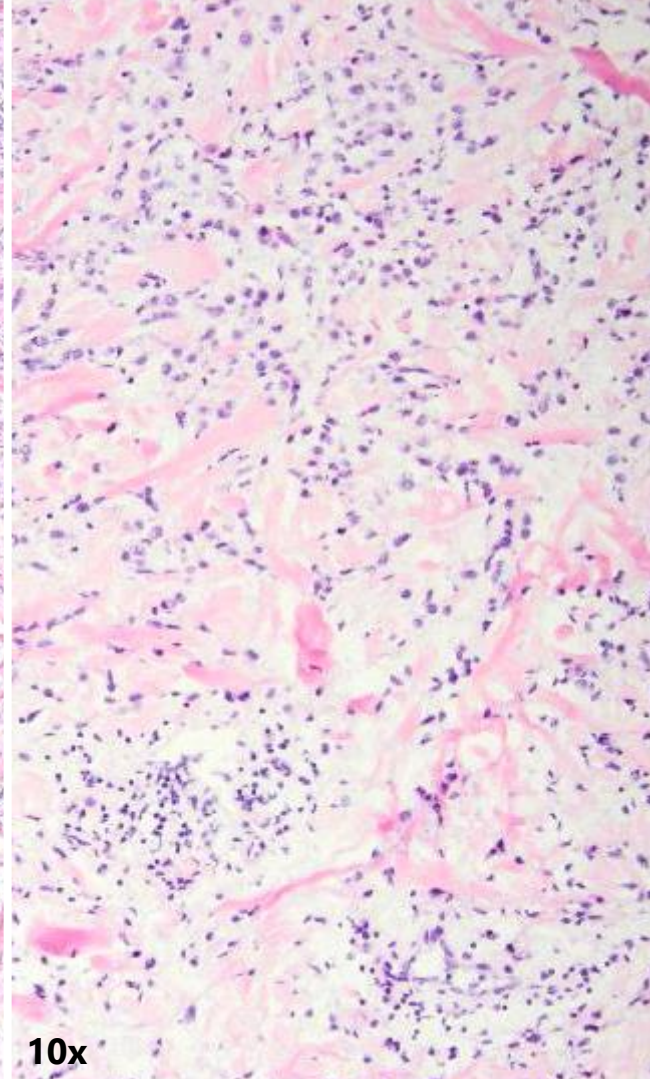
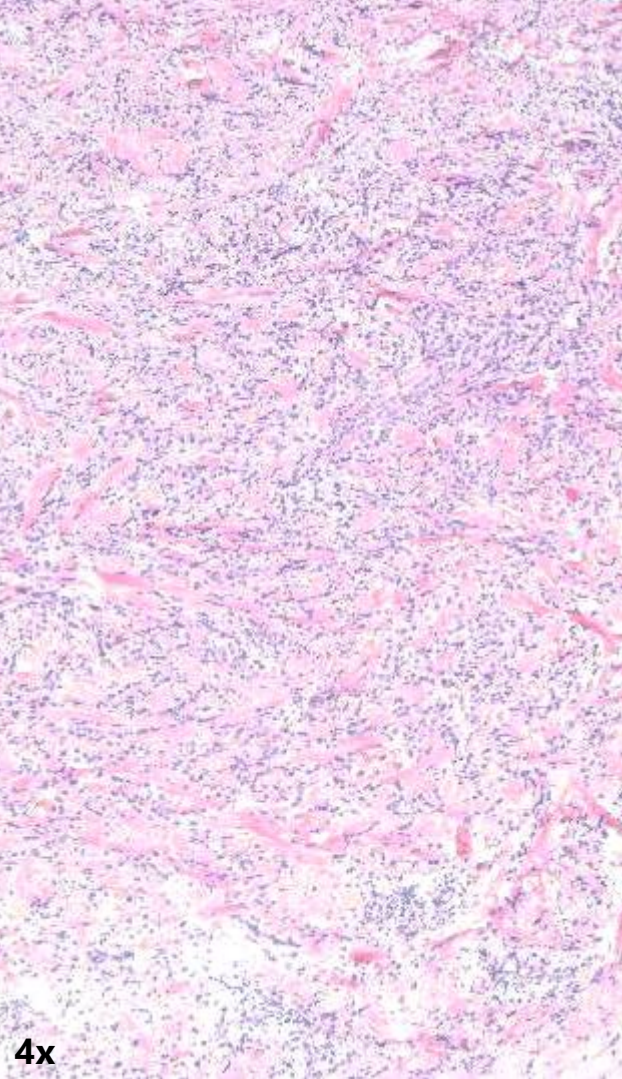


