

PANMEP

PROGRAMA ANDALUZ DE FORMACIÓN EN MEDICINA
PERSONALIZADA Y DE PRECISIÓN

EXPERTO UNIVERSITARIO EN MEDICINA PERSONALIZADA Y DE PRECISIÓN

TÉCNICAS MOLECULARES Y CELULARES EN MEDICINA DE PRECISIÓN

FORMACIÓN
IAVANTE
Fundación
Progreso y Salud

COLABORA

Johnson & Johnson

ORGANIZAN

un
i Universidad
Internacional
de Andalucía
A



Junta de Andalucía
Consejería de Salud y Consumo

Módulo 2. NGS APLICADA AL ANALISIS DE ADN circulante y de tejido

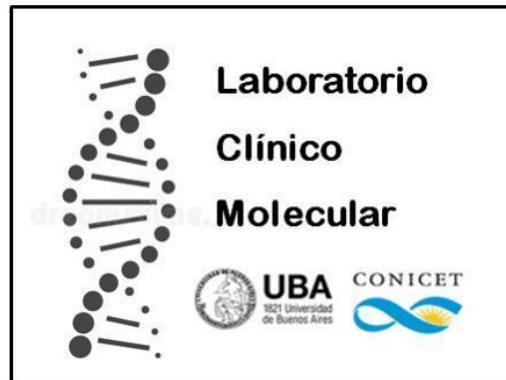
Objetivo: Aplicabilidad clínica del análisis de NGS

Prof. Dra. Valeria Denninghoff

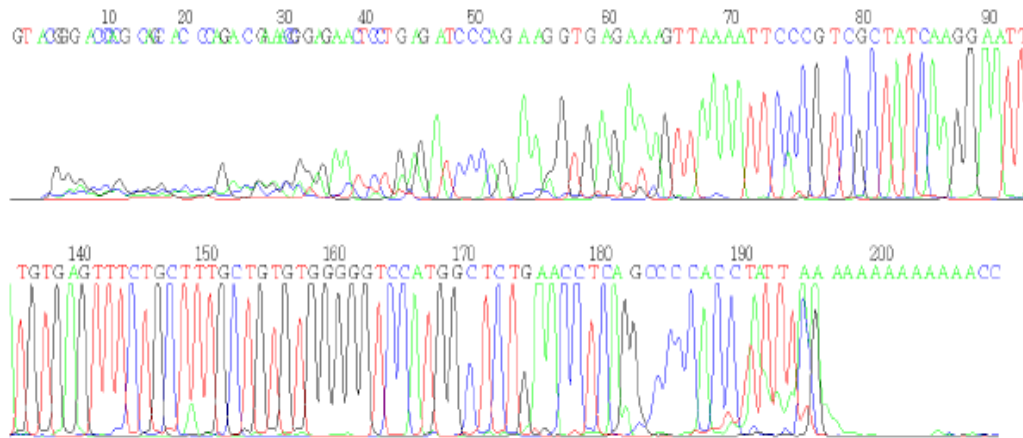
Grupo de Biopsia Líquida e Intercepción del Cáncer - GENyO - Centro de Genómica e Investigación Oncológica - Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía – Granada - España

Directora Laboratorio Clínico Molecular – Universidad de Buenos Aires
Investigadora Adjunta - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación - Argentina

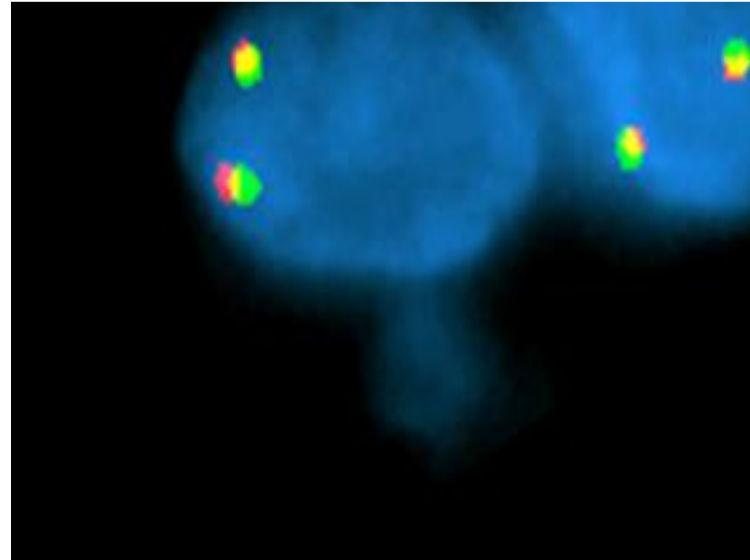
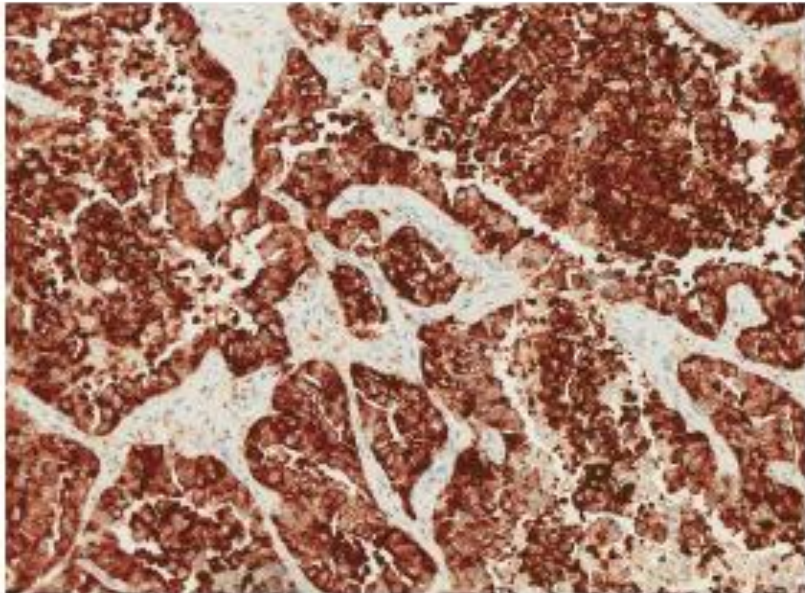
22 de Marzo 2024 - 11:15 -12:00 horas



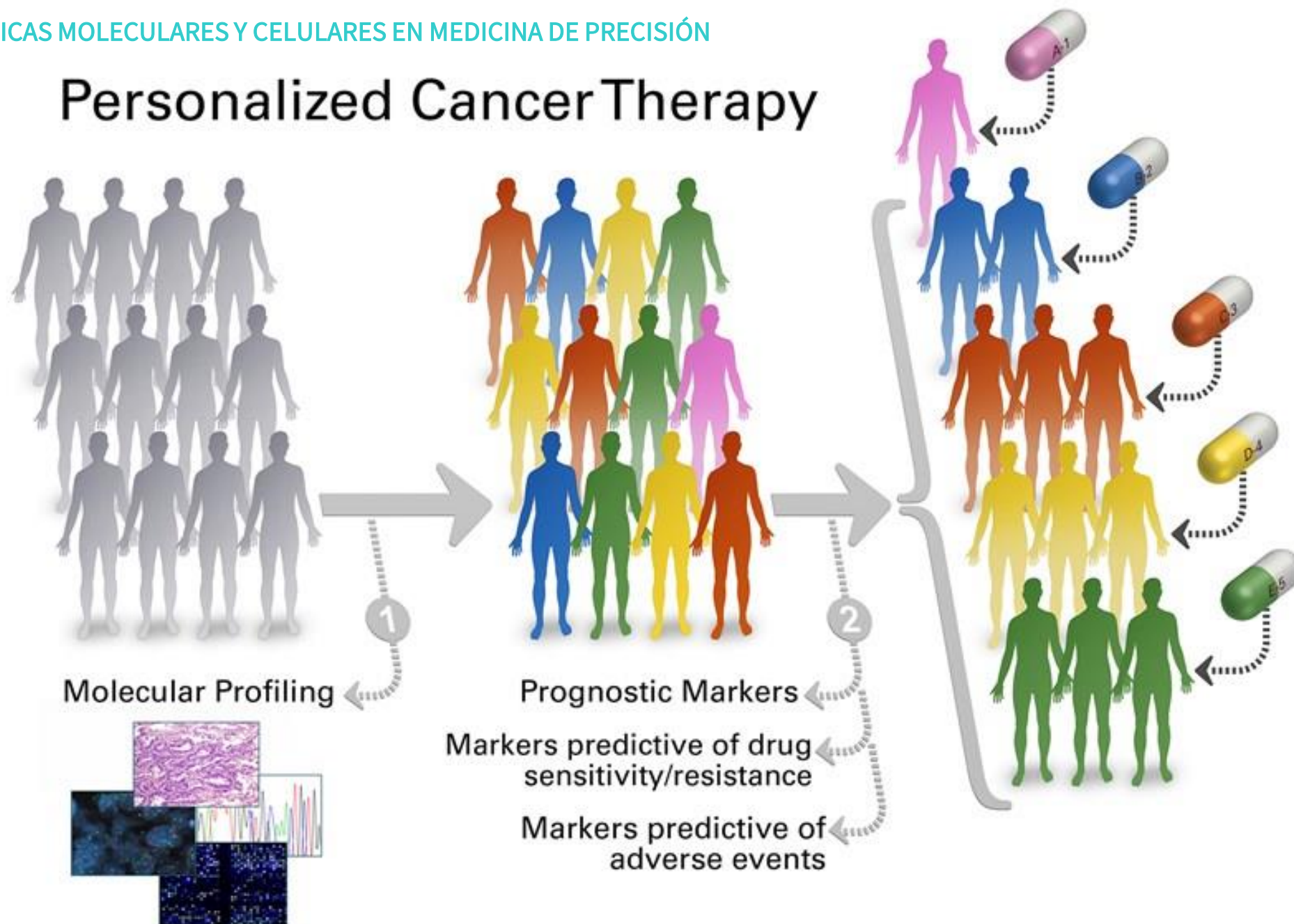
File: PUL001-EGFR19-EGFR19-FW.ab1 Run Ended: 2012/4/17 3:6:0 Signal G:6527 A:6523 C:7529 T:6232
Sample: PUL001-EGFR19_EGFR19-FW Lane: 56 Base spacing: -16.163063 209 bases in 2470 scans

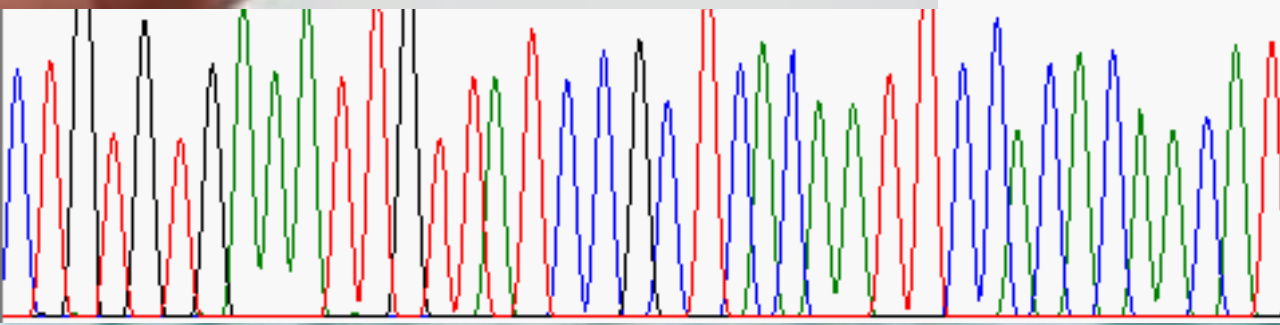


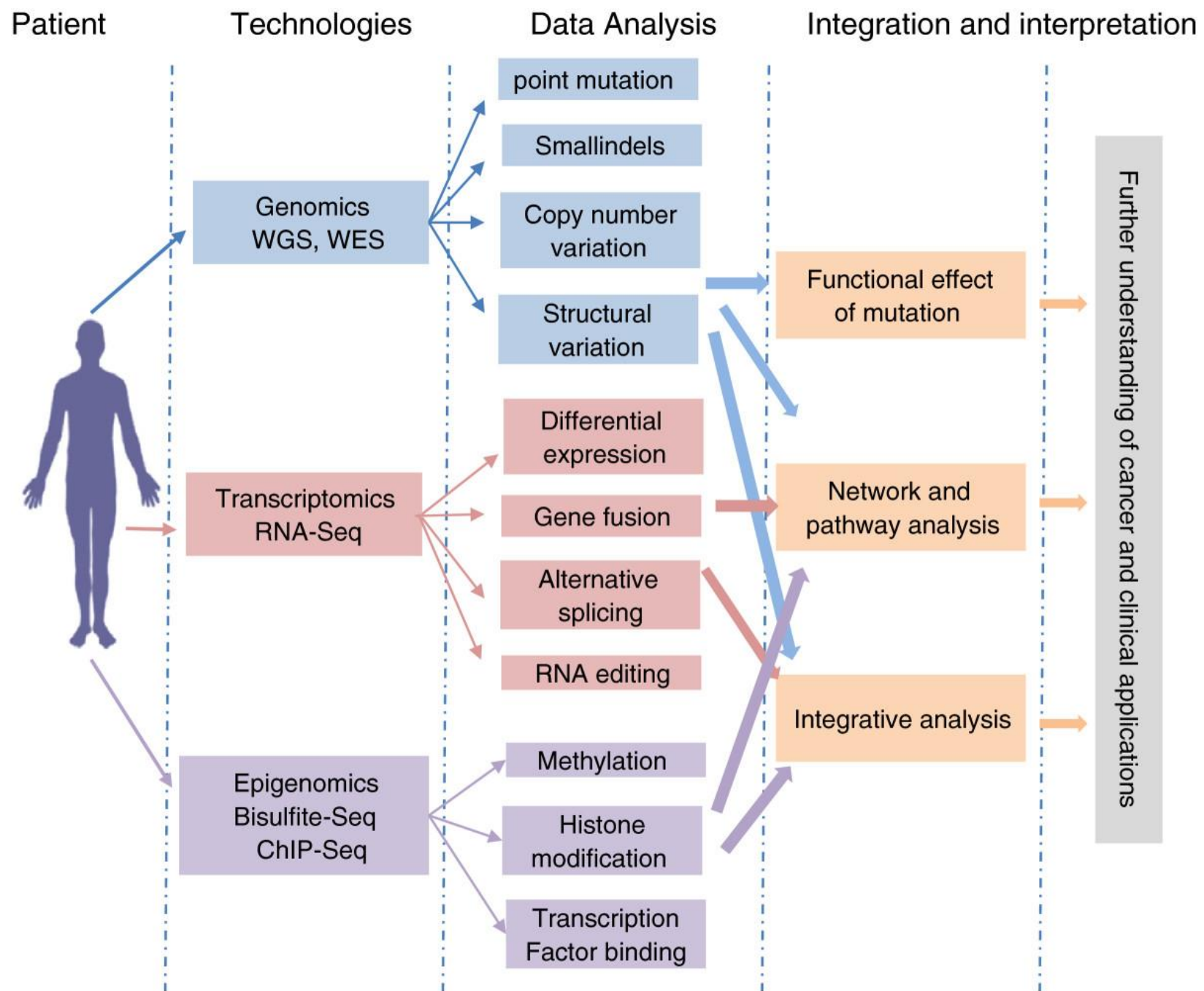
La identificación de
pacientes con targets
moleculares en sus
tumores es hoy un
STANDARD de cuidado



Personalized Cancer Therapy







Preclinical
studies



Clinical
Trial



ARM 1



ARM 2

Approved
Treatment



Lung Cancer

Numerous oncogene alterations have been identified to be important for lung cancer pathogenesis and impact therapy selection, including EGFR, ALK, ROS1, BRAF, MET, HER2, RET, etc. Testing of non-small cell lung cancer (NSCLC) for multiple gene mutations is vital for identification of potentially efficacious targeted therapies.

Gene	Alteration	Frequency in NSCLC	Available Targeted Therapy
EGFR	Mutation	10~35%	Gefitinib, Erlotinib, Afatinib, Osimertinib
ALK	Fusion	3~7%	Crizotinib, Alectinib, Ceritinib
ROS1	Fusion	2%	Crizotinib, Ceritinib
BRAF	Mutation	1~4%	Trametinib, Dabrafenib
MET	Exon 14 skipping mutation	3%	Crizotinib
HER2	Mutation	2~4%	Ado-trastuzumab emtasine
RET	Fusion	1%	Cabozantinib, Vandetanib
NTRK	Fusion	1%	Larotrectinib, Entrectinib
KRAS	G12C mutation	11~16%	AMG510, MRTX849

Hay que estudiar los biomarcadores asociados a fármacos que están aprobados en cada país, esta situación es altamente heterogénea porque depende de la permeabilidad de cada uno





Therapeutic

1 Level 1

FDA-approved drugs
43 Genes

2 Level 2

Standard care
23 Genes

3 Level 3

Clinical evidence
26 Genes

4 Level 4

Biological evidence
25 Genes

10 Level R1

Standard care
8 Genes

12 Level R2

Clinical evidence
6 Genes

+ Diagnostic (for hematologic malignancies only)

+ Prognostic (for hematologic malignancies only)

+ FDA-Recognized Content

43 actionable genes



Select a cancer type



70 drugs



Showing 142 clinical implications (43 genes, 28 cancer types, 1 level of evidence)

[Associations](#)[Reset filters](#)

Level	Gene	Alterations	Cancer Types	Drugs
1	EGFR	L861Q	Non-Small Cell Lung Cancer	Afatinib
1	EGFR	S768I	Non-Small Cell Lung Cancer	Afatinib
1	ROS1	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Entrectinib
1	ROS1	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Crizotinib
1	EGFR	Exon 19 in-frame deletions, L858R	Non-Small Cell Lung Cancer	Dacomitinib
1	EGFR	Exon 19 in-frame deletions, L858R	Non-Small Cell Lung Cancer	Osimertinib
1	EGFR	Exon 19 in-frame deletions, L858R	Non-Small Cell Lung Cancer	Gefitinib
1	EGFR	Exon 19 in-frame deletions, L858R	Non-Small Cell Lung Cancer	Afatinib
1	EGFR	Exon 19 in-frame deletions, L858R	Non-Small Cell Lung Cancer	Erlotinib, Erlotinib + Ramucirumab
1	EGFR	T790M	Non-Small Cell Lung Cancer	Osimertinib
1	EGFR	G719	Non-Small Cell Lung Cancer	Afatinib
1	EGFR	Exon 20 in-frame insertions	Non-Small Cell Lung Cancer	Mobocertinib



Therapeutic

1 Level 1

FDA-approved drugs
43 Genes

2 Level 2

Standard care
23 Genes

3 Level 3

Clinical evidence
26 Genes

4 Level 4

Biological evidence
25 Genes

R1 Level R1

Standard care
8 Genes

R2 Level R2

Clinical evidence
6 Genes

+ Diagnostic (for hematologic malignancies only)

+ Prognostic (for hematologic malignancies only)

+ FDA-Recognized Content

43 actionable genes



Select a cancer type



70 drugs



Showing 142 clinical implications (43 genes, 28 cancer types, 1 level of evidence)

[Associations](#)[Reset filters](#)

Level	Gene	Alterations	Cancer Types	Drugs
1	EGFR	Exon 20 in-frame insertions	Non-Small Cell Lung Cancer	Mobocertinib
1	EGFR	Exon 20 in-frame insertions	Non-Small Cell Lung Cancer	Amivantamab
1	RET	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Pralsetinib
1	RET	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Selpercatinib
1	BRAF	V600E	Non-Small Cell Lung Cancer	Dabrafenib + Trametinib
1	ALK	Oncogenic Mutations	Non-Small Cell Lung Cancer	Lorlatinib
1	ALK	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Brigatinib
1	ALK	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Alectinib
1	ALK	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Ceritinib
1	ALK	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Crizotinib
1	KRAS	G12C	Non-Small Cell Lung Cancer	Sotorasib
1	MET	D1010, Exon 14 Deletion, Exon 14 in-frame deletions, Exon 14 splice mutations	Non-Small Cell Lung Cancer	Tepotinib
1	MET	D1010, Exon 14 Deletion, Exon 14 in-frame deletions, Exon 14 splice mutations	Non-Small Cell Lung Cancer	Capmatinib

— Therapeutic

1 Level 1

FDA-approved drugs
43 Genes

2 Level 2

Standard care
23 Genes

3 Level 3

Clinical evidence
26 Genes

4 Level 4

Biological evidence
25 Genes

R1 Level R1

Standard care
8 Genes

R2 Level R2

Clinical evidence
6 Genes

+ Diagnostic (for hematologic malignancies only)

+ Prognostic (for hematologic malignancies only)

+ FDA-Recognized Content

43 actionable genes



Select a cancer type



70 drugs



Showing 142 clinical implications (43 genes, 28 cancer types, 1 level of evidence)

Associations

Reset filters

Level	Gene	Alterations	Cancer Types	Drugs
1	ALK	Fusions	Anaplastic Large-Cell Lymphoma ALK Positive	Crizotinib
1	NTRK3	Fusions	All Solid Tumors	Entrectinib
1	NTRK3	Fusions	All Solid Tumors	Larotrectinib
1	NTRK2	Fusions	All Solid Tumors	Entrectinib
1	NTRK2	Fusions	All Solid Tumors	Larotrectinib
1	NTRK1	Fusions	All Solid Tumors	Entrectinib
1	NTRK1	Fusions	All Solid Tumors	Larotrectinib
1	Other Biomarkers	Tumor Mutational Burden-High	All Solid Tumors	Pembrolizumab
1	Other Biomarkers	Microsatellite Instability-High	All Solid Tumors	Pembrolizumab

Therapeutic

1 Level 1

FDA-approved drugs
43 Genes

2 Level 2

Standard care
23 Genes

3 Level 3

Clinical evidence
26 Genes

4 Level 4

Biological evidence
25 Genes

R1 Level R1

Standard care
8 Genes

R2 Level R2

Clinical evidence
6 Genes

+ Diagnostic (for hematologic malignancies only)

+ Prognostic (for hematologic malignancies only)

+ FDA-Recognized Content

26 actionable genes



Select a cancer type



42 drugs



Showing 89 clinical implications (26 genes, 25 cancer types, 2 levels of evidence)

Associations

Reset filters

Level	Gene	Alterations	Cancer Types	Drugs
R1	EGFR	Exon 20 in-frame insertions (excluding A763_Y764insFGEA)	Non-Small Cell Lung Cancer	Erlotinib, Gefitinib, Afatinib
R1	EGFR	T790M	Non-Small Cell Lung Cancer	Erlotinib, Gefitinib, Afatinib
2	MET	Amplification	Non-Small Cell Lung Cancer	Crizotinib
2	MET	D1010, Exon 14 Deletion, Exon 14 in-frame deletions, Exon 14 splice mutations	Non-Small Cell Lung Cancer	Crizotinib
2	RET	Fusions	Non-Small Cell Lung Cancer	Cabozantinib
2	ERBB2	Oncogenic Mutations	Non-Small Cell Lung Cancer	Trastuzumab Deruxtecan
2	ERBB2	Oncogenic Mutations	Non-Small Cell Lung Cancer	Ado-Trastuzumab Emtansine
2	EGFR	A763_Y764insFGEA	Non-Small Cell Lung Cancer	Erlotinib

BLACK-BOX TESTING

TEST CASE INPUT

APPLICATION

TEST CASE OUTPUT

ZERO KNOWLEDGE



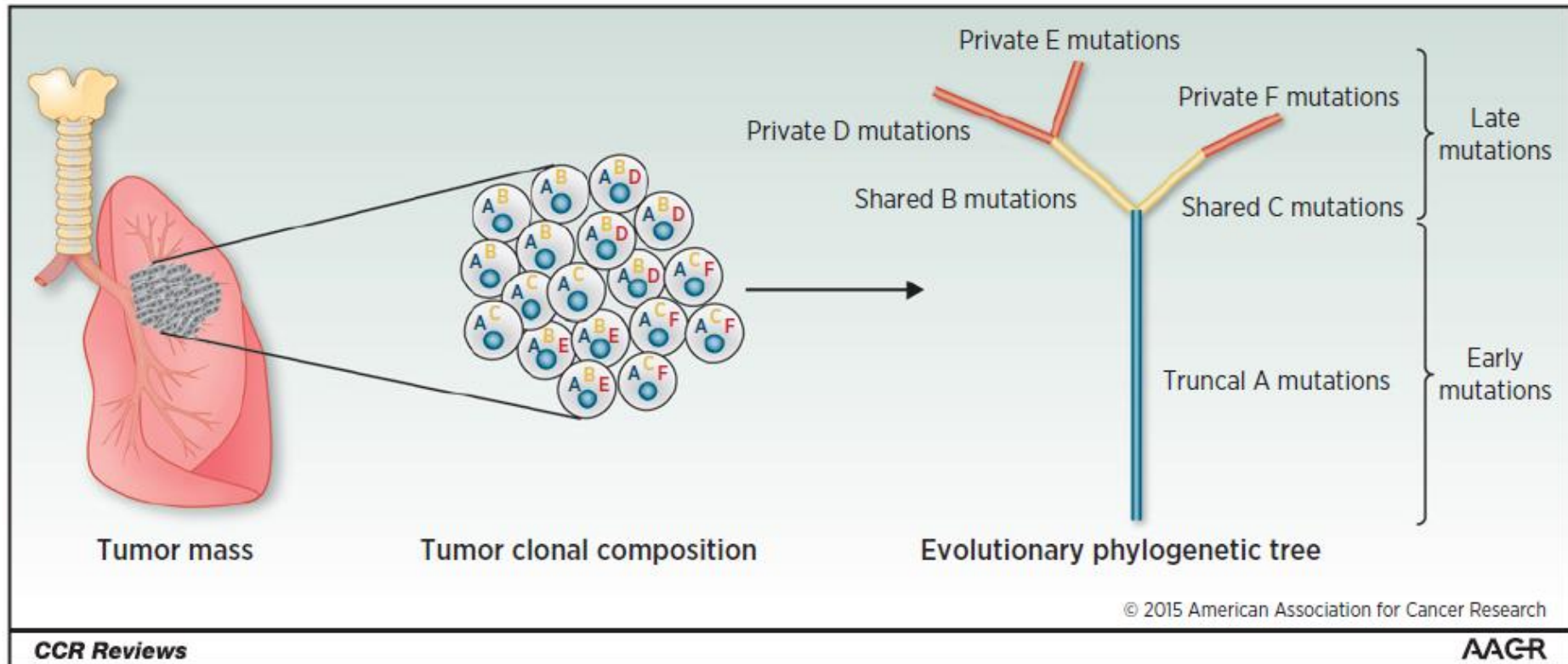
List of Human Genetic Tests

Disease/Use		Trade Name	Manufacturer	Submission
Non-Small Cell Lung Cancer		VYSIS ALK BREAK APART FISH PROBE KIT	ABBOTT MOLECULAR, INC.	P110012
		Cobas EGFR MUTATION TEST v2	Roche Molecular Systems, Inc.	P120019
		THERASCREEN EGFR RGQ PCR KIT	QIAGEN MANCHESTER LTD	P120022
		Cobas EGFR MUTATION TEST v2	Roche Molecular Systems, Inc.	P150044
		Cobas EGFR MUTATION TEST v2	Roche Molecular Systems, Inc.	P150047
		Oncomine Dx Target Test	LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION	P160045

Tumor Profiling	MSK-IMPACT (Integrated Mutation Profiling Of Actionable Cancer Targets):A Hybridization-Capture Based Next Generation Sequencing Assay	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center	DEN170058
	FoundationOne CDx	Foundation Medicine, Inc.	P170019
Tumor Profiling	FoundationOne Liquid CDx (F1 Liquid CDx)	Foundation Medicine, Inc.	P200006
Tumor Profiling	Myriad myChoice CDx	Myriad Genetic Laboratories, Inc.	P190014
Tumor Profiling	NYU Langone Genome PACT	NYU Langone Medical Center	K202304
Tumor Profiling	Omics Core	NantHealth, Inc..	K190661
Tumor Profiling	PGDx elio tissue complete	Personal Genome Diagnostics	K192063
Tumor Profiling; NSCLC	Guardant360® CDx	Guardant Health, Inc.	P200010
Tumor Profiling, Liquid Biopsy	FoundationOne® Liquid CDx	Foundation Medicine, Inc.	P190032
Whole exome sequencing	Helix Laboratory Platform	Helix OpCo, LLC	DEN190035

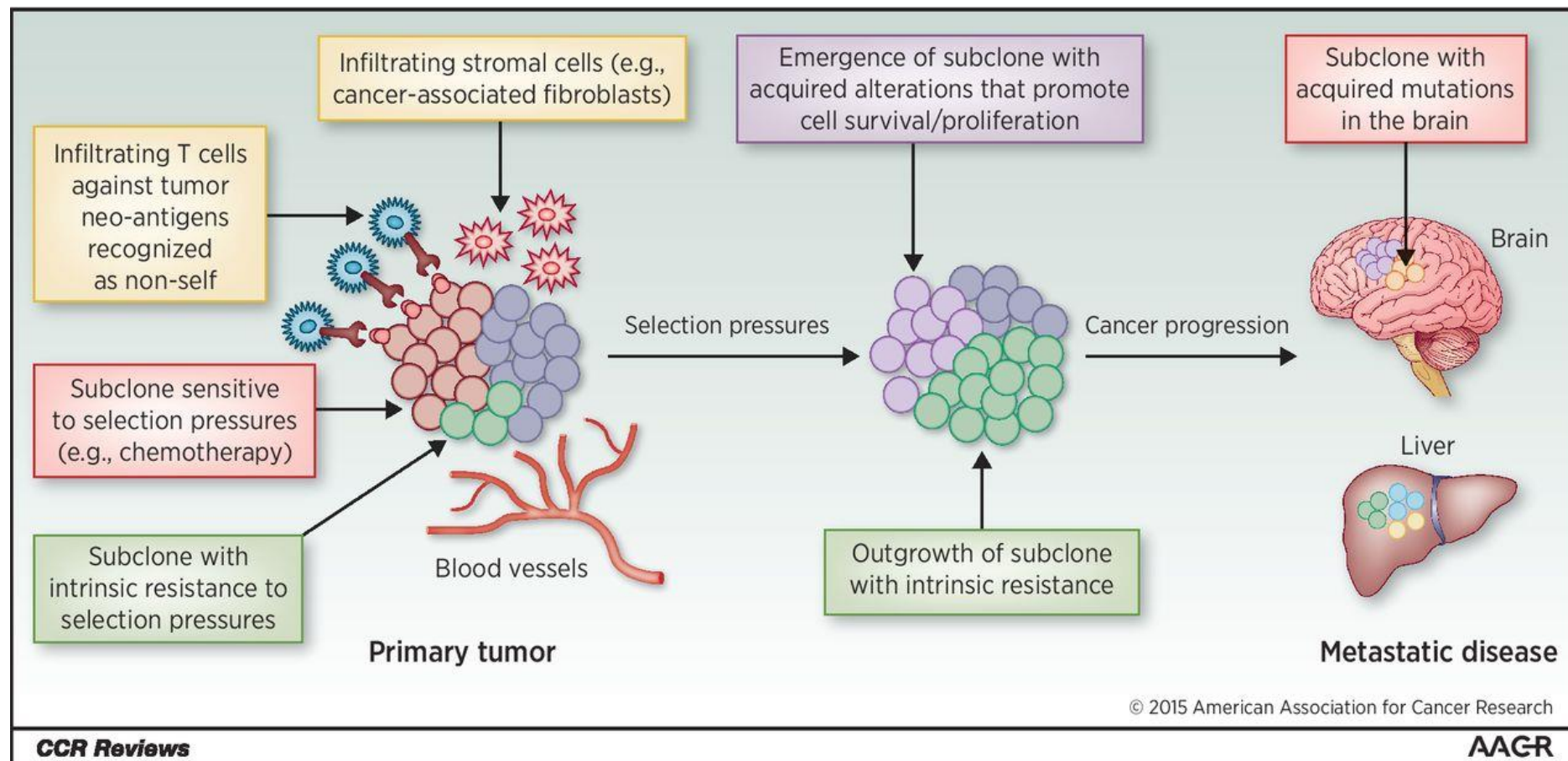
Translational Implications of Tumor Heterogeneity CME

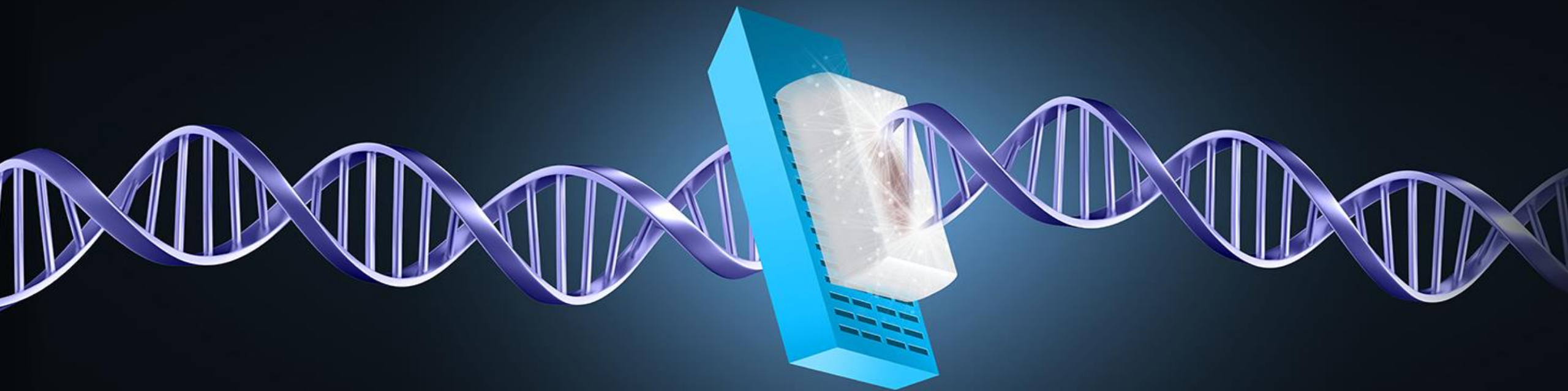
Mariam Jamal-Hanjani^{1,2}, Sergio A. Quezada¹, James Larkin³, and Charles Swanton^{1,2}



Translational Implications of Tumor Heterogeneity CME

Mariam Jamal-Hanjani^{1,2}, Sergio A. Quezada¹, James Larkin³, and Charles Swanton^{1,2}



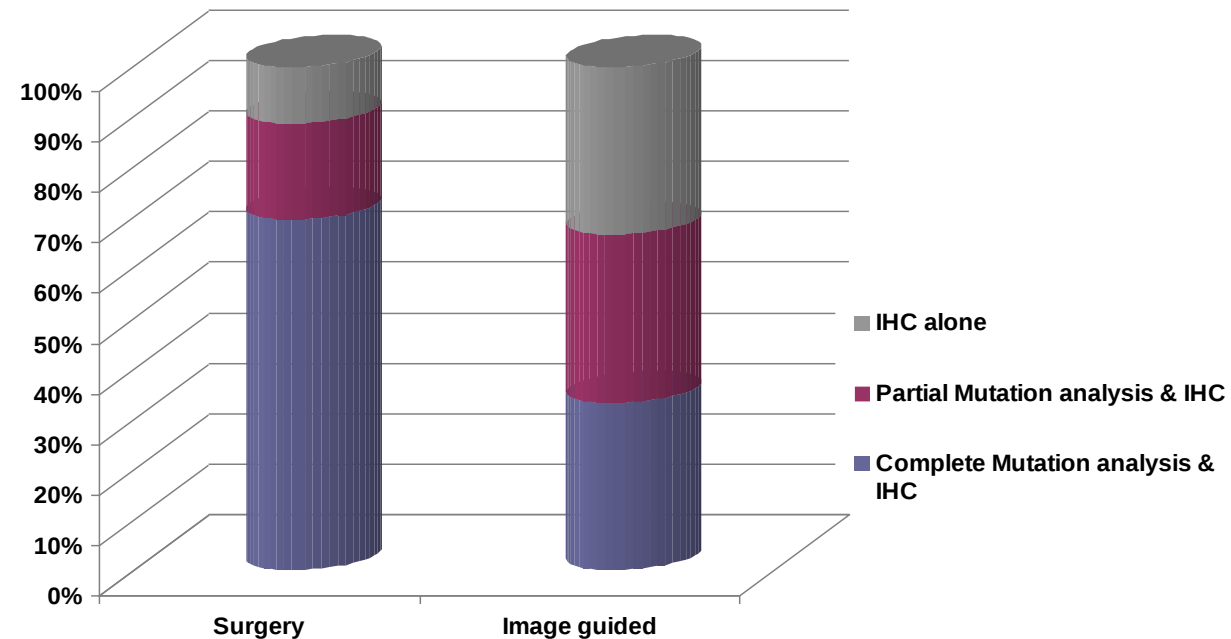
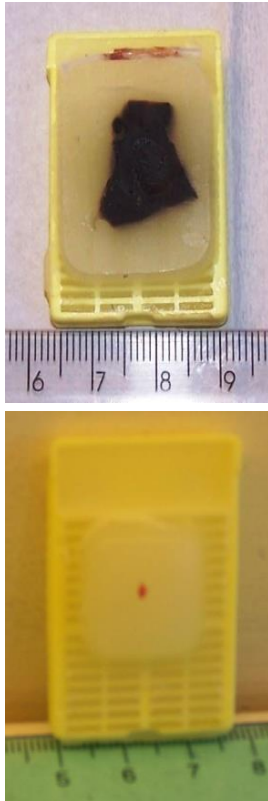


IMPORTANCIA DE LA MUESTRA DE TEJIDO PARA UN ANÁLISIS COMPLETO

RESEARCH ARTICLE

Performance Assessment of Epidermal Growth Factor Receptor Gene Sequencing According to Sample Size in Daily Practice Conditions

Alejandro García, MD, Constanza Lorente, MD, María T. Cuello, MD, Mariana dos Santos, BS, Boris Elsner, PhD, Alejandra Avagnina, MD, and Valeria Denninghoff, PhD



La cantidad de tejido obtenido a partir de una biopsia no quirúrgica es frecuentemente inadecuado para una evaluación completa

Spatial and Temporal Heterogeneity of Panel-Based Tumor Mutational Burden in Pulmonary Adenocarcinoma: Separating Biology From Technical Artifacts

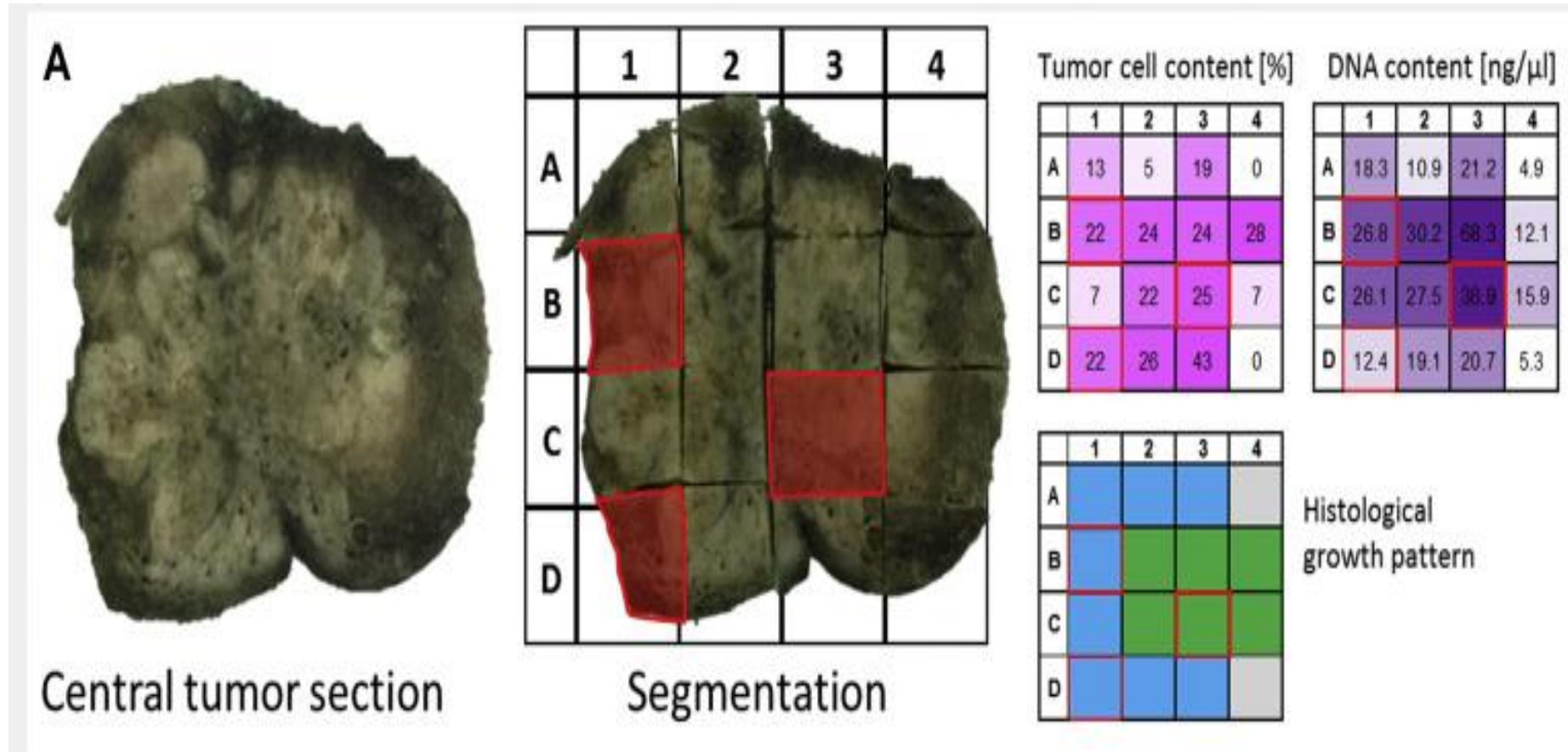
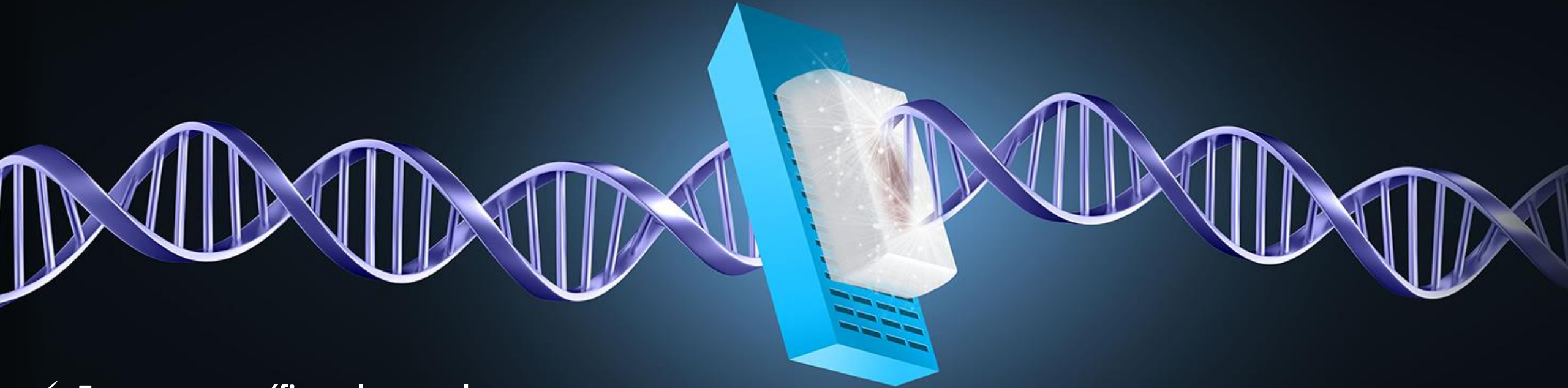


Figure 4. A, Representative sample (case #14): central tumor section, before (left) and after segmentation (middle), as well as the tumor cell content, DNA content, and histologic growth pattern (blue indicates lepidic; green indicates acinar; and gray indicates non-neoplastic) determined for each tumor segment separately. Segments selected for tumor mutational burden (TMB) measurement are circled in red.

Existen tres enfoques principales para el diagnóstico molecular a partir de muestras de tejido fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE) :



- ✓ Ensayos específicos de un solo gen
- ✓ Ensayos de panel genético
- ✓ Ensayos de todo el genoma

“Aunque se prefieren los paneles NGS, existen otras plataformas de genotipado más rentables que pueden proporcionar información sobre el conjunto mínimo de anomalías genéticas (EGFR, ALK, MET, ROS1, BRAF, NTRK) necesarias para el manejo adecuado de los pacientes con NSCLC que prueban los paneles de anomalías de los puntos calientes de genes utilizando metodologías cuantitativas (q)PCR y PCR digital (dd).

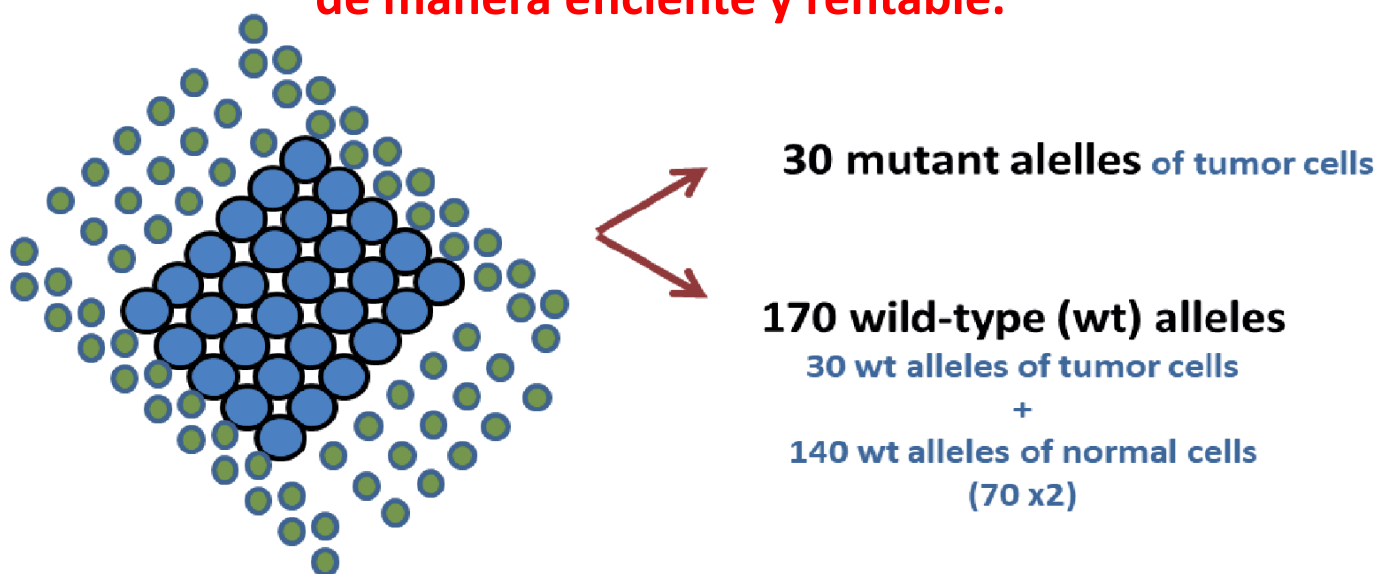
La correcta integración de los paneles multigénicos de genotipado en el manejo del cáncer de pulmón de los pacientes es de gran importancia clínica, así como la selección de la plataforma adecuada para cada entorno clínico".