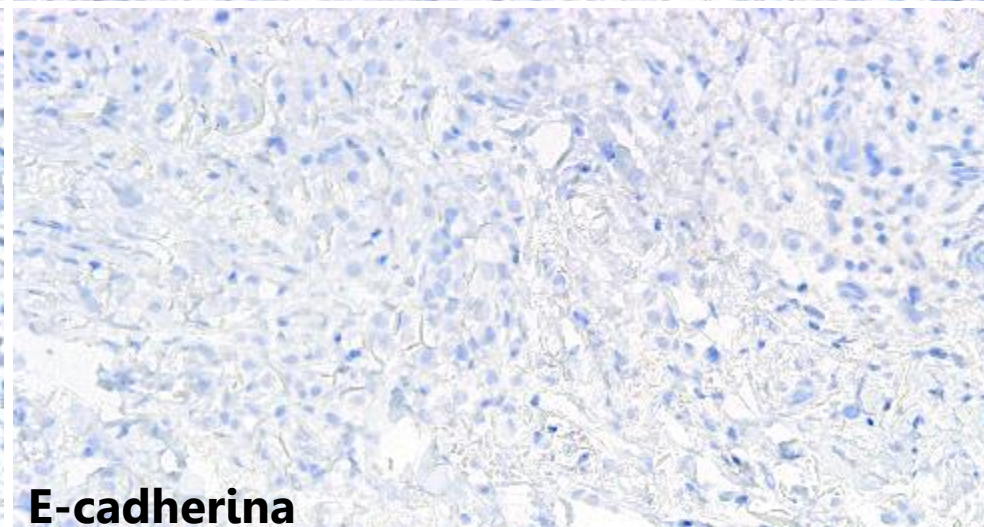
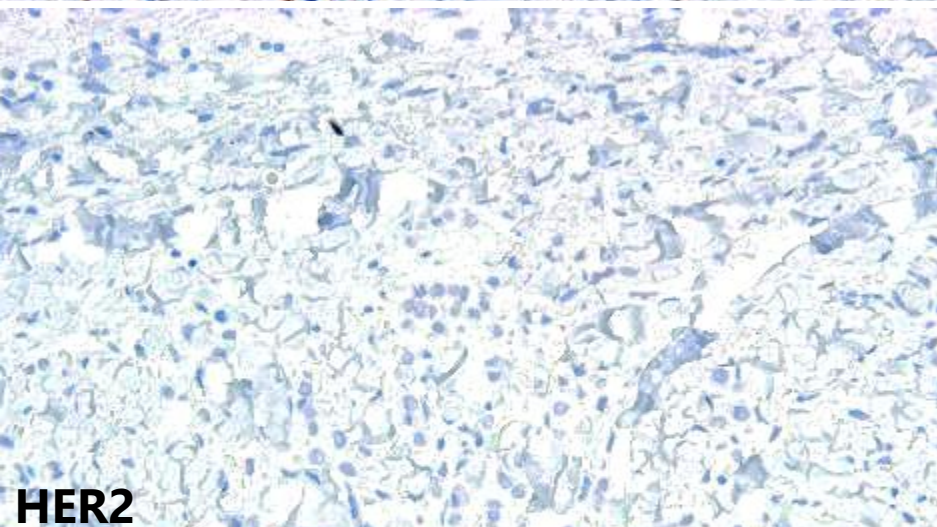