Los ensayos de un solo gen han sido el pilar del diagnóstico molecular del cáncer durante 3 décadas. Generalmente implican la amplificación de la diana de interés (ADN o ARN).

El principal inconveniente de los ensayos de un solo gen es su alcance limitado. Cada prueba individual requiere tiempo, recursos y muestras. A medida que aumenta el número de ensayos, disminuye la viabilidad de realizarlos todos de manera eficiente. Eventualmente, la complejidad de realizar muchos ensayos individuales supera el beneficio de la personalización y la capacidad de entregar todos los resultados necesarios de manera eficiente y rentable. —



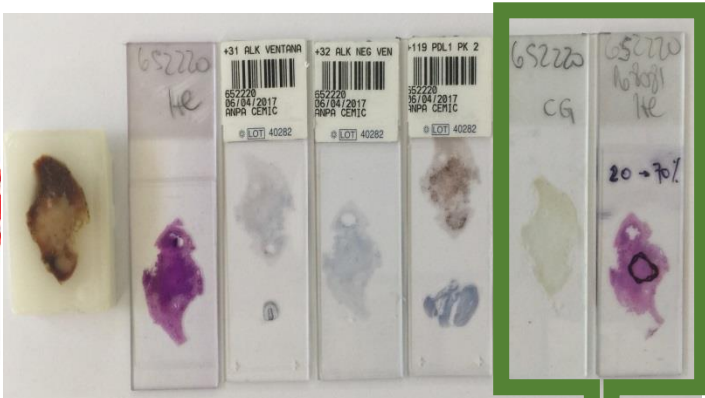
Chapter

Molecular Pathology in the New Age of Personalized Medicine

Valeria Cecilia Denninghoff



Figure 1.
Mutant allele fractions (MAFs, or the ‘mutation dose’).



Predictivo (+/-) Genómico **Binomial**

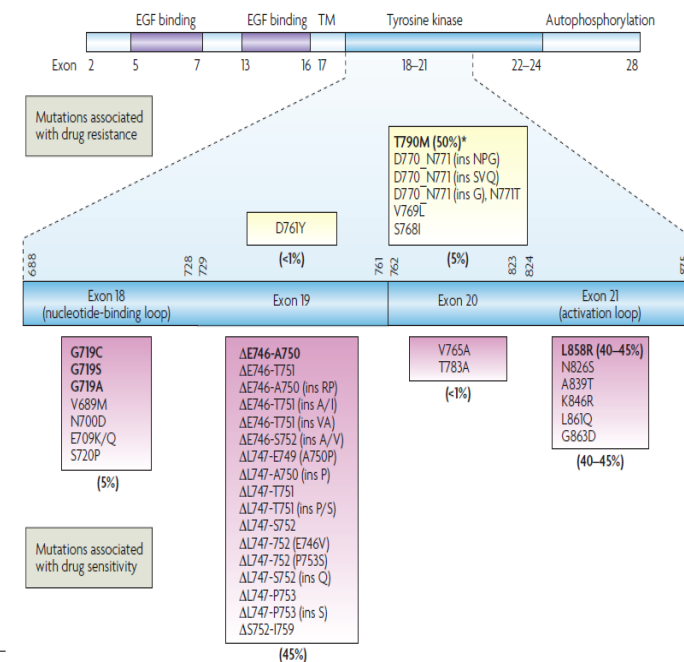
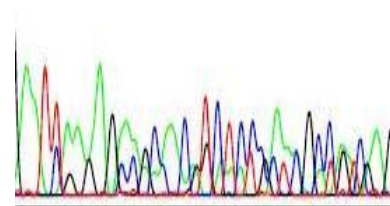
Table 2 EGFR mutations detected by the cobas EGFR Mutation Test v2 (44)

Exon	EGFR mutation
Exon 18	G719X
Exon 19	Ex19Del
Exon 20	S768I
	T790M
	Ex20Ins
Exon 21	L858R
	L861Q

EGFR, epidermal growth factor receptor.

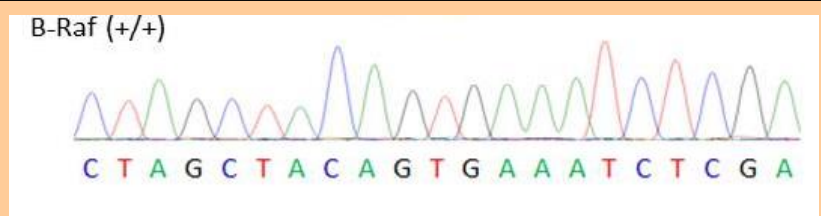


+2 days
EGFR / BRAF / KRAS
(COBAS - Idylla)



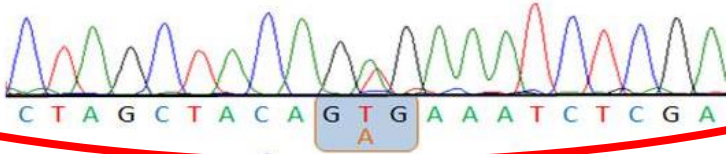
Predictivo (+/-) Genómico

Binomial



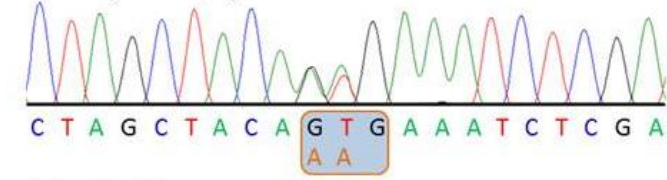
c.1799T>A (V600E)
c.1799_1800delTGinsAA (V600E)

B-Raf (V600E/+)

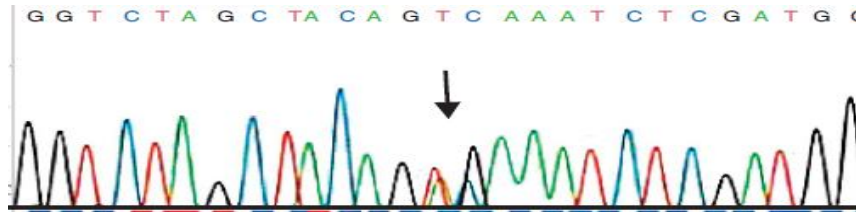


c.1798_1799delGTinsAA (V600K)

B-Raf (V600K/+)

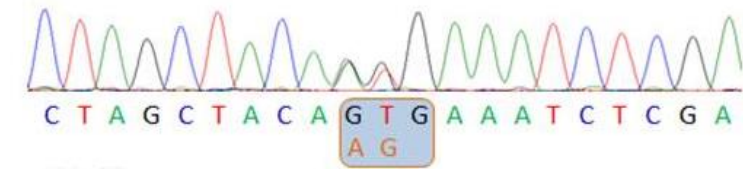


c.1799_1800delTGinsAT (V600D)



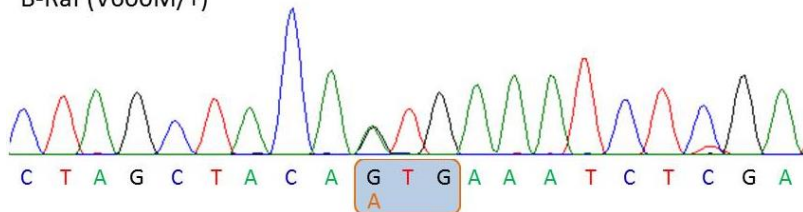
c.1798_1799delGTinsAG (V600R)

B-Raf (V600R/+)



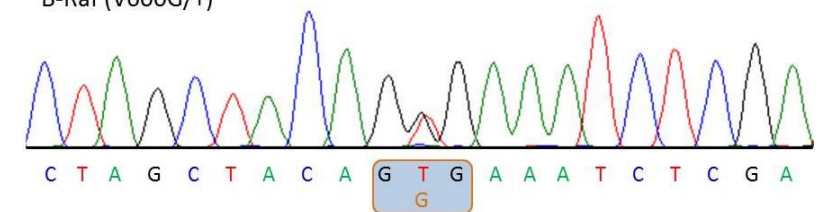
c.1798G>A (V600M)

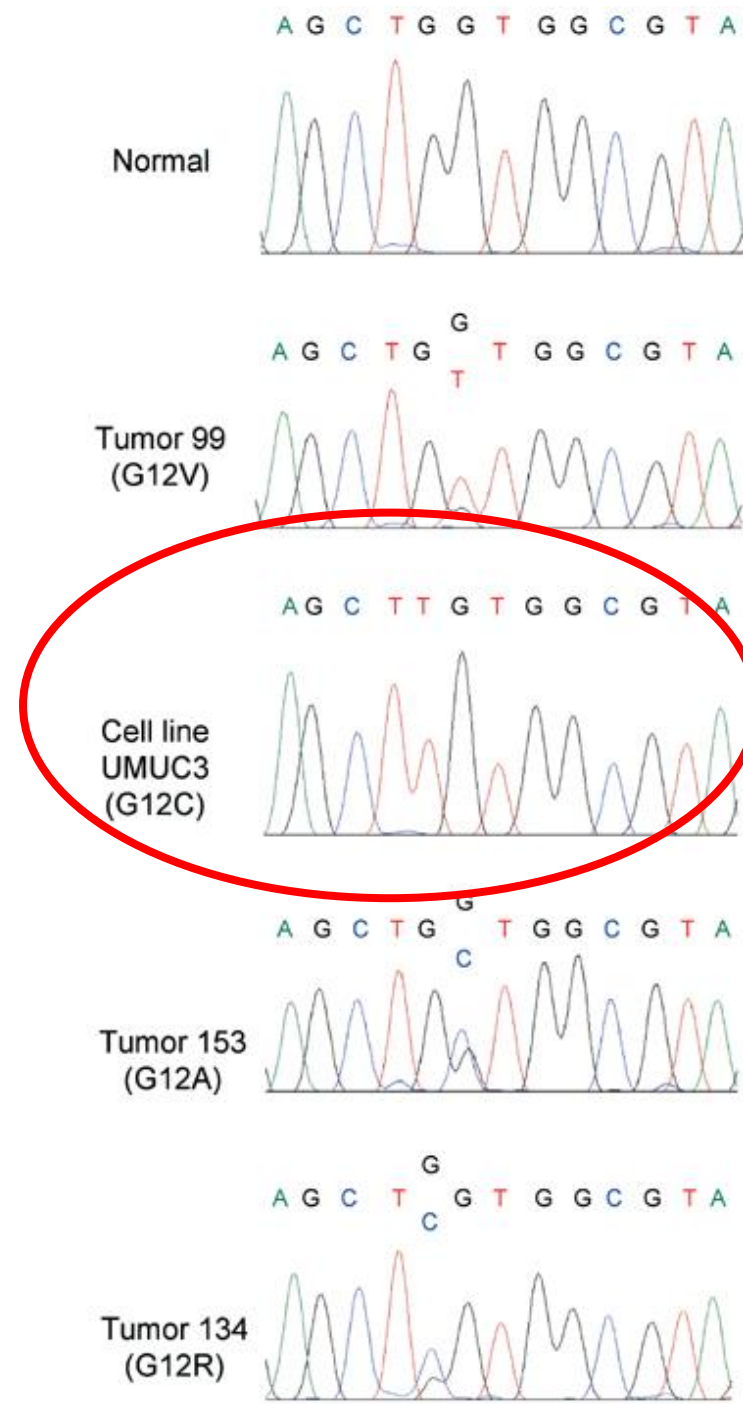
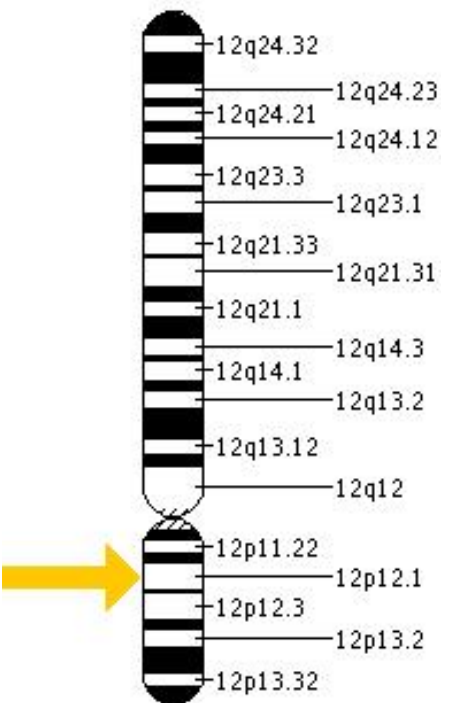
B-Raf (V600M/+)

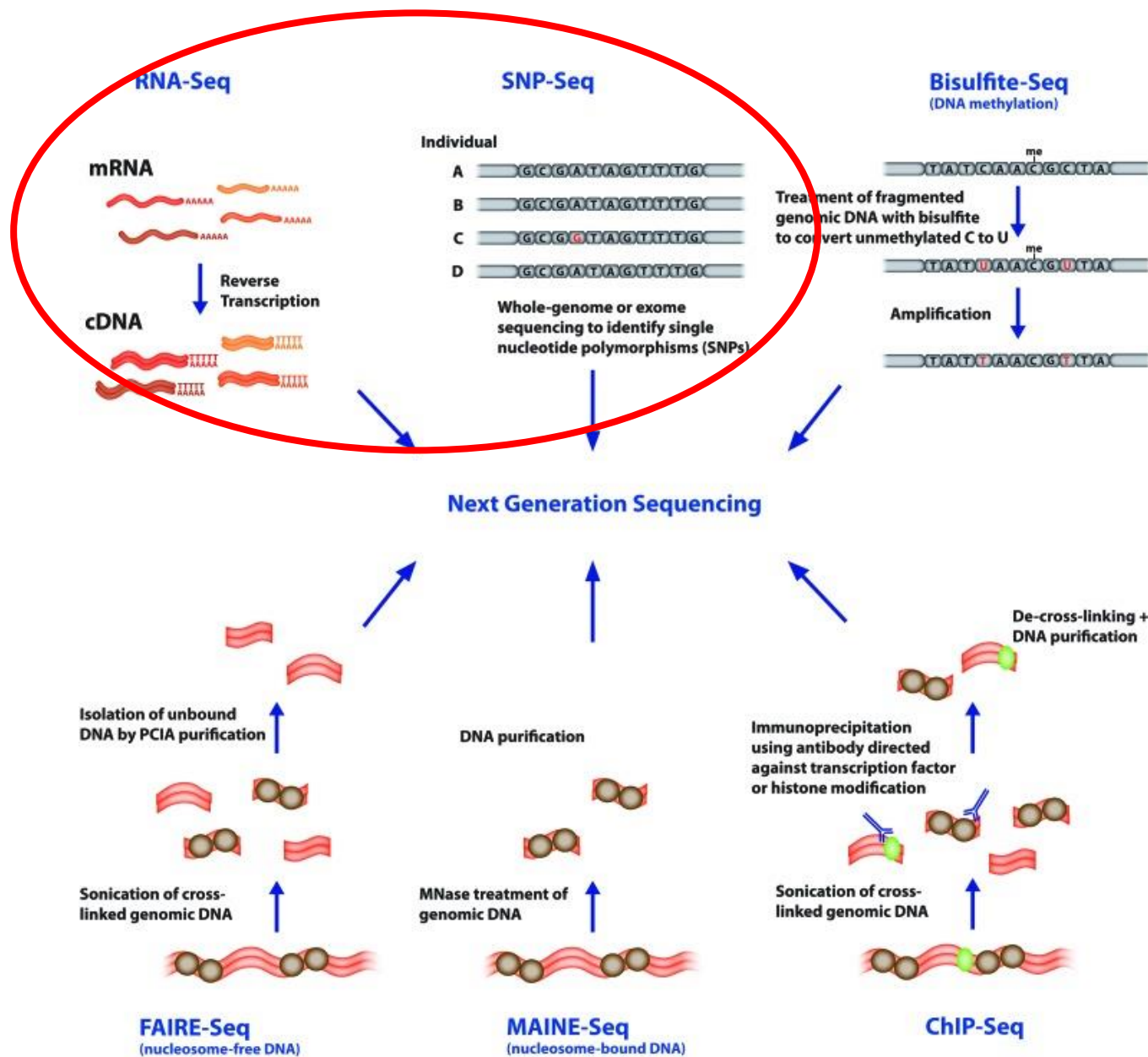


c.1799T>G (V600G)

B-Raf (V600G/+)







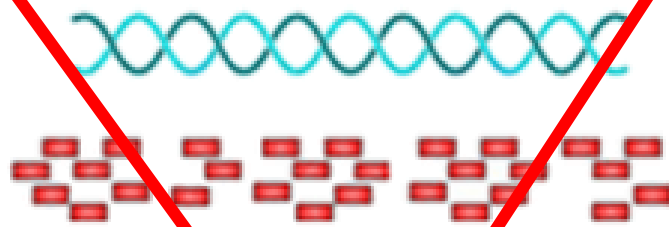
La disponibilidad de secuenciadores de última generación de mesa, rápidos, económicos, con sensibilidad clínica, con software de análisis y reactivos preenvasados, ha impulsado el rápido crecimiento y la difusión de esta tecnología disruptiva (NGS) en los laboratorios clínicos en los últimos años

La NGS puede secuenciar simultáneamente millones de moléculas de ADN en paralelo

Se han utilizado dos estrategias de enriquecimiento empleado para aplicaciones clínicas:

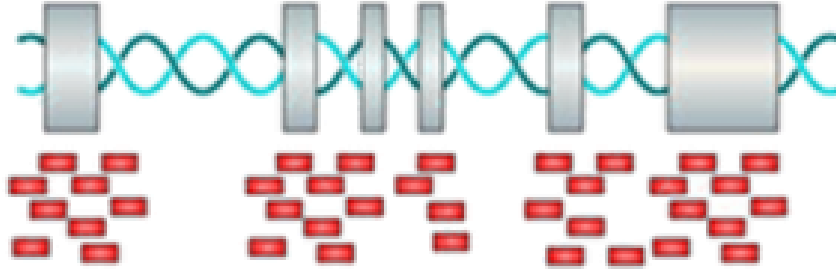
- 1-“Hybrid-capture”.**
- 2- PCR-based “amplicon”**

Whole genome sequencing



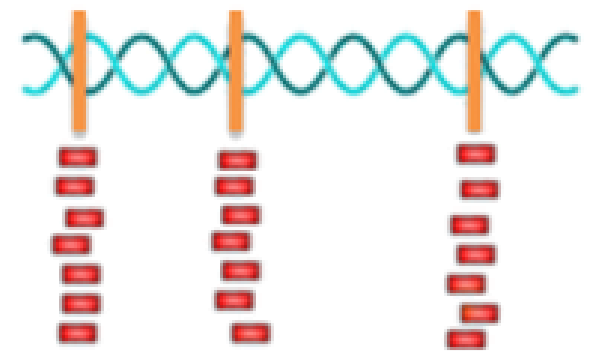
- Sequencing region : whole genome
- Sequencing Depth : >30X
- Covers everything – can identify all kinds of variants including SNPs, INDELs and SV.

Whole exome sequencing

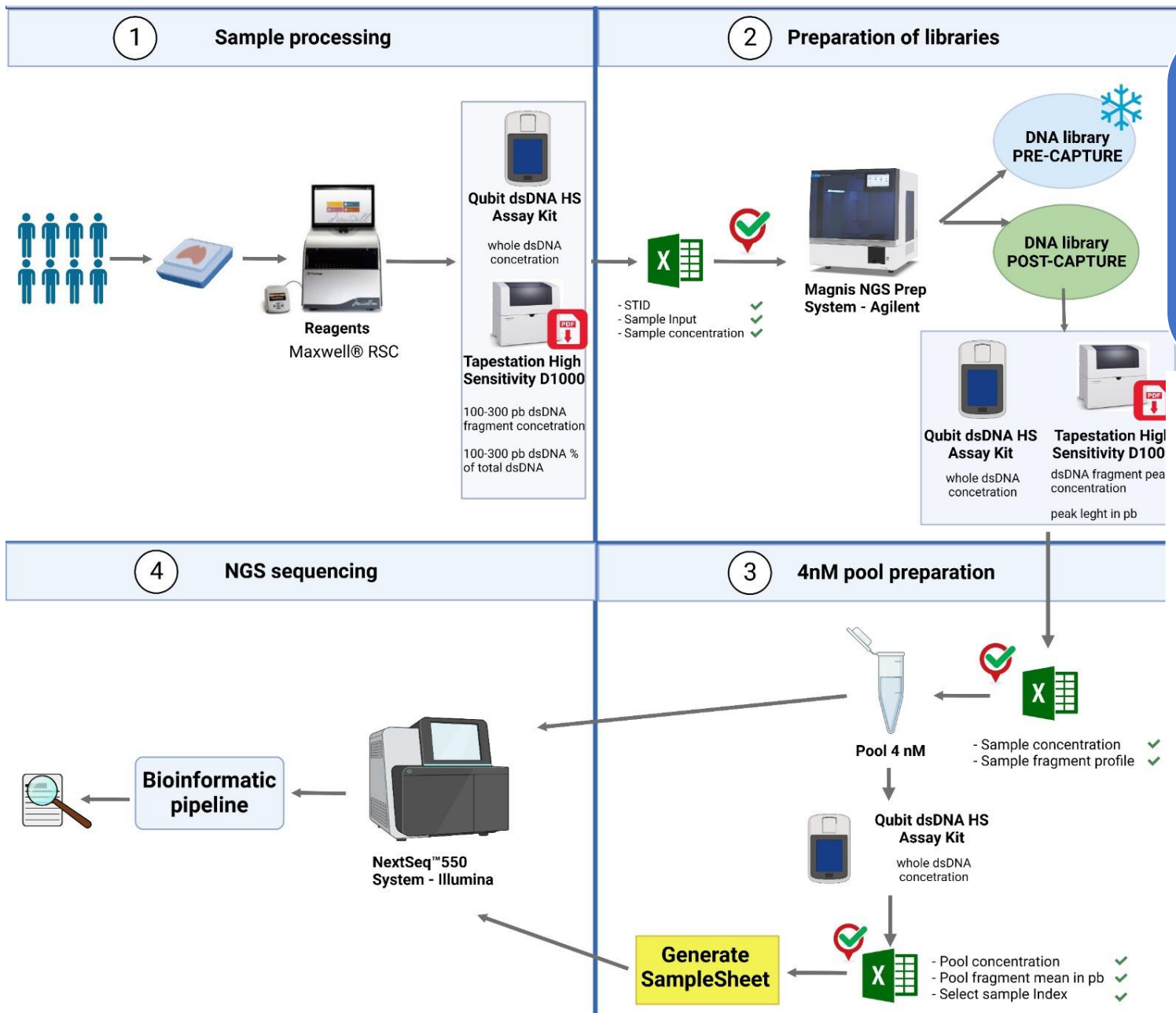


- Sequencing region: whole exome
- Sequencing Depth : >50X ~ 100X
- Identify all kinds of variants including SNPs, INDELs and SV in coding region.
- Cost effective

Targeted sequencing



- Sequencing region: specific regions (could be customized)
- Sequencing Depth : >500X
- Identify all kinds of variants including SNPs, INDELs in specific regions
- Most Cost effective



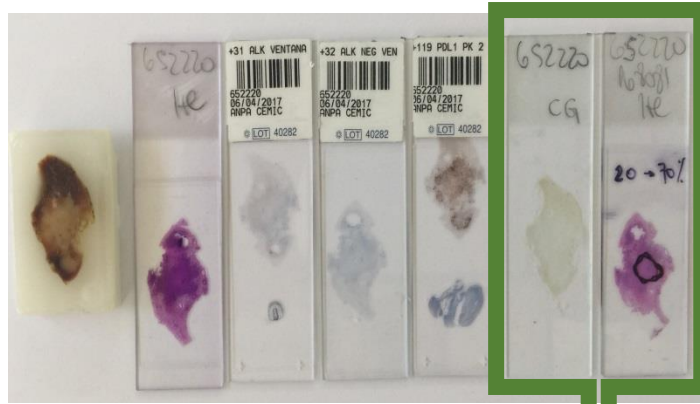
Los paneles NGS tienen un coste incremental muy bajo para genes adicionales y, por lo tanto, uno de los beneficios de estos paneles es su capacidad para incluir también un gran número de genes en investigación con potencial utilidad clínica a un bajo coste añadido.



Los paneles NGS tienen un coste incremental muy bajo para genes adicionales y, por lo tanto, uno de los beneficios de estos paneles es su capacidad para incluir también un gran número de genes en investigación con potencial utilidad clínica a un bajo coste añadido.

Las limitaciones de los ensayos de panel de genes son la inversión inicial en equipos y el costo de los reactivos de secuenciación, lo que hace que solo sea financieramente viable ejecutar las muestras en lotes y, por lo tanto, poco práctico cuando el número es bajo, lo que afecta el TAT.

Los marcos regulatorios y de reembolso para los laboratorios clínicos que han estado en práctica durante 40 años son principalmente inapropiados para los ensayos de panel de genes, lo que limita su implementación en los laboratorios hospitalarios.



+10-30 days

Oncomine® Cancer Panel Gene List

Hotspot genes, n=37

AKT1	IDH2
ALK	JAK1
AR	JAK2
ARAF	JAK3
BRAF	KIT
CDK4	KRAS
CTNNB1	MAP2K1
DDR2	MAP2K2
EGFR	MET
ERBB2	MTOR
ERBB3	NRAS
ERBB4	PDGFRA
ESR1	PIK3CA
FGFR2	RAF1
FGFR3	RET
GNA11	ROS1
GNAQ	SMO
HRAS	TERT
IDH1	

Copy Number Variants, n=19

ALK	FGFR3
AR	FGFR4
BRAF	KIT
CCND1	KRAS
CDK4	MET
CDK6	MYC
EGFR	MYCN
ERBB2	PDGFRA
FGFR1	PIK3CA
FGFR2	

Fusion drivers, n=23

ABL1	FGFR2
AKT3	FGFR3
ALK	MET
AXL	NTRK1
BRAF	NTRK2
ERG	NTRK3
ETV1	PDGFRA
ETV4	PPARG
ETV5	RAF1
EGFR	RET
ERBB2	ROS1
FGFR1	

RNA Panel

DNA Panel

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 19, No. 2, March 2017



See related Commentary on page 226

The Journal of
Molecular
Diagnostics
jmd.elsevier.com



Analytical Validation of the Next-Generation Sequencing Assay for a Nationwide Signal-Finding Clinical Trial

Molecular Analysis for Therapy Choice Clinical Trial

Chih-Jian Li,¹ Robin D. Harrington,² David J. Sims,³ Kneslay N. Harper,⁴ Courtney H. Book,⁵ Vivekananda Datta,⁶ Jonathan Yau,⁷ Rajesh R. Singh,⁸ Mark J. Routbort,⁹ Rajalakshmi Luthra,¹⁰ Keyur P. Patel,¹¹ Geeta S. Mantha,¹² Savitri Krishnamurthy,¹³ Karyn Ronski,¹⁴ Zenta Walther,¹⁵ Karin E. Finberg,¹⁶ Sandra Canosa,¹⁷ Hayley Robinson,¹⁸ Amelia Raymond,¹⁹ Long P. Le,²⁰ Lisa M. McShane,²¹ Eric C. Polley,²² Barbara A. Conley,²³ James H. Doroshow,²⁴ A. John Taffure,²⁵ Jeffrey L. Sklar,²⁶ Stanley R. Hamilton,²⁷ and P. Mickey Williams²⁸

Chapter

Molecular Pathology in the New Age of Personalized Medicine

Valeria Cecilia Denninghoff

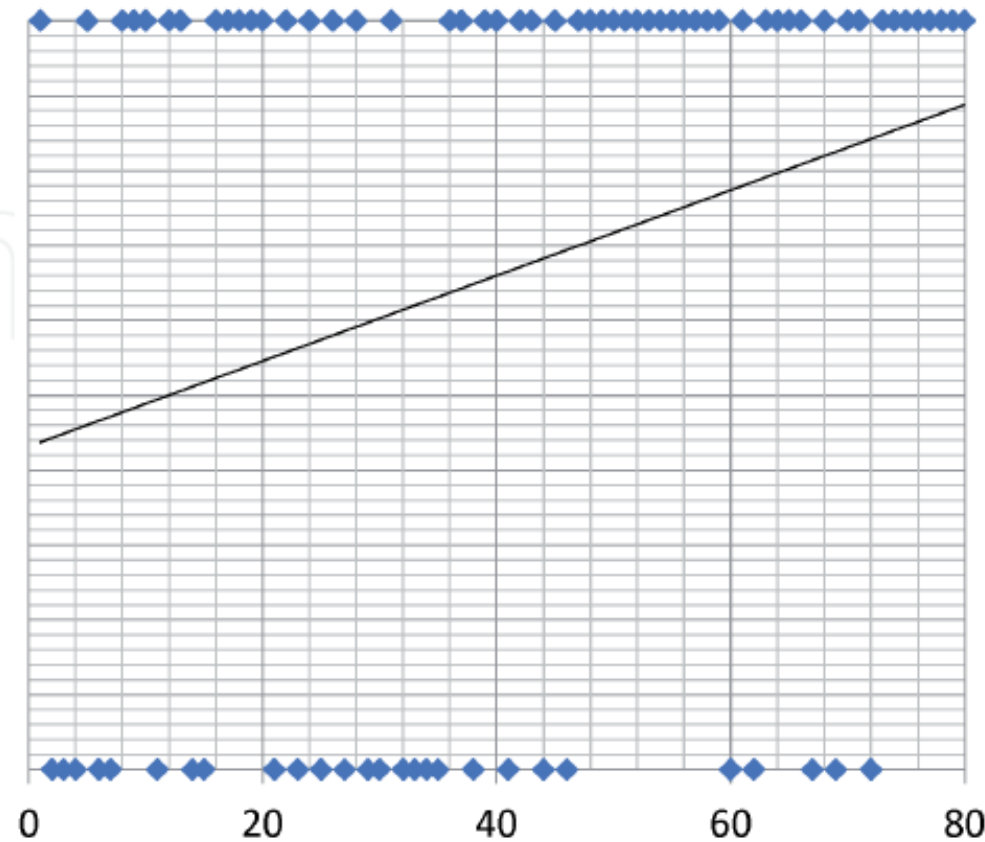
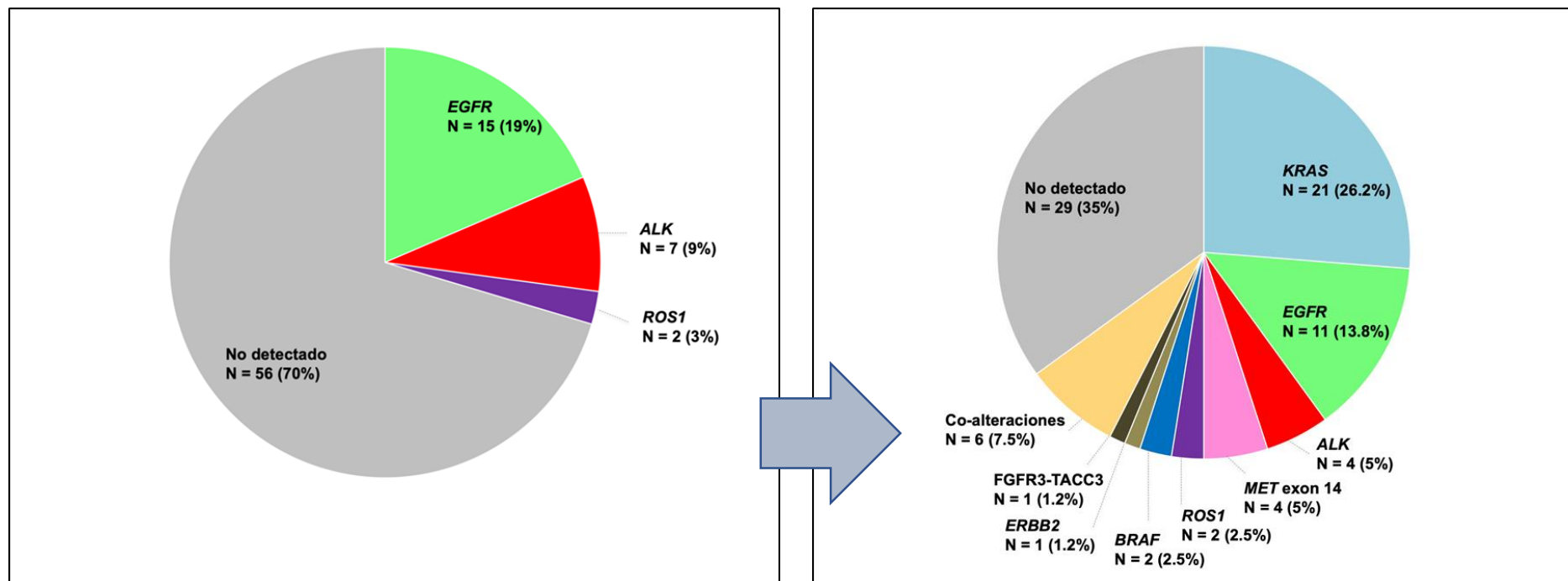


Figure 3.
RNA performance (1 = > 5000 reads, 0 < 5000 reads).



Oncomine® Cancer Panel Gene List

Hotspot genes, n=37

AKT1	IDH2
ALK	JAK1
AR	JAK2
ARAF	JAK3
BRAF	KIT
CDK4	KRAS
CTNNB1	MAP2K1
DDR2	MAP2K2
EGFR	MET
ERBB2	MTOR
ERBB3	NRAS
ERBB4	PDGFRA
ESR1	PIK3CA
FGFR2	RAF1
FGFR3	RET
GNA11	ROS1
GNAQ	SMO
HRAS	TERT
IDH1	

Copy Number Variants, n=19

ALK	FGFR3
AR	FGFR4
BRAF	KIT
CCND1	KRAS
CDK4	MET
CDK6	MYC
EGFR	MYCN
ERBB2	PDGFRA
FGFR1	PIK3CA
FGFR2	

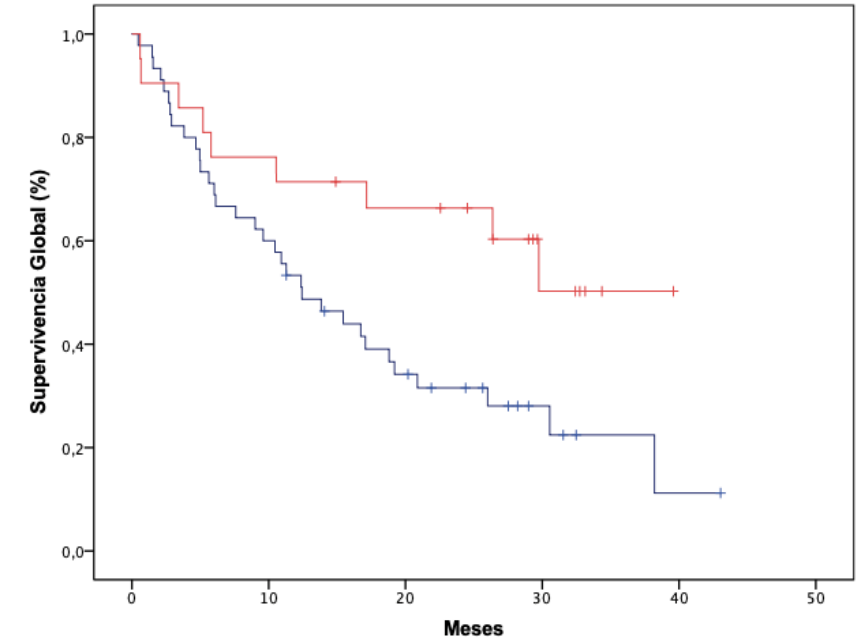
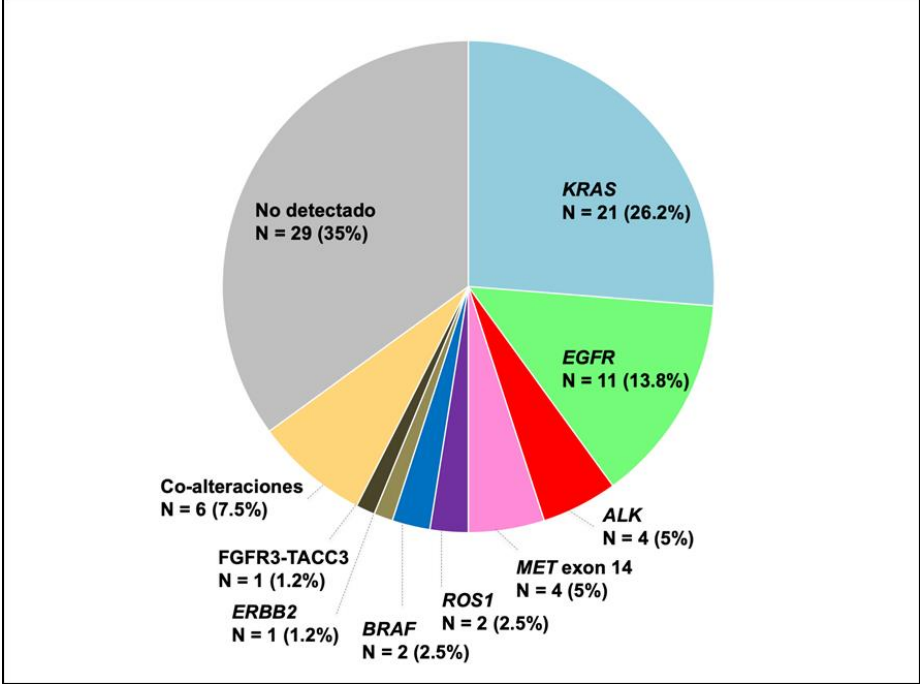
Fusion drivers, n=23

ABL1	FGFR2
AKT3	FGFR3
ALK	MET
AXL	NTRK1
BRAF	NTRK2
ERG	NTRK3
ETV1	PDGFRA
ETV4	PPARG
ETV5	RAF1
EGFR	RET
ERBB2	ROS1
FGFR1	

RNA Panel

DNA Panel

Gen	Variante de AA		N°
KRAS	G12C	7	21
	G12V	6	
	G12S	2	
	G13C	2	
	Q61H	2	
	G12A	1	
	G12D	1	
EGFR	L858R	4	11
	E746_A750del	3	
	E746_S752delinsV	1	
	D770delinsGY	1	
	E746_A750del + L858R	1	
	E746_A750del + L747_T751delinsQ	1	
EML4-ALK			4
MET	splice donor mutation	1	4
	MET-MET	3	
BRAF	V600E	1	2
	G469A	1	
SDC4-ROS1			2
ERBB2 (HER2)	(E770_A771insAYVM)		1
FGFR3-TACC3			1
Combinado	ALK + KRAS (G12S)		6
	MET-MET + EGFR (L861Q) + KRAS (G12D)		
	ERBB2amp + EGFR (L858R)		
	EML4-ALK + EGFR (E746_A750del)		
	KRAS (Q61H + G12D) + BRAF (V600E)		
	EGFR (E746_A750delinsAP) + BRAF (V600M)		
—			
Total			52



Gen	N°
PIK3CA	4
(E81V)	1
(E545K)	1
(M1043V)	1
(E365K)	1
IDH1 (R132C)	3
MET	2
(T1010I)	1
(H1112Y)	1
BRAF (G466E)	1
CTNNB1 (H36Y)	1
AKT1 (E17K)	1
Total	12

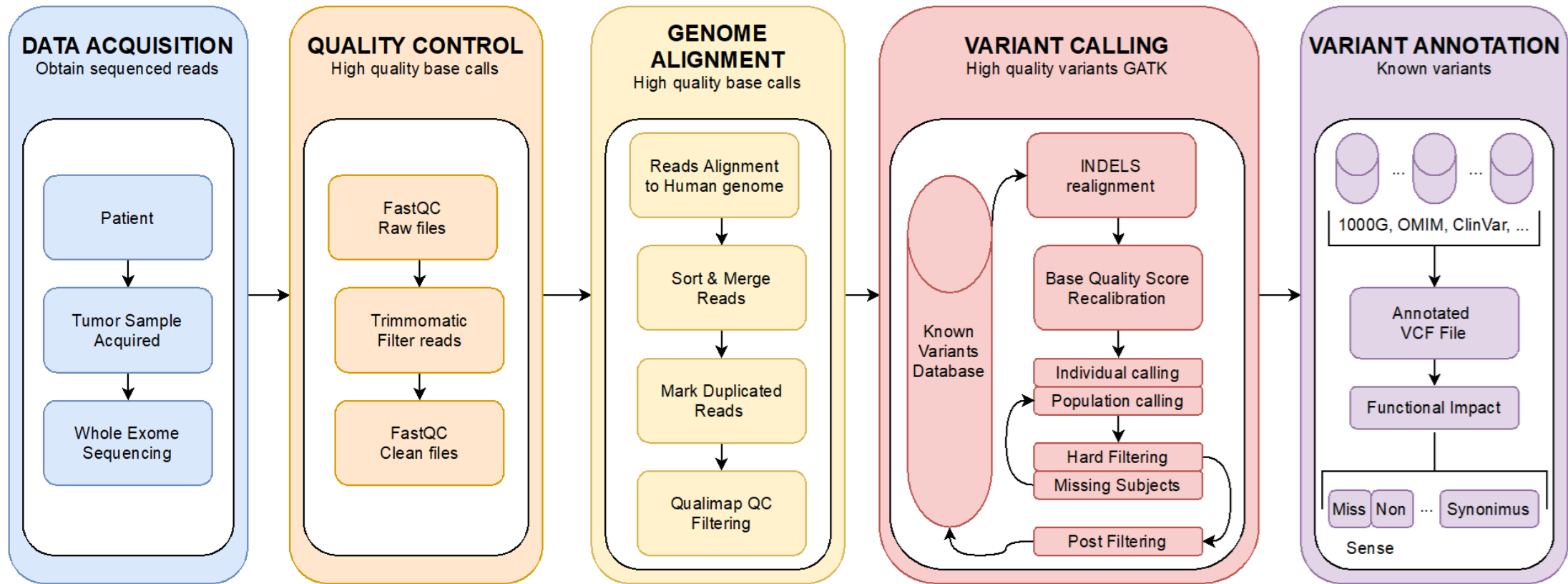
Variante por individuo estudiado	N° individuos
0	33
1	11
2	9
3	17
4	3
5	5
>5	2

Gen	Variante AA	Función	Refseq ID	N° Individuos
JAK3	(A660fs)	<i>frameshift insertion</i>	NM_000215.03	10
KIT	(M541L)	<i>missense</i>	NM_000222.2	8
ALK	(T680I)	<i>missense</i>	NM_004304.4	7
MYC	(N26S)	<i>missense</i>	NM_002467.4	6
IDH1	(R119fs)	<i>frameshift deletion</i>	NM_005896.3	6
RET	(R886fs)	<i>frameshift insertion</i>	NM_020975.4	5
JAK2	(V617F)	<i>missense</i>	NM_004972.3	4
ERBB2	(G882A)	<i>missense</i>	NM_004448.3	4
MAP2K1	(A76fs)	<i>frameshift insertion</i>	NM_002755.3	4
JAK1	(P733R)	<i>missense</i>	NM_002227.2	3

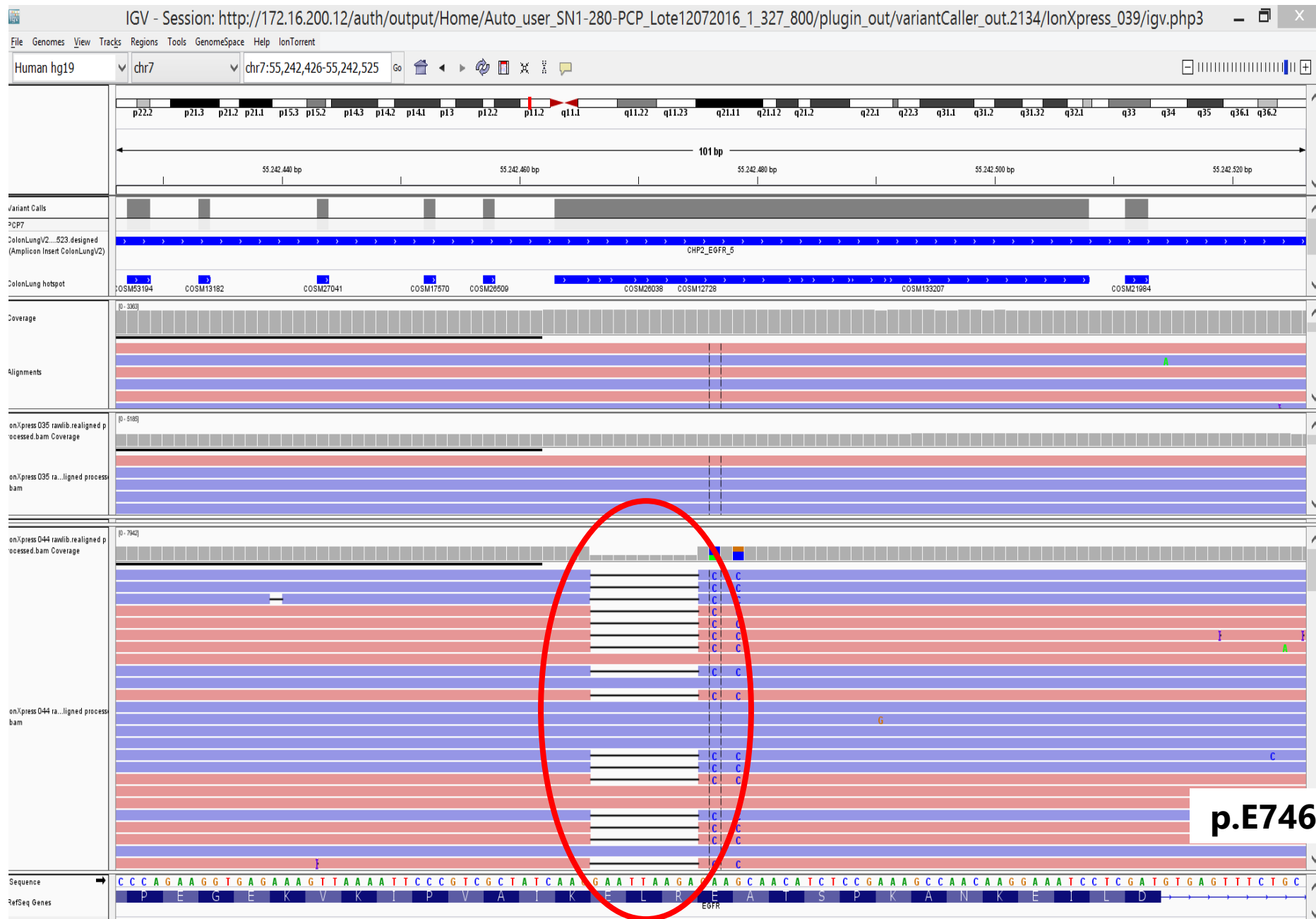
Data Pipeline

Tumor-only approach

Aumenta los requisitos computacionales, incluidos los costos de almacenamiento de datos, y la mayoría de los datos genéticos adicionales proporcionados exceden nuestra capacidad para comprenderlos y aplicarlos



Case # «walking chromosome»





International Association for the Study of Lung Cancer

Desde abril de 2015

2023-2025

✓ *Pathology Committee*

✓ *Molecular Working Group Member*



Gen	Level	Target	Single Gen	DNA panel		DNA-RNA panel	Exoma	IHC
				50	300	Genexus		
			150	800	2000	1000	200	30
Onco Drivers								
EGFR	DNA	18-21	X	X	X	X	X	
KRAS	DNA	G12C	X (#)	X	X	X	X	
ALK (*)	protein	mut/fusion			X	X		X
MET (*)	RNA	skipping			X	X		
ROS1 (*)	protein	fusion			X	X		X
BRAF	DNA	V600E	X	X	X	X	X	
RET (*)	RNA	fusion			X	X		
NTRK 1-3	RNA	fusion			X (#)			
ImmunoOncology								
PD-L1	protein							X
TMB	DNA				X		X	
MSI-h	DNA				X		X	



Gen	Level	Target	Single Gen	DNA panel		DNA-RNA panel	Exoma	IHC
				50	300	Genexus		
			150	800	2000	1000	200	30
Onco Drivers								
EGFR	DNA	18-21	X	X	X	X	X	
ALK (*)	protein	mut/fusion			X (#)	X		X
ROS1 (*)	protein	fusion			X	X		X
PD-L1	protein							X

- ✓ Solo los tratamientos para estos biomarcadores están aprobados en los países de LATAM: Argentina, Brasil, Chile, Uruguay y Colombia.
- ✓ BRAF es solo para medicina privada.
- ✓ El acceso a TKI de 3ª generación puede estar restringido y suele estar judicializado.





by Rolfo C.

Neoantigens in cancer immunotherapy

mutaciones somáticas/Mb de DNA codificante

Ton N. Schumacher^{1*} and Robert D. Schreiber^{2*}

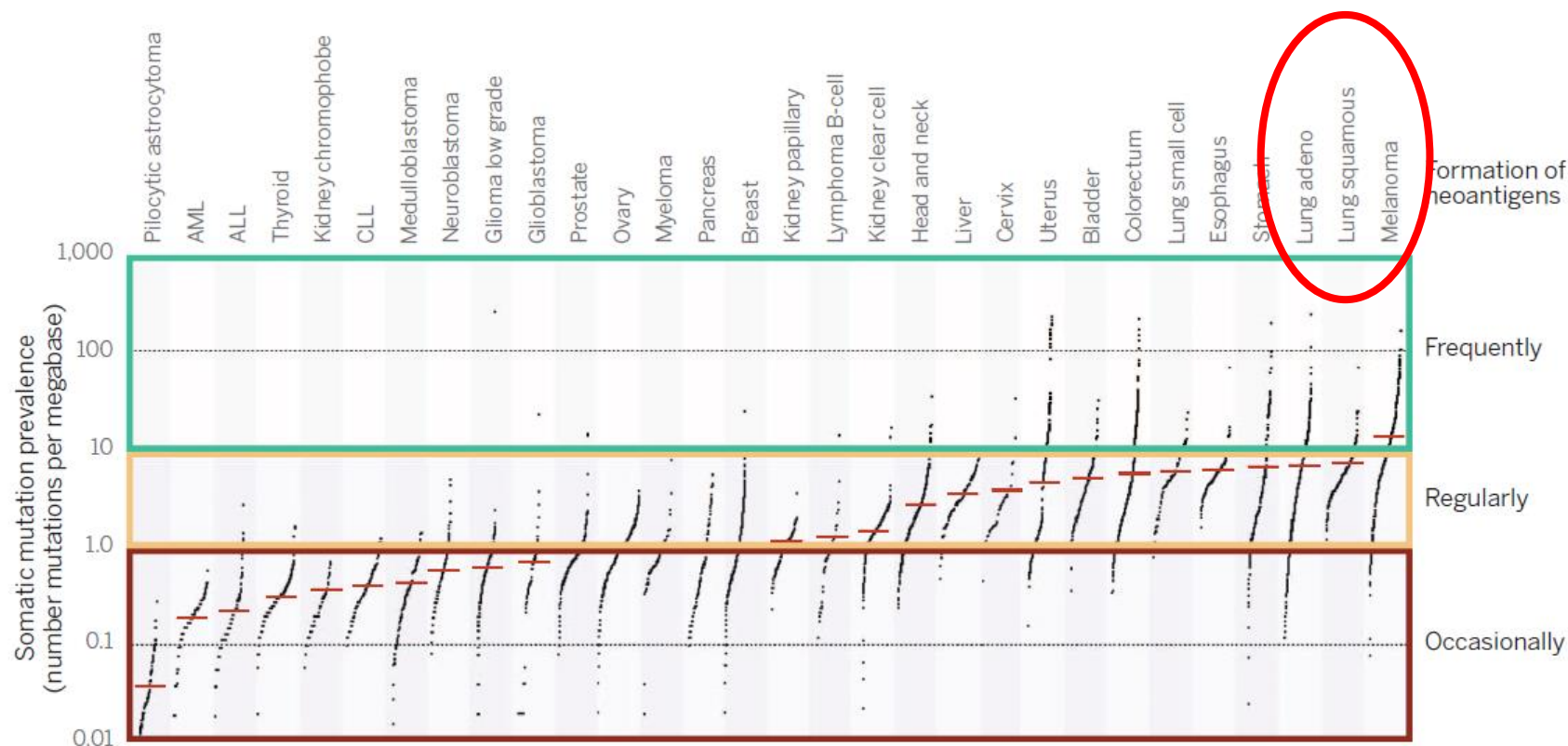
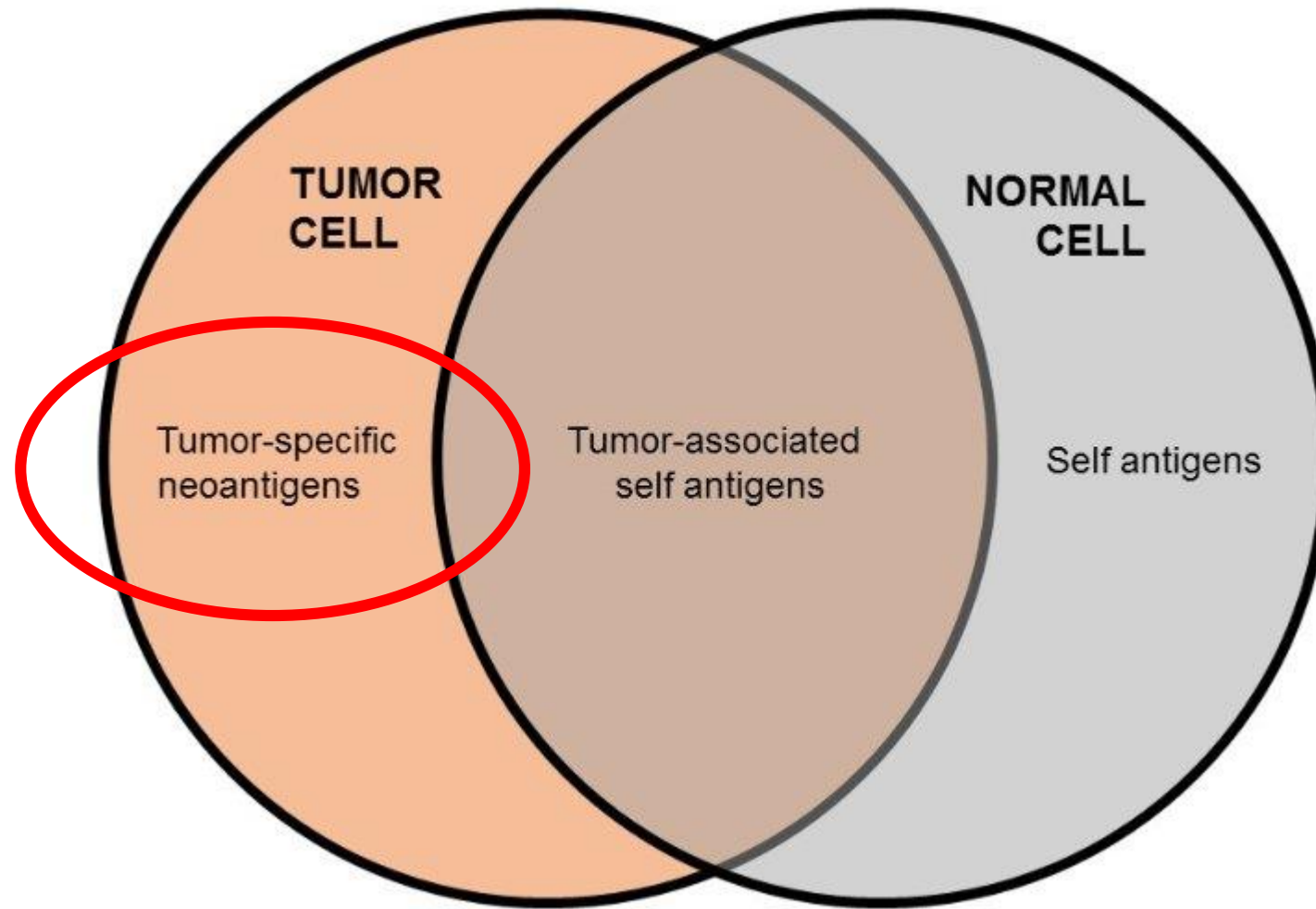


Fig. 2. Estimate of the neoantigen repertoire in human cancer. Data depict the number of somatic mutations in individual tumors. Categories on the right indicate current estimates of the likelihood of neoantigen formation in different tumor types. Adapted from (50). It is possible that the immune system in melanoma patients picks up on only a fraction of the available neoantigen repertoire, in which case the current analysis will be an underestimate. A value of 10 somatic mutations per Mb of coding DNA corresponds to ~150 nonsynonymous mutations within expressed genes.



Genomic Approaches to Understanding Response and Resistance to Immunotherapy

David A. Braun^{1,2}, Kelly P. Burke¹, and Eliezer M. Van Allen^{1,3,4}

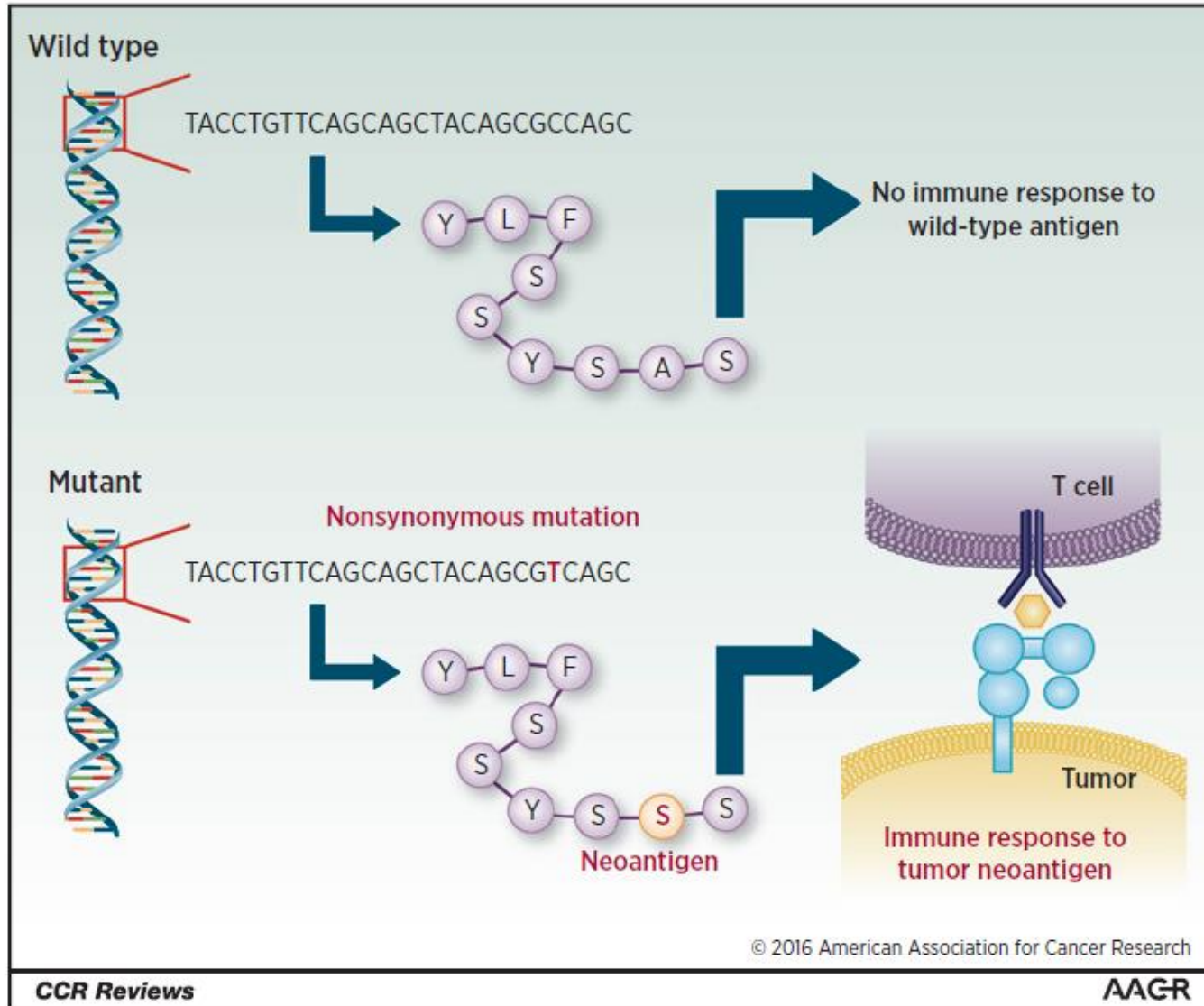


Figure 2.

Generation of neoantigens. Wild-type antigens are recognized as "self" and do not generate an immune response. Nonsynonymous mutations may lead to an altered peptide sequence that is ultimately presented on MHC molecules. This altered peptide sequence, therefore, produces a new or "neoantigen," which may then be recognized by the host immune system, leading to an antitumor immune response.



ORIGINAL ARTICLE

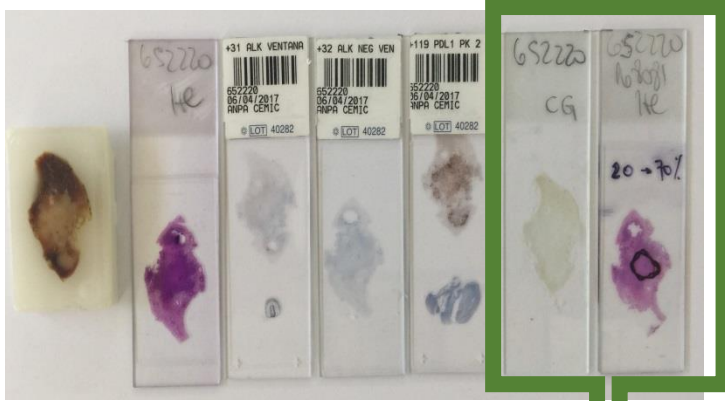
Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer

M.D. Hellmann, L. Paz-Ares, R.B. Caro, B. Zurawski, S.-W. Kim, E.C. Costa, K. Park, A. Alexandru, L. Lupinacci, E. de la Mora Jimenez, H. Sakai, I. Albert, A. Vergnenegre, S. Peters, K. Syrigos, F. Barlesi, M. Reck, H. Borghaei, J.R. Brahmer, K.J. O'Byrne, W.J. Geese, P. Bhagavatheswaran, S.K. Rabin dran, R.S. Kasinathan, F.E. Nathan, and S.S. Ramalingam, for the CheckMate 227 Investigators*

	Median OS, months				
	NIVO + IPI n=583	Chemo n=583	Unstratified HR (95% CI)	Unstratified HR (95% CI)	Difference in OS
Overall (n=1166)	17.1	13.9	0.73 ^a (0.64-0.84)		3.2
Interplay subgroups					
<1% PD-L1;<10 mut/Mb TMB (n=111)	15.5	13.0	0.69 (0.46- 1.05)		2.5
≥1% PD-L1;<10 mut/Mb TMB (n=269)	16.2	12.1	0.78 (0.57- 1.06)		4.1
≥50% PD-L1;<10 mut/Mb TMB (n=125)	18.1	8.1	0.67 (0.44- 1.03)		10
<1% PD-L1;≥10 mut/Mb (n=86)	20.4	11.2	0.51 (0.30- 0.87)		9.2
≥1% PD-L1;≥10 mut/Mb TMB (n=213)	24.4	18.1	0.77 (0.52- 1.15)		6.3
≥50% PD-L1;≥10 mut/Mb TMB (n=111)	NR	17.2	0.63 (0.37- 1.07)		12.8+*

0.25 0.5 1 2

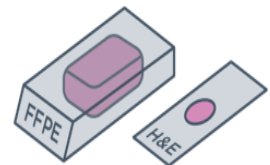
NIVO + IPI ↔ Chemo



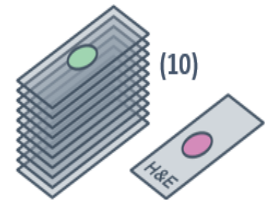
+5 / 21 days
Oncomine / Illumina

Predictivo ???
Genómico

Continuo



OR



Genomic DNA



Sequencing Library Biotinylated DNA Baits



All synonymous and non-synonymous base subs and indels

Remove polymorphisms

Remove predicted "drivers"



Somatic mutation count per megabase (mut/Mb)

Sequencing

Analysis & Interpretation



Next-Generation Sequencing (NGS)

Overview

- Simultaneous (“massively parallel”) sequencing reaction carried out on microarray-style platforms
- Thousands/millions of sequencing reads per sample

WGS

- Allows for full complement of genomic analyses (intronic, exonic, intergenic regions)
- Requires paired blood for germline variation subtraction

Patient genome



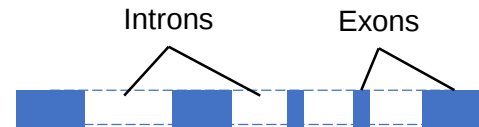
WGS
(whole genome)



WES

- All coding regions (~180,000 exons), making up ~1% of the genome
- 85% of mutations contributing to disease are found in the coding region
- Requires paired blood for germline-variation subtraction

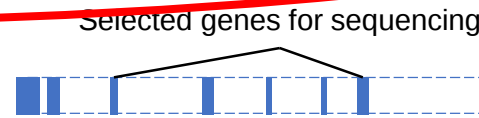
WES
(exons only)



Targeted gene panels

- Predefined set of genes
- May or may not require paired germline sample
- The optimal number of genes is still under investigation and will depend on the intended use of the assay

Gene panel
(selected genes)



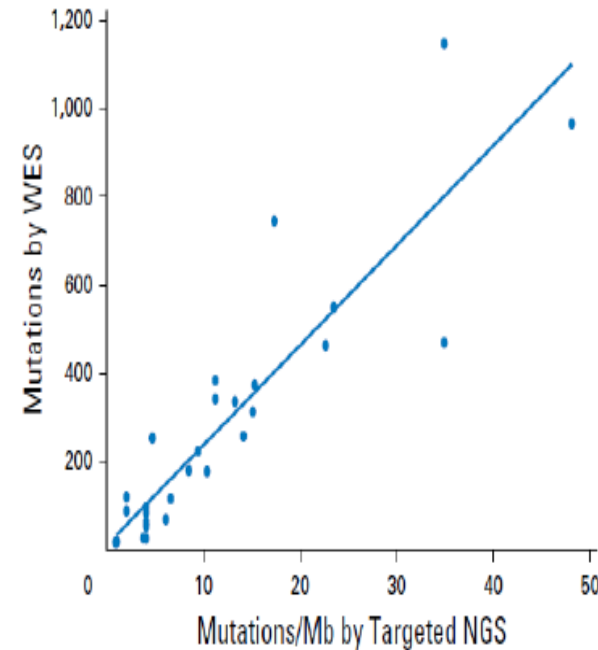
Advantages (vs Sanger sequencing)	Challenges	Clinical utility
• Simultaneous screening of mutations¹ - Multiple mutations analyzed in many samples in a single run - Faster mutation discovery - Gene regulation analysis • Small sample requirements	• Output formats from different platforms • Considerable run and data processing time (days)² • Costs (consumables, data storage, analysis)⁵ • Sequence bias in enrichment steps^{7,8}	• Copy number variations^{9,10} • Point mutations^{9,10} • Gene fusions¹⁰ • Short insertions and deletions (indels)^{9,10} • Tumor mutational burden assessment (for more details see slide 24)¹¹ • Microsatellite instability¹¹

Tumor Mutational Burden – Evaluation of Test Performance

- Definition of the minimal requirements for a Cancer Gene Panel
 - exonic region > 1 Mb
 - driver mutations covered, including translocations and CNVs
 - microsatellite markers included
 - negative predictors covered (e.g. *STK11*, *MDM2*, *MDM4*, *EGFR*)
 - secondary resistance mutations included (e.g. *JAK1*, *JAK2*, *B2M*)
 - repair pathway genes included (e.g. *POLE*, *POLD*, *MSH2*)
 - sensitivity and specificity comparable to WES
 - amount of input material low
 - available as kit, suited for local testing
 - local bioinformatic pipeline available

TMB Testing in Clinical Practice

- in previous studies, TMB was analyzed by whole exome sequencing, but there are some disadvantages in daily practice:
 - analysis of normal tissue is required for data evaluation
 - from FFPE tissue, 200 ng DNA are necessary (Checkmate 026: 42% of samples failed)
 - not yet possible on cytology
- are the results from Cancer Gene Panels comparable?
 - targeted NGS by MSK-IMPACT Panel was compared with results from WES for 49 pts
 - TMB assessed by targeted NGS correlates with TMB assessed by whole-exome sequencing



Rizvi et al., J Clin Oncol 2018

Harmonization

The terms “standardized” and “harmonized” are frequently used interchangeably to refer to the condition in which results are consistent and comparable among different measurement procedures. “Standardized” refers to the condition in which calibration is traceable to a reference measurement procedure that is typically calibrated with an appropriate reference material. There are situations in which the reference measurement procedure defines the analyte without any primary reference material (e.g., enzyme activity). Standardization has the advantage of trustworthy reproducibility over time and location, because the reference measurement procedure provides a stable anchor for calibration traceability of routine clinical laboratory procedures. “Harmonized” is a more general term. It may include the standardized condition, but it also includes the condition in which results are consistent and comparable in the absence of a reference measurement procedure. The process of harmonization typically depends on the availability of a suitable reference material that can be used as a common calibrator among routine clinical laboratory measurement procedures.

Clinical Chemistry 60:7
923–927 (2014)



Harmonization of Test Results: What Are the Challenges; How Can We Make It Better?

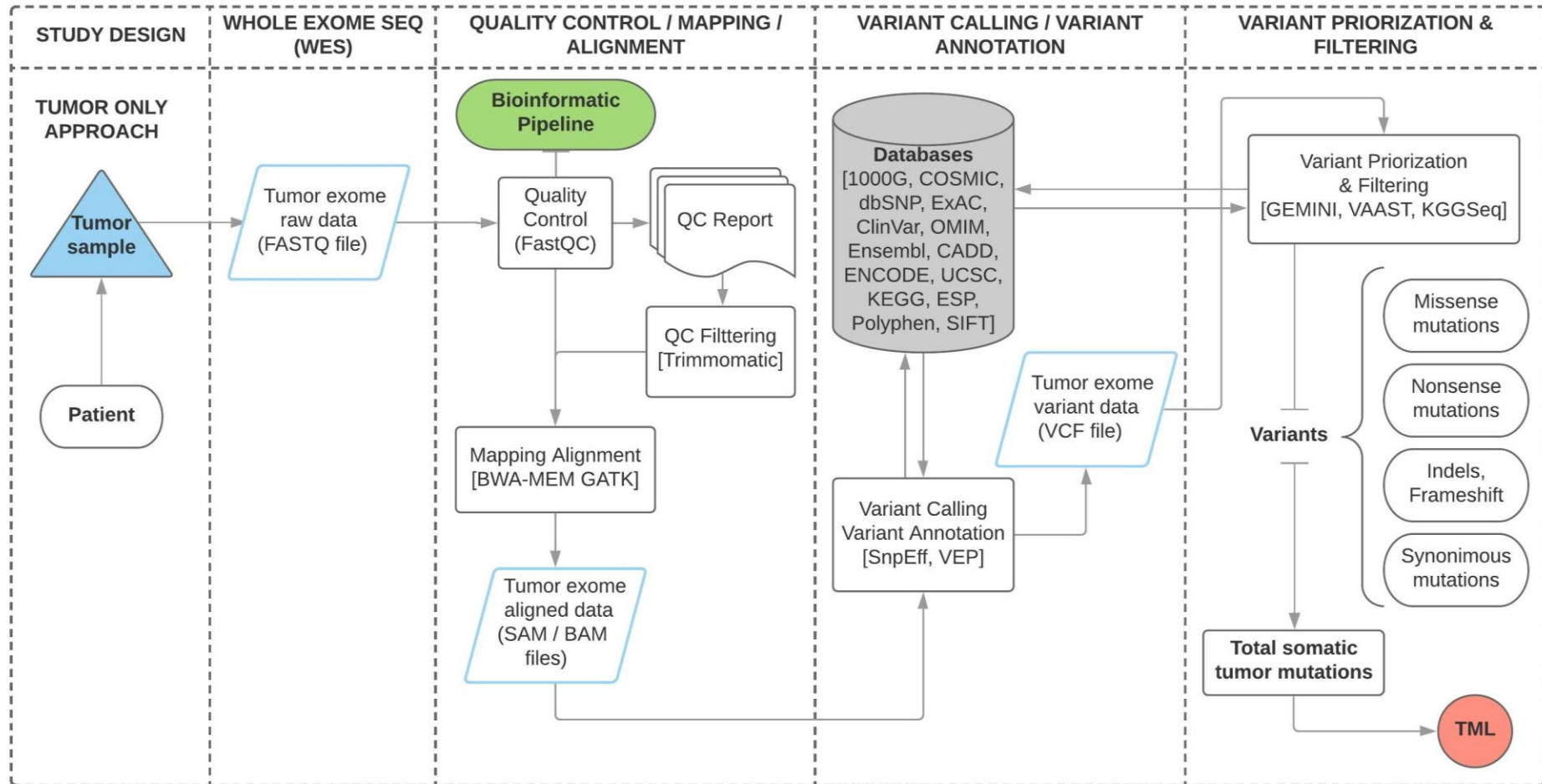
Moderator: W. Greg Miller^{1,2*}

Experts: John H. Eckfeldt,^{3,4} Joseph Passarelli,^{5,6} William Rosner,^{7,8} and Ian S. Young^{9,10}

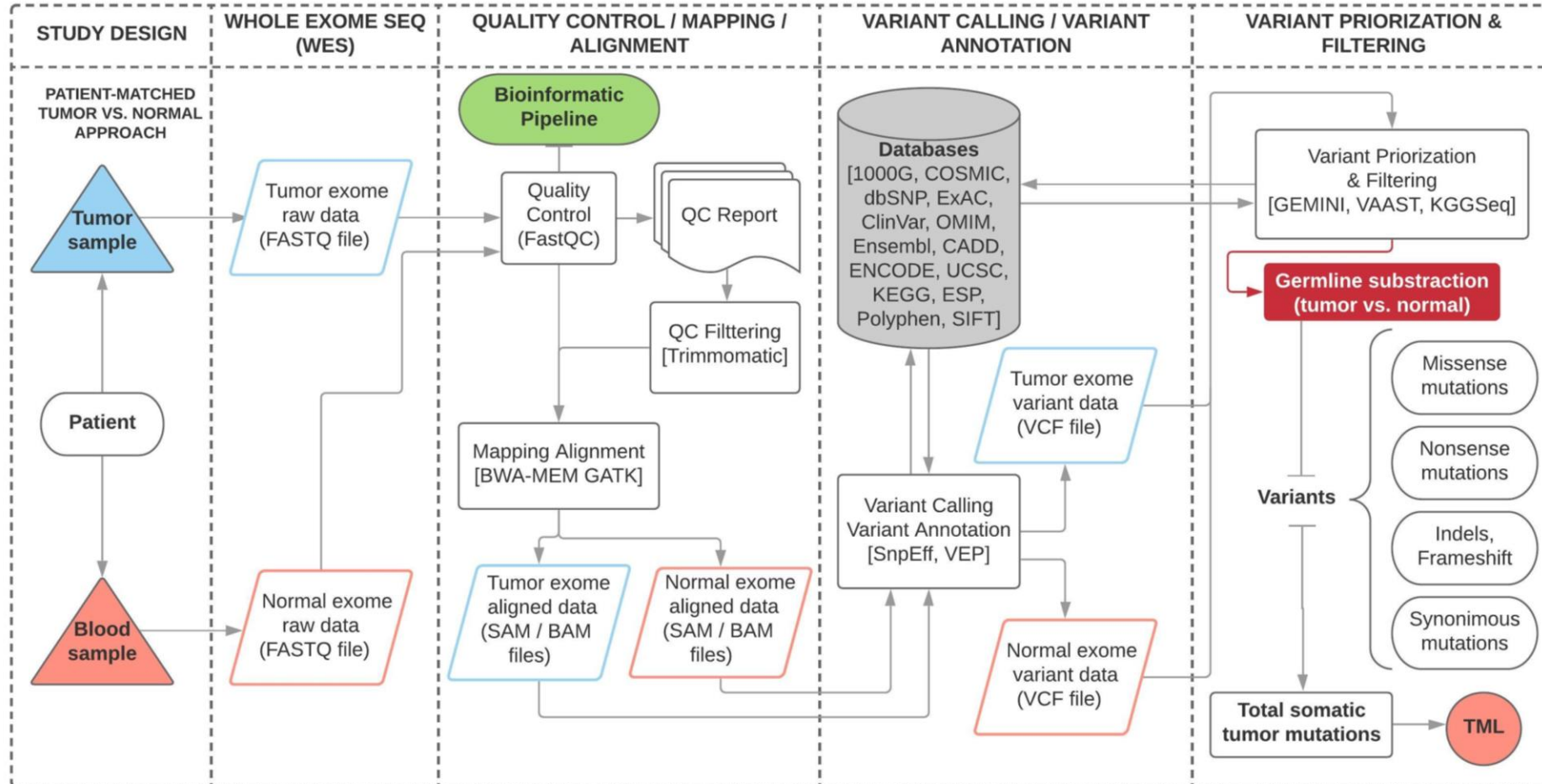
Estandarización	Harmonización
INTER-laboratorio WES	ENTRE-laboratorios

TML assessment by WES:

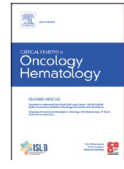
Tumor-only approach



TML assessment by WES: Patient-matched (tumor vs. normal) approach







Next generation sequencing for liquid biopsy based testing in non-small cell lung cancer in 2021

Pasquale Pisapia^{a,1}, José Luis Costa^{b,1}, Francesco Pepe^a, Gianluca Russo^a, Gianluca Gagnano^a, Alessandro Russo^c, Antonino Iaccarino^a, Diego de Miguel-Perez^{d,e}, Maria José Serrano^d, Valeria Denninghoff^f, Luca Quagliata^b, Christian Rolfo^e, Umberto Malapelle^{a,*}

Dentro del Tumor Circuloma, el ADN tumoral circulante (ctDNA) y las células tumorales circulantes (CTC) tienen aplicaciones clínicas aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos y Europea (FDA/EMA).

Table 1

Principal analytes identified in blood samples: pros and cons.

Analyte	Pros	Cons
ctDNA	- highly studied - clinical approved for targeted treatments - high specificity (no false positive results)	- short half life - low concentration - low sensitivity (possibility of false negative results)
CTC	- clinical approved for targeted treatments - ensure morph-molecular analysis	- low concentration - low specificity in particular when considering early stage of disease - challenging isolation and extraction
Exosomes	- ensure nucleic acids stabilization - high serum concentration	- lack of standardization - challenging isolation and extraction
ctRNA	- ensure the analysis of gene rearrangements and genomic aberrations	- lack of standardization - short half life - low concentraion
Serum biomarkers	- easy to analyze - less expensive	- very low sensitivity and specificity

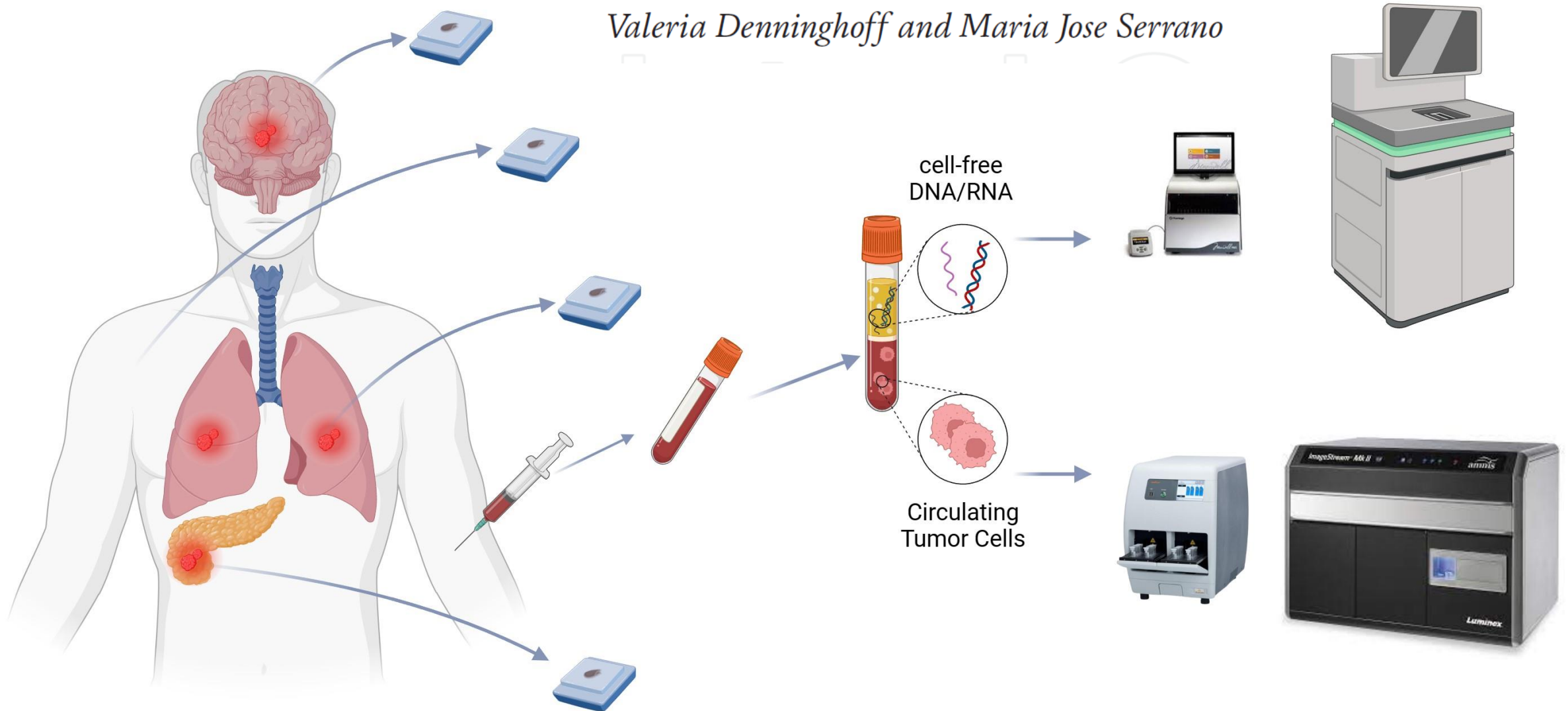
Abbreviations: CTC: circulating tumor cell; ctDNA: circulating tumor DNA; ctRNA: circulating tumor RNA.

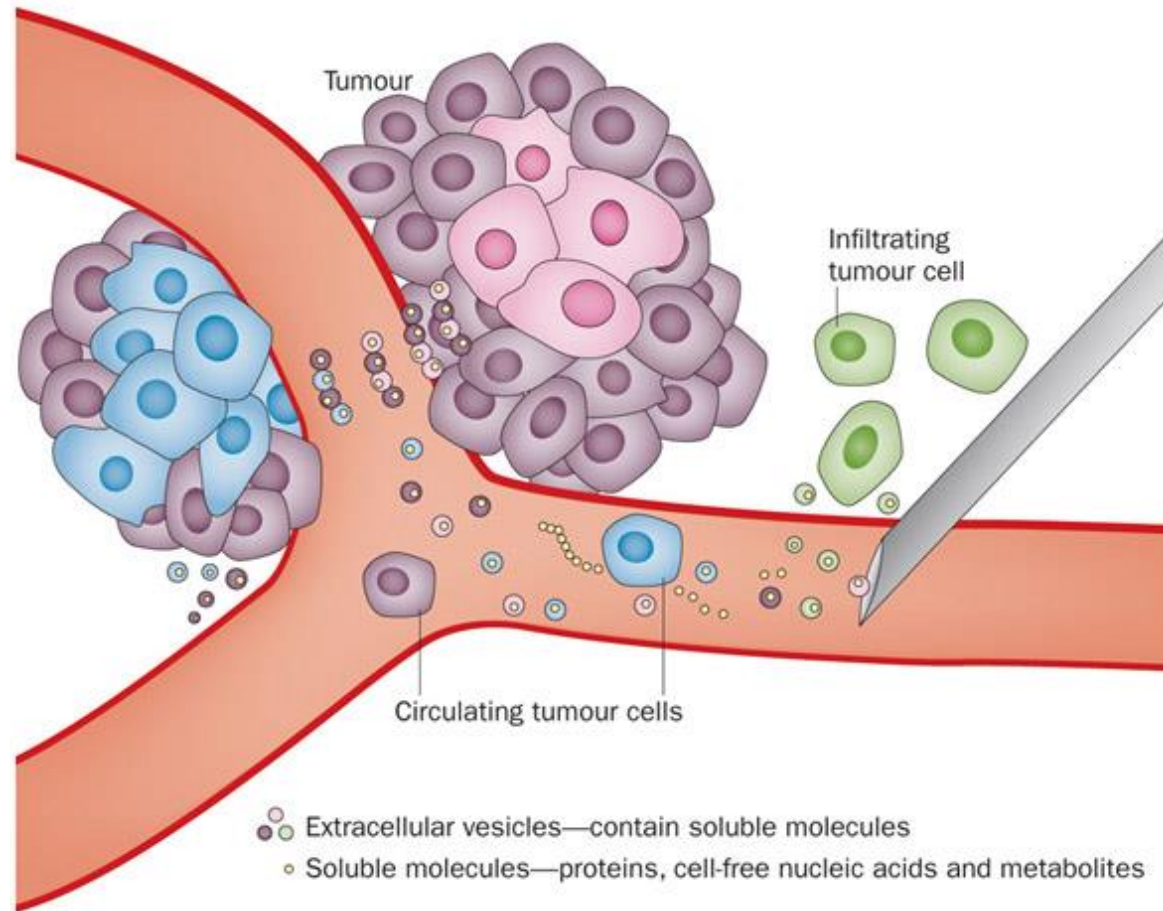
Tumor Circulome

Chapter

Liquid Biopsy

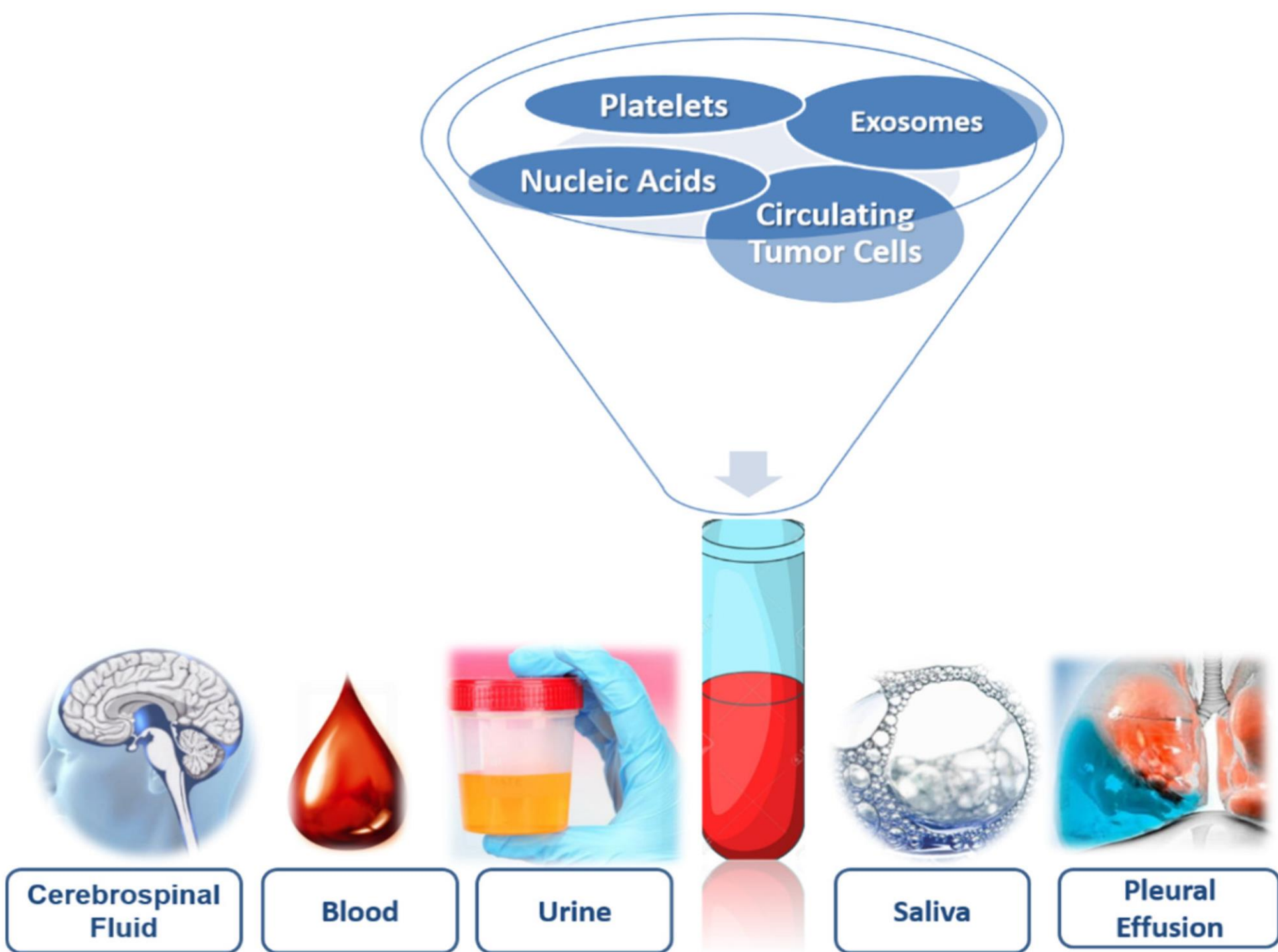
Valeria Denninghoff and Maria Jose Serrano





Nature Reviews | **Neurology**

Westphal, M. & Lamszus, K. (2015) Circulating biomarkers for gliomas
 Nat. Rev. Neurol. doi:10.1038/nrneurol.2015.171



Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer

Limits of
detection

Variants detected

Real-Time PCR



1%–5%

Only hotspot mutations
(probe-based)



Digital PCR



0.1%–1%

Only hotspot mutations
(probe-based)