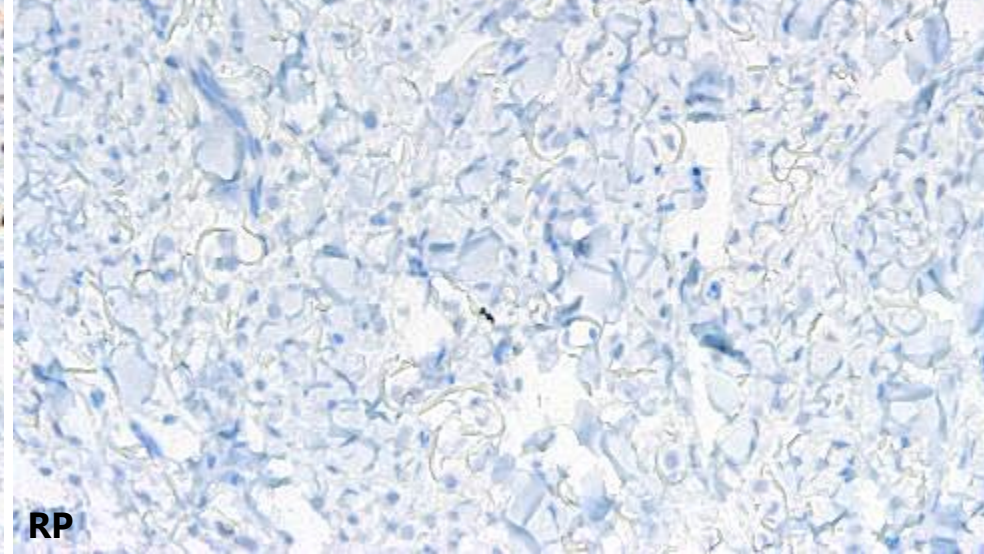
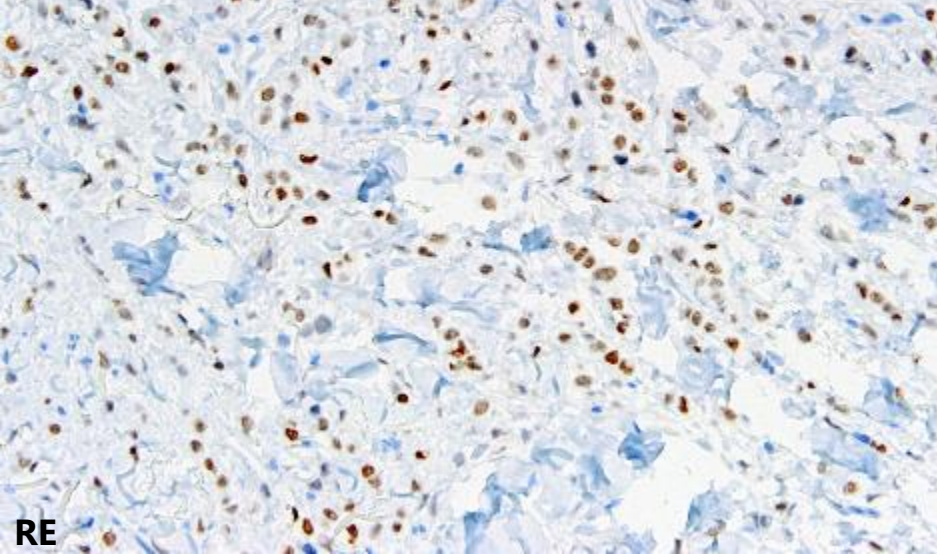