NGS



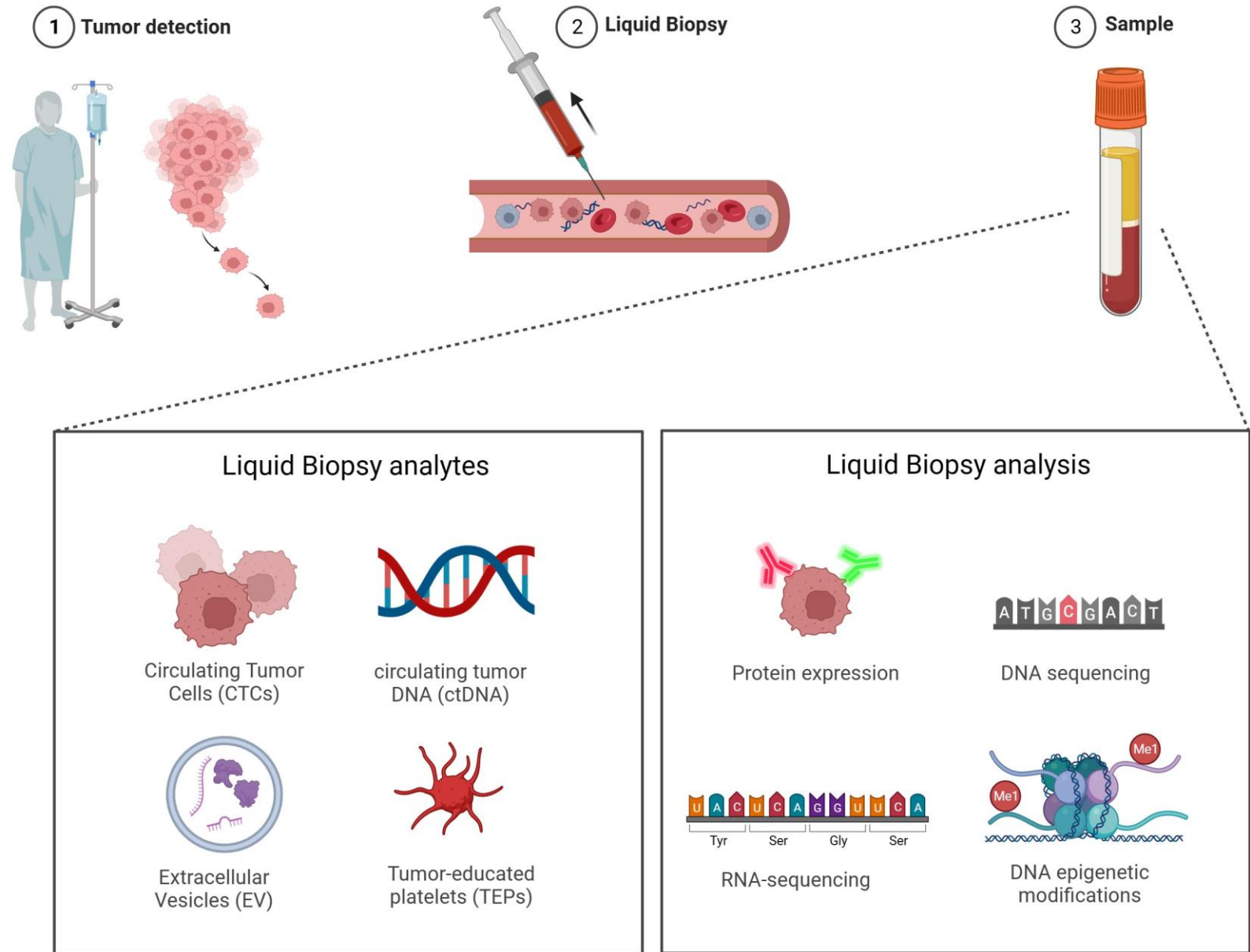
0.01%–5%

All the mutations
present in the analyzed
gene regions



Only if NGS
not available

Recommended



Chapter

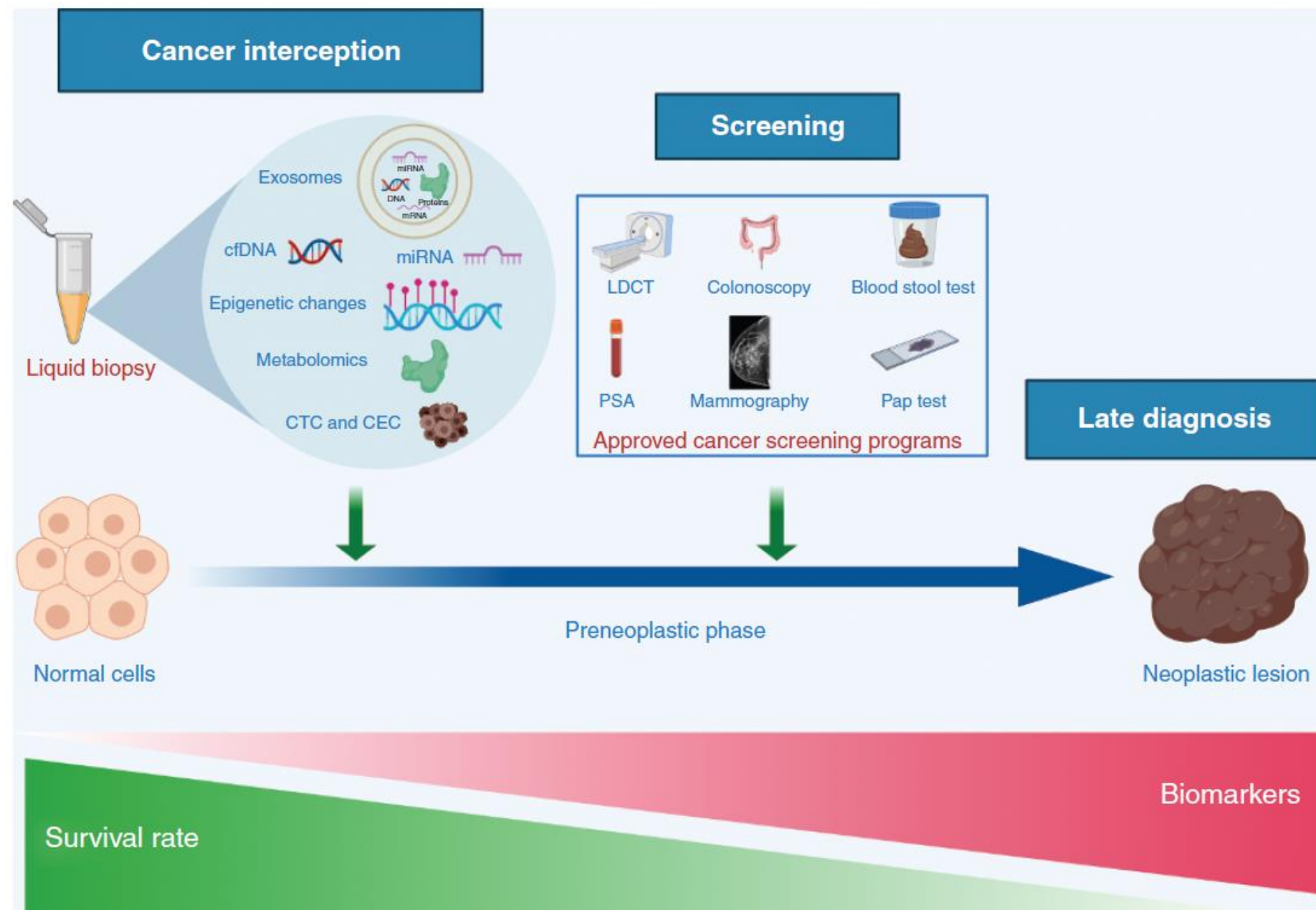
Liquid Biopsy

Valeria Denninghoff and Maria Jose Serrano

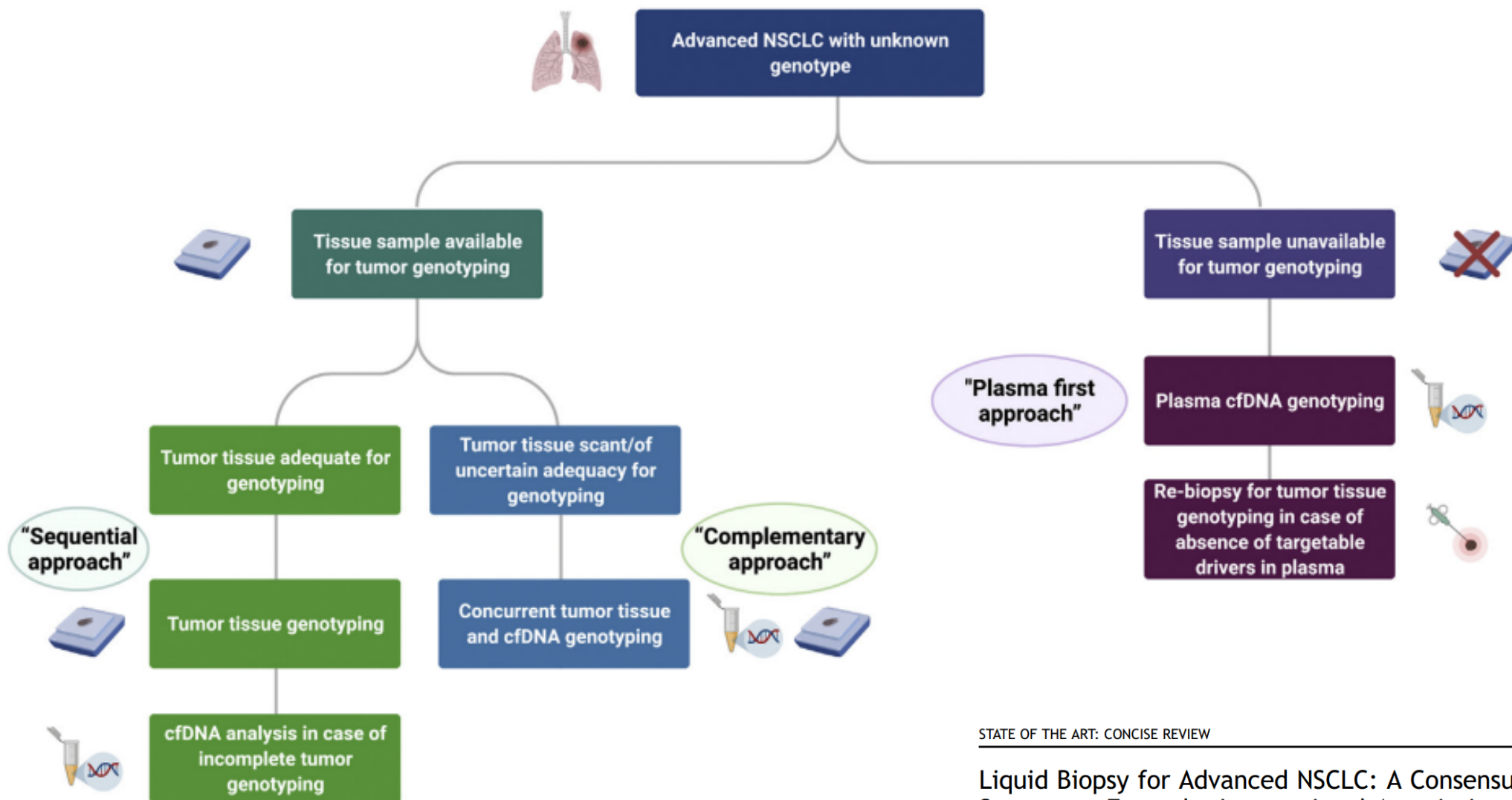
Precision Prevention and Cancer Interception: The New Challenges of Liquid Biopsy

Maria Jose Serrano^{1,2,3}, Maria Carmen Garrido-Navas¹, Juan Jose Diaz Mochon^{1,4,5}, Massimo Cristofanilli⁶, Ignacio Gil-Bazo⁷, Patrick Pauwels⁸, Umberto Malapelle⁹, Alessandro Russo¹⁰, Jose A. Lorente^{1,11}, Antonio J. Ruiz-Rodriguez¹², Luis G. Paz-Ares¹³, Eduardo Vilar¹⁴, Luis E. Raez¹⁵, Andres F. Cardona^{16,17,18}, and Christian Rolfo¹⁹ on behalf of the International Society of Liquid Biopsy

Tumor Circulome

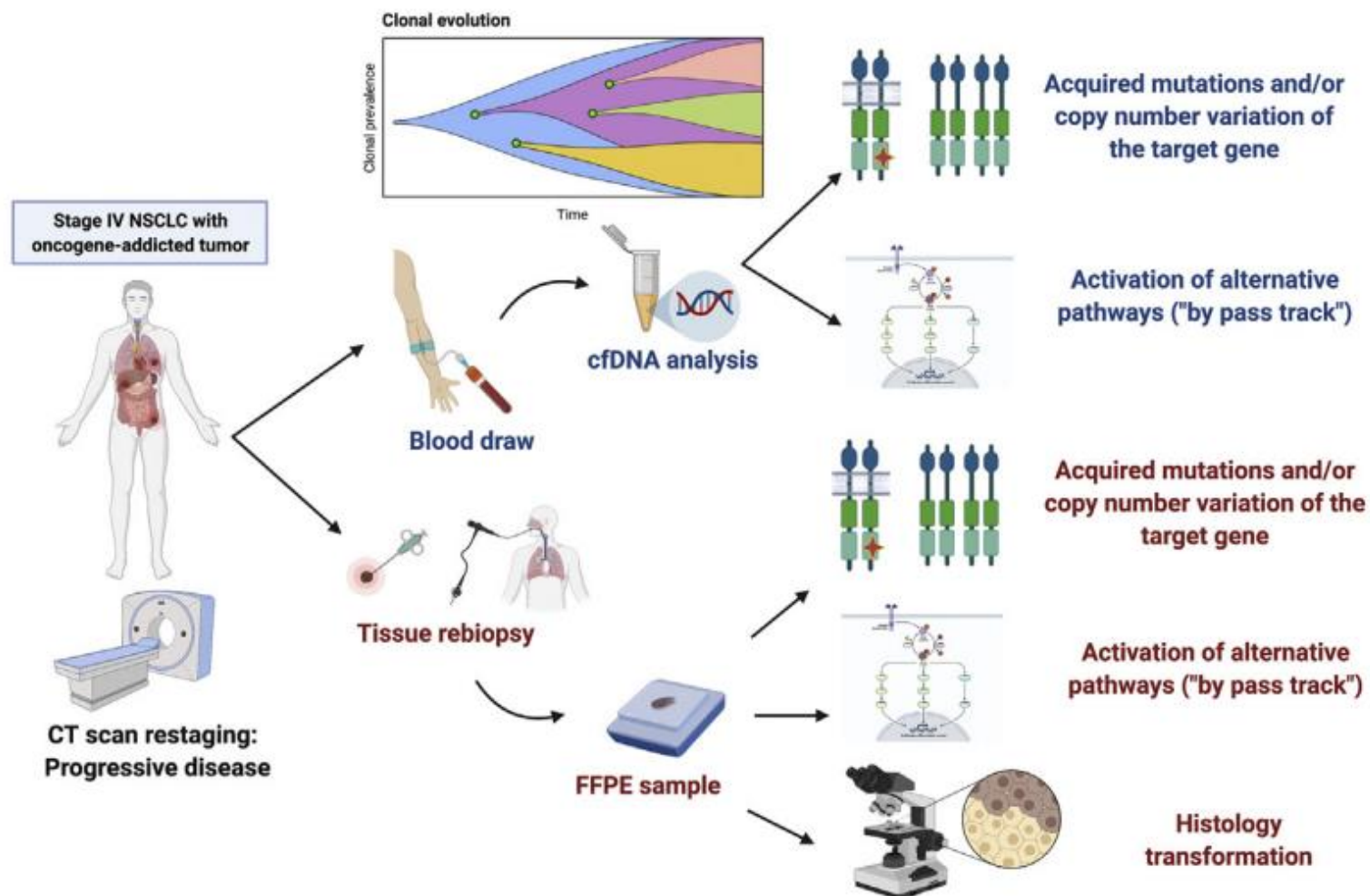


Diagnostic algorithm for liquid biopsy use in treatment-naïve advanced/metastatic NSCLC



STATE OF THE ART: CONCISE REVIEW

Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer



Main liquid biopsy techniques used



NGS-based approaches:

- ✓ High sensitivity
- ✓ Multiplex
- ✓ Gene rearrangements
- ✓ Gene amplifications



PCR-based approaches:

- ✓ Variable sensitivity
- ✓ Single gene testing
- ✓ Only for mutations

Main techniques used for tumor tissue



NGS-based approaches:

- ✓ High sensitivity
- ✓ Multiplex
- ✓ Gene rearrangements
- ✓ Gene amplifications



FISH:

- ✓ Gene rearrangements & amplifications



PCR-based approaches:

- ✓ Variable sensitivity
- ✓ Single/Multiplex gene testing
- ✓ Only for mutations



IHC:

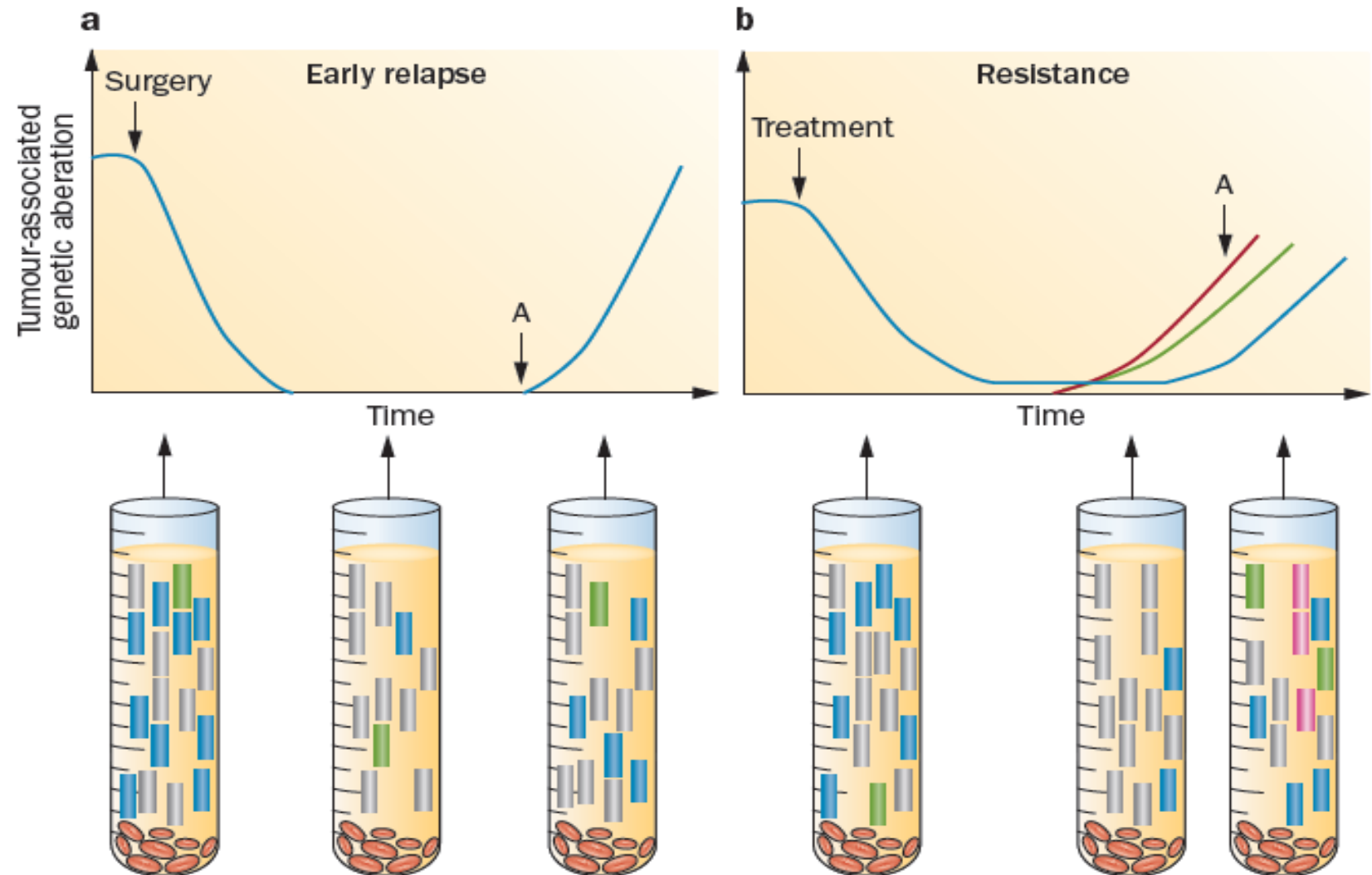
- ✓ Protein expression

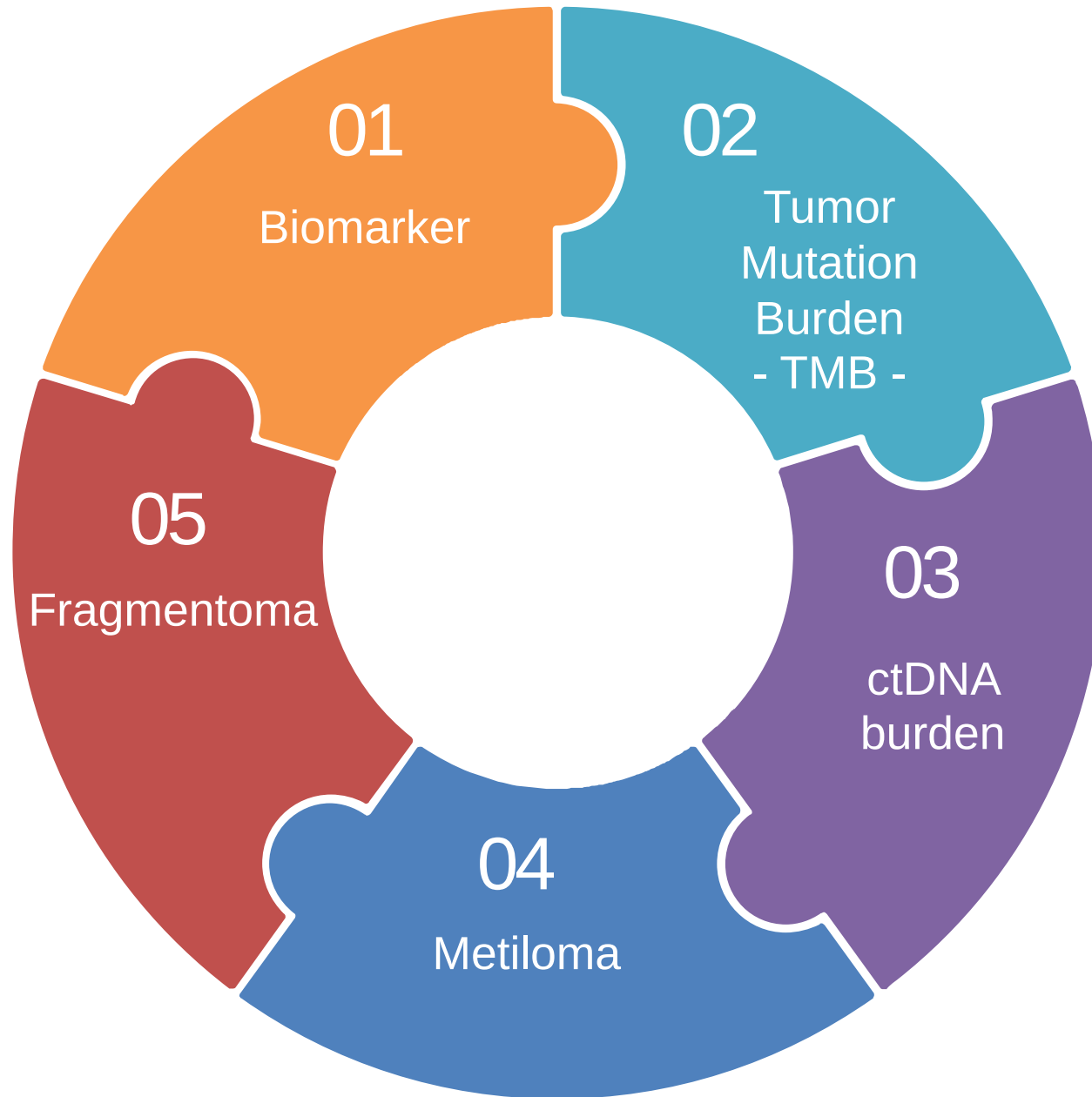
STATE OF THE ART: CONCISE REVIEW

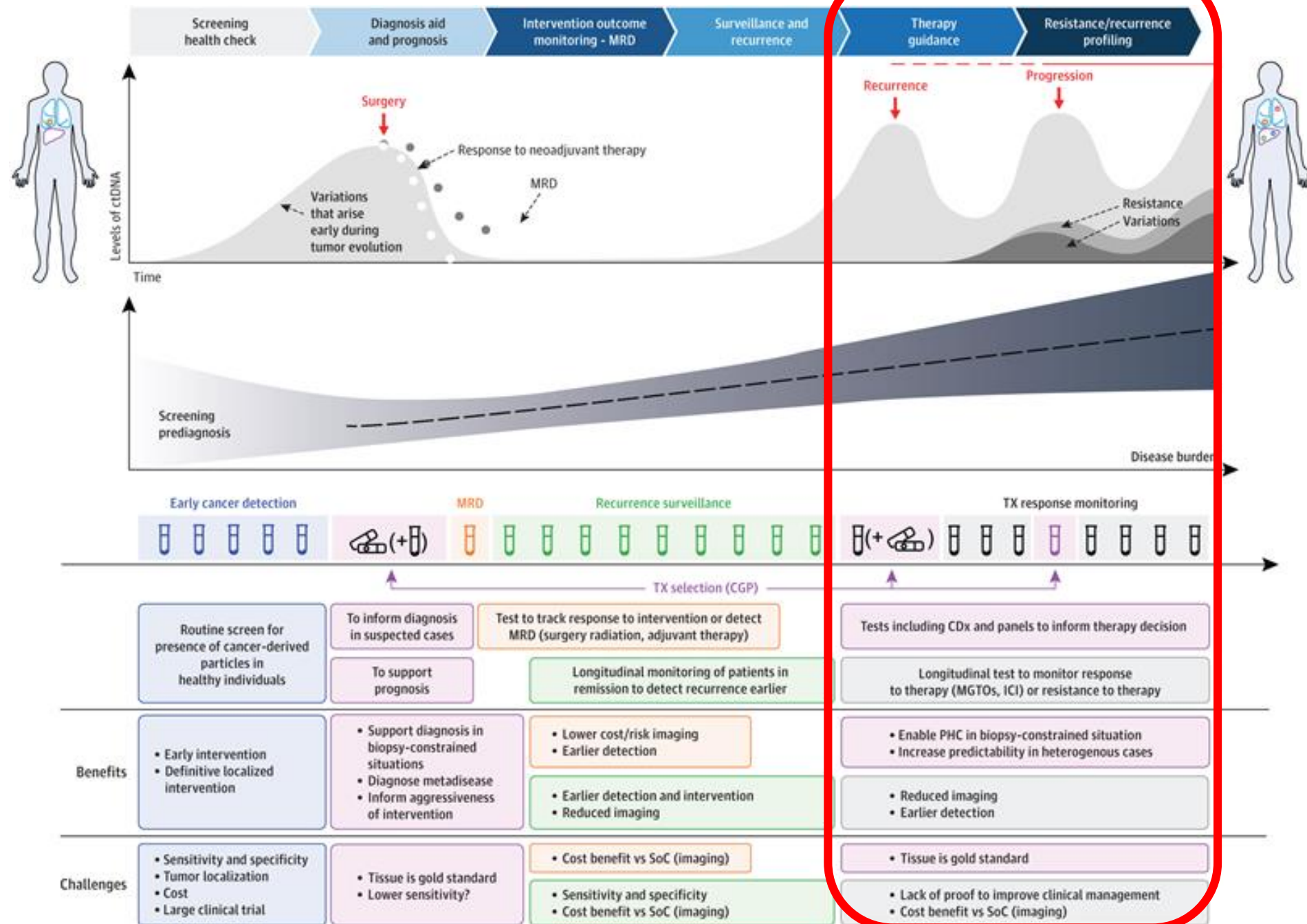
REVIEWS

Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood

Emily Crowley, Federica Di Nicolantonio, Fotios Loupakis and Alberto Bardelli









Next generation sequencing for liquid biopsy based testing in non-small cell lung cancer in 2021

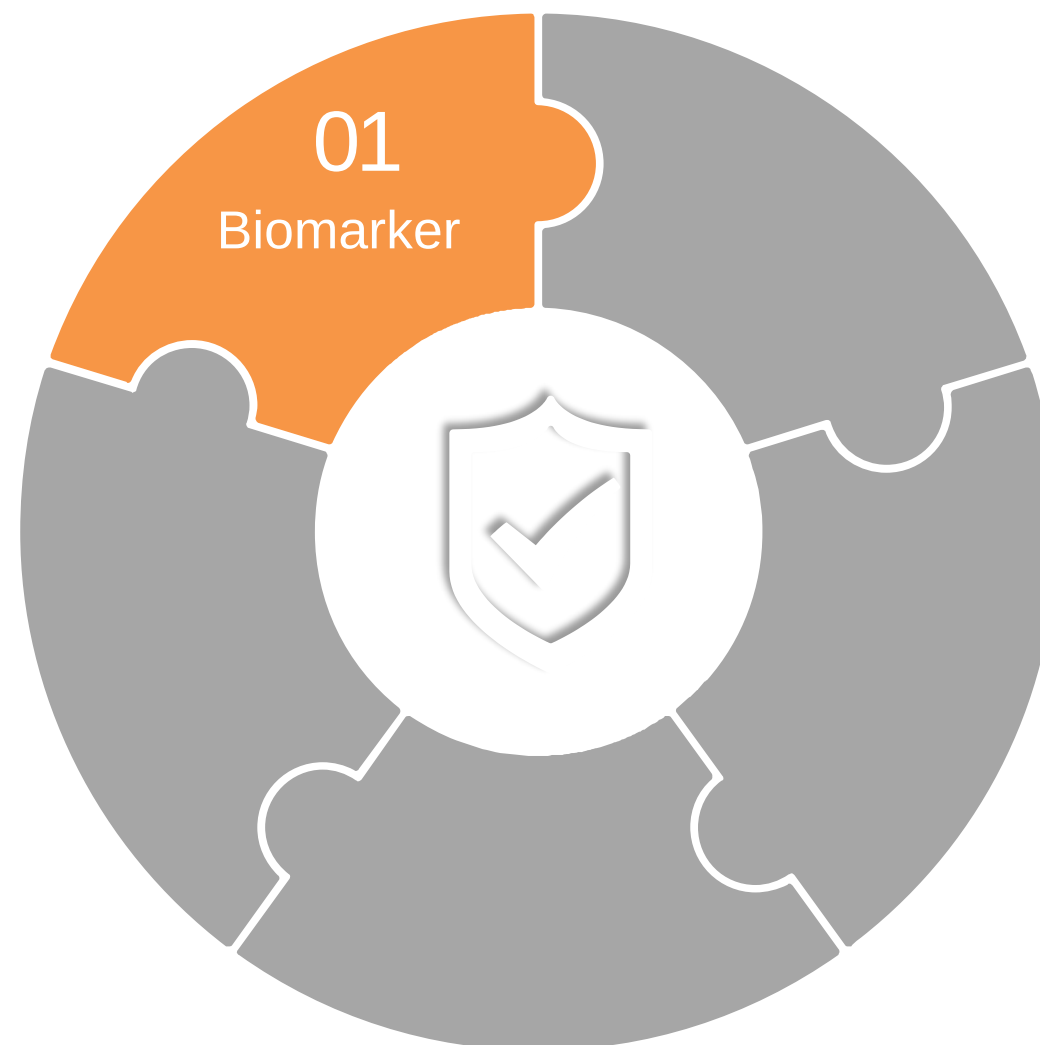
Pasquale Pisapia ^{a,1}, José Luis Costa ^{b,1}, Francesco Pepe ^a, Gianluca Russo ^a, Gianluca Gragnano ^a, Alessandro Russo ^c, Antonino Iaccarino ^b, Diego de Miguel-Perez ^{d,e}, Maria José Serrano ^d, Valeria Denninghoff ^f, Luca Quagliata ^b, Christian Rolfo ^e, Umberto Malapelle ^{b,g}

Table 2

Pre-analytical factors in ctDNA analysis: advantages and disadvantages.

Collection tube	
K2-EDTA-containing tubes	- less expensive - avoid blood clotting - blood samples have to be processed as quickly as possible (within 2 h from collection) - blood withdrawal and ctDNA analysis are necessary performed within the same or nearby physical location
Preservative-containing tubes	- stabilize ctDNA (up to 14 days upon collection depending on storage conditions) - easy sample management (storage and transportation at room temperature) - more expensive
Main centrifugation protocols	
Malapelle et al (Malapelle et al., 2017b)	Two centrifugations at 2300 G for 10 min at room temperature
Sorber et al (Sorber et al., 2019)	Adapted protocol from the European Committee for Standardization (CEN) (two-step, 1900 G for 10 min and then 16,000 G for 10 min at room temperature)
Page et al (Page et al., 2013)	Three centrifugation steps (the first at 1000 G for 10 min at 4 °C, the second at 1000 G, or 2000 G, or 10,000 G for 10 min at 4 °C, and the third, performed after thawing, at 1000 G for 5 min at room temperature)
ctDNA extraction methods	
Manual	- less expensive - necessity of high trained personnel - less accurate (high risk of contamination)
Fully automated	- more accurate (low risk of contamination) - more expensive

Abbreviations: ctDNA: circulating tumor DNA; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.



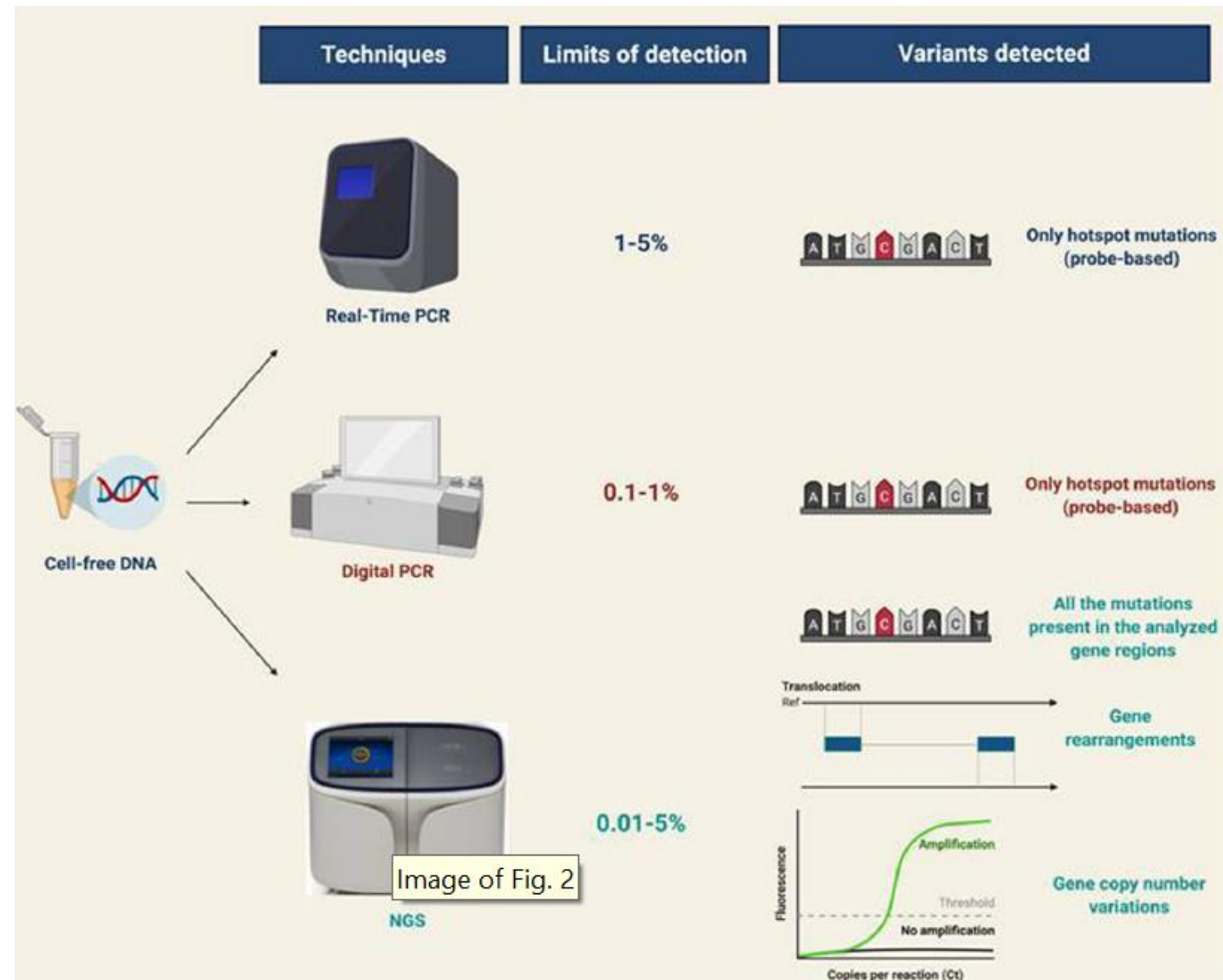


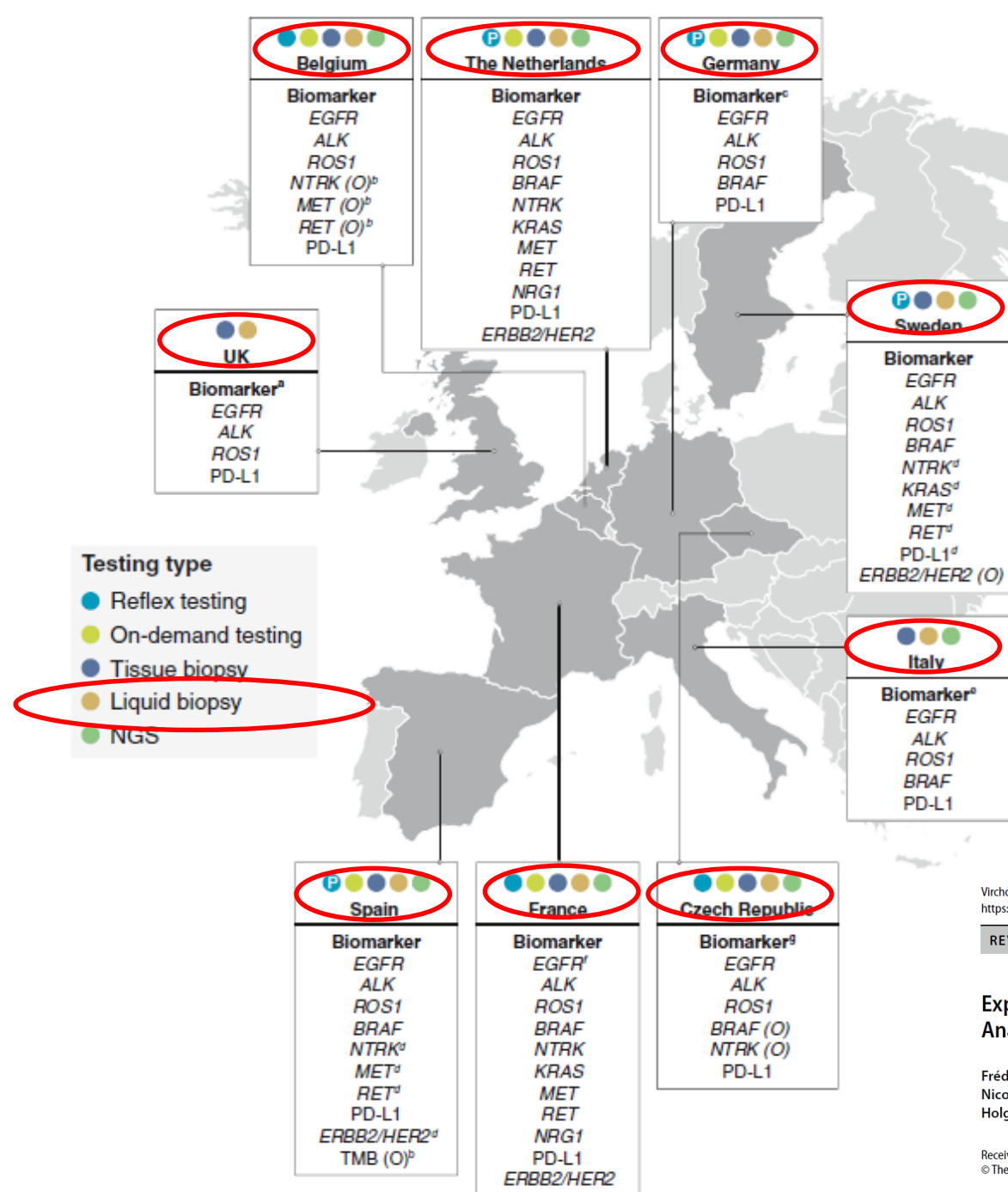
Next generation sequencing for liquid biopsy based testing in non-small cell lung cancer in 2021

Pasquale Pisapia^{a,1}, José Luis Costa^{b,1}, Francesco Pepe^a, Gianluca Russo^a,
Gianluca Gragnano^a, Alessandro Russo^c, Antonino Iaccarino^a, Diego de Miguel-Perez^{d,e}, Maria
José Serrano^d, Valeria Denninghoff^f, Luca Quagliata^b, Christian Rolfo^e, Umberto Malapelle^{a,*}

El ctDNA representa entre el 0,01 y el 10% del cfDNA, por lo que su detección requiere una alta sensibilidad

Denninghoff & Serrano 2023





Virchows Archiv
<https://doi.org/10.1007/s00428-022-03344-1>

REVIEW AND PERSPECTIVES

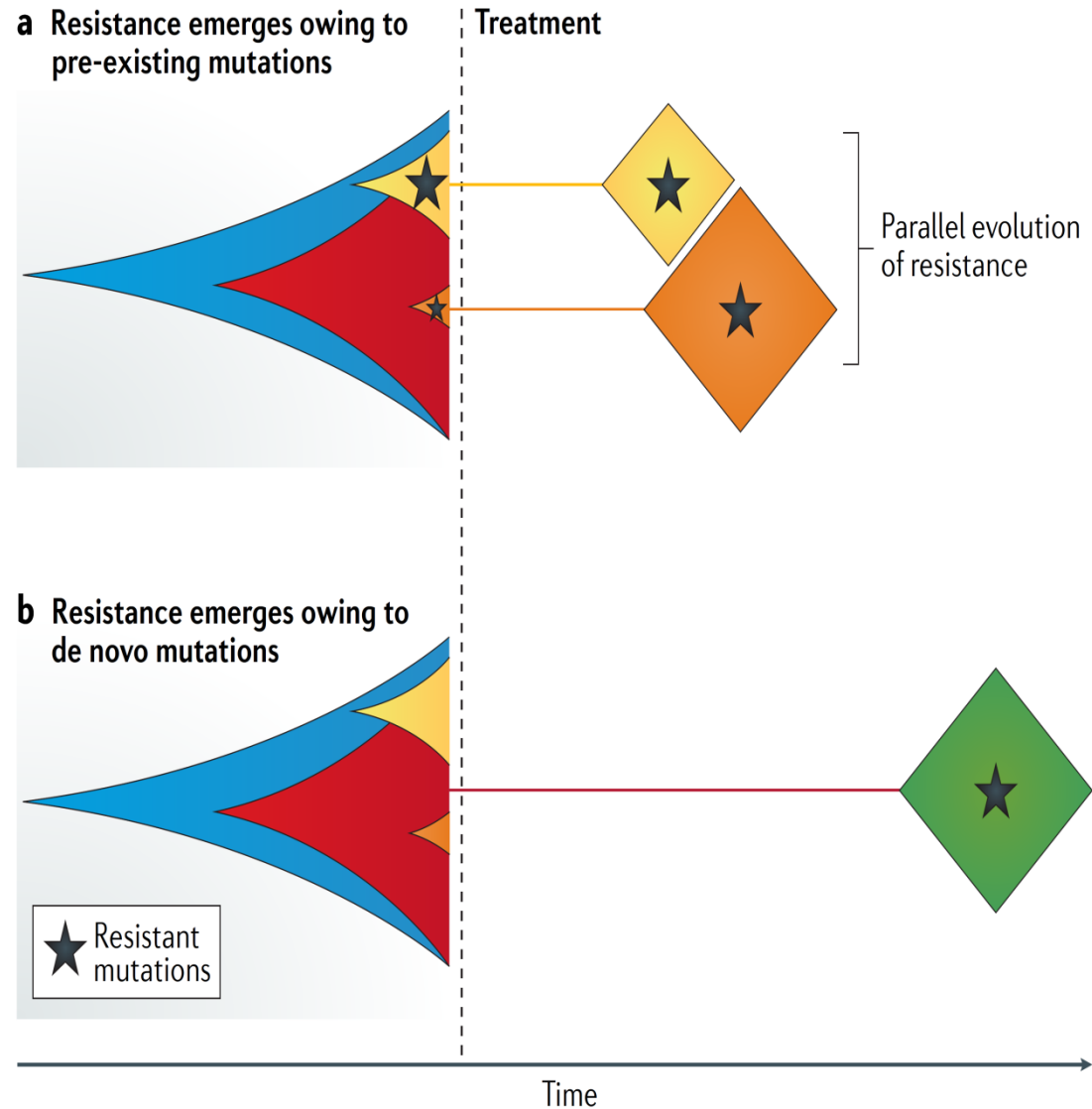
Expert opinion on NSCLC small specimen biomarker testing — Part 2: Analysis, reporting, and quality assessment

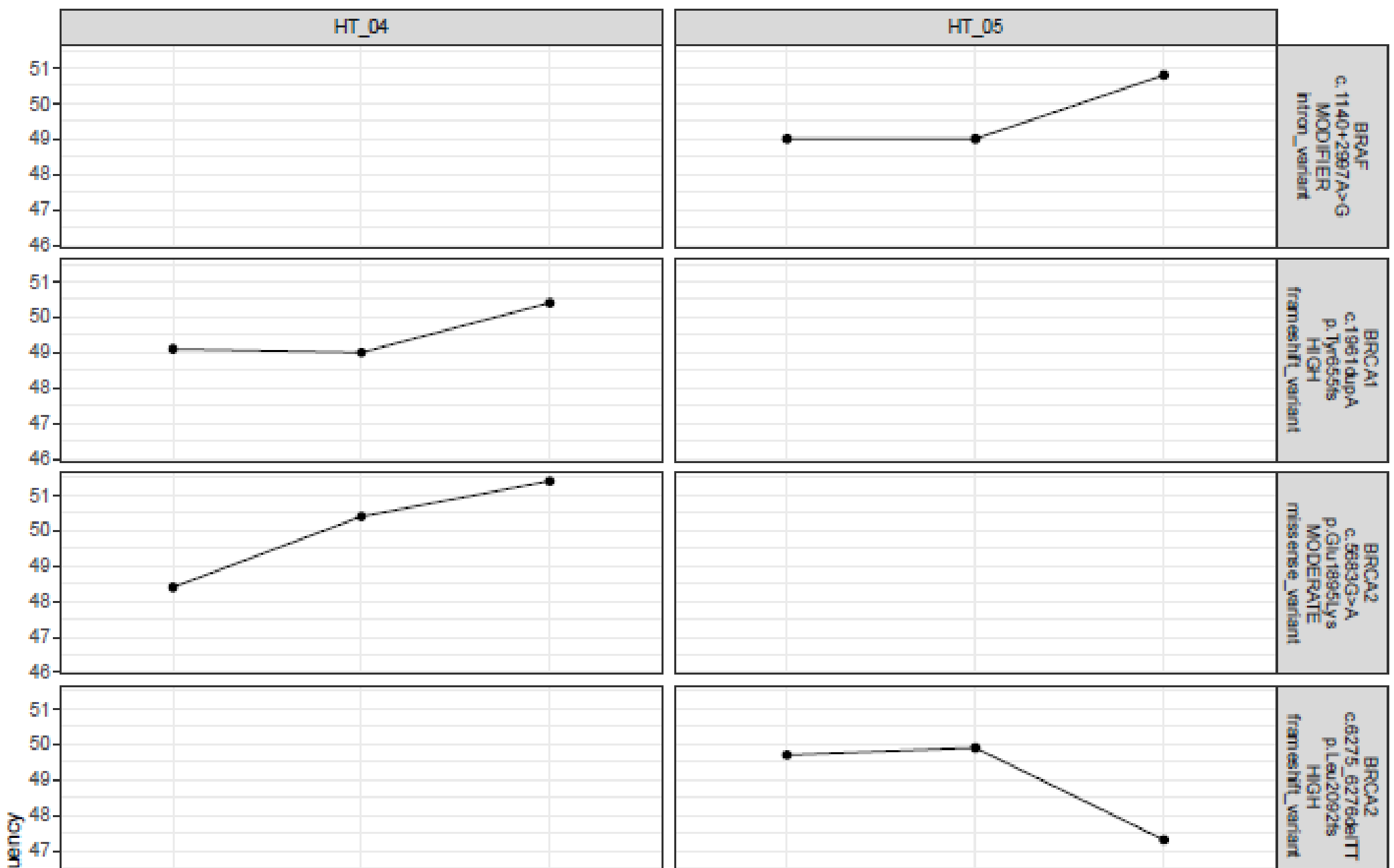
Frédérique Penault-Llorca¹ · Keith M. Kerr² · Pilar Garrido³ · Erik Thunnissen⁴ · Elisabeth Dequeker⁵ · Nicola Normanno⁶ · Simon J. Patton⁷ · Jenni Fairley⁸ · Joshua Kapp⁹ · Daniëlle de Ridder¹⁰ · Aleš Ryska¹¹ · Holger Moch¹²

Received: 16 December 2021 / Revised: 16 May 2022 / Accepted: 18 May 2022
 © The Author(s) 2022