Historia oncológica

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

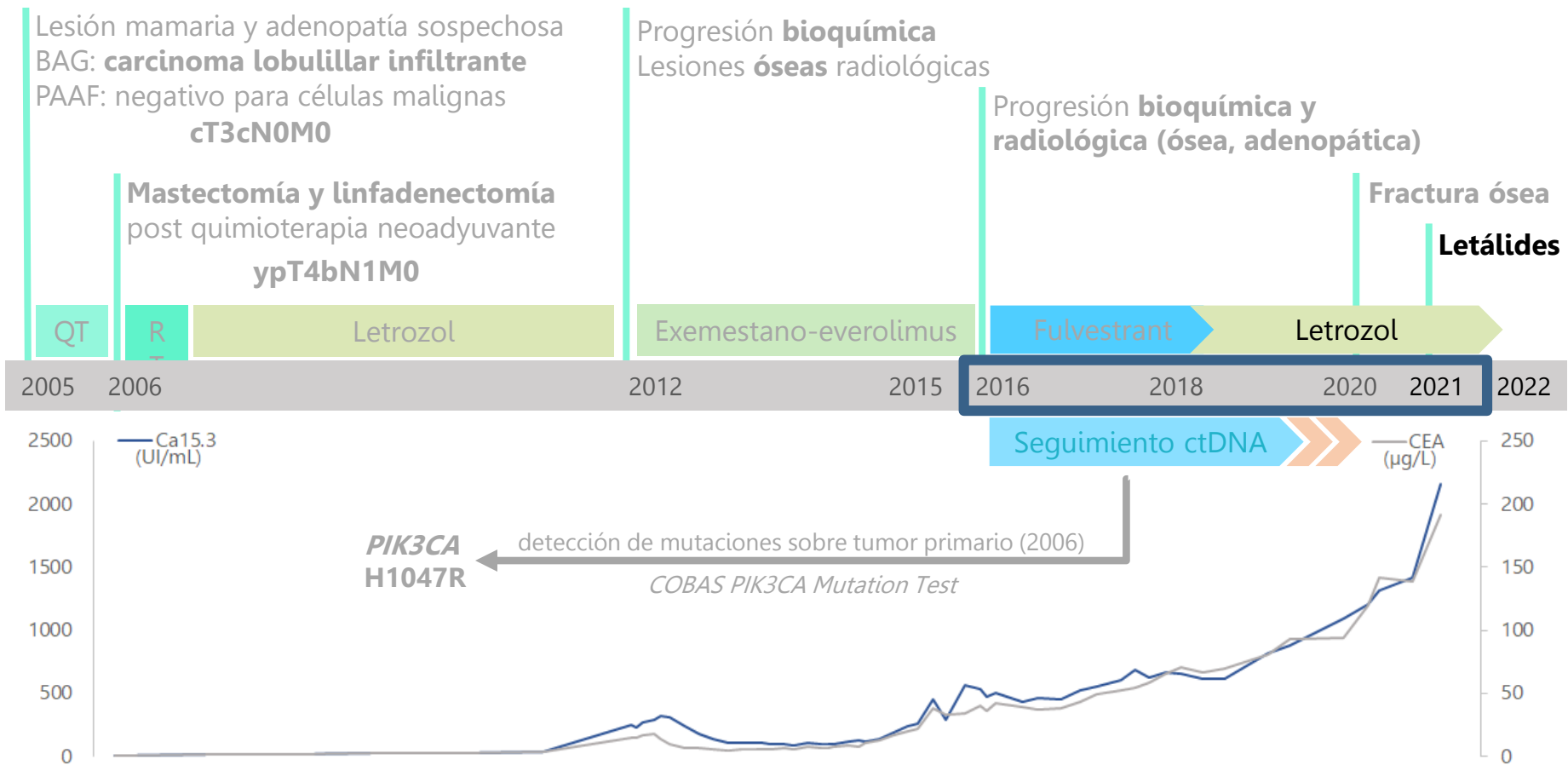






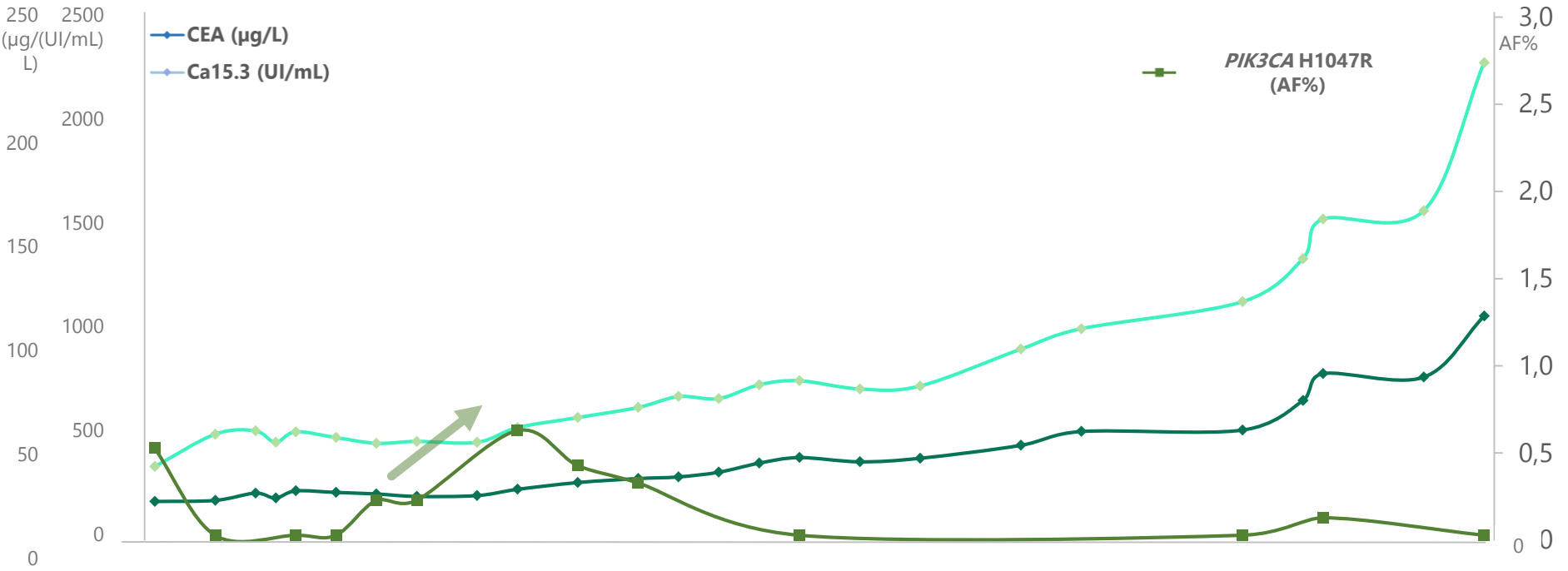
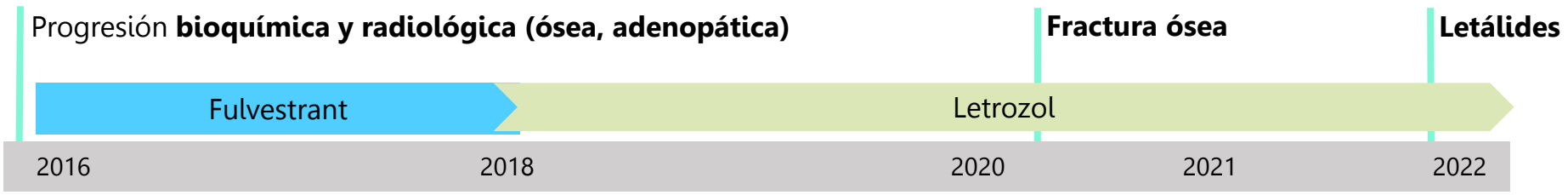
Historia oncológica

DIAGNÓSTICO MOLECULAR



Progresión de CEA, Ca15.3 y mutaciones en *PIK3CA* en sangre periférica

DIAGNOSTICO MOLECULAR



Oncomine Breast cfDNA Assay en sangre periférica durante recaída cutánea

PIK3CA	c.1633G>A; p.(Glu545Lys)	2,39%
TP53	c.839G>C; p.(Arg280Thr)	1,93%
TP53	c.853G>A; p.(Glu285Lys)	1,85%
PIK3CA	c.1624G>A; p.(Glu542Lys)	0,91%
PIK3CA	c.2176G>A; p.(Glu726Lys)	0,78%
TP53	c.524G>A; p.(Arg175His)	0,74%