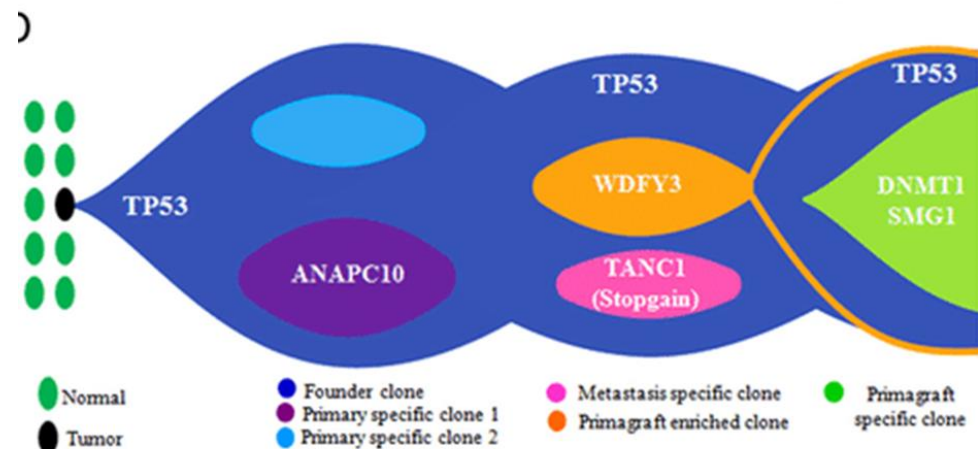
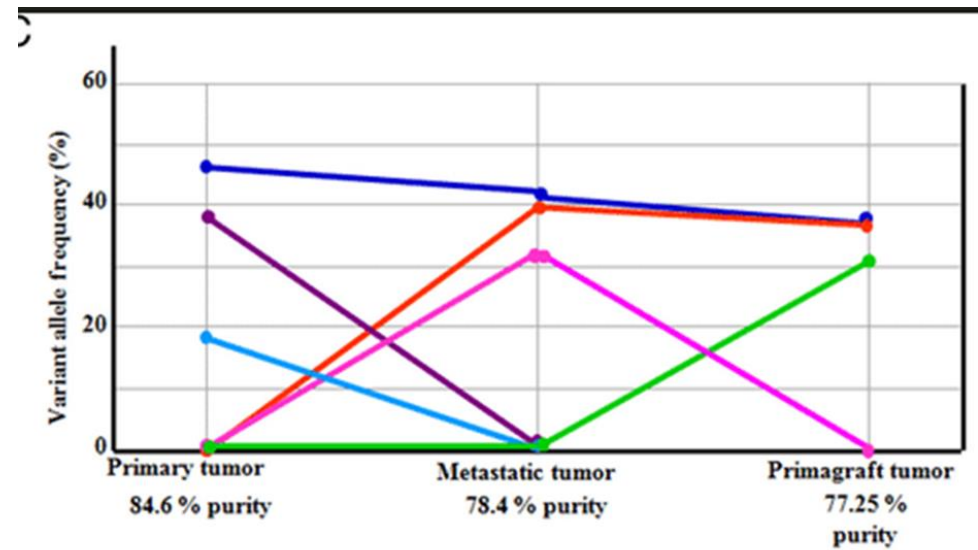
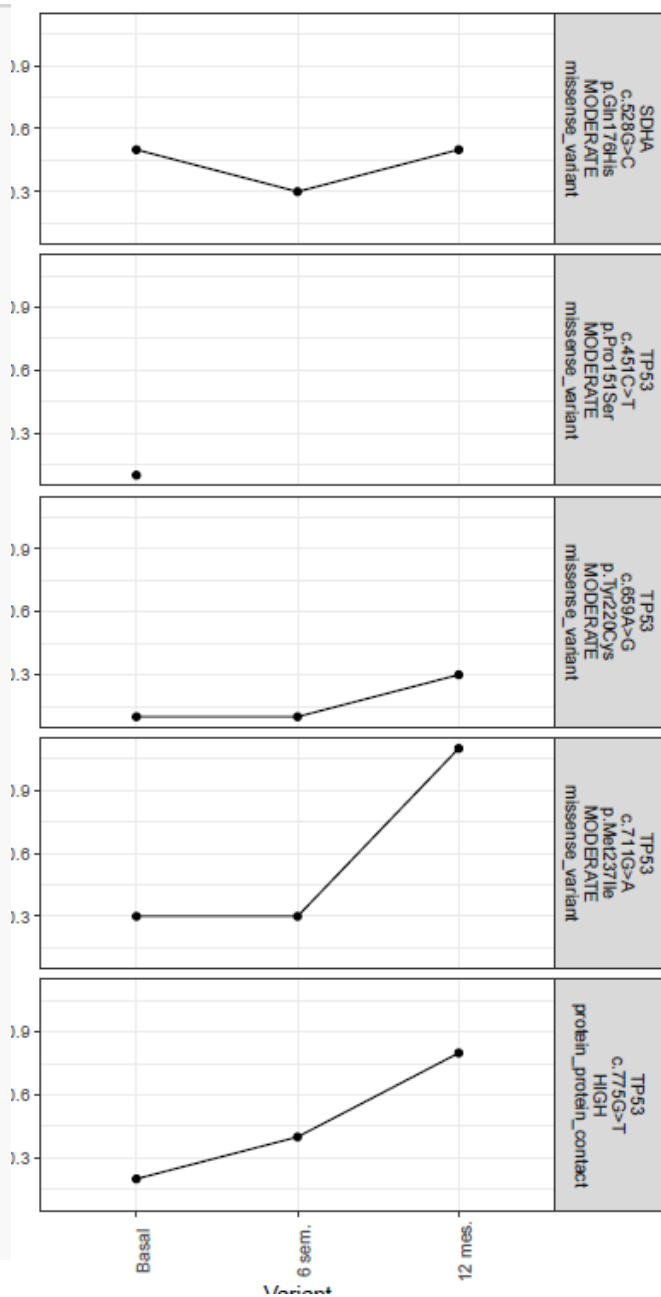
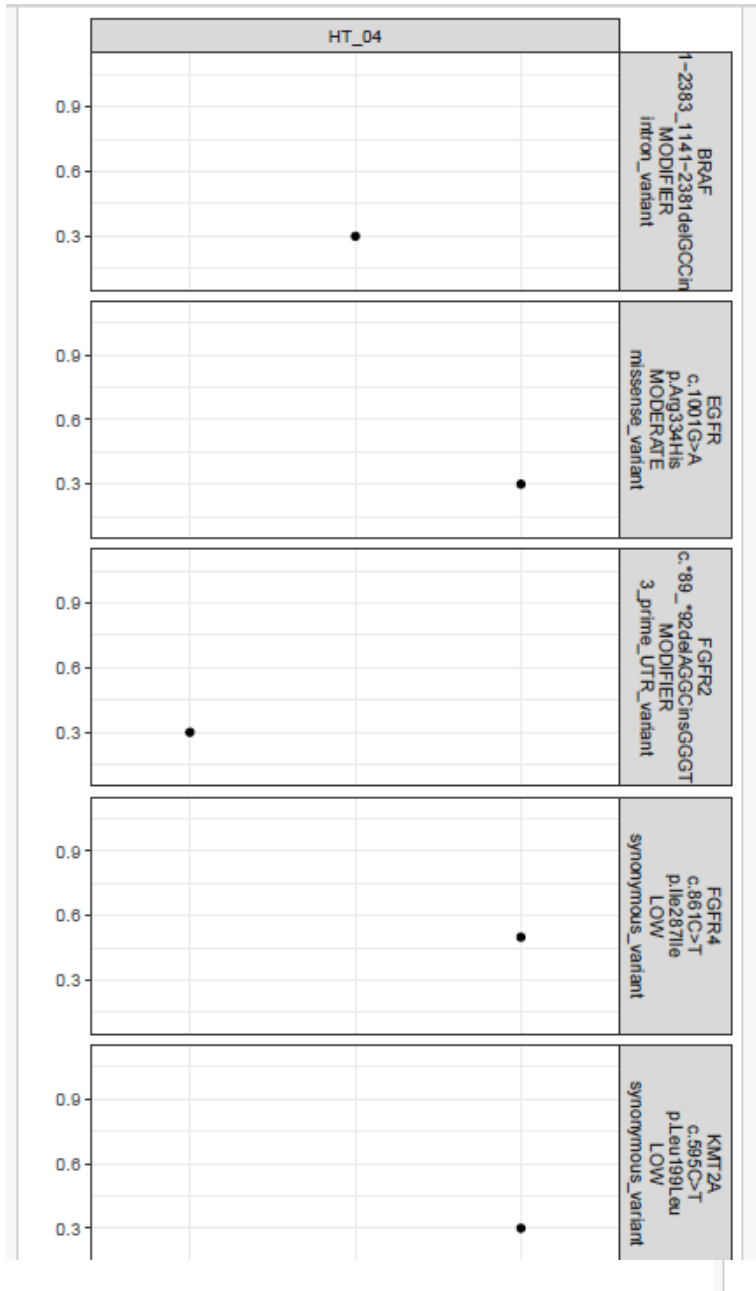


Clonal evolution of treatment resistance





frequency





Diagnóstico y tratamiento de precisión en enfermedades infecciosas y cáncer -BIOPSIA LIQUIDA-

Denninghoff V, de Álava E, Serrano MJ

El proyecto "Diagnóstico y tratamiento de precisión en enfermedades infecciosas y cáncer" está financiado en un 80% por la Unión Europea a través del Programa Operativo Plurirregional de España - FEDER 2014-2020, ayudas concedidas por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través del programa FID "Fomento de la Innovación desde la Demanda", y el Servicio Andaluz de Salud.

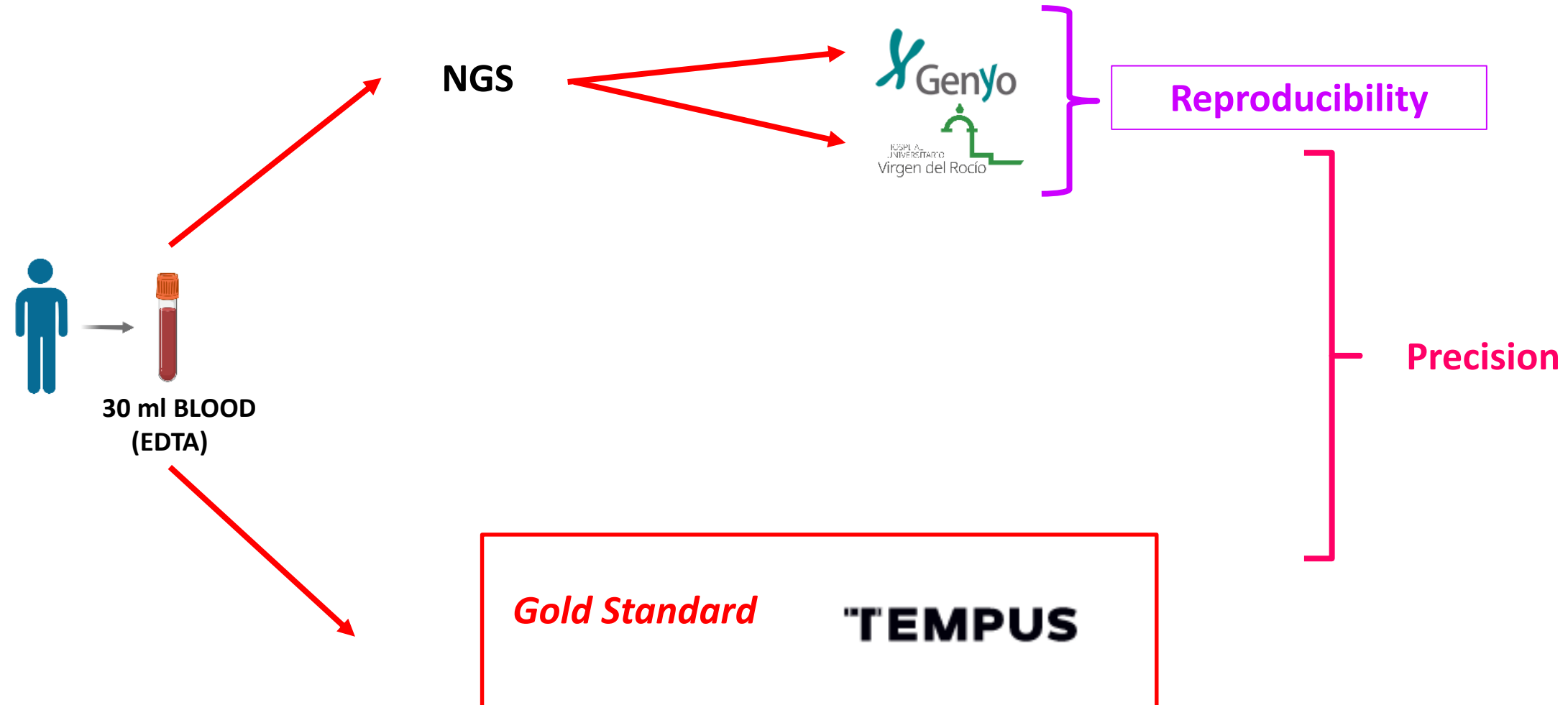


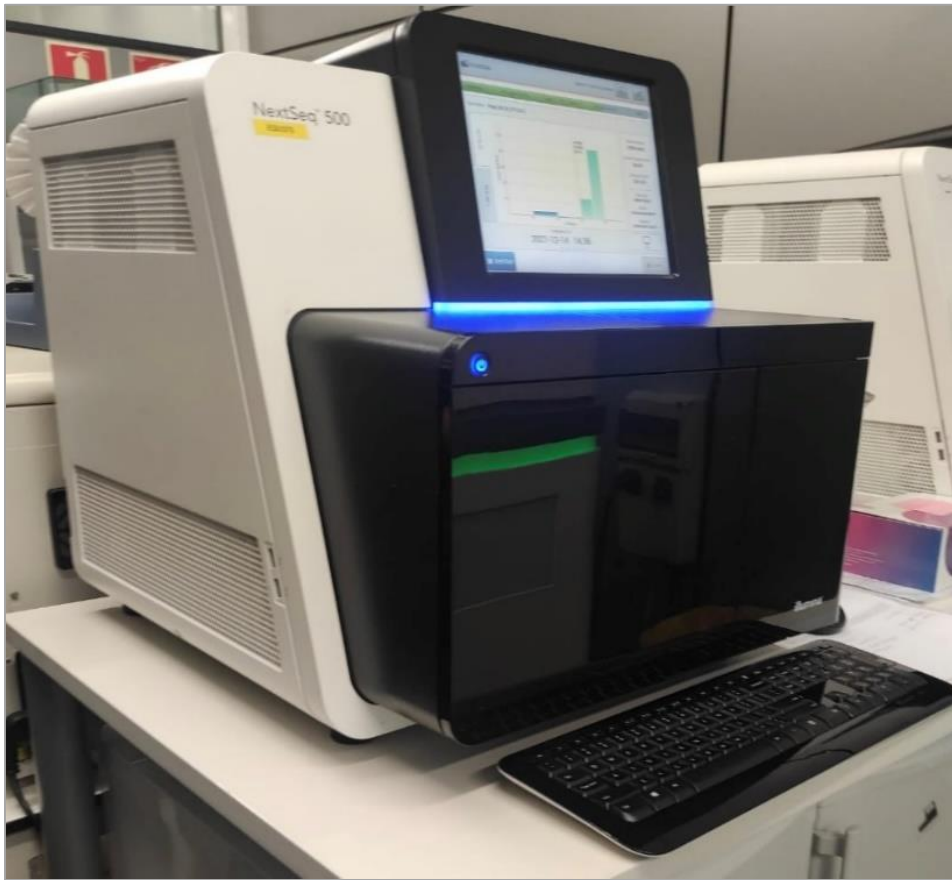
BIOPSIA LIQUIDA



BIOPSIA LIQUIDA

Technical Validation





 BIOPSIA LIQUIDA

 **imegen**

A part of healthincode

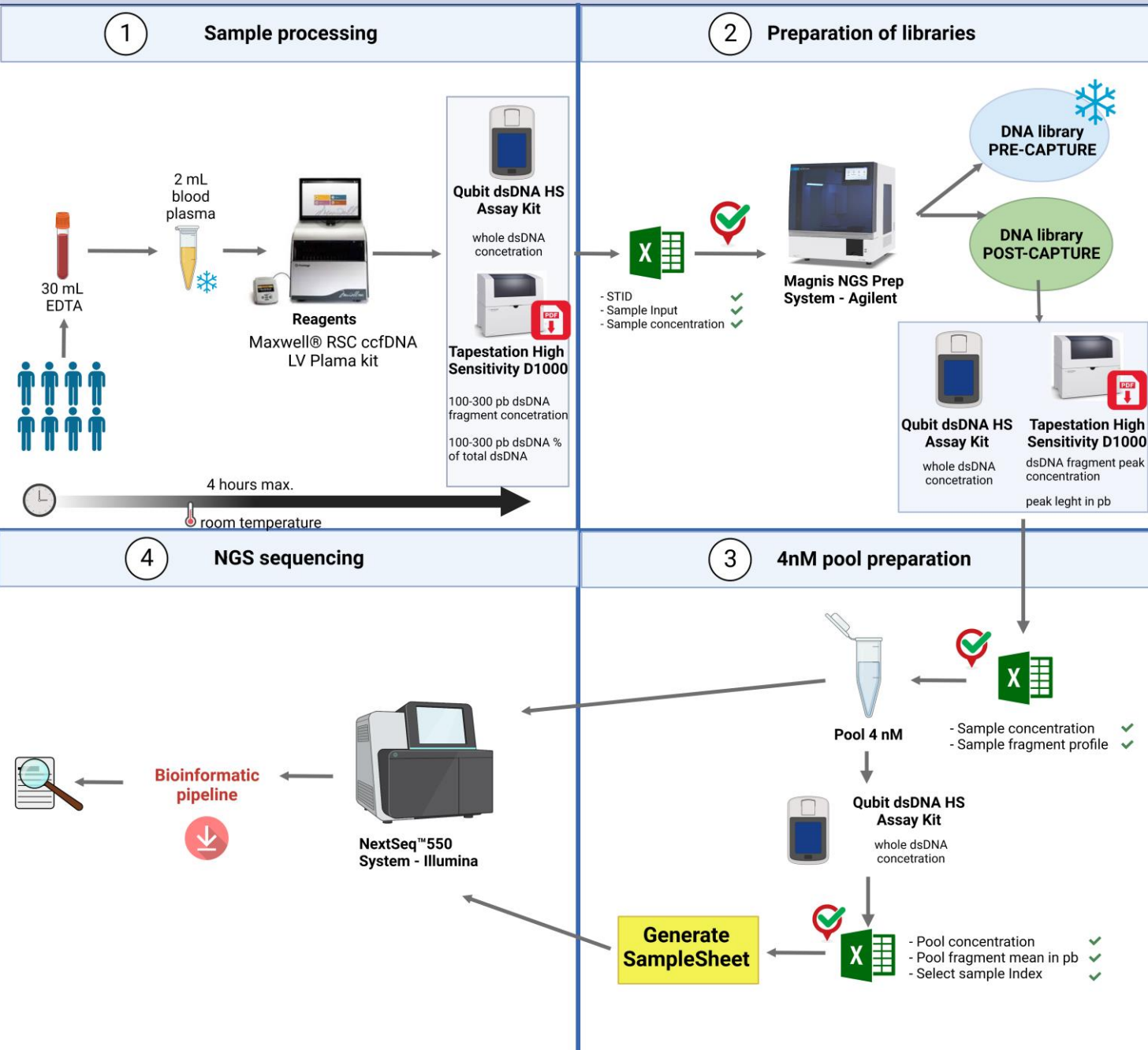
Equipamiento y reactivos



 **Genyo**

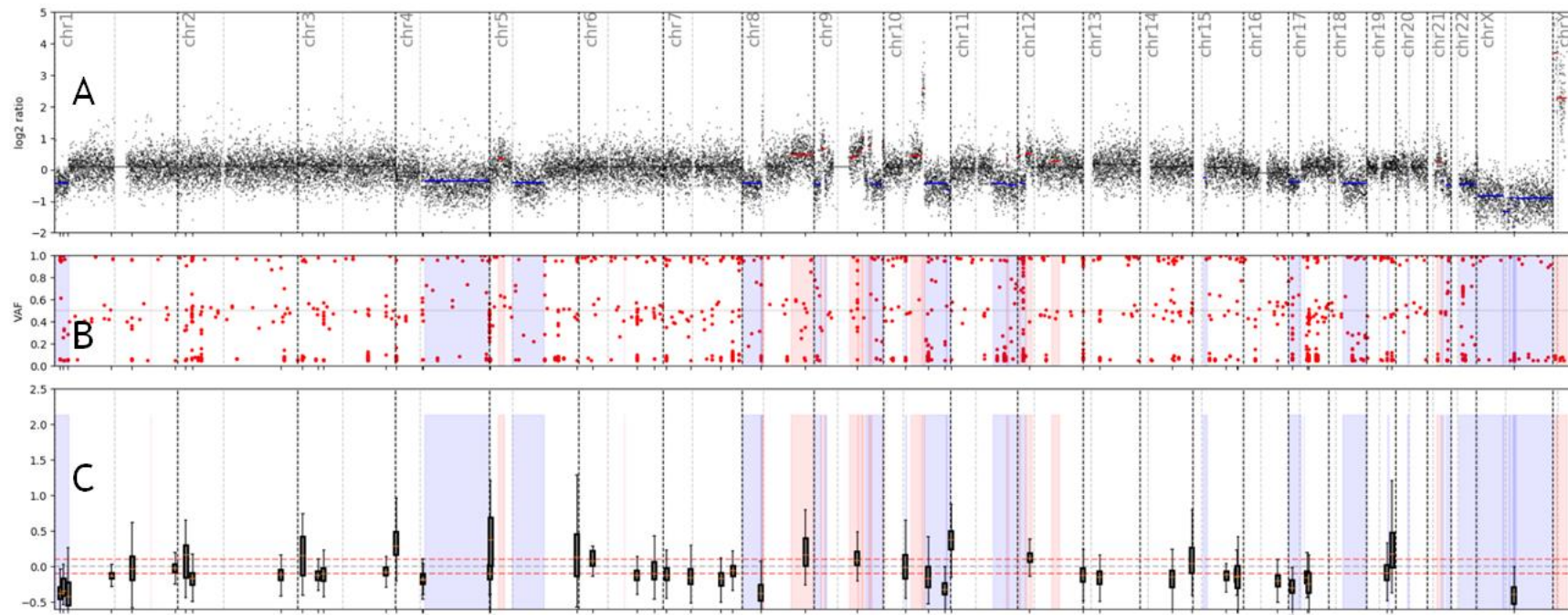

 IUSPL AL
 UNIVERSITARIO
 Virgen del Rocío

LOTE 1 - NGS sequencing



MUTACIONES	FUSIONES	FARMACOGENÉTICA
ALK	ALK	CALU
BRAF	NTRK1	CYP2C18
EGFR	NTRK2	CYP2C19
ERBB2	NTRK3	CYP2C9
ESR1	RET	CYP2D6
KRAS	ROS1	CYP4F2
MAP2K1	CNVs	DPYD
MET	ERBB2 (amplif)	GGCX
NRAS	MET (amplif)	UGT1A1
NTRK1		VKORC1
NTRK2		
NTRK3		
PIK3CA		
RET		
ROS1		
TP53		

Quality Control	MEDIA (Range)
CC (ng/ul)	0,56 (0,11 - 2,34)
%DNA (100-300pb)	63,07 (43,45 – 88,1)
INPUT (ng totales)	29,34 (5,55 - 117)
Q30 [>80] (%)	95,46 (94,94 – 95,80)
Clúster number (millions)	110,46 (102,99 – 116,60)



Kuilman et al. *Genome Biology* (2015) 16:49
DOI 10.1186/s13059-015-0617-1

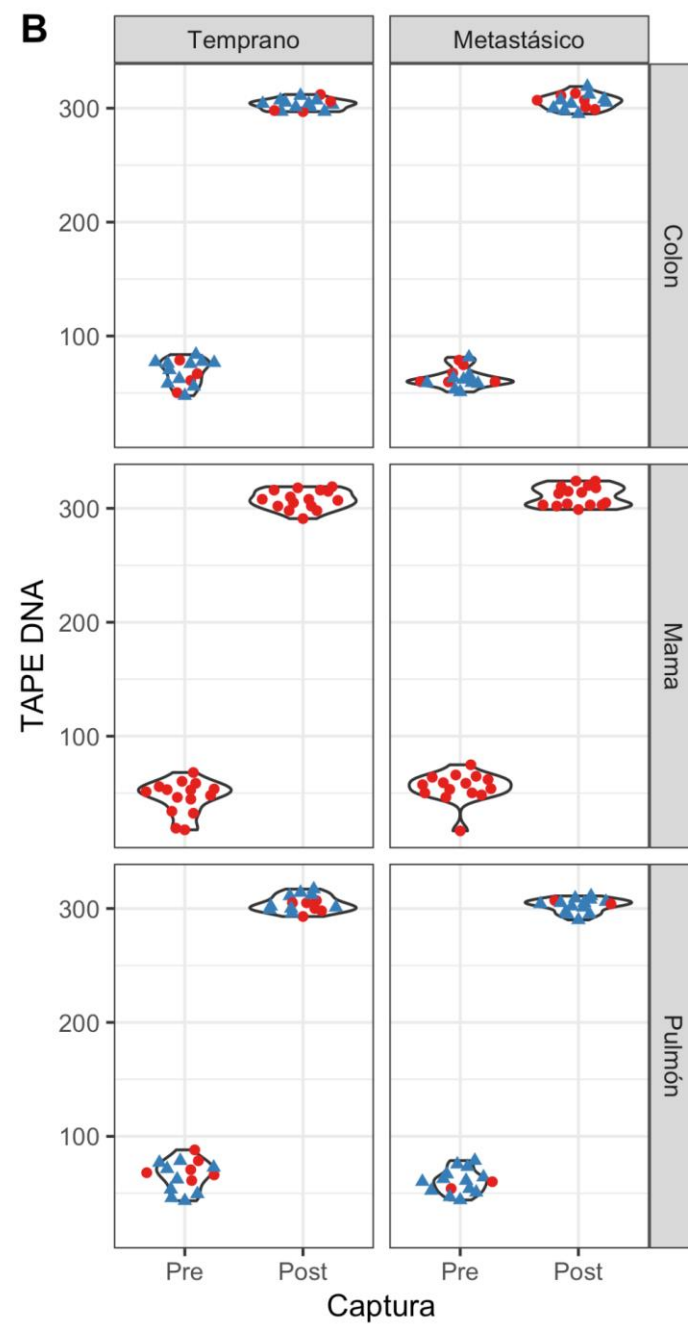
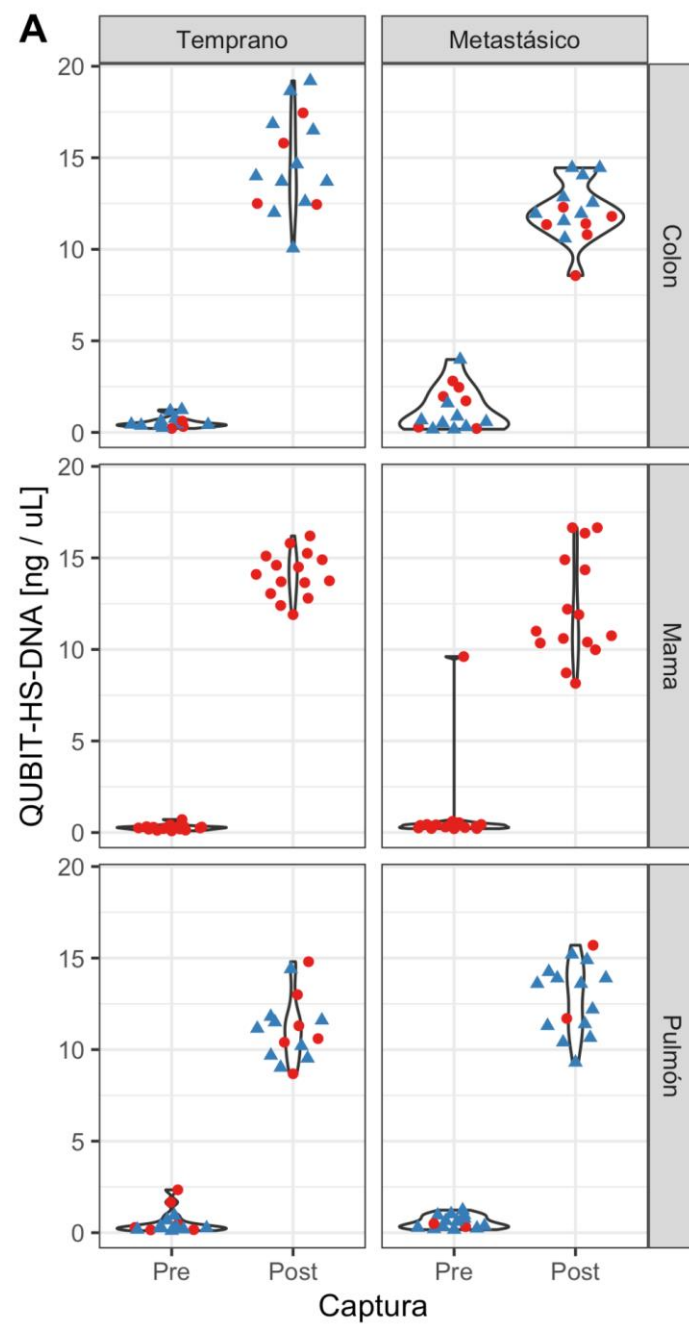


METHOD

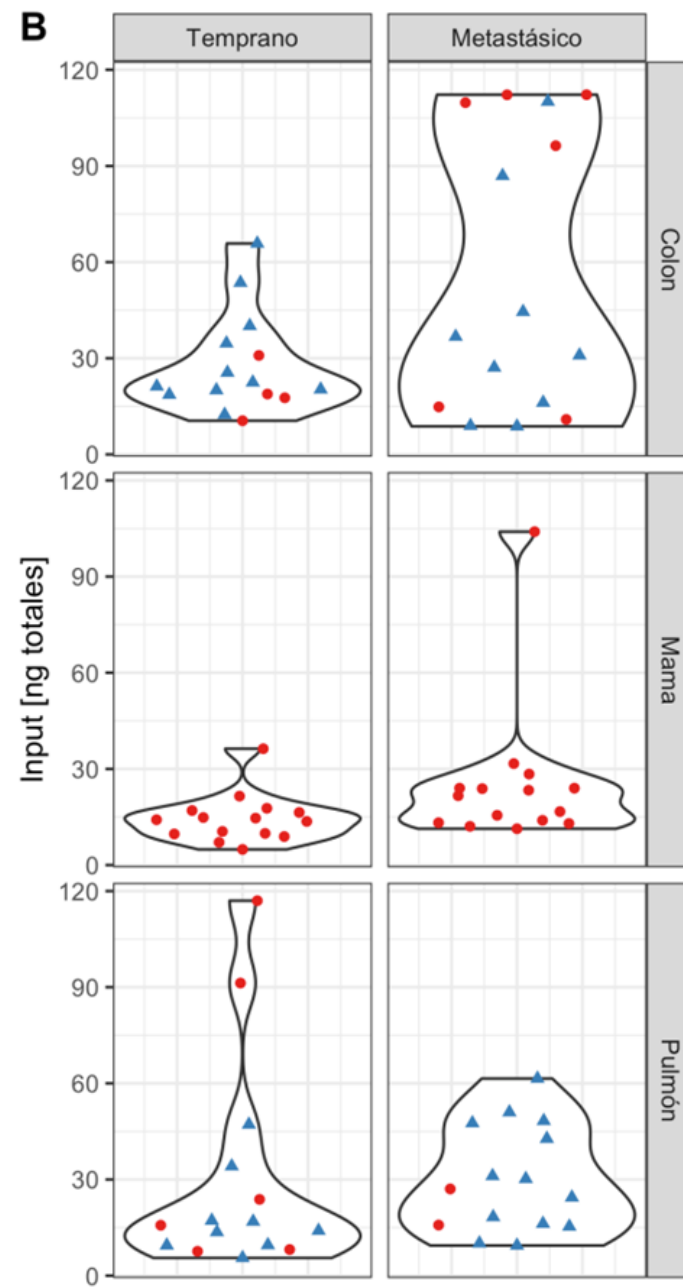
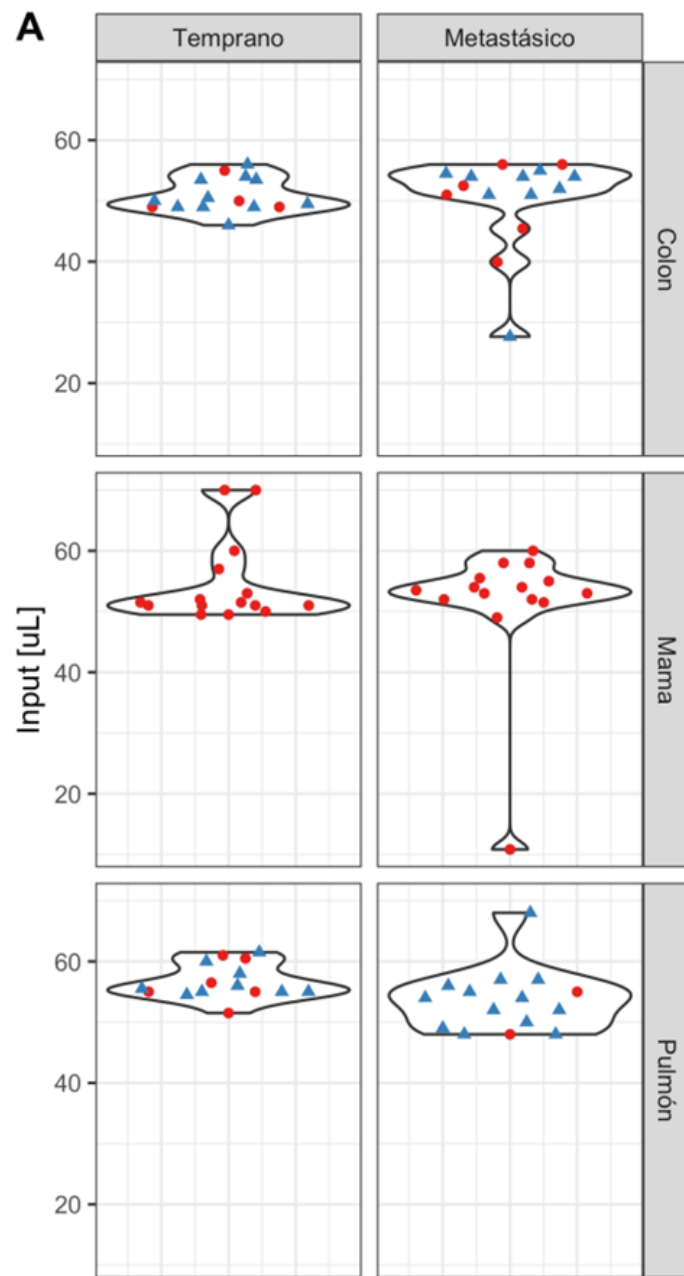
Open Access

CopywriteR: DNA copy number detection from off-target sequence data

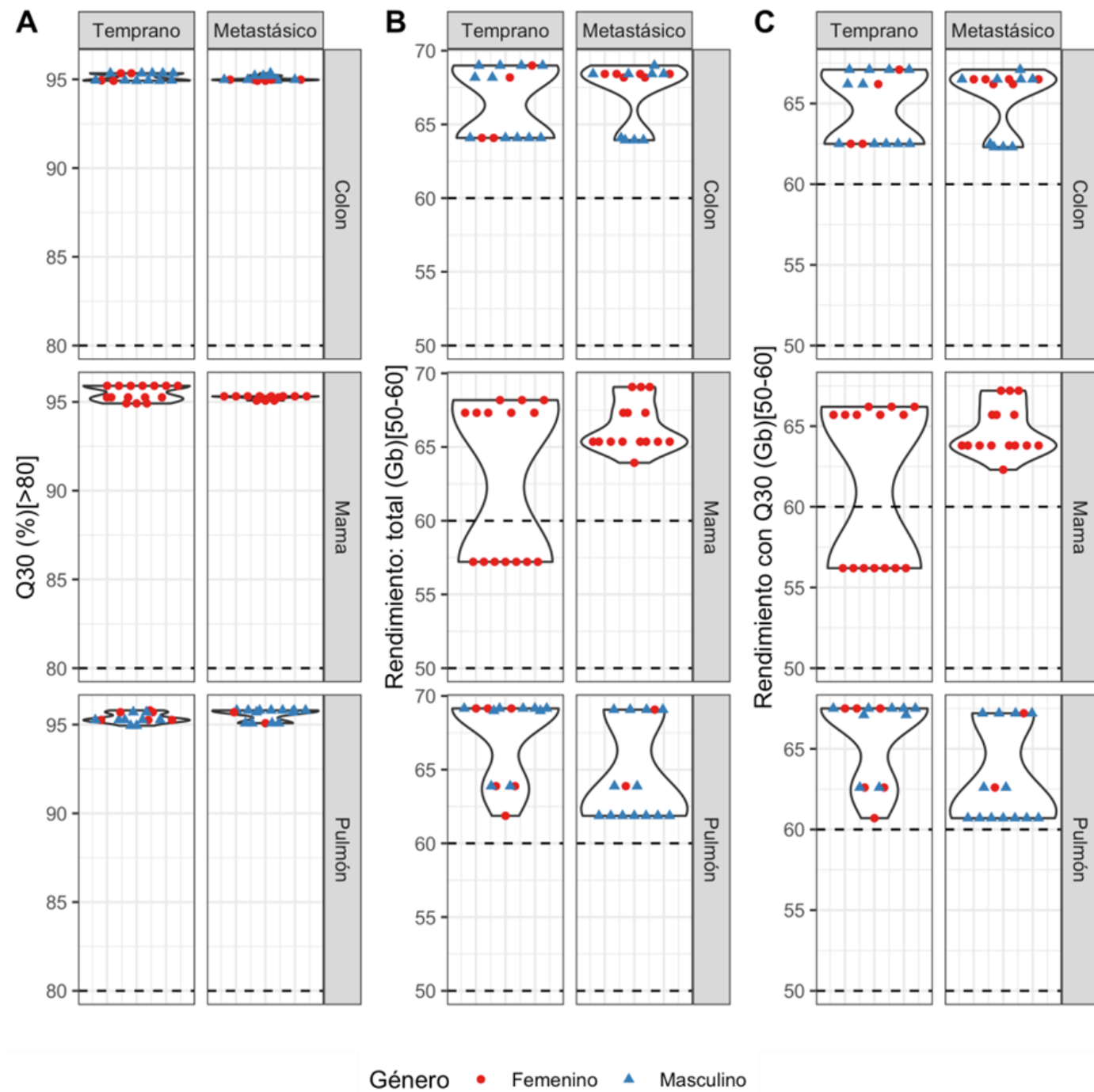
Thomas Kuilman¹, Arno Velds², Kristel Kemper¹, Marco Ranzani³, Lorenzo Bombardelli⁴, Marlous Hoogstraat⁵, Ekaterina Nevedomskaya^{5,6}, Guotai Xu¹, Julian de Ruiter^{5,6}, Martijn P Lolkema⁷, Bauke Ylstra⁸, Jos Jonkers⁶, Sven Rottenberg^{1,9}, Lodewyk F Wessels⁵, David J Adams³, Daniel S Peeper^{1*} and Oscar Krijgsman¹

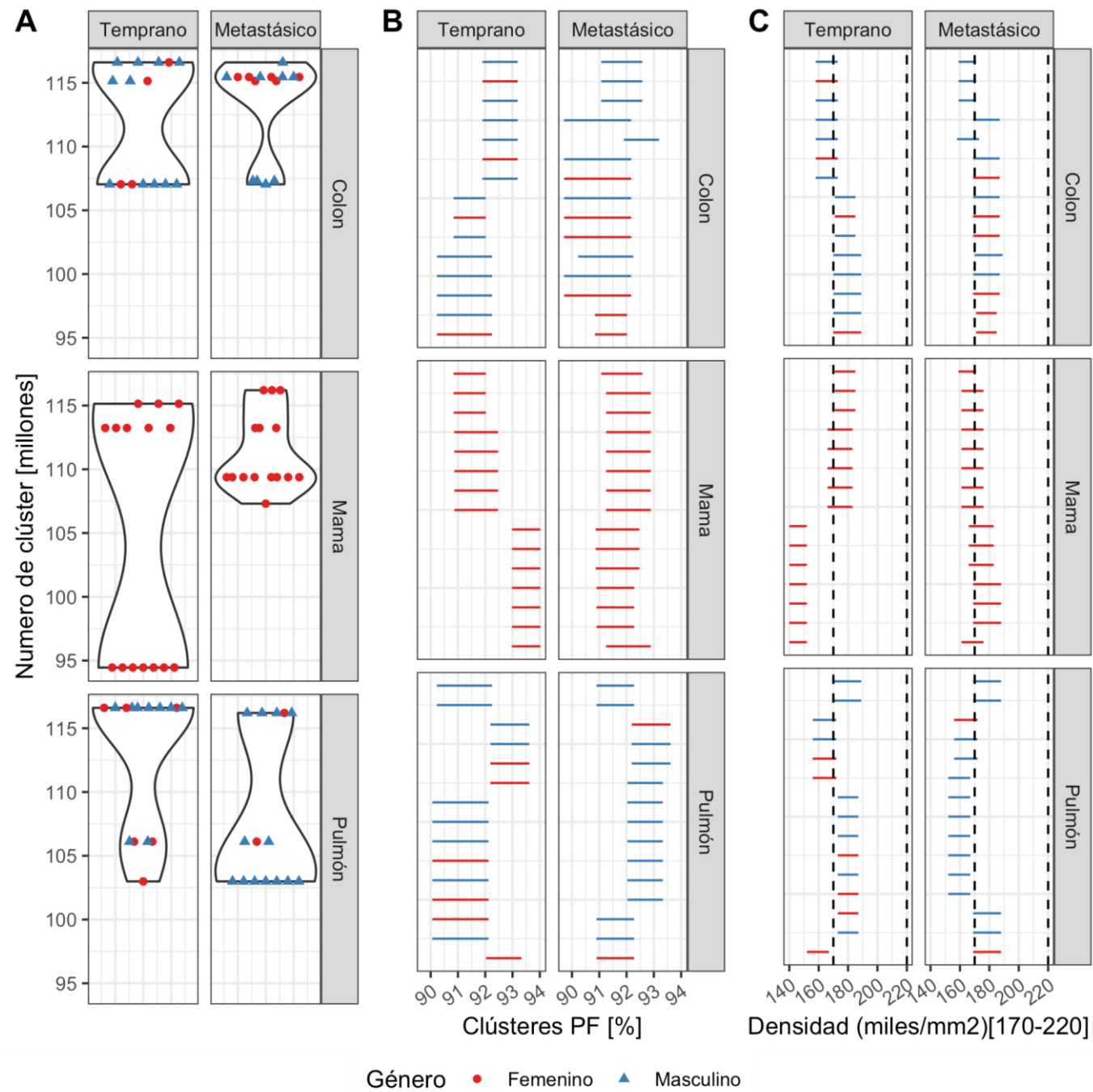


Género • Femenino ▲ Masculino



Género • Femenino ▲ Masculino

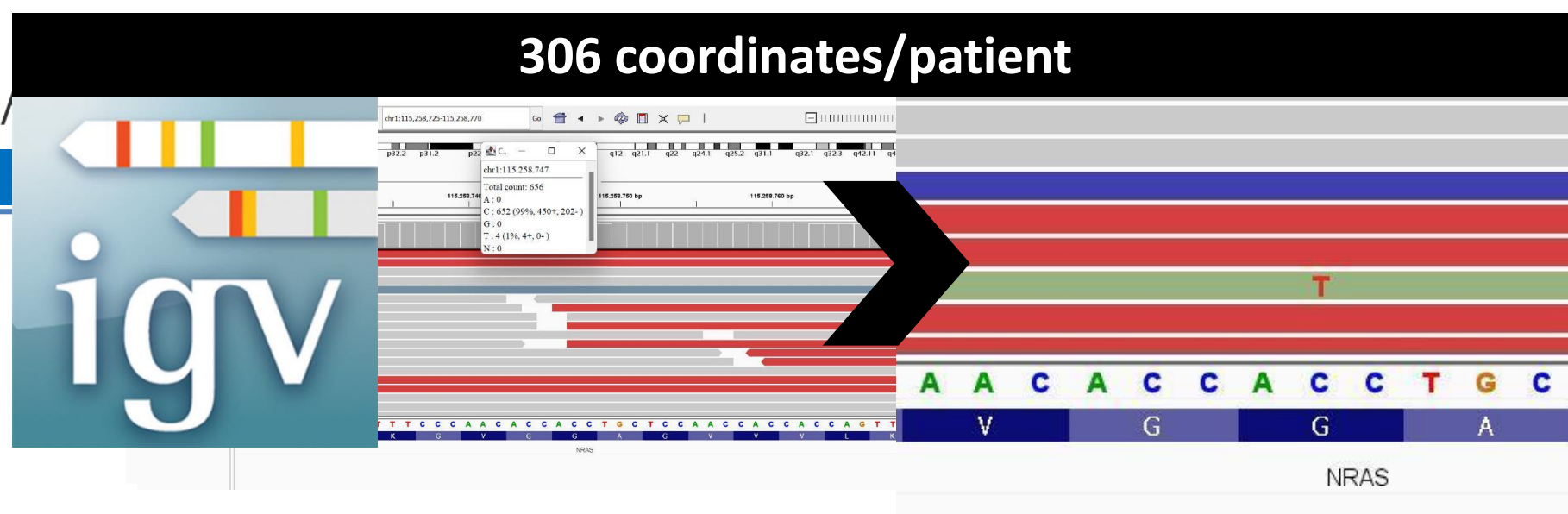






BIOPSIA LIQUIDA

Technical Validation



"TEMPUS

Orders

State: All

☐ Show batches ☒ Show samples

21/07/2022

CPIG015PTG – Global Liquid Biopsy OncoKit

CPIG015PTG Modality: Global Liquid Biopsy OncoKitD

Requests:

Request: Bioinformatics

Shc

Request: Filtering

Open fi

Request: Filtering

Open fi

1 total

version 1.50.0

Serrano CPIG015PT

Diagnosis
Lung cancer

Accession No.
TL-22-3S4RMCZ

xF

FOR RESEARCH USE ONLY

Date of Birth
Unknown

Sex
Not-specified

Authorized by
M. Jose Serrano

Institution
Genyo_Serrano_Lung_30

Study Case ID
CPIG015PT

TEMPUS | xF

105 gene liquid biopsy

cfDNA specimen:
Frozen plasma
Study Sample ID CPI-15
Collected 8/9/2022
Received 8/10/2022

GENOMIC VARIANTS

Biologically Relevant

Variant Allele Fraction

NRAS p.G12D Missense variant (exon 2) - GOF

0.4%

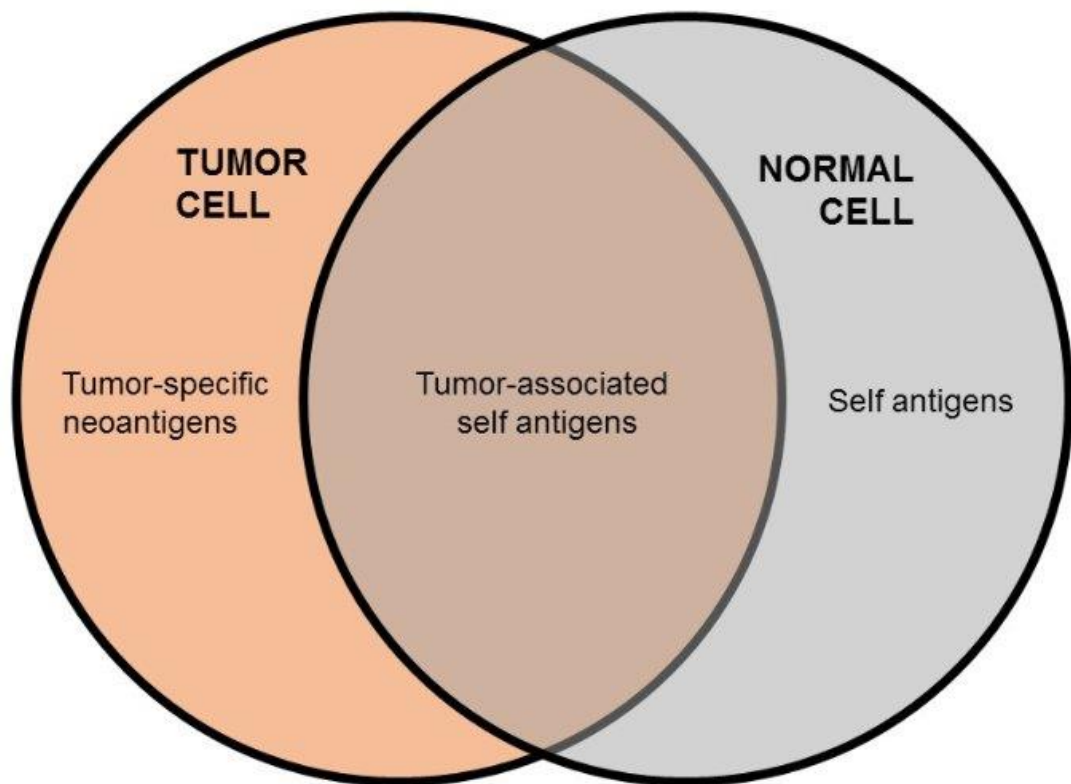
Median Variant Allele Fraction

0.4%

IMMUNOTHERAPY MARKERS

Microsatellite Instability Status

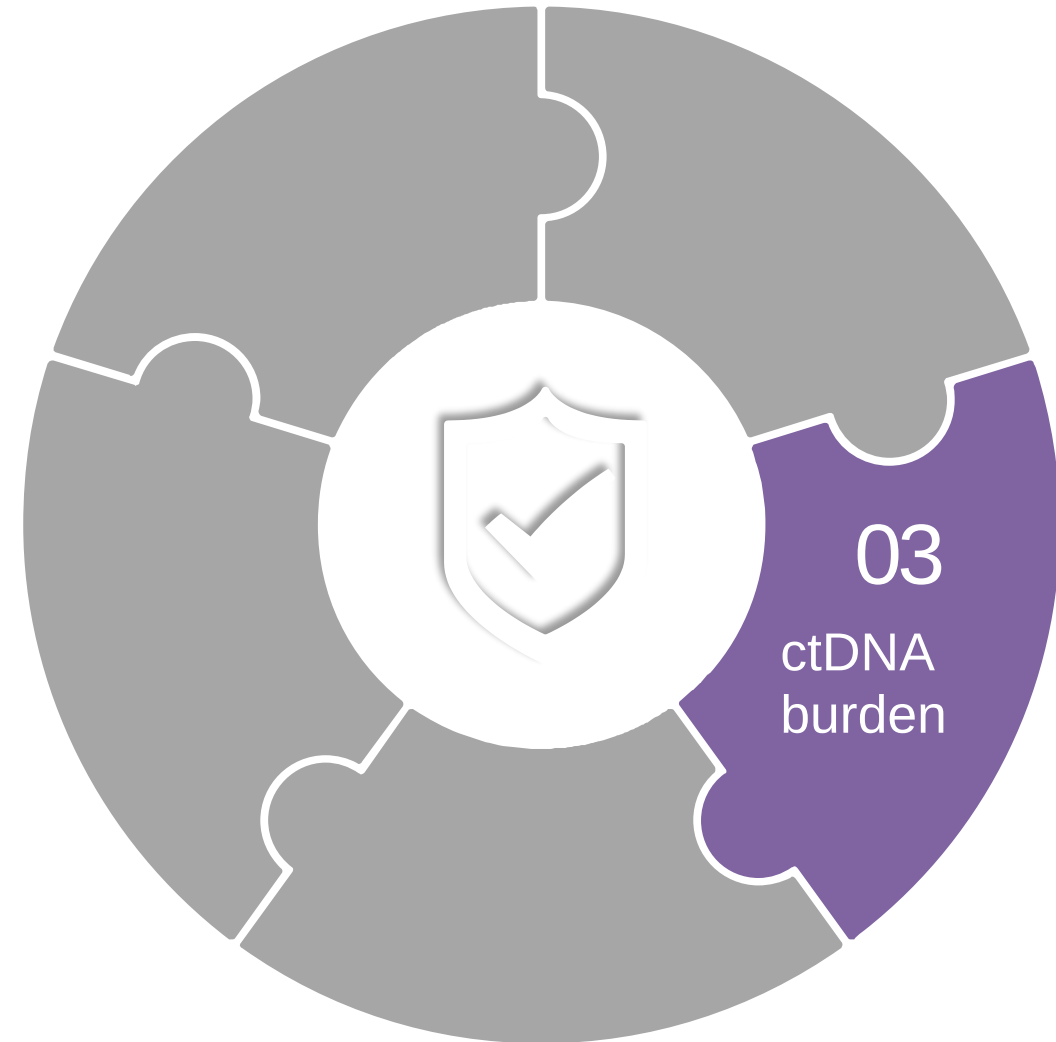
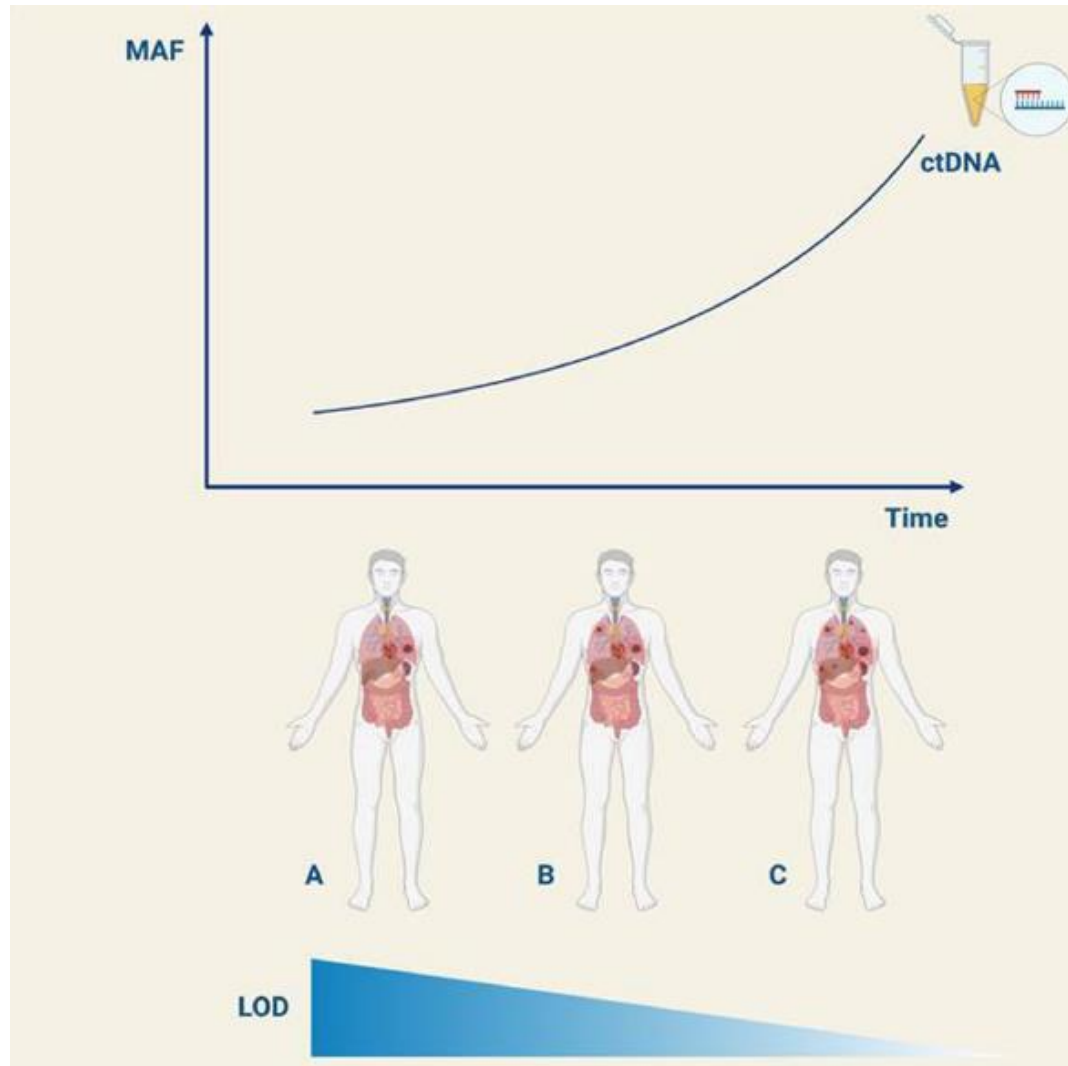
MSI-High not detected

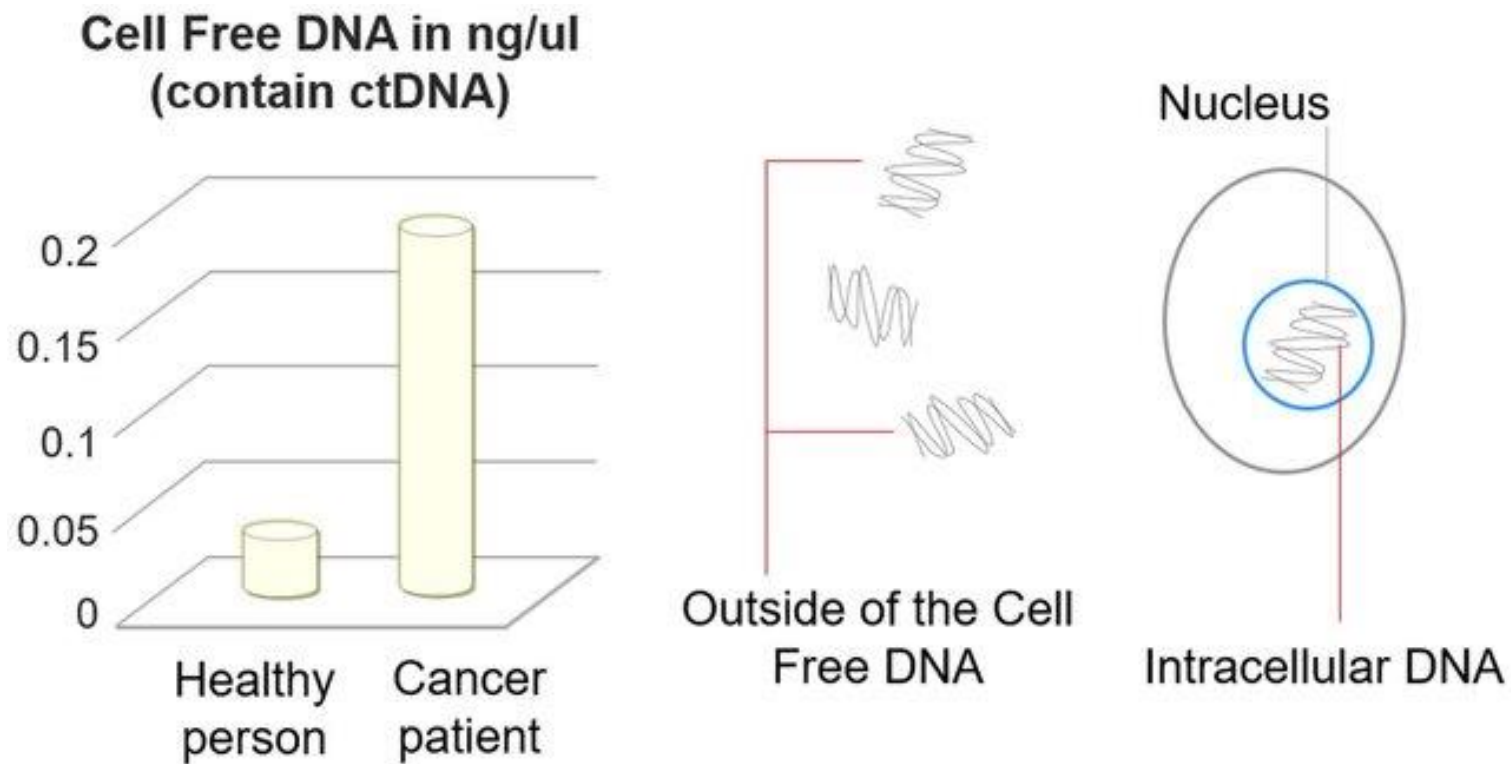




Next generation sequencing for liquid biopsy based testing in non-small cell lung cancer in 2021

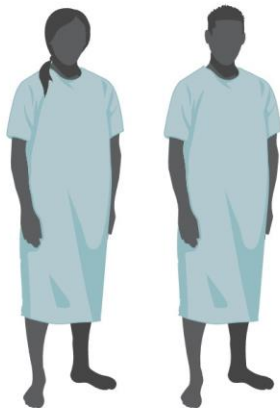
Pasquale Pisapia ^{a,1}, José Luis Costa ^{b,1}, Francesco Pepe ^a, Gianluca Russo ^a,
Gianluca Gragnano ^a, Alessandro Russo ^c, Antonino Iaccarino ^a, Diego de Miguel-Perez ^{d,e}, Maria
José Serrano ^a, Valeria Denninghoff ^f, Luca Quagliata ^b, Christian Rolfo ^e, Umberto Malapelle ^{a,g}





En pacientes con cáncer, los niveles de cfDNA son mucho más altos que en los individuos sanos porque a medida que el tumor aumenta de tamaño, induce tanto a las células sanas adyacentes como a las células tumorales a apoptosis y necrosis.

La cantidad de cfDNA que proviene de las células tumorales (ctDNA) depende de las características de cada tumor como su tamaño, la etapa en la que se encuentra, o su capacidad para invadir el endotelio vascular (Denninghoff y Serrano 2013).



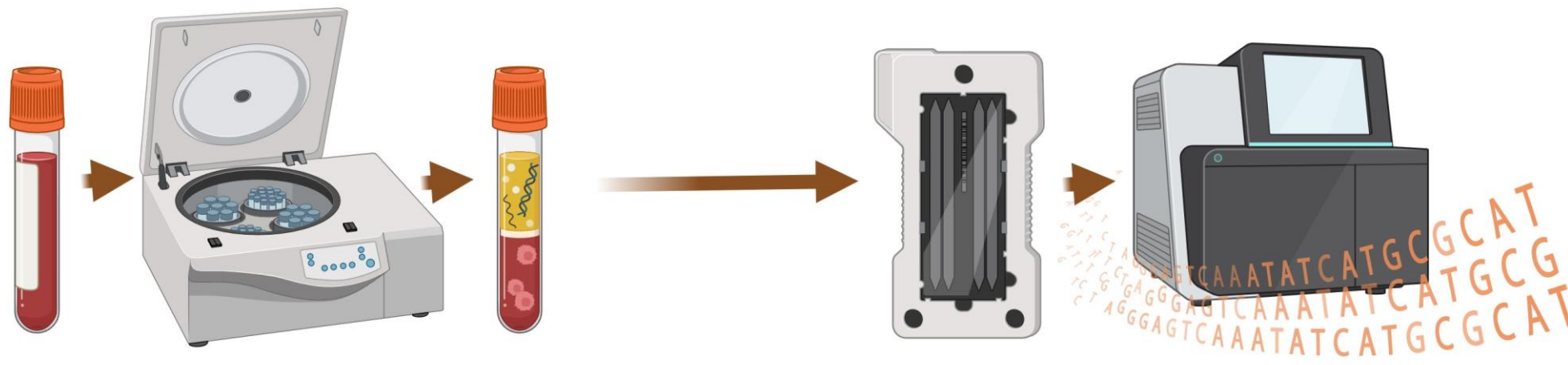
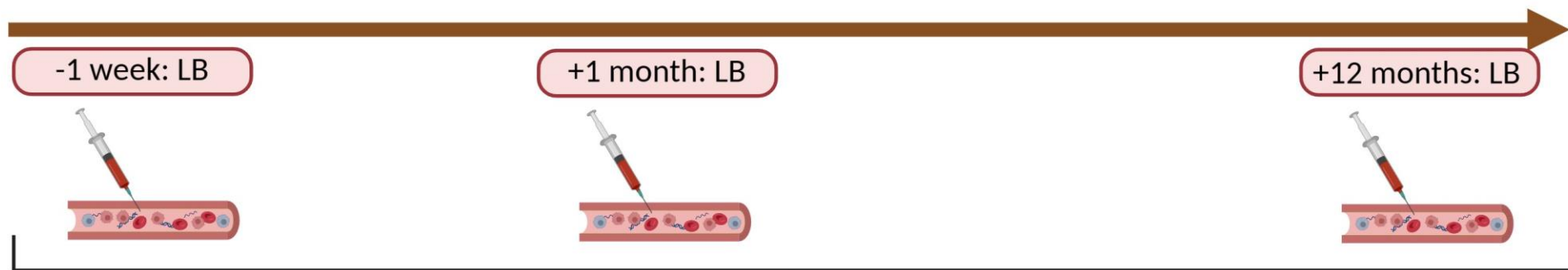
0 day: surgery

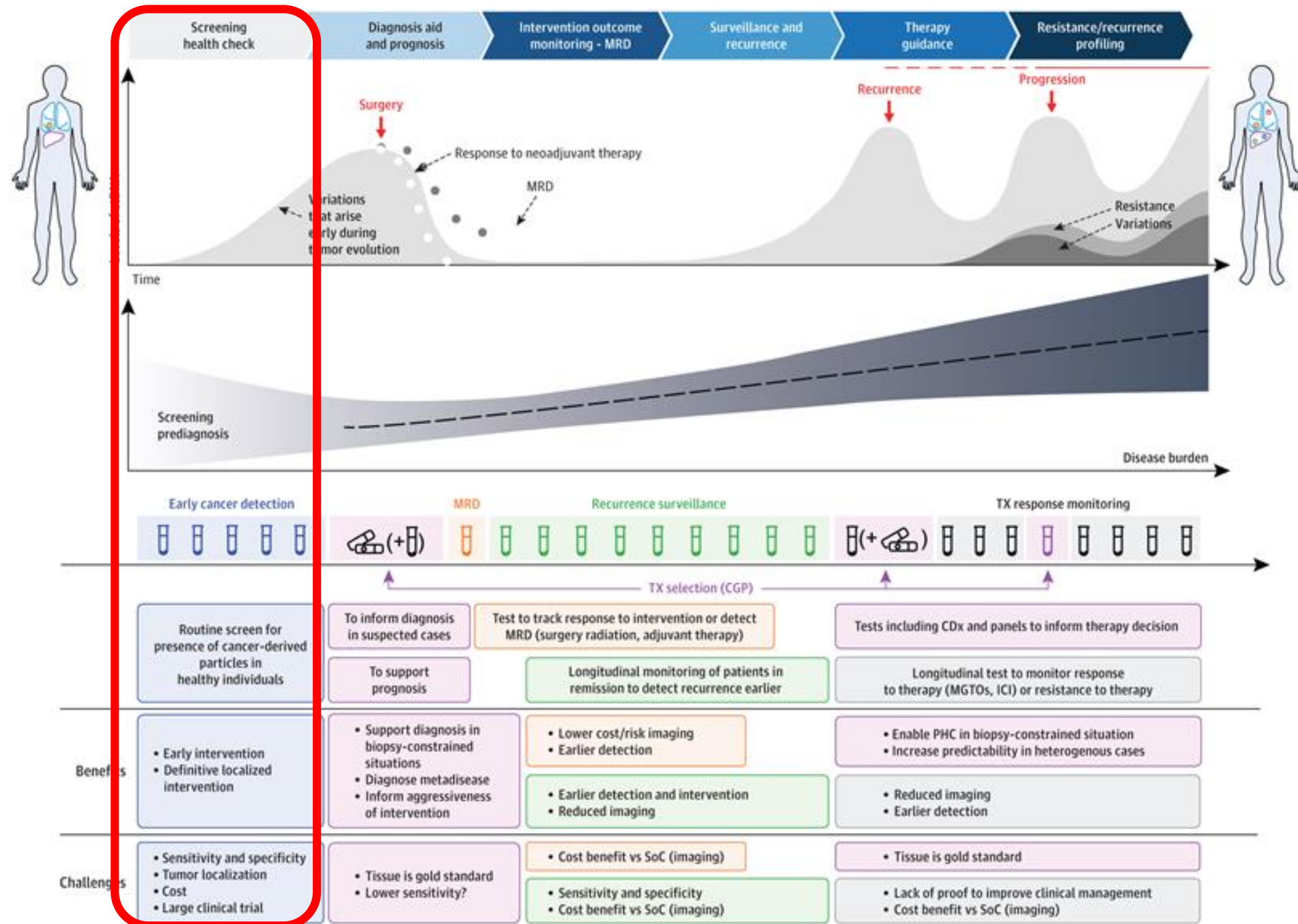


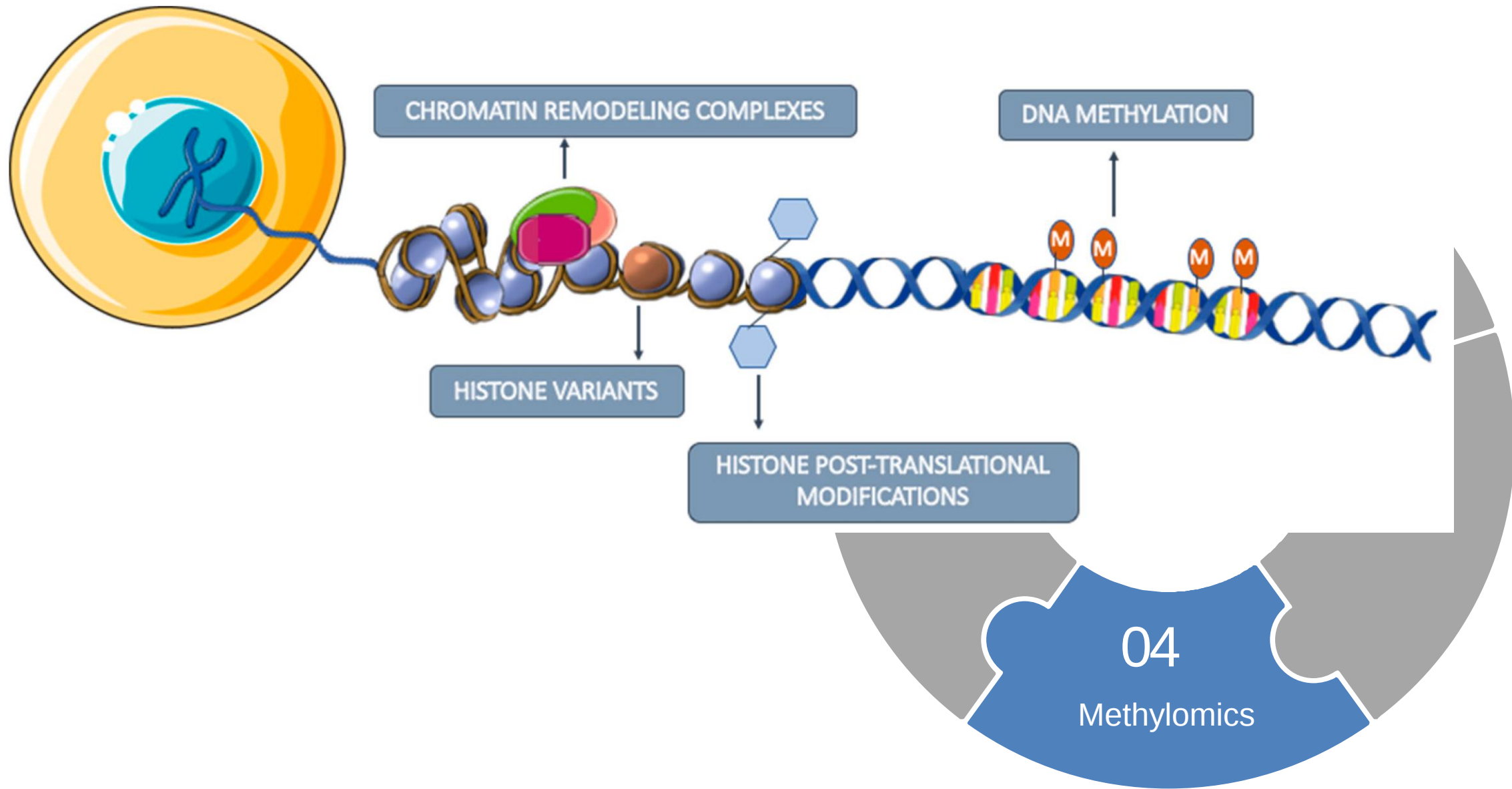
Chapter

Liquid Biopsy

Valeria Denninghoff and Maria Jose Serrano



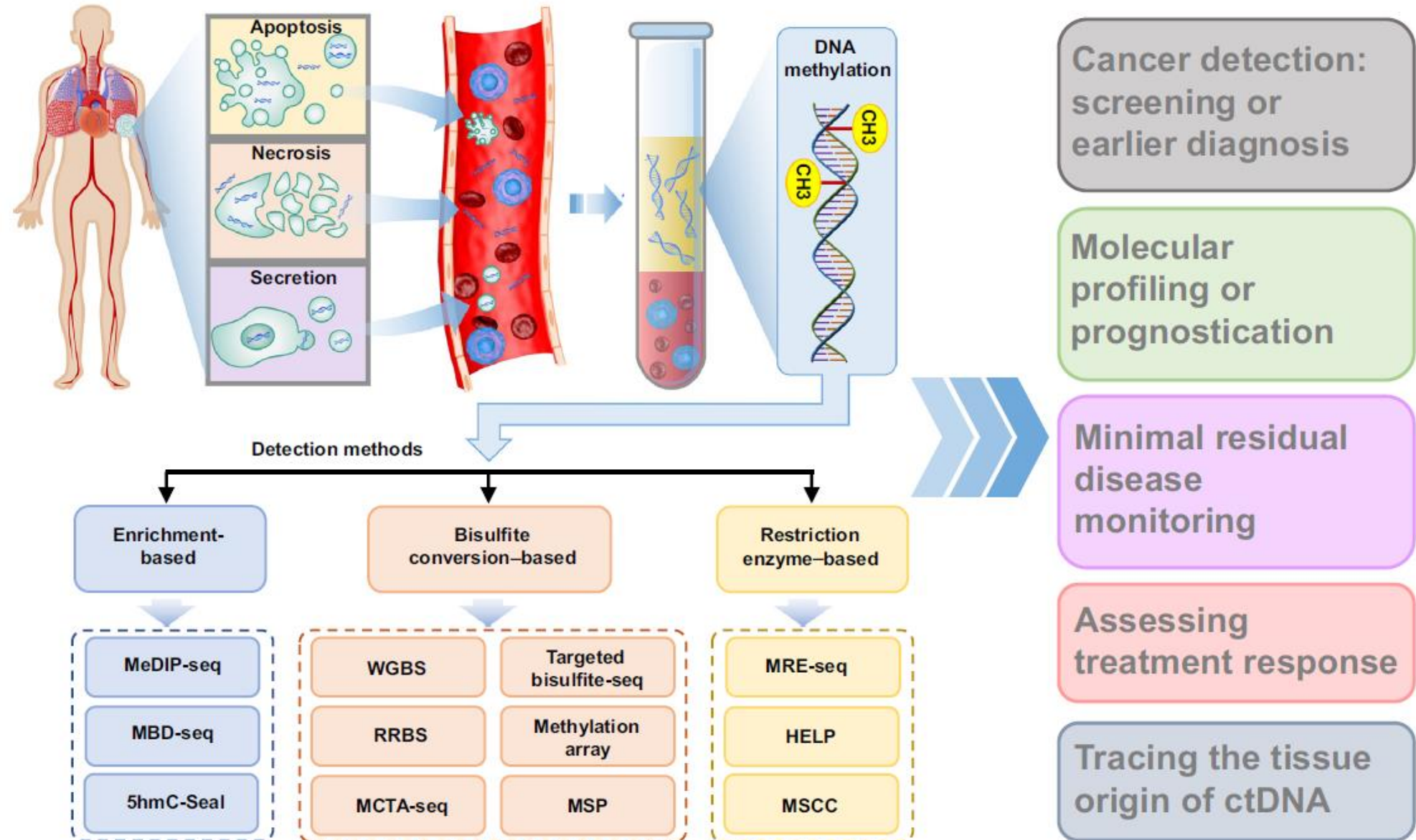


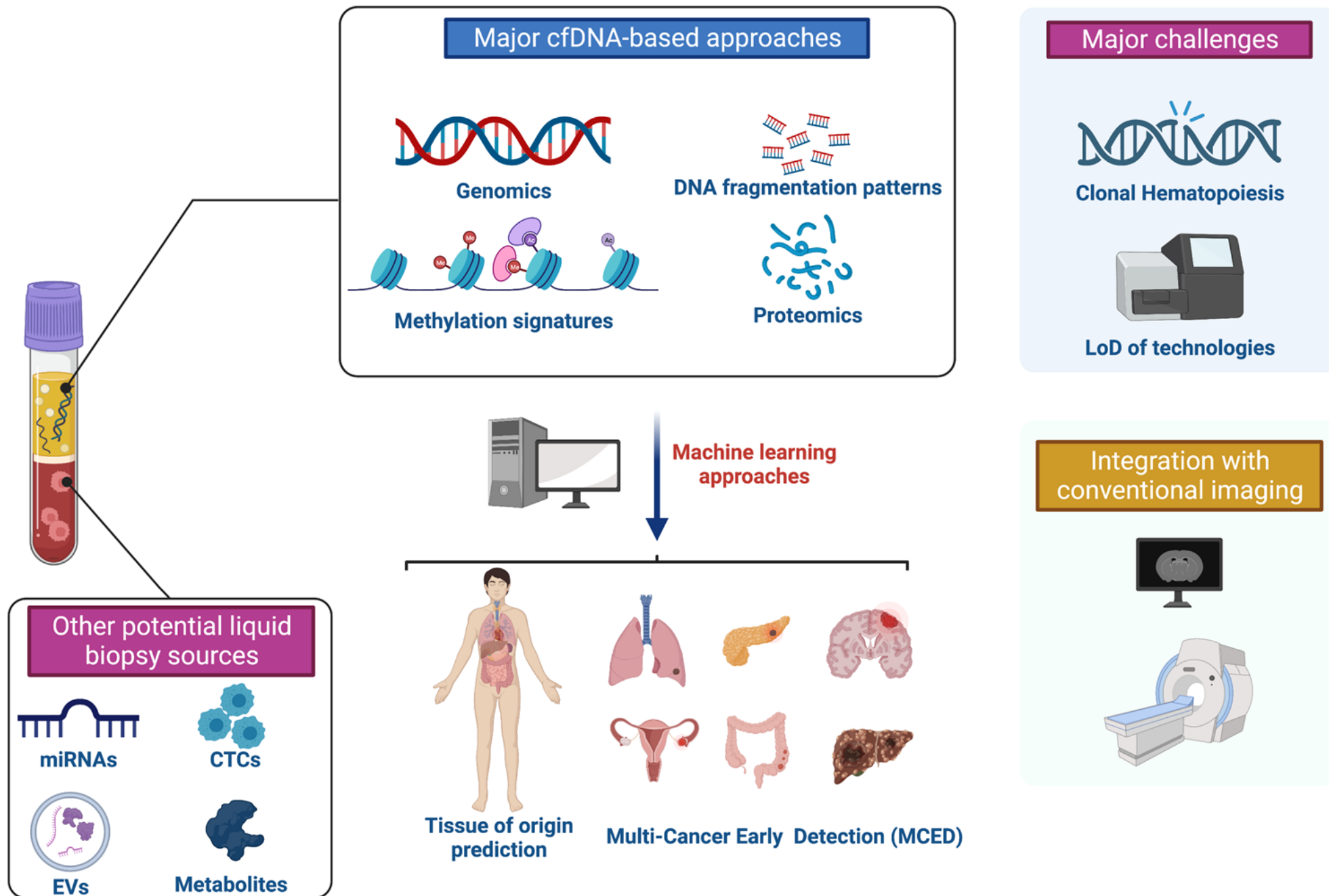


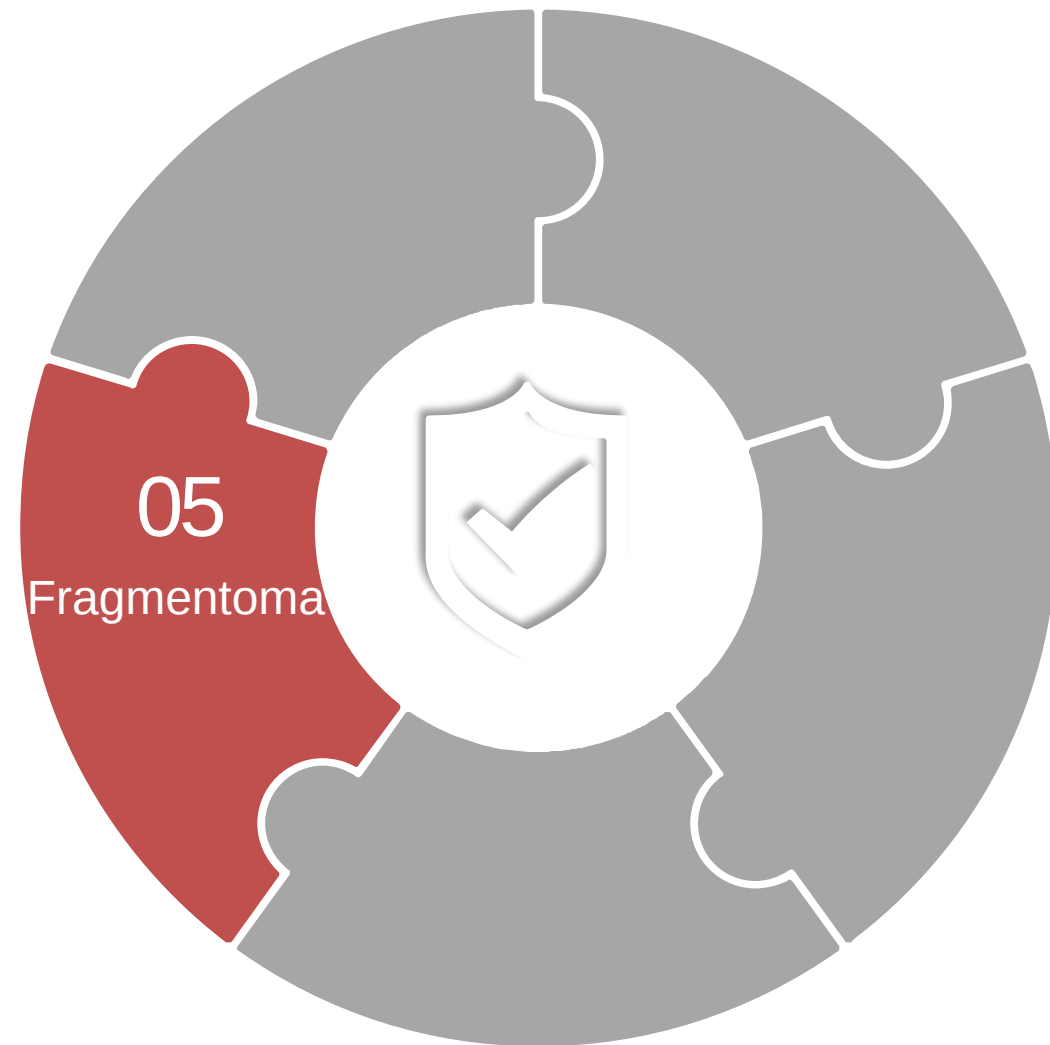
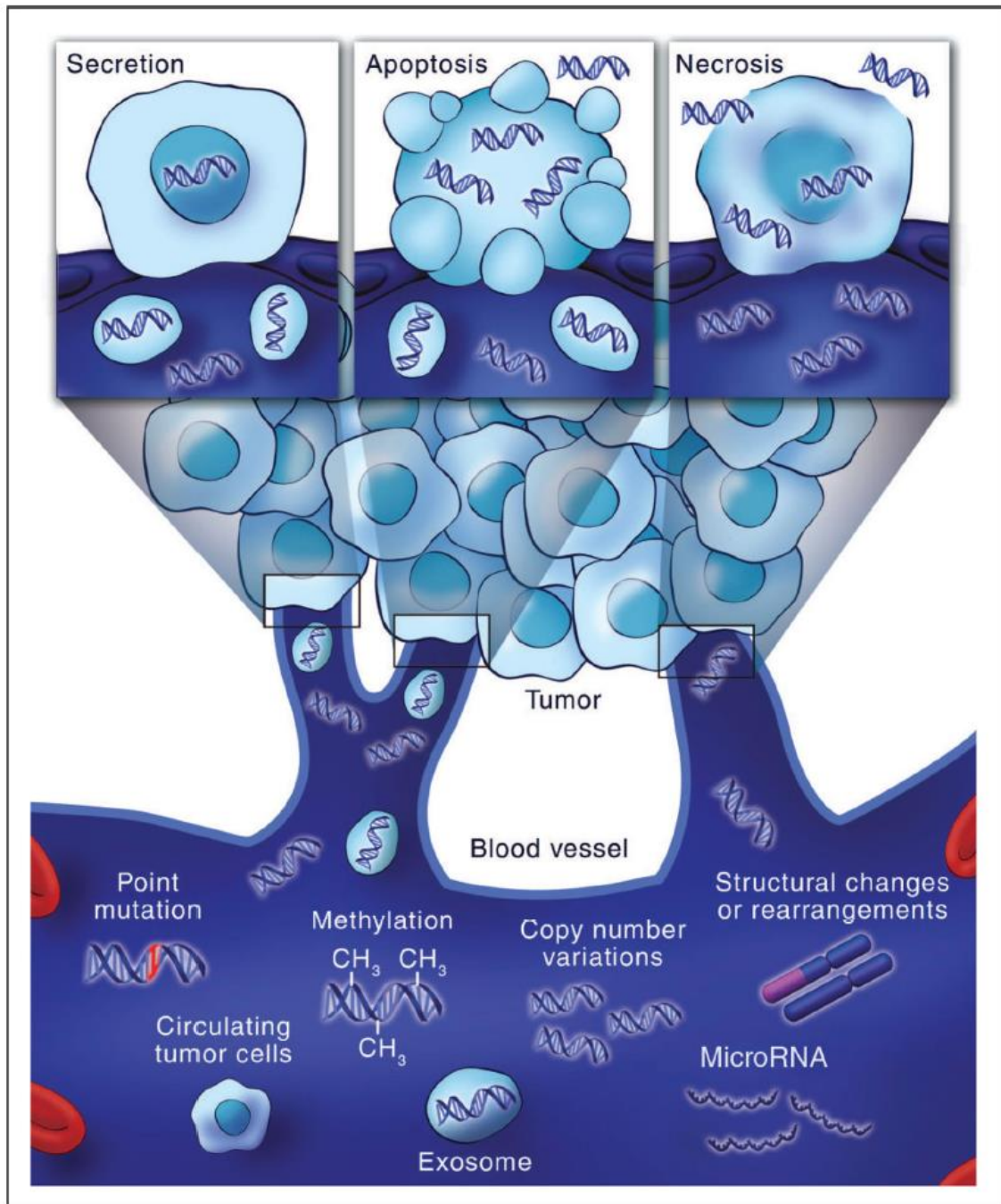
04

Methylomics

Origins of Cell Free Tumor DNA (ctDNA), Technologies for ctDNA Methylation Detection, and Clinical Applications

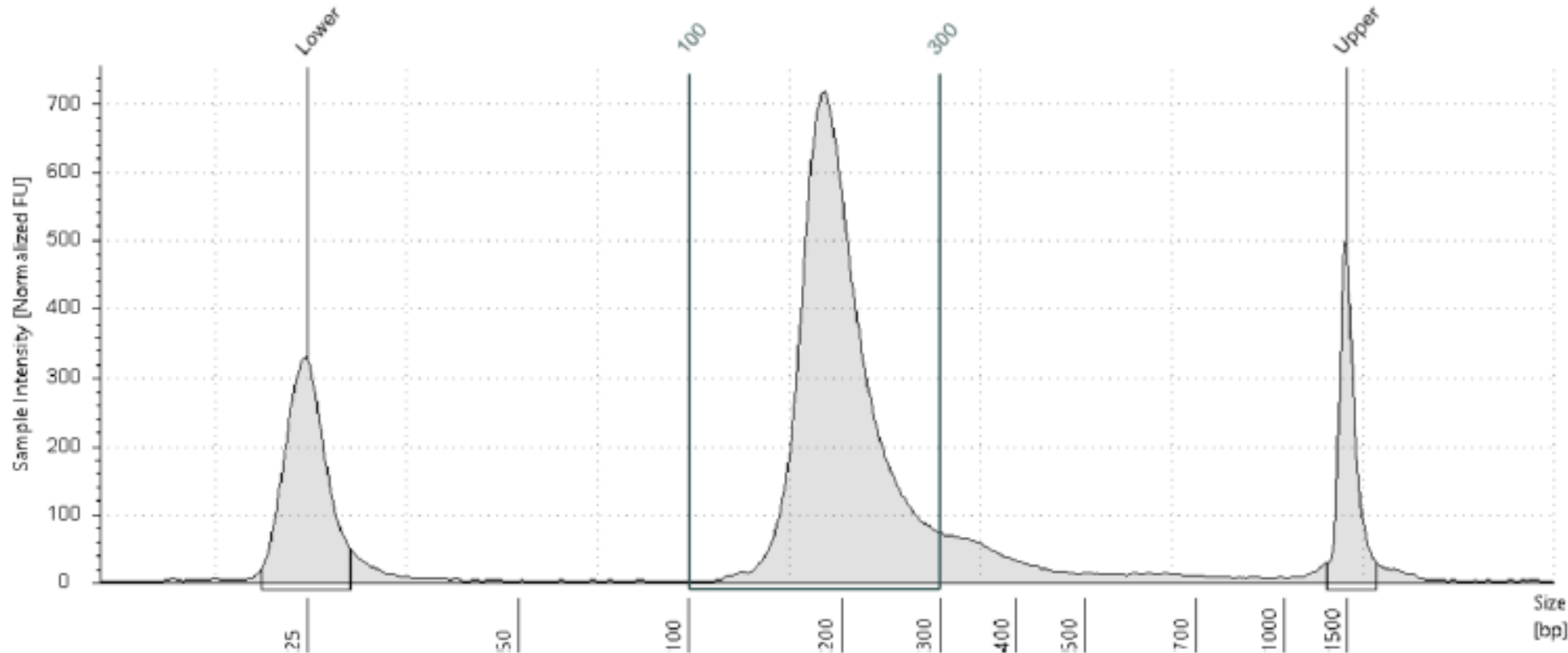






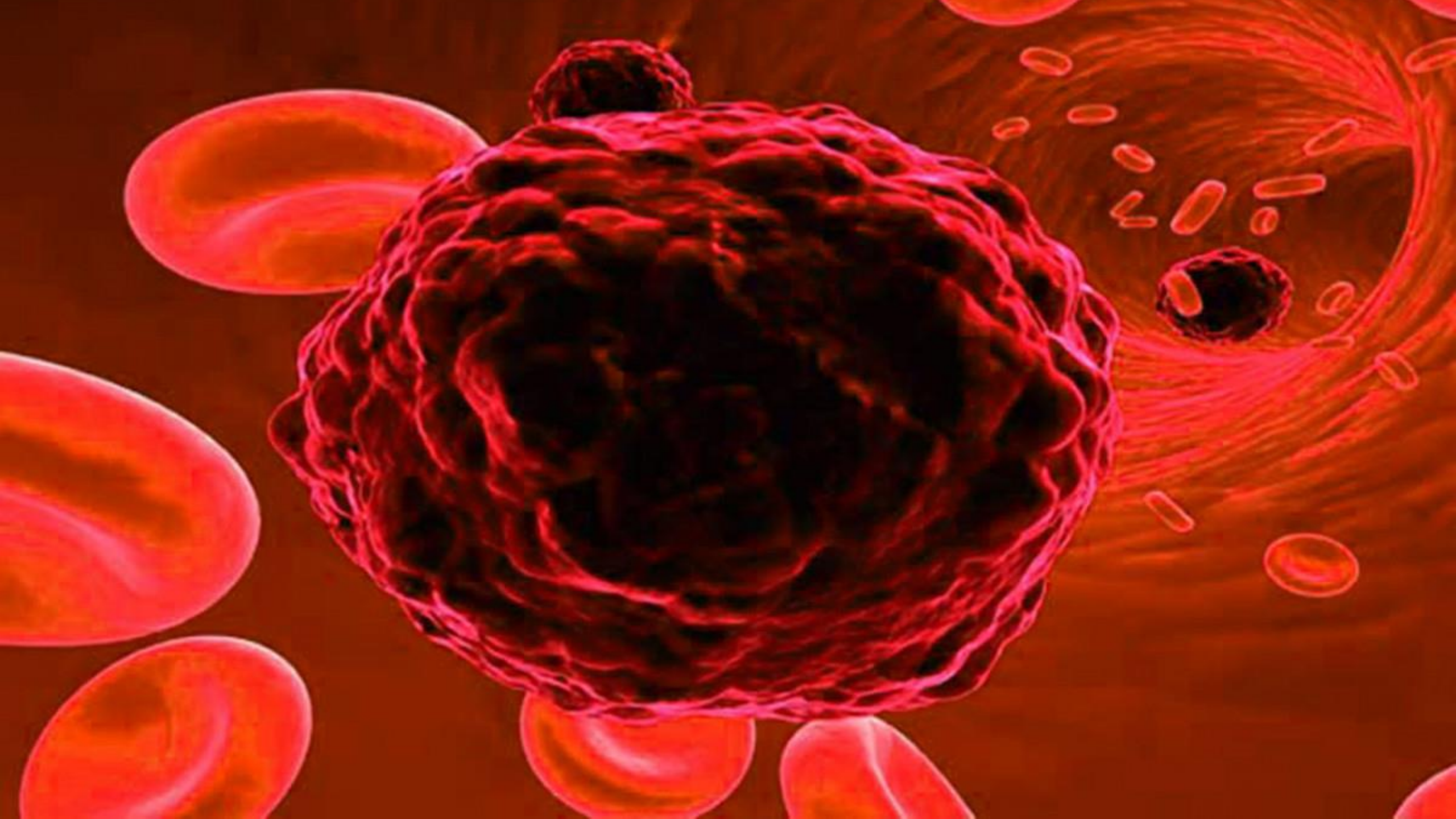
146 pb de ADN dan 1,8 vueltas al octámero de histonas o nucleosomas

E1: CPIS003CTG

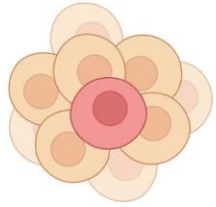


Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Region Molarity [pmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
100	300	203	1420	11100	83.72		

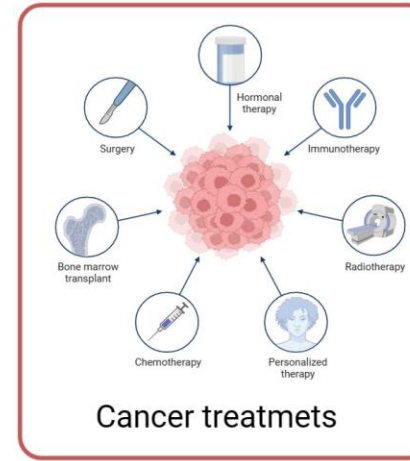
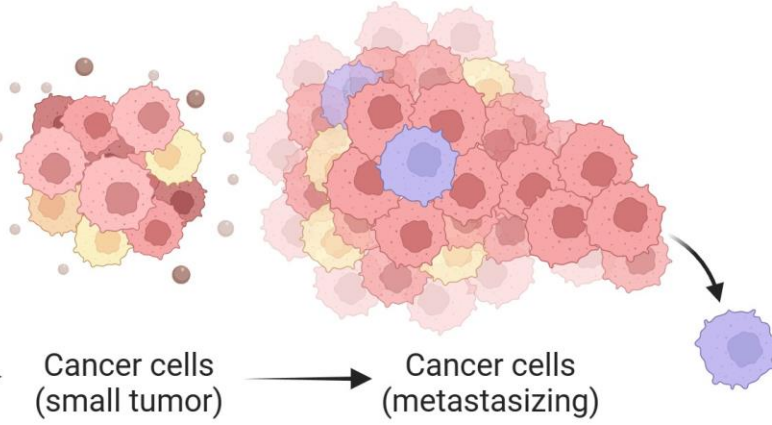


Cancer Interception (CI)