Oncomine Solid Tumor DNA Kit sobre letálides

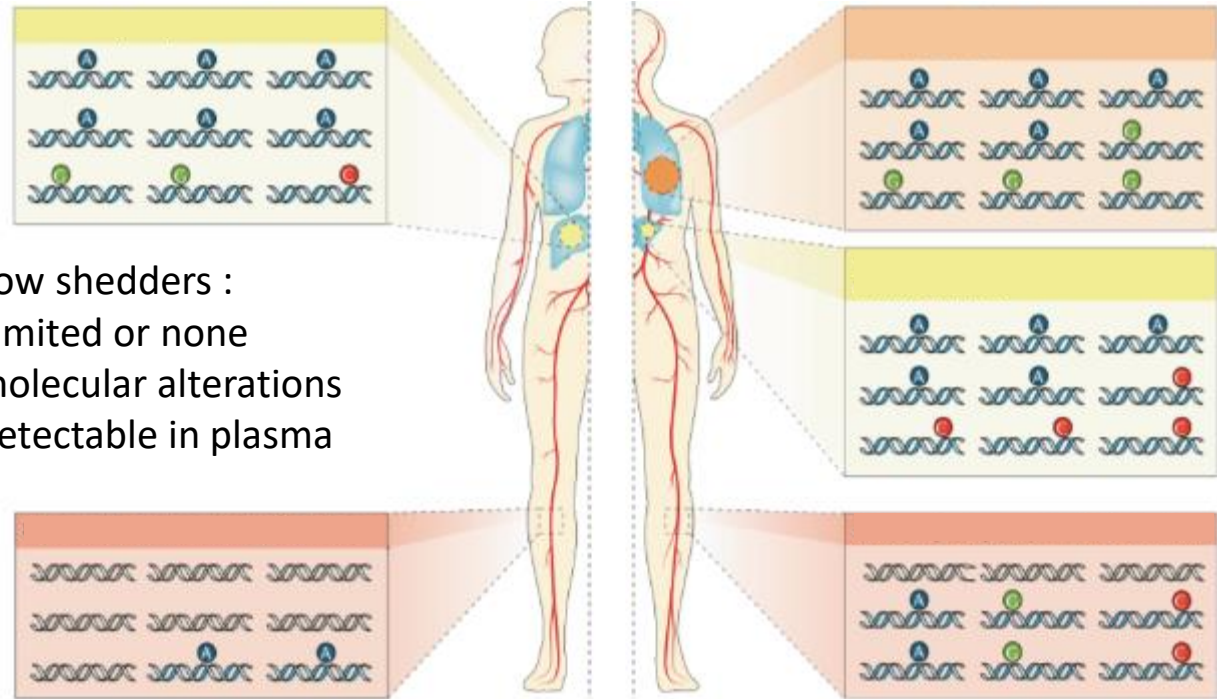
<i>EGFR:</i>	No mutado	<i>NOTCH1:</i>	No mutado
<i>AKT1:</i>	No mutado	<i>FGFR3:</i>	No mutado
<i>ALK:</i>	No mutado	<i>CTNNB1:</i>	No mutado
<i>PTEN:</i>	No mutado	<i>MET:</i>	No mutado
<i>ERBB2:</i>	c.2326G>A; p.(Gly776Ser) 36,4%	<i>SMAD4:</i>	No mutado
<i>NRAS:</i>	No mutado	<i>DDR2:</i>	No mutado
<i>ERBB4:</i>	No mutado	<i>FBXW7:</i>	No mutado
<i>MAP2K1:</i>	No mutado	<i>KRAS:</i>	No mutado
<i>FGFR1:</i>	No mutado	<i>TP53:</i>	c.853G>A; p.(Glu285Lys) 41,8 %
<i>STK11:</i>	No mutado	<i>PIK3CA:</i>	<u>No mutado</u>
<i>FGFR2:</i>	No mutado	<i>BRAF:</i>	No mutado