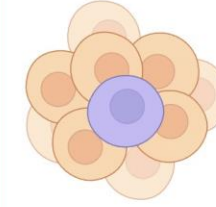


Cancer cell

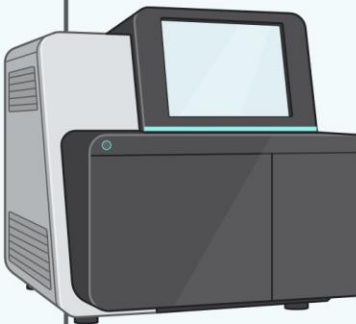
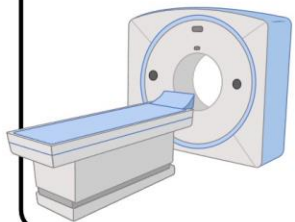
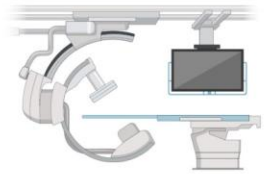
Metastasis Interception (MI)



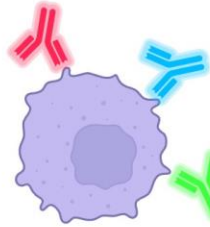
Minima Residual Disease (MRD)



Cancer cell



NGS approach



CTC phenotype



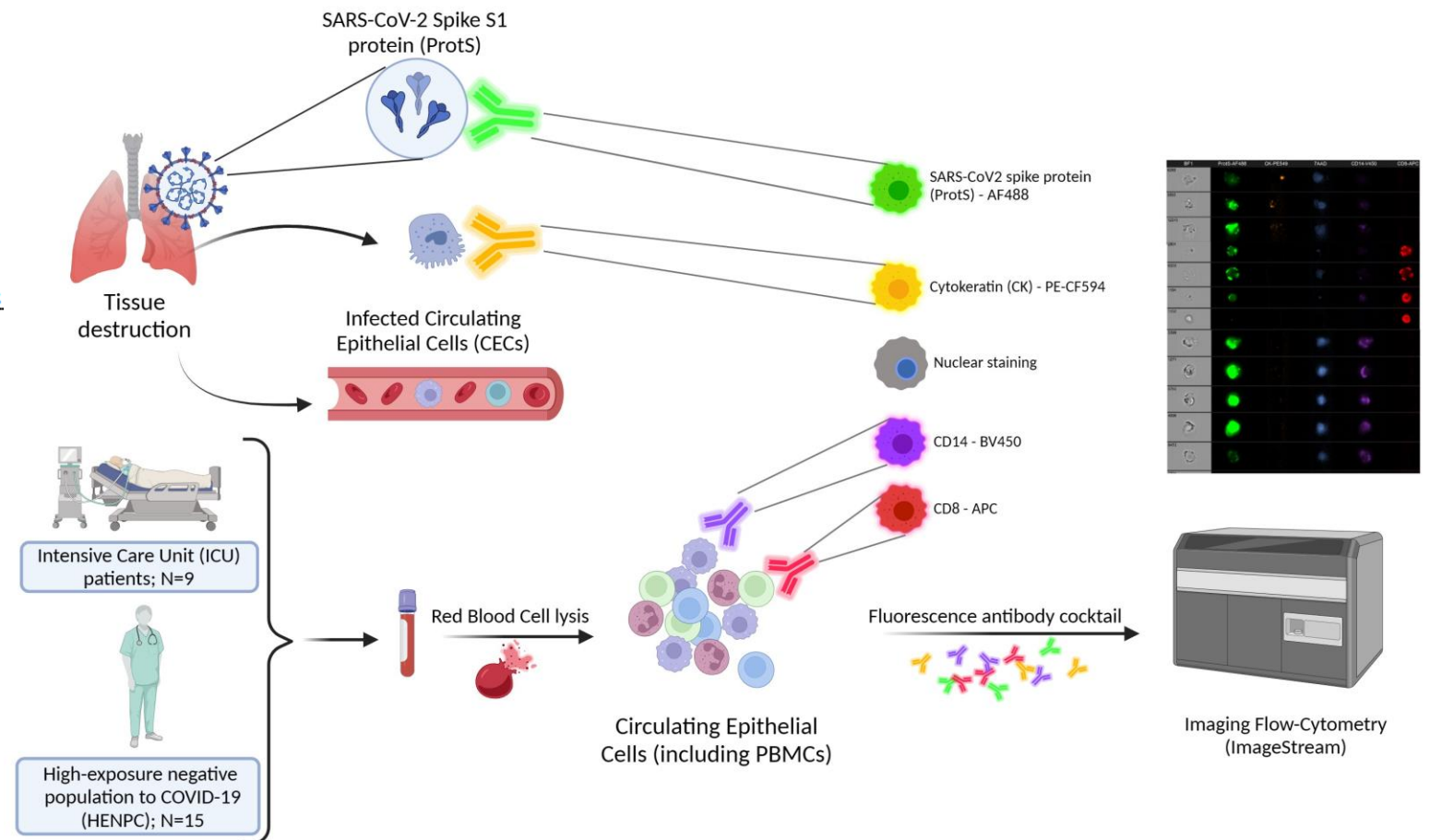
CHAPTER FIVE

Circulating tumor cells in cancer-risk populations as a cancer interception tool

María José Serrano^{a,b,c,*}, Christian Rolfo^d,
José Expósito-Hernández^{a,b,c}, Carmen Garrido-Navas^{b,c},
Javier Lopez-Hidalgo^e, and Valeria Denninghoff^{a,f,*}

Circulating epithelial cell as viral infection and tissue origin mark patients with severe COVID-19

Valeria Denninghoff^{a b 1}  , María del Carmen Garrido-Navas^{a 1},
María del Pilar Molina-Vallejo^{a 1}, Abel García-Díaz^a,
José Miguel Pérez-Villares^{c d}, Manuel Colmenero-Ruiz^{d e},
José Expósito-Hernández^{a f}, José Antonio Lorente-Acosta^{a g},
José María Navarro-María^{d h}, Juan José Díaz-Mochón^{a i},
Diego de Miguel-Perez^j, Christian Rolfo^j, Pedro José Romero-Palacios
Bernardino Alcázar Navarrete^{a l}, María José Serrano^{a d f m}  



Caso Clínico

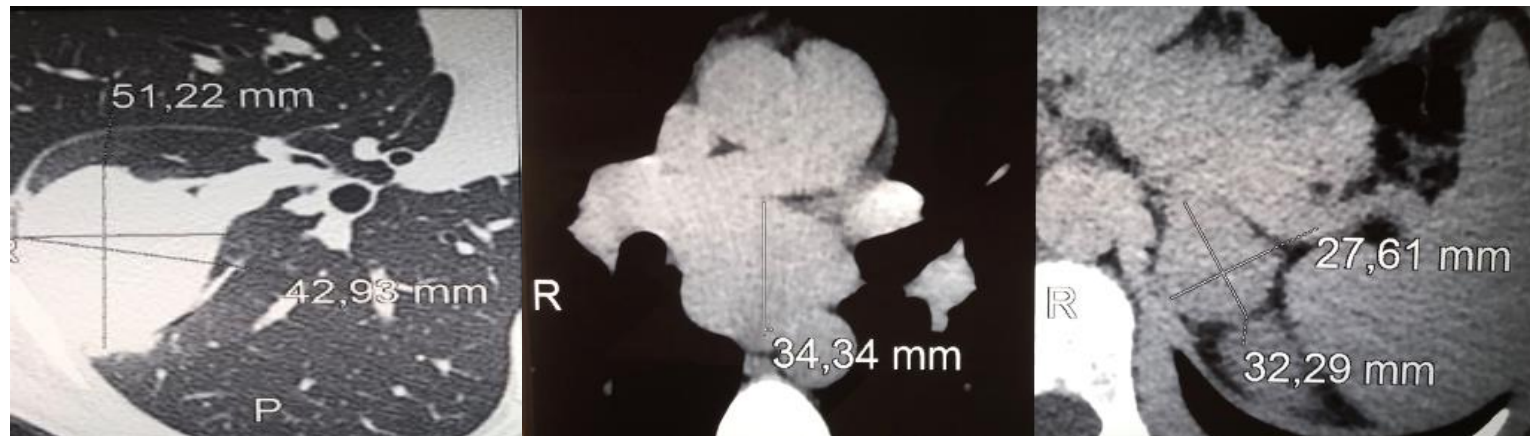


Paciente masculino de 32 años

No tabaquista.

Consulta por dolor abdominal y tos.

- Se realiza ecografía abdominal y radiografía de tórax que informan masa adrenal izquierda y opacidad en base pulmonar derecha respectivamente.
- PET-CT con 18FDG confirma lesión en lóbulo inferior derecho (LID) de 7cm SUVmax 24, adenomegalias mediastinales, retroperitoneales, lesión costal derecha y acetabular izquierda hipercaptantes.



Paciente masculino de 32 años

SERVICIO DE PATOLOGIA

DRA. ALEJANDRA AVAGNINA	DR. BORIS ELSNER	DR. ROBERTO M. IOTTI
DR. ALEJANDRO GARCIA	DR. GABRIEL CASAS	DRA. VALERIA DENNINGHOFF
DRA. MARIA FLORENCIA TORRES	DRA. MARIA DE LOS ANGELES JUAREZ	DRA. MARIA PAULA PEÑALOZA

INFORME HISTOPATOLOGICO

DESCRIPCION MACROSCOPICA

Varios fragmentos pardo claros irregulares que miden en conjunto 2.5 x 2.5 cms.
Se efectuan biopsias intraoperatorias examinandose por separado tacos representativos de los distintos fragmentos detallados en la descripcion macroscopica.

DESCRIPCION MICROSCOPICA

Los ganglios biopsiados presentan extenso reemplazo de su arquitectura por la metastasis de una neoplasia compuesta por celulas grandes, con nucleos claros, de contorno nuclear irregular, con presencia de nucleolos y moderada cantidad de citoplasma claro o focalmente vacuolado. Las celulas se disponen en forma difusa, en nidos y sincios.
Existen numerosas imagenes de mitosis anormales.
Se realizaron determinaciones inmunohistoquimicas siendo positivas en las celulas neoplasicas la citoqueratina AE1-AE3 (que mostro tincion focal) y el TTF1 que fue positivo en numerosos nucleos de las celulas neoplasicas.
El resto de las marcaciones empleadas resultaron negativas:
CD45, CD20, CD3, CD45, CD34 y CD30 (marcadores linfoides)
Sinaptofisina, cromogranina y CD56 (marcadores neuroendocrinos)
Citoqueratinas 7, 20 y 5/6
Vimentina, S100, HMB45 (marcadores para celulas melanicas)
OCT4 y fosfatasa alcalina placentaria (marcadores para origen germinal)
Se realizaron ademas PAX8 y CDX2 que resultaron negativos.
Los hallazgos morfologicos e inmunohistoquimicos corresponden a un carcinoma indiferenciado, compatible con un origen pulmonar.

DIAGNOSTICO

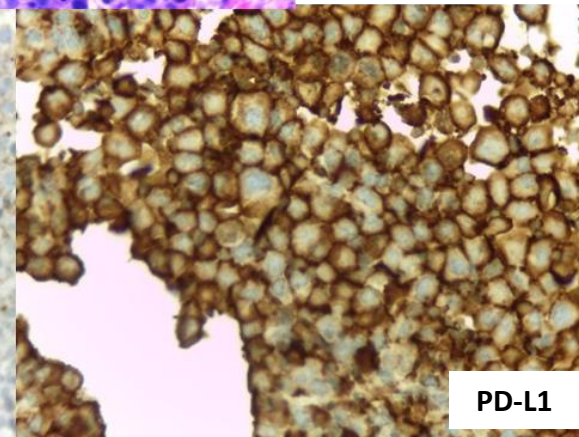
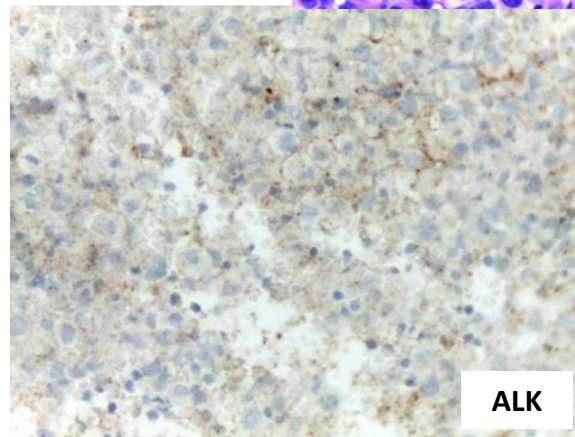
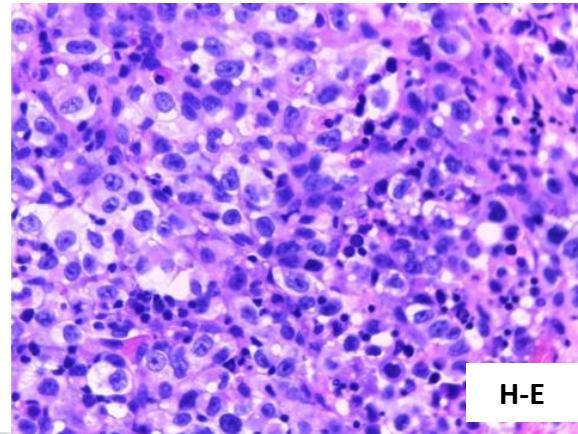
Ganglios mediastinales, biopsia: Carcinoma indiferenciado (lease la descripcion).

MB0103 P1140 T08

- ☐ Biopsia ganglionar por mediastinoscopia (19-01-2017).
- ☐ Carcinoma indiferenciado TTF1+ (T3N3M1c).

Paciente masculino de 32 años

Se realizó determinaciones de ALK y PD-L1 por inmunohistoquímica (Ventana Medical Systems. Inc).



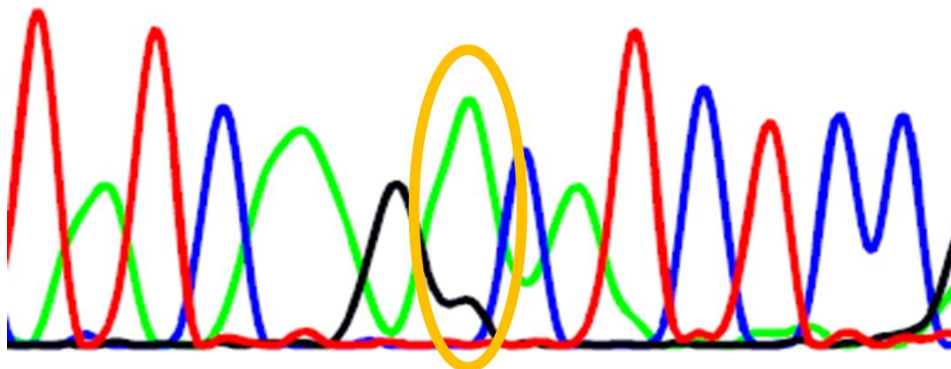
Paciente masculino de 32 años

Se realizó determinaciones de EGFR por PCR (Sanger).

! T A T C ! N N A C A T C T C C
73 85

Doble heterocigota
Deleción del exón 19

delE746_A750
+
del L747_T751insQ



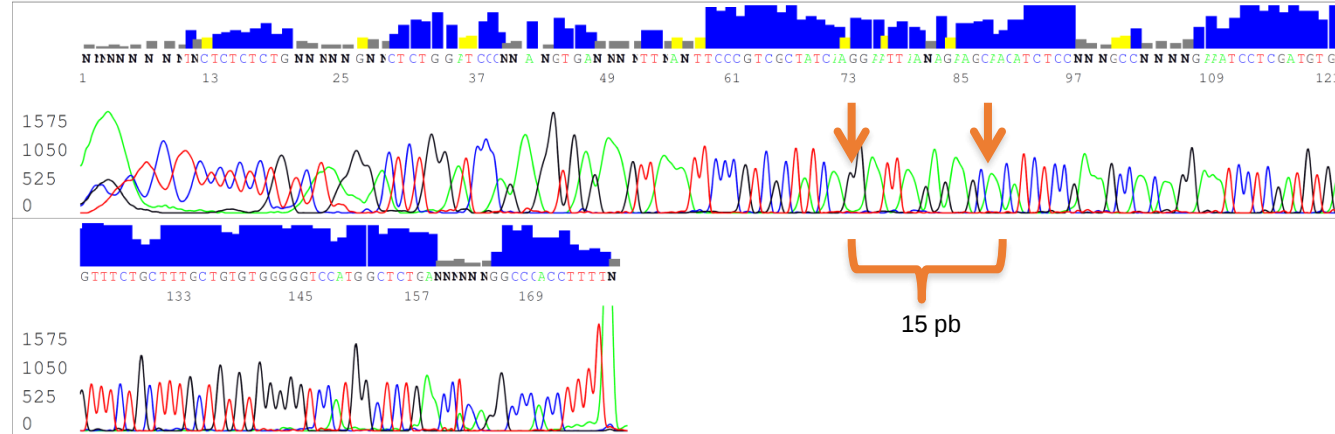
Ganglio FFPET

AB Applied Biosystems

S/N G:131 A:75 T:71 C:63
KB.bcp
KB 1.4.0 Cap:7

223-647840-EGFR19-FW2-2-17-9-42 PM
223-647840-EGFR19-FW
KB_310_POP4_BDTv3_36Rapid.mob
Pts 1534 to 3336 Pk1 Loc:1534
Version 5.3.1 HiSQV Bases: 130

Inst Model/Name 310 /ABI PRISM 310
Feb 02,2017 09:42PM, ACT
Feb 02,2017 09:58PM, ACT
Spacing:9.81 Pts/Panel1500
Plate Name: Unassigned



Doble heterocigota
Delección del exón 19

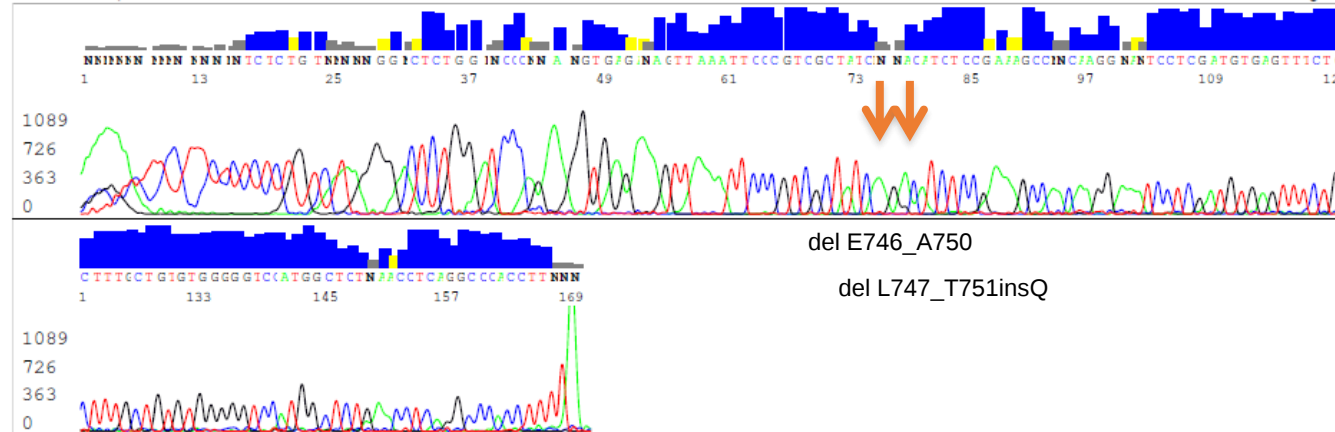
delE746_A750
+
del L747_T751insQ

AB Applied Biosystems

S/N G:34 A:21 T:19 C:19
KB.bcp
KB 1.4.0 Cap:17

506-649821-EGFR19-FW3-10-17-3-59 AM
506-649821-EGFR19-FW
KB_310_POP4_BDTv3_36Rapid.mob
Pts 1517 to 3218 Pk1 Loc:1517
Version 5.3.1 HiSQV Bases: 121

Inst Model/Name 310 /ABI PRISM 310
Mar 10,2017 03:59AM, ACT
Mar 10,2017 04:16AM, ACT
Spacing:9.47 Pts/Panel1500
Plate Name: Unassigned



Paciente masculino de 32 años

Se efectuó NGS con panel Oncomine™ Focus Assay (Ion 520 Chip).

Oncomine® Cancer Panel Gene List

Hotspot genes, n=37

AKT1	IDH2
ALK	JAK1
AR	JAK2
ARAF	JAK3
BRAF	KIT
CDK4	KRAS
CTNNB1	MAP2K1
DDR2	MAP2K2
EGFR	MET
ERBB2	MTOR
ERBB3	NRAS
ERBB4	PDGFRA
ESR1	PIK3CA
FGFR2	RAF1
FGFR3	RET
GNA11	ROS1
GNAQ	SMO
HRAS	TERT
IDH1	

Copy Number Variants, n=19

ALK	FGFR3
AR	FGFR4
BRAF	KIT
CCND1	KRAS
CDK4	MET
CDK6	MYC
EGFR	MYCN
ERBB2	PDGFRA
FGFR1	PIK3CA
FGFR2	

Fusion drivers, n=23

ABL1	FGFR2
AKT3	FGFR3
ALK	MET
AXL	NTRK1
BRAF	NTRK2
ERG	NTRK3
ETV1	PDGFRA
ETV4	PPARG
ETV5	RAF1
EGFR	RET
ERBB2	ROS1
FGFR1	

RNA Panel

DNA Panel

Paciente masculino de 32 años

Resumen de la variante

Tipo de cáncer de muestra: Carcinoma pulmonar no microcítico

- ☒ En este tipo de cáncer ☐ En otro tipo de cáncer ☒ En este tipo de cáncer y en otros tipos de cáncer ☒ Contraindicado ☒ Tanto para uso como contraindicado ☒ Sin pruebas (sin indicios)

Variante del gen	US-FDA	EMA
EGFR p.(L747_T751delinsQ) c.2239_2252delTTAAGAGAAGCAACinsCA	☒ (3)	☒ (4)
EGFR p.(E746_A750del) c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA	☒ (3)	☒ (4)

US-FDA: Agencia estadounidense de alimentos y medicamentos (FDA), EMA: Agencia europea de medicamentos (EMA). Los números entre paréntesis indican el número de tratamientos correspondientes con pruebas.

Paciente masculino de 32 años

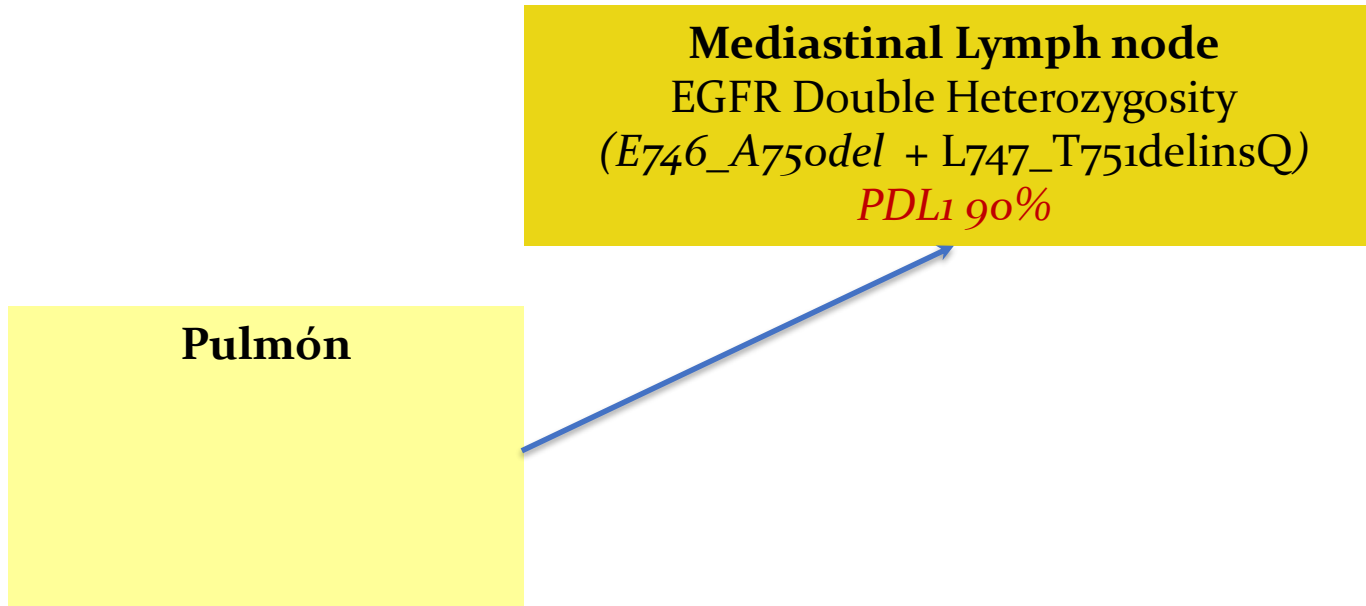
Variantes de secuencia de ADN

Gen	Cambio de aminoácidos	Codificación	ID de la variante	Locus	Frecuencia de alelo	Transcripto	Efecto de la variante
EGFR	p.(E746_A750del)	c.2236_2250delGAA TTAAGAGAAGCA	COSM6225	chr7:55242465	85.55%	NM_005228.3	nonframeshift Deletion
EGFR	p. (L747_T751delinsQ)	c.2239_2252delTTAA GAGAAGCAACinsCA	COSM12420	chr7:55242469	82.68%	NM_005228.3	nonframeshift Block Substitution
ALK	p.(D1529E)	c.4587C>G	.	chr2:29416366	100.00%	NM_004304.4	missense
ALK	p.(I1461V)	c.4381A>G	.	chr2:29416572	100.00%	NM_004304.4	missense
ALK	p.(=)	c.4338C>T	.	chr2:29416615	53.95%	NM_004304.4	synonymous
EGFR	p.(=)	c.2361G>A	.	chr7:55249063	9.61%	NM_005228.3	synonymous
FGFR3	p.(=)	c.1953G>A	.	chr4:1807894	99.02%	NM_000142.4	synonymous
FGFR4	p.(P136L)	c.407C>T	.	chr5:176517797	100.00%	NM_213647.1	missense
FGFR4	p.(=)	c.483A>G	.	chr5:176517985	11.76%	NM_213647.1	synonymous
JAK1	p.(=)	c.2097C>G	.	chr1:65311214	51.13%	NM_002227.2	synonymous
MAP2K1	p.(A76fs)	c.226_227insG	.	chr15:66727505	21.45%	NM_002755.3	frameshift Insertion
PDGFRA	p.(=)	c.1701A>G	.	chr4:55141055	100.00%	NM_006206.4	synonymous
PDGFRA	p.(=)	c.2472C>T	.	chr4:55152040	50.49%	NM_006206.4	synonymous
RET	p.(=)	c.2307G>T	.	chr10:43613843	49.95%	NM_020975.4	synonymous
RET	p.(=)	c.2712C>G	.	chr10:43615633	50.98%	NM_020975.4	synonymous

Doble heterocigota
Deleción del exón 19

delE746_A750
+
del L747_T751insQ

Paciente masculino de 32 años



Paciente masculino de 32 años

Inició tratamiento con Afatinib 40mg/día y Denosumab.

Afatinib es un Inhibidor de la Tirosin Kinasa (TKI) del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) para el tratamiento del carcinoma pulmonar no microcítico metastásico (mutación EGFR positivo).

SE DESCONOCE RESPUESTA A LA DOBLE HETEROCIGOSIS.

Denosumab es un anticuerpo monoclonal humano (IgG2) que se dirige y se une con gran afinidad y especificidad al RANKL, impidiendo la activación de su receptor, RANK, en la superficie de los precursores de los osteoclastos y en los osteoclastos.

Paciente masculino de 32 años

Respuesta parcial y beneficio clínico a 6 semanas.

➤ Continúa Afatinib y Denosumab.

Paciente masculino de 32 años

Al 4to mes evoluciona con epistaxis.

➤ Fibrobroncoscopía del LID (27/04/2017).

SERVICIO DE PATOLOGIA

DRA. ALEJANDRA AVAGNINA
DR. ALEJANDRO GARCÍA
DRA. MARIA FLORENCIA TORRES

DR. BORIS ELSNER
DR. GABRIEL CASAS
DRA. MARIA DE LOS ANGELES
JUAREZ

DR. ROBERTO M. IOTTI
DRA. VALERIA DENNINGHOFF
DRA. MARIA PAULA PEÑALOZA

INFORME HISTOPATOLOGICO

DESCRIPCION MACROSCOPICA

Varios fragmentos pardo claros, con areas pardo rojizas, que en conjunto miden entre 1.5 x 1.5 cms.

DESCRIPCION MICROSCOPICA

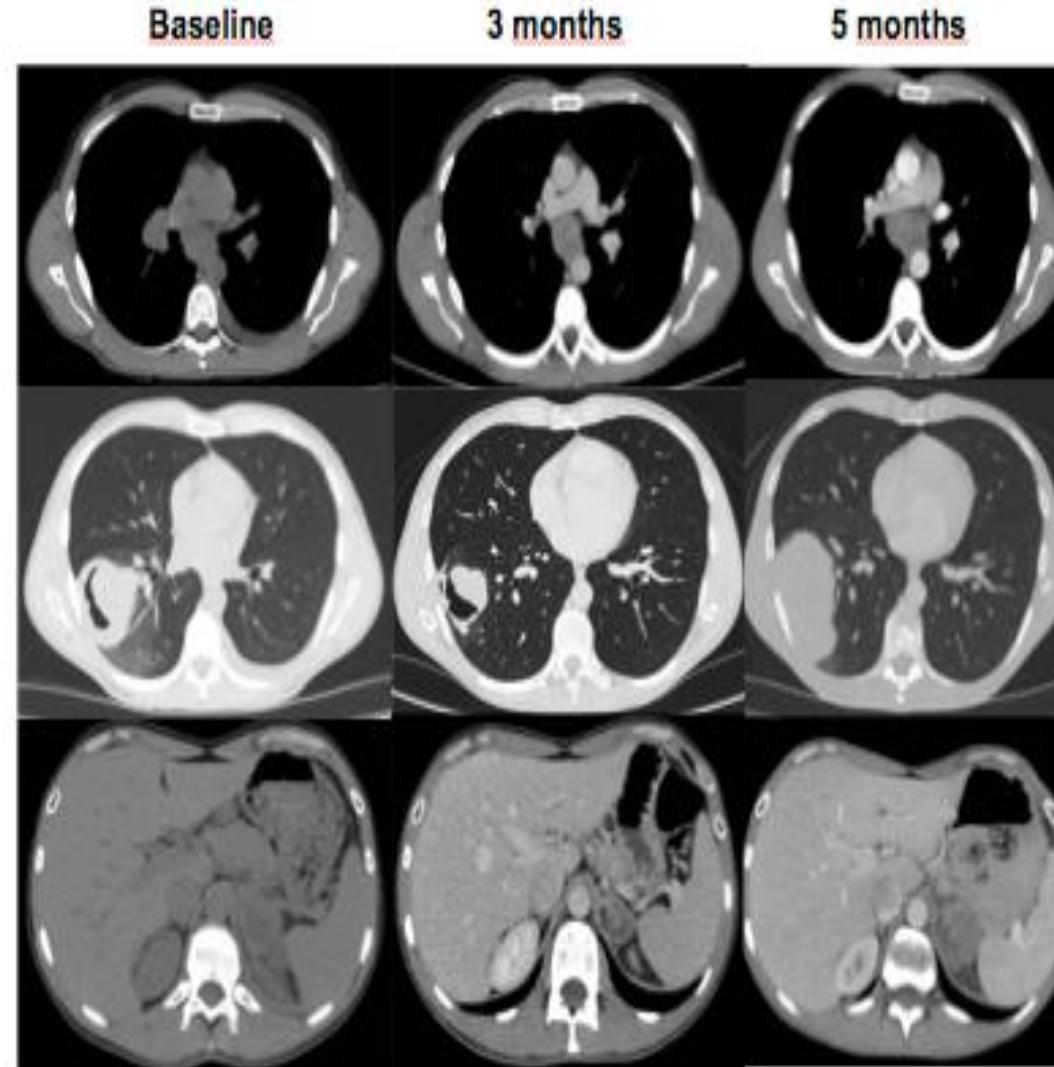
Los cortes muestran extensa necrosis tumoral en la que se reconocen muy escasas celulas neoplasicas viables con nucleos hiperromaticos, presencia de nucleolo y escaso citoplasma.

DIAGNOSTICO

Pulmon (lobulo inferior derecho), biopsia bronquial directa: Carcinoma pobremente diferenciado con extensa necrosis tumoral.

M98200 P1140 T28

Paciente masculino de 32 años



Paciente masculino de 32 años

Se confirma mutación de resistencia T790M en Biopsia Líquida (COBAS).

SERVICIO DE PATOLOGIA

Dra. Alejandra Avegnina
M.N. 50313

Dr. Boris Eisner
M.N. 25896

Dr. Roberto M. Iotti
M.N. 25354

Dra. Valeria C Denninghoff
M.N. 8787

ESTADO MUTACIONAL EGFR COBAS®EGFR (En Biopsia Líquida)

TECNICA

Prueba de mutación en COBAS-EGFR v2. Ensayo de PCR en tiempo real diseñado para la detección e identificación cualitativa de mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El kit MD detecta la mutación G719X (G719A, G719C, G719S) del exón 18; deleciones del exón 19; las mutaciones S768I, T790M e inserciones del exón 20; y las mutaciones L858R y L861Q del exón 21.

RESULTADO

Se detectó mutaciones en regiones target del gen EGFR: deleción del exon 19 y T790M del exón 20.

NOTA:

Se recibe cell free DNA collection tube (ROCHE) rotulado como N° AZO-10005 (plasma).

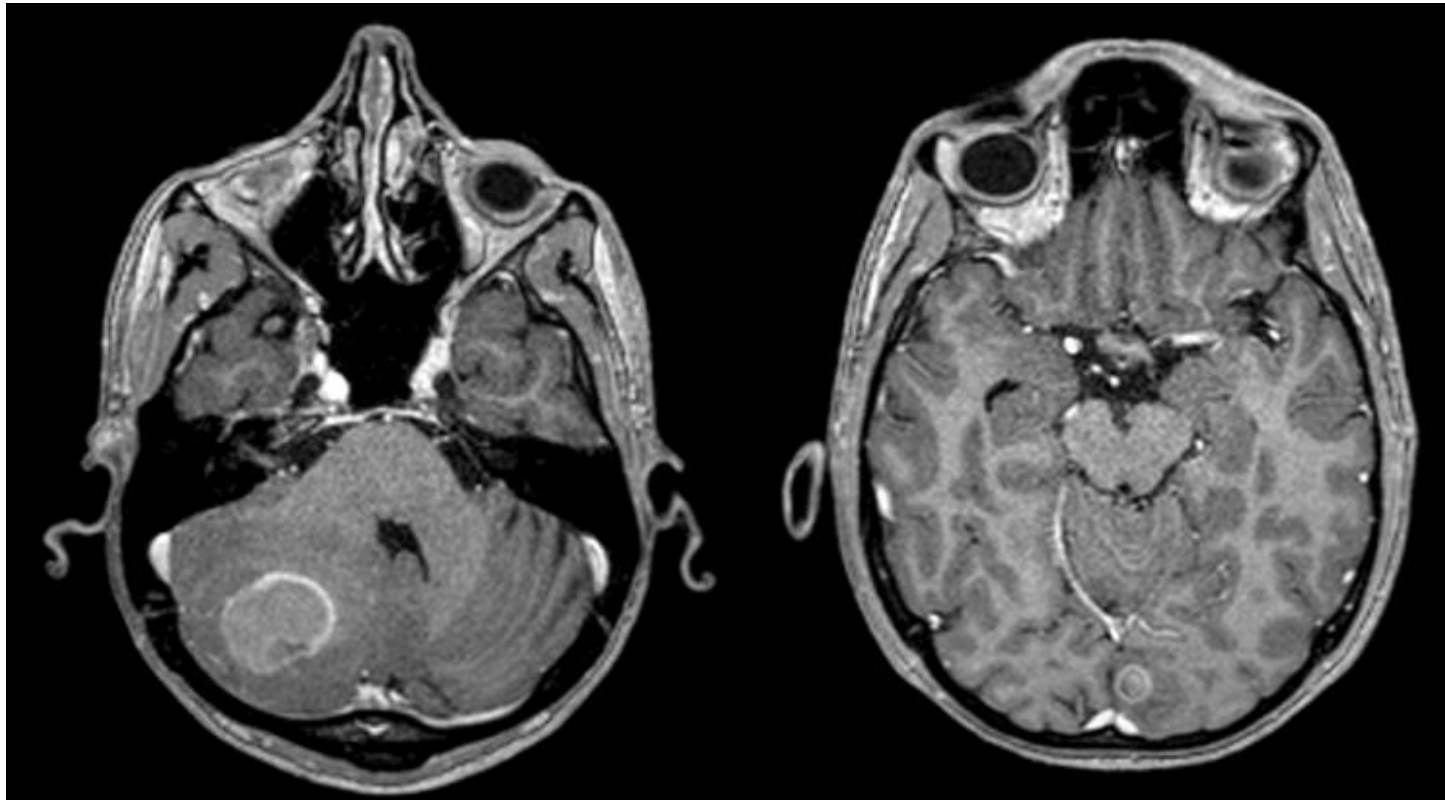
M88200 / P / T28_



VALERIA DENNINGHOFF
MN: 8787

Paciente masculino de 32 años

Al 5to mes de tratamiento evoluciona con mareos por lo que realiza RMN SNC donde se evidencia metástasis cerebral y cerebelosa, sintomática que requiere neurocirugía.



➤ Se interna al paciente.

Paciente masculino de 32 años

Se realiza neurocirugía de ambas lesiones (23/06/2017).

SERVICIO DE PATOLOGIA

DRA. ALEJANDRA AVAGNINA
DR. ALEJANDRO GARCÍA
DRA. MARÍA FLORENCIA TORRES

DR. BORIS ELSNER
DR. GABRIEL CASAS
DRA. MARÍA DE LOS ANGELES
JUAREZ

DR. ROBERTO M. IOTTI
DRA. VALERIA DENNINGHOFF
DRA. MARÍA PAULA PEÑALOZA

INFORME HISTOPATOLOGICO

DESCRIPCION MACROSCOPICA

A) Fosa posterior (primera muestra): Dos fragmentos pardo claros que miden 0.4 x 0.3 y 0.3 x 0.3 cm.
B) Fosa posterior (segunda muestra): Varios fragmentos irregulares pardo claros que alternan con otros de aspecto parduzco irregulares que en conjunto miden 2.5 x 2 cm.
C) Region occipital: Fragmento irregular pardo claro que mide 0.8 x 0.3 cm.
Se efectuan biopsias intraoperatorias examinandose por separado tacos representativos de los distintos fragmentos detallados en la descripción macroscopica.

DESCRIPCION MICROSCOPICA

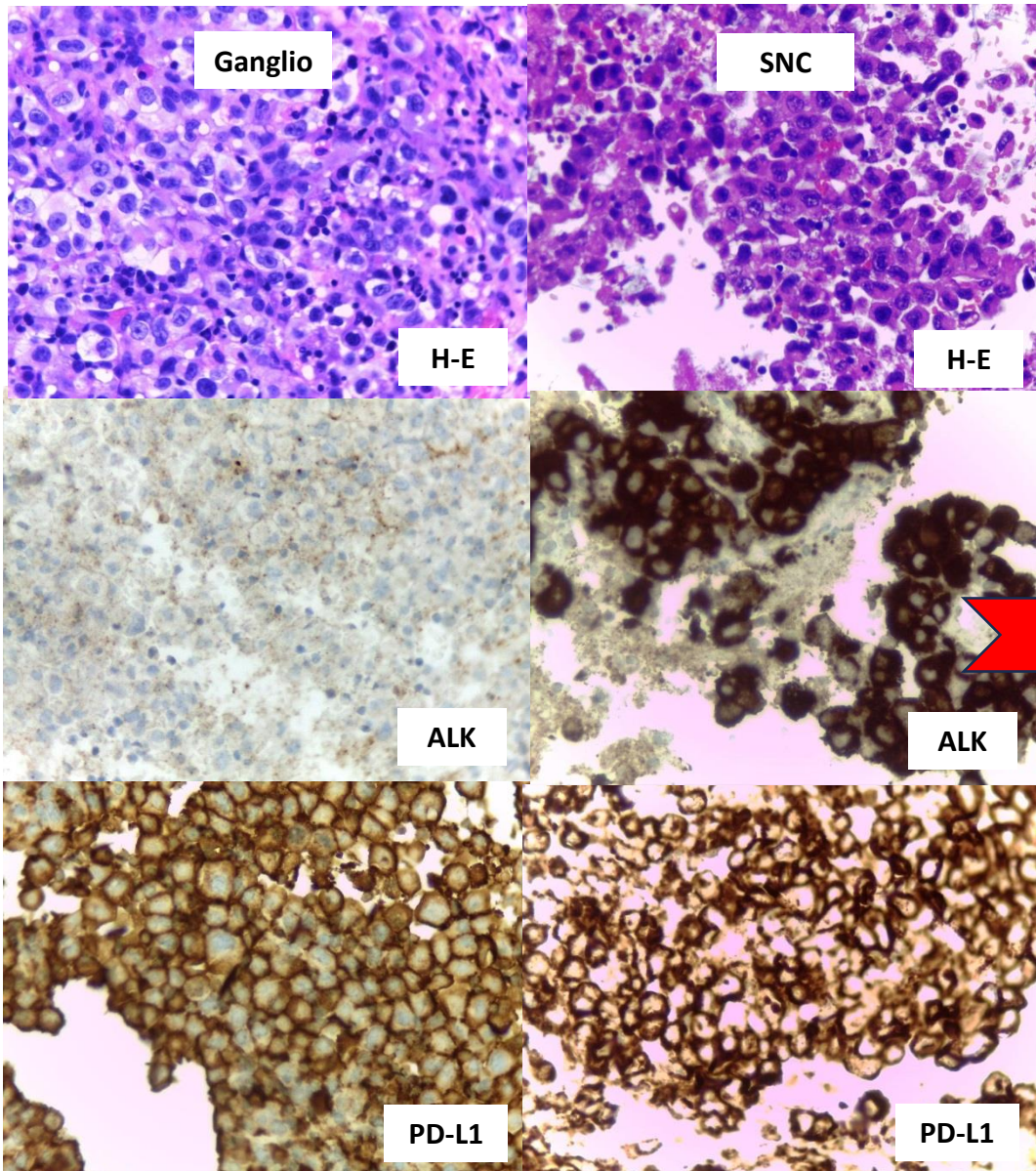
Las muestras de fosa posterior presentan abundante corteza cerebelosa infiltrada focalmente por una neoplasia pobremente diferenciada, compuesta por células con marcado pleomorfismo nuclear, núcleos grandes, con presencia de nucleolos evidentes, algunas células multinucleadas y moderada cantidad de citoplasma eosinófilo.
La imagen histológica es similar a la de las biopsias previas del paciente.
En el material rotulado como tumor occipital se observa la misma neoplasia con focos de necrosis.
Las determinaciones de ALK y PD-L1 del tumor se remiten por informe complementario.

DIAGNOSTICO

Sistema nervioso central (fosa posterior y region occipital), biopsia: Metastasis de carcinoma pobremente diferenciado (pulmonar).

M80103 P1140 TXZ

Paciente masculino de 32 años



Se repiten determinaciones de ALK y PDL1 por inmunohistoquímica en metástasis SNC y translocación de ALK por FISH

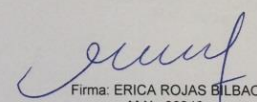

DPTO. PATOLOGIA
SERVICIO DE INMUNOHISTOQUIMICA Y PATOLOGIA MOLECULAR
Jefa de Sección a cargo: Erica Rojas Bilbao
U.B.A.
Direc. Area Diagnóstico: Directora Dra. Liliana Gimenez
Dpto. Patología: Jefa Dra. Susana Gorostidy

MATERIAL
CEREBRO 1 TACO NJ 657293/B
17/046

SERVICIO DE PATOLOGIA MOLECULAR
Se realizó hibridación in situ fluorescente (FISH) mediante doble detección con sonda molecular DNA específica (Vysis ALK Break Apart-FISH PROBE KIT-REF: 06N38-020, Abbott molecular, INC) para detección de reordenamiento del locus del gen ALK utilizando sondas para las regiones 5' y 3' del gen ALK en 2p23. El número señales fluorescentes fue evaluado en ...50... núcleos intactos de células neoplásicas.
Nº de células tumorales infiltrantes contadas con señal de rearreglo: 13 (8 deleciones y 5 rearreglos)
Nº de observadores: 1

Para que el test sea válido, se requiere al menos 50 células de carcinoma infiltrante con señal evaluable.
- El caso se considera positivo con mayor o igual al 15% de células con reordenamiento del gen ALK.
- El caso se considera negativo con menor o igual al 10% de células con reordenamiento del gen ALK.

DIAGNOSTICO
INTERPRETACIÓN DIAGNÓSTICA:
DETECCIÓN DE PROTEÍNA EML4-ALK POR TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN IN SITU (FISH):
POSITIVO PARA REARREGLO DEL GEN EML4-ALK EN EL 26% DE LAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS EVALUADAS.


Firma: ERICA ROJAS BILBAO
M.N.: 98246

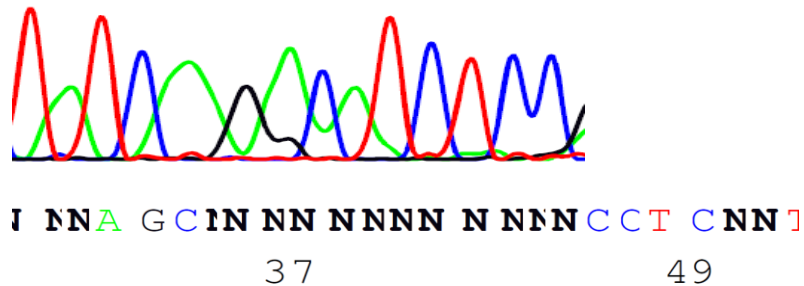
Paciente masculino de 32 años

Se repiten deleción del exón 19 (Sanger y COBAS)

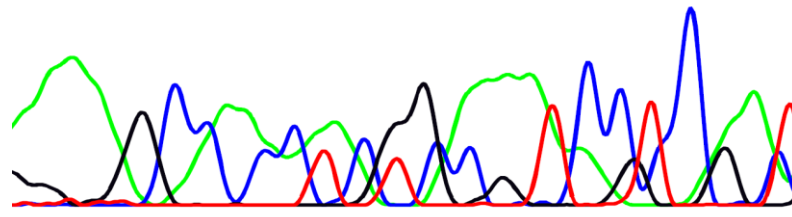
! T A T C I N N A C A T C T C C
73 85

**COBAS EGFR
del 19 POSITIVE**

Ganglio

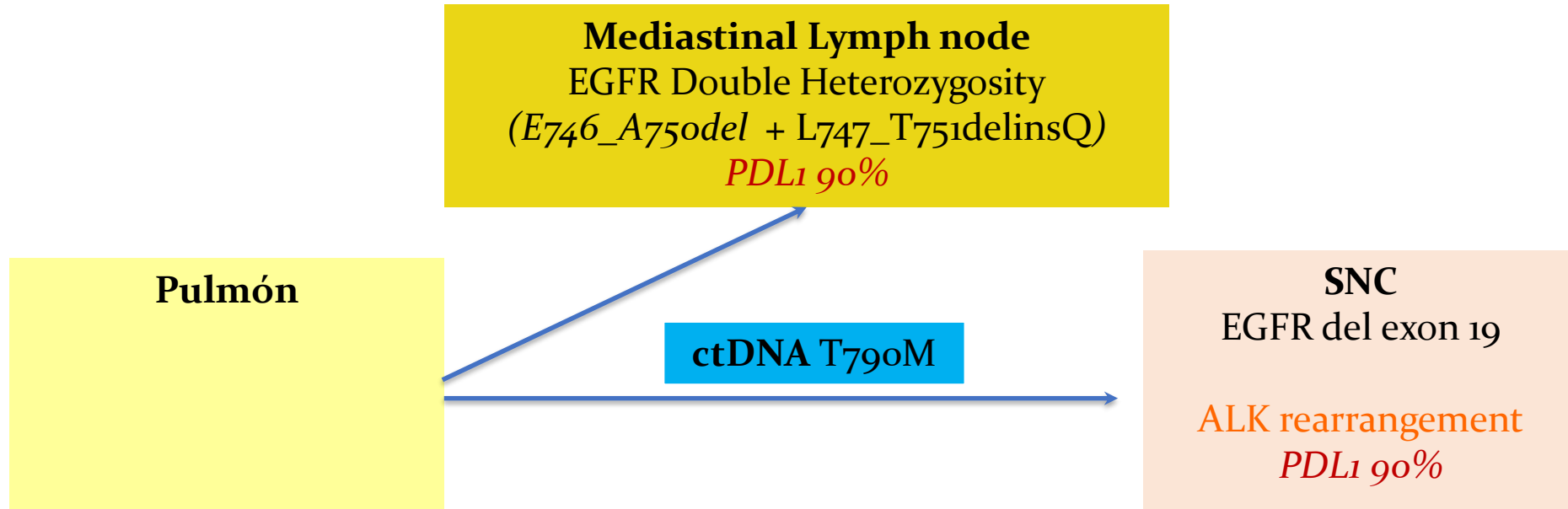


SNC



**COBAS EGFR
del 19 POSITIVE**

Paciente masculino de 32 años



Paciente masculino de 32 años

Se interpreta ALK como probable mecanismo de resistencia a EGFR.