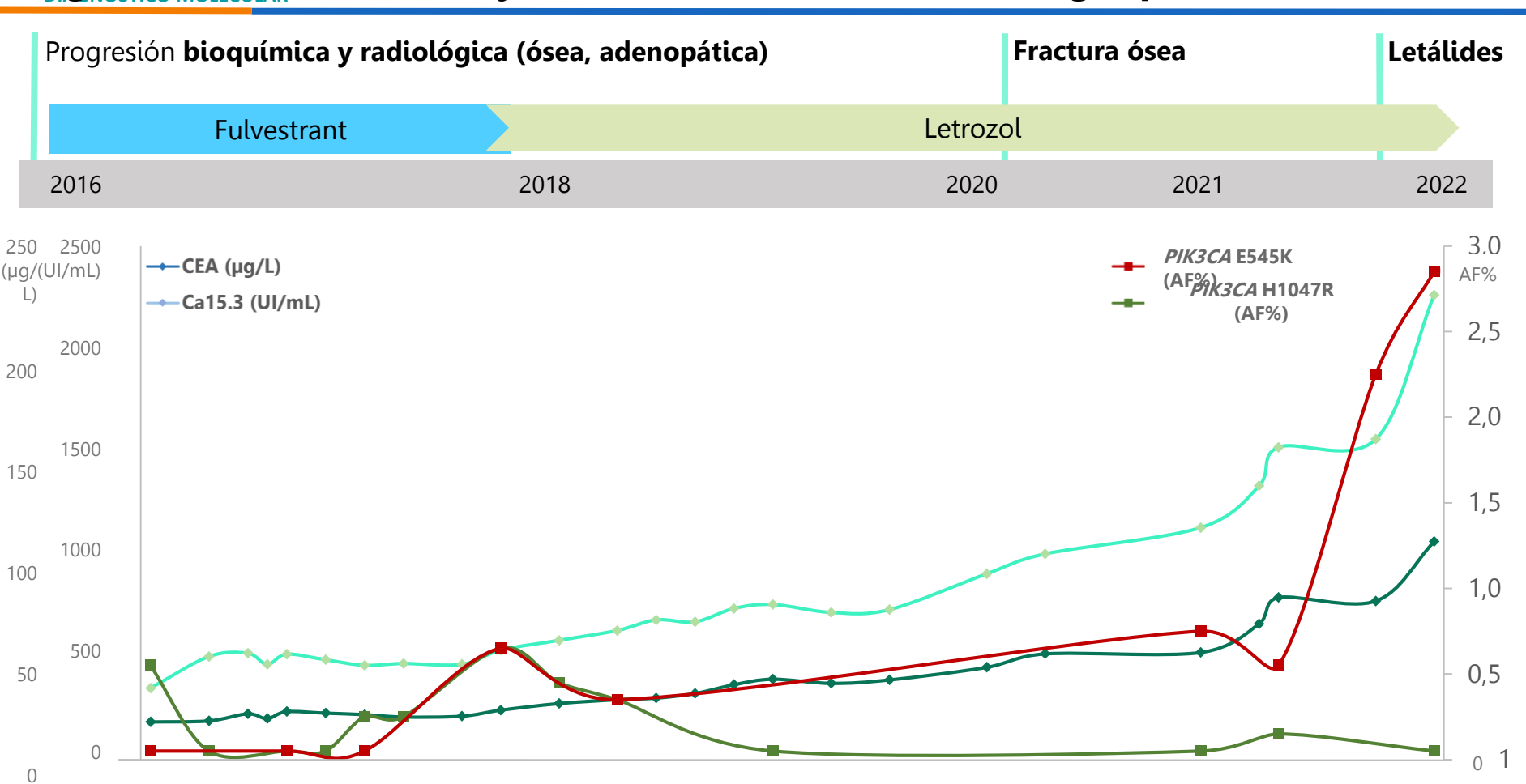
≠



Low shedders :
Limited or none
molecular alterations
detectable in plasma



Progresión de CEA, Ca15.3 y mutaciones en *PIK3CA* en sangre periférica



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Alpelisib for *PIK3CA*-Mutated, Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer

F. André, E. Ciruelos, G. Rubovszky, M. Campone, S. Loibl, H.S. Rugo, H. Iwata, P. Conte, I.A. Mayer, B. Kaufman, T. Yamashita, Y.-S. Lu, K. Inoue, M. Takahashi, Z. Pápai, A.-S. Longin, D. Mills, C. Wilke, S. Hirawat, and D. Juric, for the SOLAR-1 Study Group*

Diciembre 21: Capecitabina – Vinorelbina (por angina de Prinzmetal asociada a capecitabina)

Marzo 22: Progresión de letálides. Inicia eribulina – (PS - fragilidad)
Respuesta clínica parcial

Octubre 22 : exitus por progresión enfermedad

FORMACIÓN **IAVANTE** Fundación Progreso y Salud

CENTRO DE SIMULACIÓN CLÍNICA AVANZADA

@IAVANTE_FPS | #IAVANTEsimulación | www.iavante.es



Gracias por su atención

www.IAVANTE.es

IAVANTE