- Inicia Crizotinib.
- Evoluciona desfavorablemente con progresión pulmonar, ascitis y sangrado retroperitoneal.



SERVICIO DE PATOLOGIA

DRA. ALEJANDRA AVAGNINA
DR. ALEJANDRO GARCÍA
DRA. MARIA FLORENCIA TORRES

DR. BORIS ELSNER
DR. GABRIEL CASAS
DRA. MARIA DE LOS ANGELES

DR. ROBERTO M. IOTTI
DRA. VALERIA DENNINGHOFF
DRA. MARIA PAULA PEÑALOZA

INFORME HISTOPATOLOGICO

DESCRIPCION MACROSCOPICA

- A) Glandula suprarrenal izquierda remitida en varios fragmentos pardo anaranjados, con areas pardo rojizas de aspecto hematico, que miden en conjunto 5 x 5 cms. y pesan 17 grs.
- B) Reseccion de cola de pancreas que mide 5 x 5 x 3 cms. y pesa 38 grs., rodeada de escasa cantidad de tejido adiposo peripancreatico. Se observa sutura mecanica correspondiente al margen quirurgico que mide 5.4 cms. Al corte, formacion solido quistica, con contenido hematico, que mide 3 x 2 x 2 cms. y dista 1 cms. del margen quirurgico y 0.4 cms. de la superficie externa. A 0.2 cms., una segunda formacion tumoral, solido quistica que mide 0.6 x 0.6 cms. con contenido pardo rojizo que dista 0.4 cms del margen.
- C) Epiplon que mide 10 x 3 x 1.5 cms. Al corte, se observan areas pardo amarillentas con areas de aspecto fibroso.
- D) Pieza de esplenectomia que mide 9 x 7.2 x 1.7 cms. y pesa 102 grs. Superficie externa rugosa y despulida. Al corte, parenquima pardo rojizo.

DESCRIPCION MICROSCOPICA

La suprarrenal izquierda presenta infiltracion neoplasica de la corteza y de los tejidos blandos perifericos, por la metastasis del carcinoma pobremente diferenciado primario pulmonar. Las células presentan marcado pleomorfismo nuclear, nucleos grandes, presencia de macronucleolos y citoplasma eosinofilo. Se observan embolias vasculo-linfaticas neoplasicas peritumorales.

El pancreas presenta infiltracion por la misma neoplasia del parenquima y los tejidos peripancreaticos. En los nodulos descriptos macroscopicamente existen embolias neoplasicas vasculares.

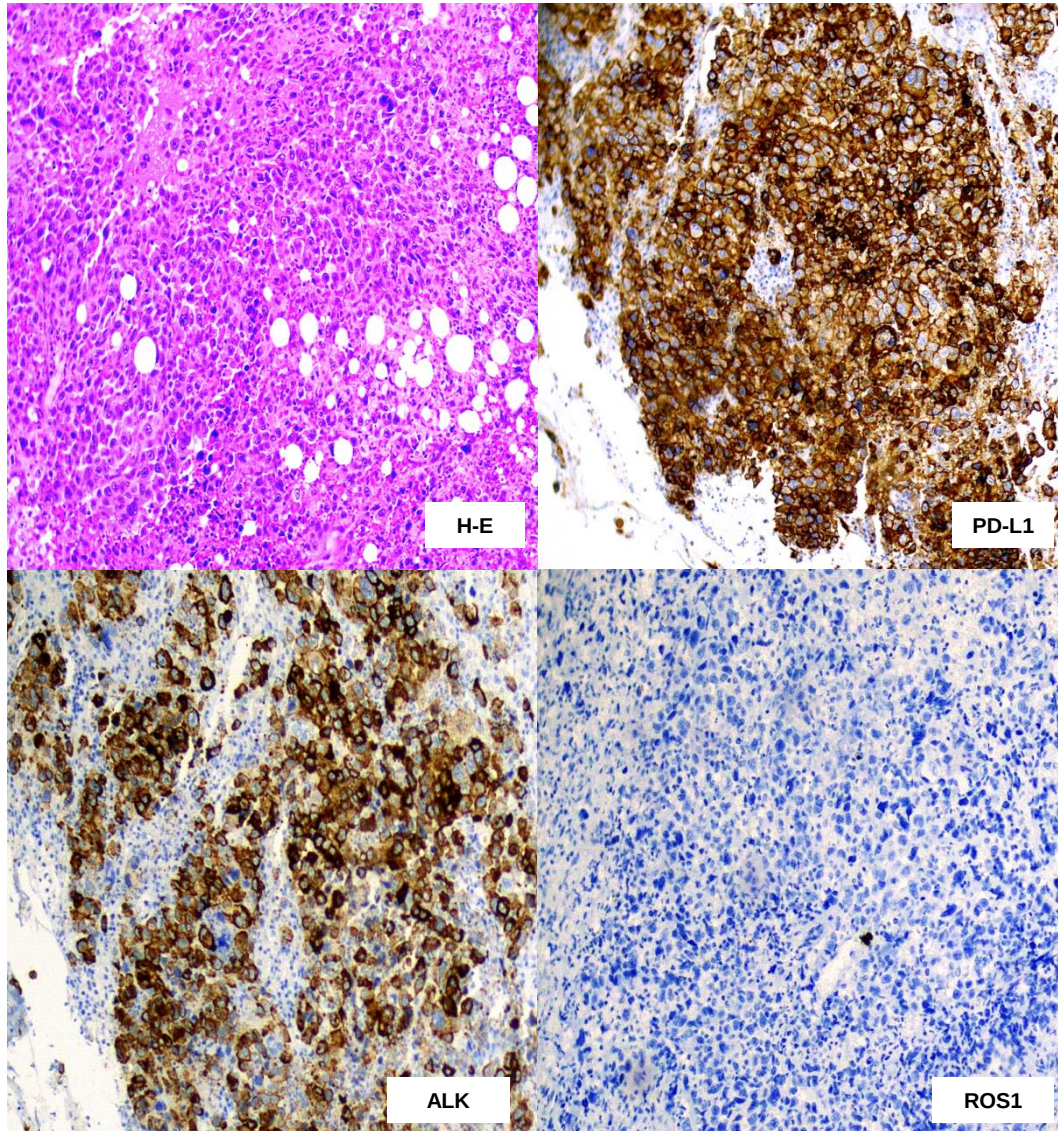
El epiplon presenta muy escaso compromiso neoplasico microscopico con algunas embolias neoplasicas y pequeños focos de infiltracion de la grasa del epiplon por la neoplasia.

El bazo presenta indemnidad de la pulpa blanca y roja. Ausencia de compromiso neoplasico.

DIAGNOSTICO

Glandula suprarrenal izquierda, cola de pancreas y epiplon, reseccion: Metastasis de carcinoma pobremente diferenciado pulmonar.
Bazo, esplenectomia: Normal.

Paciente masculino de 32 años



Re biopsia de Pulmón, metástasis en Páncreas y Glándula Suprarrenal.

Paciente masculino de 32 años

Al 6to mes fallece (17/7/2017).

Paciente masculino de 32 años

Conclusiones 1:

La sensibilidad de Afatinib en mutaciones doble heterocigotas de EGFR es desconocida.

La evolución con pérdida de mutación de EGFR en 1 alelo y translocación de ALK podría vincularse a mecanismo de resistencia o heterogeneidad tumoral.

Ganglio FFPET

SECCION PATOLOGIA MOLECULAR - SECCION ONCOLOGIA

SERVICIO DE PATOLOGIA
Galván 4102, 1° piso
C1431FWO - Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
vdenninghoff@cemic.edu.ar - www.cemic.edu.ar

GANGLIO

Fecha: 22-oct-2018

1 de 17

Tipo de cáncer de la muestra: Carcinoma pulmonar no microcítico

Sumario		Resultados del informe
Detalles de la variante	2	3 Biomarcadores clínicamente significativos
Resumen del tratamiento correspondiente	3	7 Tratamientos disponibles 218 Ensayos clínicos

Biomarcadores clínicamente significativos

Indicado ContraIndicado

Alteración genómica	Tratamientos relevantes (En este tipo de cáncer)	Tratamientos relevantes (En otro tipo de cáncer)	Ensayos clínicos
<i>EGFR p.(L747_T751delinsQ)</i> <i>c.2239_2252delTTAAGAGAAGCAACin</i> sCA epidermal growth factor receptor Nivel: IA	afatinib ^{1,2} erlotinib ^{1,2} gefitinib ^{1,2} osimertinib ^{1,2} afatinib + cetuximab bevacizumab (Allergan) + erlotinib ² bevacizumab + erlotinib ²	Ninguno	188
<i>EGFR p.(E746_A750del)</i> <i>c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA</i> epidermal growth factor receptor Nivel: IA	afatinib ^{1,2} erlotinib ^{1,2} gefitinib ^{1,2} osimertinib ^{1,2} afatinib + cetuximab bevacizumab (Allergan) + erlotinib ² bevacizumab + erlotinib ²	Ninguno	188
<i>KRAS p.(G12S) c.34G>A</i> KRAS proto-oncogene, GTPase Nivel: IA	Ninguno	cetuximab ^{1,2} panitumumab ¹ cetuximab + chemotherapy ² panitumumab + chemotherapy ²	32

Fuentes incluidas en los tratamientos relevantes: FDA¹, NCCN, ESMO, ESMO

El análisis del OncoPrint™ Focus Assay incluye 52 alteraciones somáticas: 32 genes con mutaciones hotspot, 19 focal CNV (variación en el número de copias), y 23 fusion drivers (rearrangios genómicos).

El análisis de los 32 genes con mutaciones hotspot y de los 19 CNV se realizó satisfactoriamente.

EL ANALISIS DE LOS 23 FUSION DRIVERS FALLÓ (Fusion Sample QC: FAIL: TotalMappedFusionPanelReads<=5000; Fusion Overall Call: NOCALL: FusionSampleQC=FAIL).

POR LO TANTO LOS RESULTADOS DEL ANALISIS DE ARN DEBEN SER CONSIDERADOS COMO NO EVALUABLES.

N° BIOPSIA (ORGANO): 178-649821 (GANGLIO)
TACO SELECCIONADO (MICRODISECCION): A2 (80%)
TOTAL MAPPED FUSION PANEL READS (MAPD): 142101 (0,301)

A partir de los cortes microdisecados del taco seleccionado para enriquecimiento de las células tumorales, se perfiló ADN/ARN mediante columnas Allprep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen). A partir de las microdisecadas aisladas se realizó el panel OncoPrint™ Focus Assay (on Target™ AmpliSeq™ technology) en un Ion S20 Chip que se secuenció en el Ion S5 Next Generation Sequencing Systems. Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el Ion Reporter™ Software 5.2.1 e informadas mediante Ion Torrent™ OncoPrint™ Knowledgebase Reporter (OIR).

Dra. Valeria Denninghoff
Jefe Sección Patología Molecular

Ganglio fresco

SECCION PATOLOGIA MOLECULAR - SECCION ONCOLOGIA

SERVICIO DE PATOLOGIA
Galván 4102, 1° piso
C1431FWO - Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
vdenninghoff@cemic.edu.ar - www.cemic.edu.ar

GANGLIO FRESCO

Fecha: 22-oct-2018

1 de 14

Tipo de cáncer de la muestra: Carcinoma pulmonar no microcítico

Sumario		Resultados del informe
Detalles de la variante	1	2 Biomarcadores clínicamente significativos
Resumen del tratamiento correspondiente	3	7 Tratamientos disponibles 190 Ensayos clínicos

Biomarcadores clínicamente significativos

Indicado ContraIndicado

Alteración genómica	Tratamientos relevantes (En este tipo de cáncer)	Tratamientos relevantes (En otro tipo de cáncer)	Ensayos clínicos
<i>EGFR p.(L747_T751delinsQ)</i> <i>c.2239_2252delTTAAGAGAAGCAACin</i> sCA epidermal growth factor receptor Nivel: IA	afatinib ^{1,2} erlotinib ^{1,2} gefitinib ^{1,2} osimertinib ^{1,2} afatinib + cetuximab bevacizumab (Allergan) + erlotinib ² bevacizumab + erlotinib ²	Ninguno	190
<i>EGFR p.(E746_A750del)</i> <i>c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA</i> epidermal growth factor receptor Nivel: IA	afatinib ^{1,2} erlotinib ^{1,2} gefitinib ^{1,2} osimertinib ^{1,2} afatinib + cetuximab bevacizumab (Allergan) + erlotinib ² bevacizumab + erlotinib ²	Ninguno	190

Fuentes incluidas en los tratamientos relevantes: FDA¹, NCCN, ESMO, ESMO

El análisis del OncoPrint™ Focus Assay incluye 52 alteraciones somáticas: 32 genes con mutaciones hotspot, 19 focal CNV (variación en el número de copias), y 23 fusion drivers (rearrangios genómicos).

El análisis de los 32 genes con mutaciones hotspot, 19 focal CNV, y 23 fusion drivers se realizó satisfactoriamente.

Detalles de la variante

Variantes de secuencia de ADN

Gen	Cambio de aminoácidos	Codificación	ID de la variante	Locus	Frecuencia de alelo	Transcripto	Efecto de la variante
EGFR	p.(E746_A750del)	c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA	.	chr7:55242465	88.47%	NM_005228.3	nonframeshift Deletion
EGFR	p.(E746_A750del)	c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA	COSM6225	chr7:55242465	65.42%	NM_005228.3	nonframeshift Deletion

N° BIOPSIA (ORGANO): 178-649821 (GANGLIO)
TACO SELECCIONADO (MICRODISECCION): FRESCO (85%)
TOTAL MAPPED FUSION PANEL READS (MAPD): 12762 (0,663)

Dra. Valeria Denninghoff
Jefe Sección Patología Molecular

Tipo de cáncer de la muestra: Carcinoma pulmonar no microcítico

Sumario		Resultados del informe
Detalles de la variante	1	2 Biomarcadores clínicamente significativos
Resumen del tratamiento correspondiente	2	11 Tratamientos disponibles
		228 Ensayos clínicos

Biomarcadores clínicamente significativos

Indicado ContraIndicado

Alteración genómica	Tratamientos relevantes (En este tipo de cáncer)	Tratamientos relevantes (En otro tipo de cáncer)	Ensayos clínicos
EML4-ALK fusion echinoderm microtubule associated protein like 4 - ALK receptor tyrosine kinase Nivel: 1A	brigatinib ¹ crizotinib ^{1,2} alectinib ^{1,2} ceritinib ^{1,2}	ceritinib crizotinib	49
EGFR p.(E746_A750del) c.2236_2250delGAAATTAAGAGAAGCA epidermal growth factor receptor Nivel: 1A	afatinib ^{1,2} erlotinib ^{1,2} gefitinib ^{1,2} osimertinib ^{1,2} afatinib + cetuximab bevacizumab (Allergan) + erlotinib ² bevacizumab + erlotinib ²	Ninguno	186

Fuentes incluidas en los tratamientos relevantes: FDA¹, NCCN, ESMO, ESMO

El análisis del OncoPrint™ Focus Assay incluye 52 alteraciones somáticas: 32 genes con mutaciones hotspot, 19 focal CNV (variación en el número de copias), y 23 fusion drivers (transcritos genómicos).

El análisis de los 32 genes con mutaciones hotspot, 19 focal CNV, y 23 fusion drivers se realizó satisfactoriamente.

Detalles de la variante

Variantes de secuencia de ADN

Gen	Cambio de aminoácidos	Codificación	ID de la variante	Locus	Frecuencia de alelo	Transcripto	Efecto de la variante
EGFR	p.(E746_A750del)	c.2236_2250delGAAATTAAGAGAAGCA	.	chr7:55242465	16.59%	NM_005228.3	nonframeshift Deletion
EGFR	p.(E746_A750del)	c.2236_2250delGAAATTAAGAGAAGCA	COG6225	chr7:55242465	15.23%	NM_005228.3	nonframeshift Deletion
JAK1	p.(-)	c.2097C>G	.	chr1:65311214	48.42%	NM_002227.3	synonymous
ALK	p.(D1529E)	c.4587C>G	.	chr2:29416366	99.84%	NM_004304.4	missense

N° BIOPSIA (ORGANO): 178-65397S (PULMON)

TACO SELECCIONADO (MICRODISECCION): UT (80%-ESCASA CELULAS)

TOTAL MAPPED FISSION PANEL READS (MAPD): 142101 (0.301)

A partir de los cortes microdisecados del taco seleccionado para enriquecimiento de las células tumorales, se purificó ADN/RNA mediante columnas Allprep DNA/RNA FFPET Kit (QIAGEN). A partir de las macromoléculas aisladas se realizó el panel OncoPrint™ Focus Assay (Ion Torrent™ AmpliSeq™ technology) en un Ion S20 Chip que se secuenció en el Ion SS Next Generation Sequencing System. Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el Ion Reporter™ Software 5.2.1 e informadas mediante Ion Torrent™ OncoPrint™ Knowledgebase Reporter (OBR).

Dra. Valeria Denninghoff
Jefe Sección Patología Molecular

Ganglio (FFPE)		Ganglio (en fresco)	
EGFR (E746_A750del)	85,4	EGFR (E746_A750del)	88,5
EGFR (L747_T751delinsQ)	82,8	EGFR (L747_T751delinsQ)	85,1

Ganglio	(%)
EGFR (E746_A750del)	85,4
EGFR (L747_T751delinsQ)	82,8
	-
-	-
-	-

Ganglio (FFPE)		Ganglio (en fresco)	
EGFR (E746_A750del)	85,4	EGFR (E746_A750del)	88,5
EGFR (L747_T751delinsQ)	82,8	EGFR (L747_T751delinsQ)	85,1

Tipo de cáncer de la muestra: Carcinoma pulmonar no microcítico

Sumario

Detalles de la variante	1
Resumen del tratamiento correspondiente	3

Resultados del informe

3 Biomarcadores clínicamente significativos
11 Tratamientos disponibles
230 Ensayos clínicos

Biomarcadores clínicamente significativos

Indicado ■ ContraIndicado

Alteración genómica	Tratamientos relevantes (En este tipo de cáncer)	Tratamientos relevantes (En otro tipo de cáncer)	Ensayos clínicos
EML4-ALK fusion echinoderm microtubule associated protein like 4 - ALK receptor tyrosine kinase Nivel: IA	■ brigatinib ¹ ■ crizotinib ^{1,2} ■ alectinib ^{1,2} ■ ceritinib ^{1,2}	■ ceritinib ■ crizotinib	49
EGFR p.(E746_A750del) c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA epidermal growth factor receptor Nivel: IA	■ afatinib ^{1,2} ■ erlotinib ^{1,2} ■ gefitinib ^{1,2} ■ osimertinib ^{1,2} ■ afatinib + cetuximab ■ bevacizumab (Allergan) + erlotinib ² ■ bevacizumab + erlotinib ²	Ninguno	186
MYC amplification MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor Nivel: IC	Ninguno	Ninguno	2

Fuentes incluidas en los tratamientos relevantes: FDA¹, NCCN, ESMO, ESMO

El análisis del OncoPrint™ Focus Assay incluye 52 alteraciones somáticas: 32 genes con mutaciones hotspot, 19 focal CNV (variación en el número de copias), y 23 fusión drivers (neumogénicos genes).

El análisis de los 32 genes con mutaciones hotspot, 19 focal CNV, y 23 fusión drivers se realizó satisfactoriamente.

Detalles de la variante

Variantes de secuencia de ADN

Gen	Cambio de aminoácidos	Codificación	ID de la variante	Locus	Frecuencia de alelo	Transcripto	Efecto de la variante
EGFR	p.(E746_A750del)	c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA	.	chr7:55242465	64.45%	NM_005228.3	nonframeshift Deletion

N° BIOPSIA (ORGANO): 17B-658712 (PANCREAS)

TACO SELECCIONADO (MICRODISECCION): B1 (86%)

TOTAL MAPPED FUSSION PANEL READS (MAPD): 25779 (0.352)

A partir de los cortes microdisecados del tazo seleccionado para enriquecimiento de las células tumorales, se purificó ADN/RNA mediante columnas Allprep DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN). A partir de las macromoléculas aisladas se realizó el panel OncoPrint™ Focus Assay (Ion Torrent™ AmpliSeq™ technology) en un Ion S20 Chip que se secuenció en el Ion S5 Next Generation Sequencing System. Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el Ion Reporter™ Software 5.2.1 e informadas mediante Ion Torrent™ OncoPrint™ Knowledgebase Reporter (DKR).

Dra. Valeria Denninghoff
Jefe Sección Patología Molecular

Tipo de cáncer de la muestra: Carcinoma pulmonar no microcítico

Sumario

Detalles de la variante	2
Resumen del tratamiento correspondiente	3

Resultados del informe

4 Biomarcadores clínicamente significativos
11 Tratamientos disponibles
233 Ensayos clínicos

Biomarcadores clínicamente significativos

Indicado ■ ContraIndicado

Alteración genómica	Tratamientos relevantes (En este tipo de cáncer)	Tratamientos relevantes (En otro tipo de cáncer)	Ensayos clínicos
EML4-ALK fusion echinoderm microtubule associated protein like 4 - ALK receptor tyrosine kinase Nivel: IA	■ brigatinib ¹ ■ crizotinib ^{1,2} ■ alectinib ^{1,2} ■ ceritinib ^{1,2}	■ ceritinib ■ crizotinib	49
EGFR p.(E746_A750del) c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA epidermal growth factor receptor Nivel: IA	■ afatinib ^{1,2} ■ erlotinib ^{1,2} ■ gefitinib ^{1,2} ■ osimertinib ^{1,2} ■ afatinib + cetuximab ■ bevacizumab (Allergan) + erlotinib ² ■ bevacizumab + erlotinib ²	Ninguno	186
EGFR amplification epidermal growth factor receptor Nivel: IC	Ninguno	Ninguno	10
MYC amplification MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor Nivel: IC	Ninguno	Ninguno	2

Fuentes incluidas en los tratamientos relevantes: FDA¹, NCCN, ESMO, ESMO

El análisis del OncoPrint™ Focus Assay incluye 52 alteraciones somáticas: 32 genes con mutaciones hotspot, 19 focal CNV (variación en el número de copias), y 23 fusión drivers (neumogénicos genes).

El análisis de los 32 genes con mutaciones hotspot, 19 focal CNV, y 23 fusión drivers se realizó satisfactoriamente.

N° BIOPSIA (ORGANO): 17B-658712 (GLANDULA SUPRARRENAL)

TACO SELECCIONADO (MICRODISECCION): A3 (90%)

TOTAL MAPPED FUSSION PANEL READS (MAPD): 42956 (0.299)

A partir de los cortes microdisecados del tazo seleccionado para enriquecimiento de las células tumorales, se purificó ADN/RNA mediante columnas Allprep DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN). A partir de las macromoléculas aisladas se realizó el panel OncoPrint™ Focus Assay (Ion Torrent™ AmpliSeq™ technology) en un Ion S20 Chip que se secuenció en el Ion S5 Next Generation Sequencing System. Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el Ion Reporter™ Software 5.2.1 e informadas mediante Ion Torrent™ OncoPrint™ Knowledgebase Reporter (DKR).

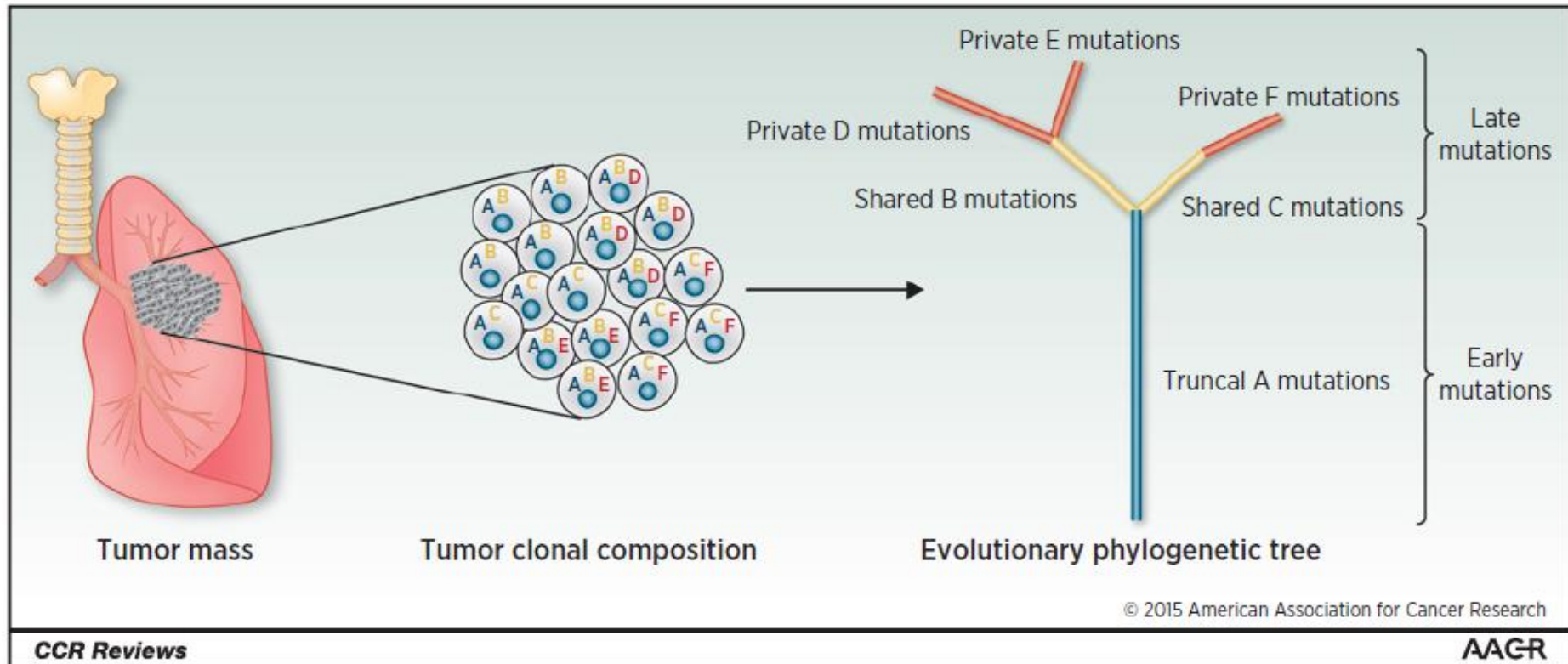
Dra. Valeria Denninghoff
Jefe Sección Patología Molecular

Pulmón	(%)	Ganglio	(%)
EGFR (E746_A750del)	15,2	EGFR (E746_A750del)	85,4
		EGFR (L747_T751delinsQ)	82,8
EML4-ALK	-		-
-	-	-	-
-	-	-	-

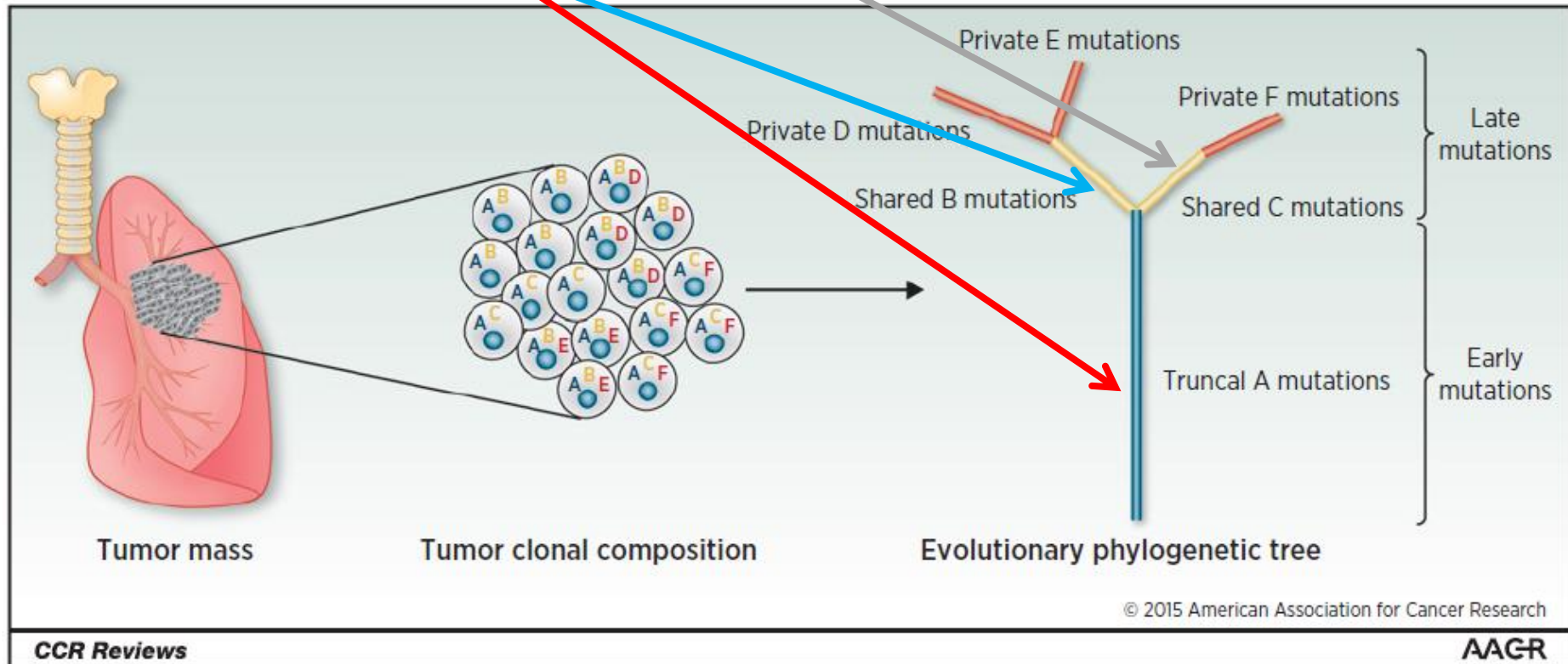
Ganglio (FFPE)		Ganglio (en fresco)	
EGFR (E746_A750del)	85,4	EGFR (E746_A750del)	88,5
EGFR (L747_T751delinsQ)	82,8	EGFR (L747_T751delinsQ)	85,1

Translational Implications of Tumor Heterogeneity CME

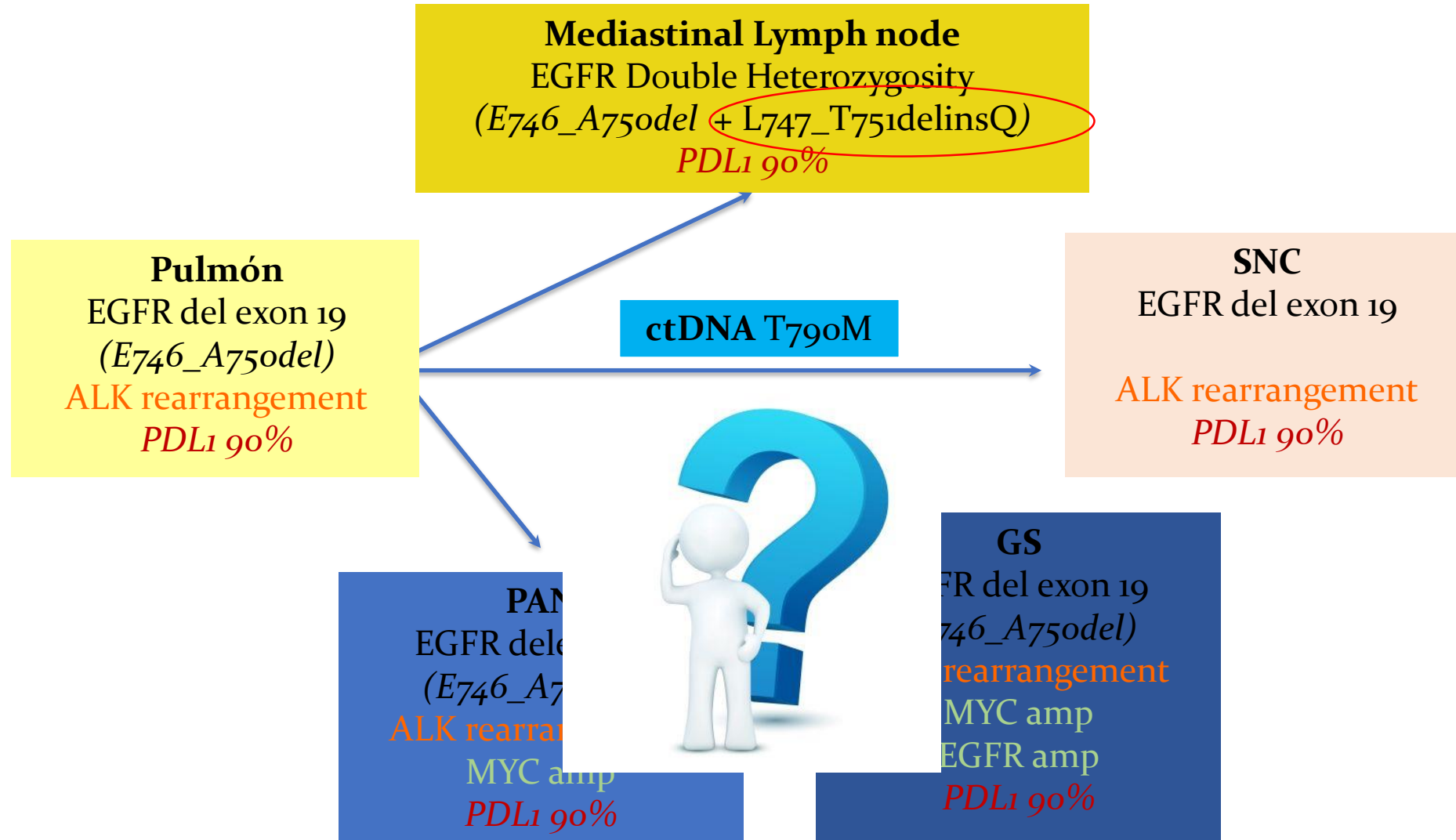
Mariam Jamal-Hanjani^{1,2}, Sergio A. Quezada¹, James Larkin³, and Charles Swanton^{1,2}



Pulmón	(%)	Ganglio	(%)	Páncreas	(%)	Suprarrenal	(%)
EGFR (E746_A750del)	15,2	EGFR (E746_A750del)	85,4	EGFR (E746_A750del)	57	EGFR (E746_A750del)	70,2
		EGFR (L747_T751delinsQ)	82,8				
EML4-ALK	-	-	-	EML4-ALK	-	EML4-ALK	-
-	-	-	-	MYC amp	5,4	MYC amp	7,0
-	-	-	-	-	-	EGFR amp	8,4



Paciente masculino de 32 años



Paciente masculino de 32 años

DETECCION DEL ESTADO MUTACIONAL EGFR (EXONES 18, 19, 20 Y 21) COBAS®EGFR

TECNICA

Prueba de mutación en COBAS®EGFR v2. Ensayo de PCR en tiempo real diseñado para la detección e identificación cualitativa de mutaciones en los exones 18, 19, 20 y 21 del gen receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en ADN obtenido de tejido fijado en formal e incluido en parafina (FFPET). El kit IVD detecta la mutación G719X (G719A, G719C, G719S) del exón 18; deleciones del exón 19; las mutaciones S768L, T790M e inserciones del exón 20; y la mutación L858R y L861Q del exón 21.

RESULTADO

Se detectó mutación en region target del gen EGFR: **deleción exón 19 (19.84)** y **T790M en el exón 20 (5.99)**.

NOTA:

Se recibe fajo en consulta rotulado como NP 17B-668712 (B)-Páncreas.

Se realizó corte histológico coloreado con Hematoxilina Eosina para constatar la presencia de lesión neoplásica en el fajo seleccionado (90% viruta).

M88200 / P / T03

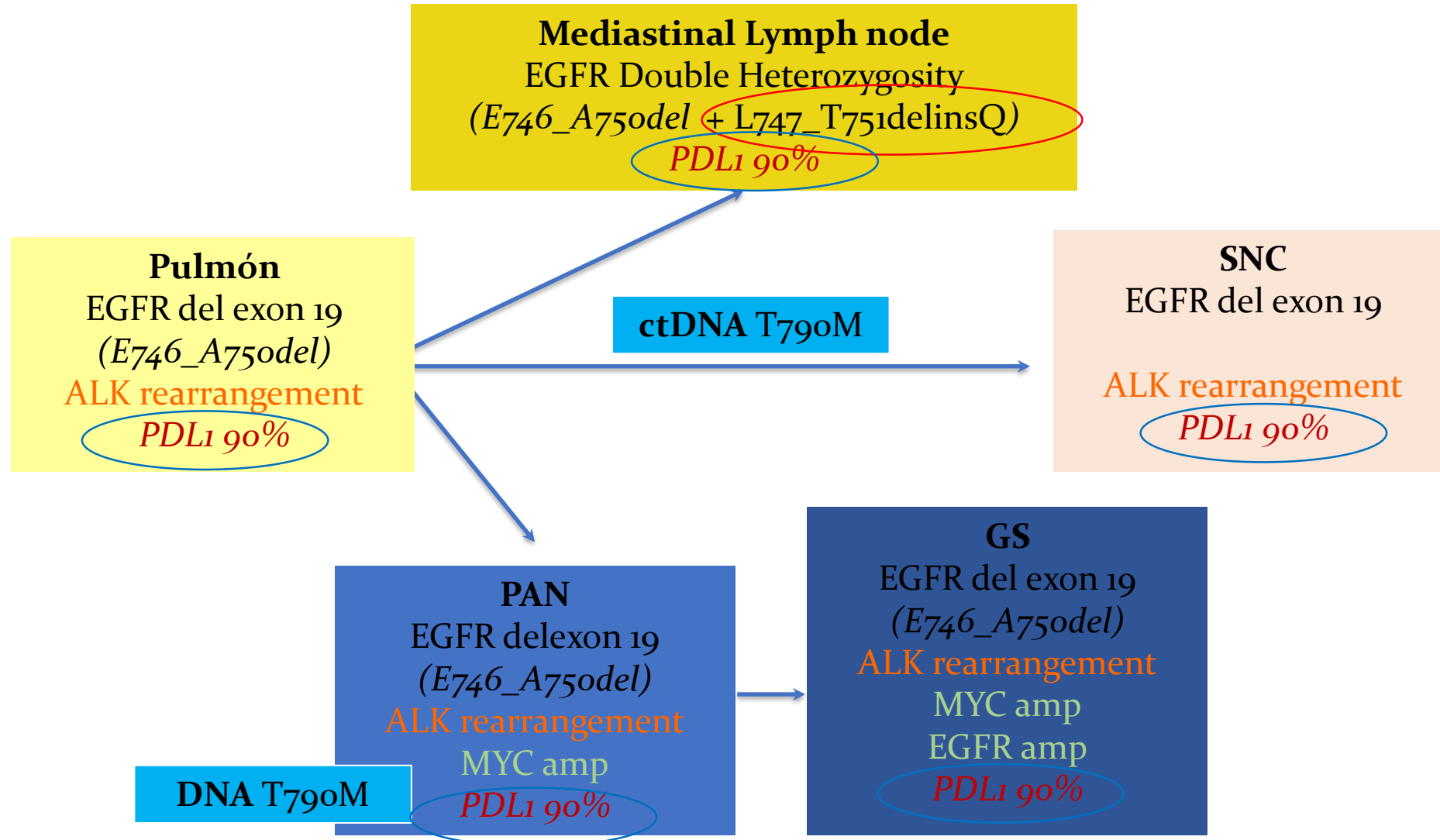
VALERIA DENNING OTT
MN: 6767

El EGFR T790M está en la posición chr7:55249071, alrededor de ella tenemos 3 variantes posibles.

COSM6240 es el T790M, sin embargo, no se llamó.



Paciente masculino de 32 años

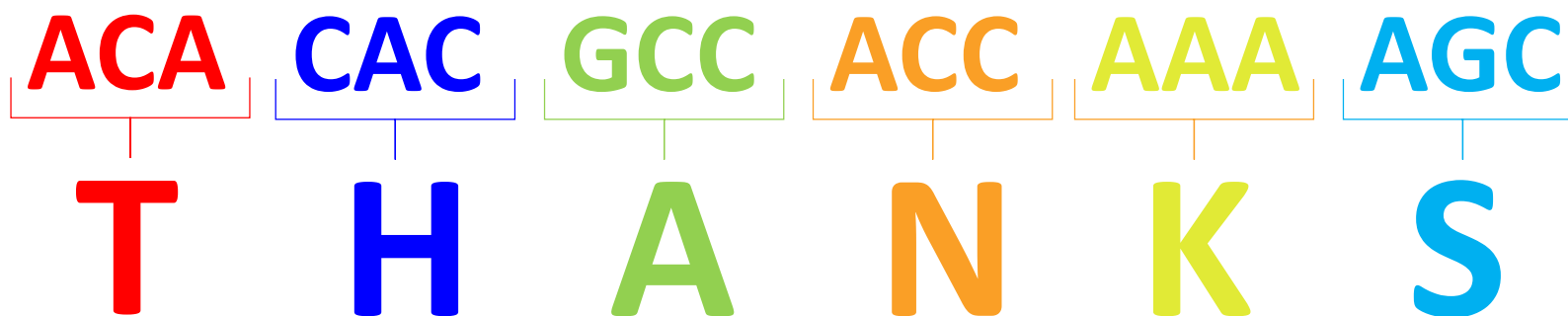


Paciente masculino de 32 años

Conclusiones 2:

El empleo de NGS es fundamental para analizar y comprender la biología de la enfermedad.

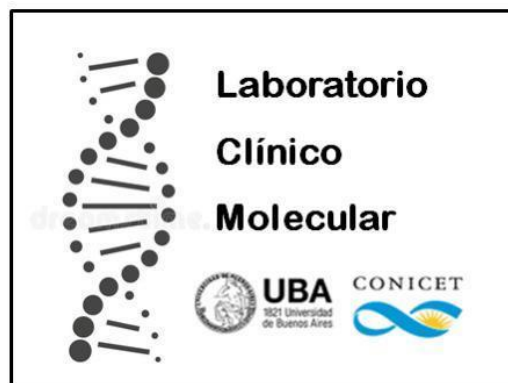
- ❖ ¿Cuál biopsia FFPE elegir en pacientes con múltiples metástasis ?
- ❖ ¿Qué solución podría haber para sortear la heterogeneidad tumoral ?



Dr. Valeria Denninghoff



ASOCIACIÓN
IBEROAMERICANA
DE PATOLOGÍA
MOLECULAR



INTERNATIONAL
ASSOCIATION
FOR THE STUDY
OF LUNG CANCER
Conquering Thoracic Cancers Worldwide

FORMACIÓN **IAVANTE** Fundación Progreso y Salud

CENTRO DE SIMULACIÓN **CLÍNICA AVANZADA**

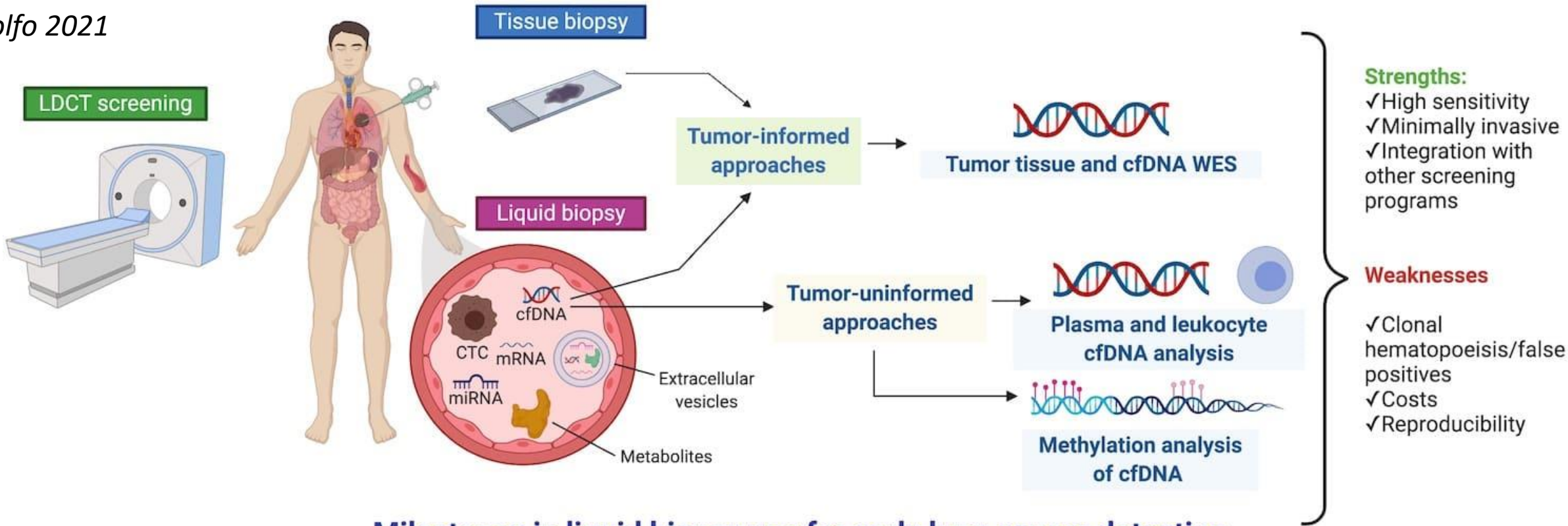
@IAVANTE_FPS | #IAVANTEformación | www.IAVANTE.es



Gracias por su atención

www.IAVANTE.es

IAVANTE



Milestones in liquid biopsy use for early lung cancer detection

