XVI CONGRESO NACIONAL
DEL LABORATORIO CLÍNICO
LABCLIN
MÁLAGA 19-21 OCTUBRE 2022
PALACIO DE FERIAS Y CONGRESOS DE MÁLAGA / FYCMA

AEBM-ML ACFA SEQC ML

Secuenciación de tumores sólidos mediante NGS: experiencia de un Servicio de Análisis Clínicos

Samuel Martín Rodríguez

F.E.A. Análisis Clínicos. Hospital San Pedro (Logroño)

LABCLIN 2022

ÍNDICE

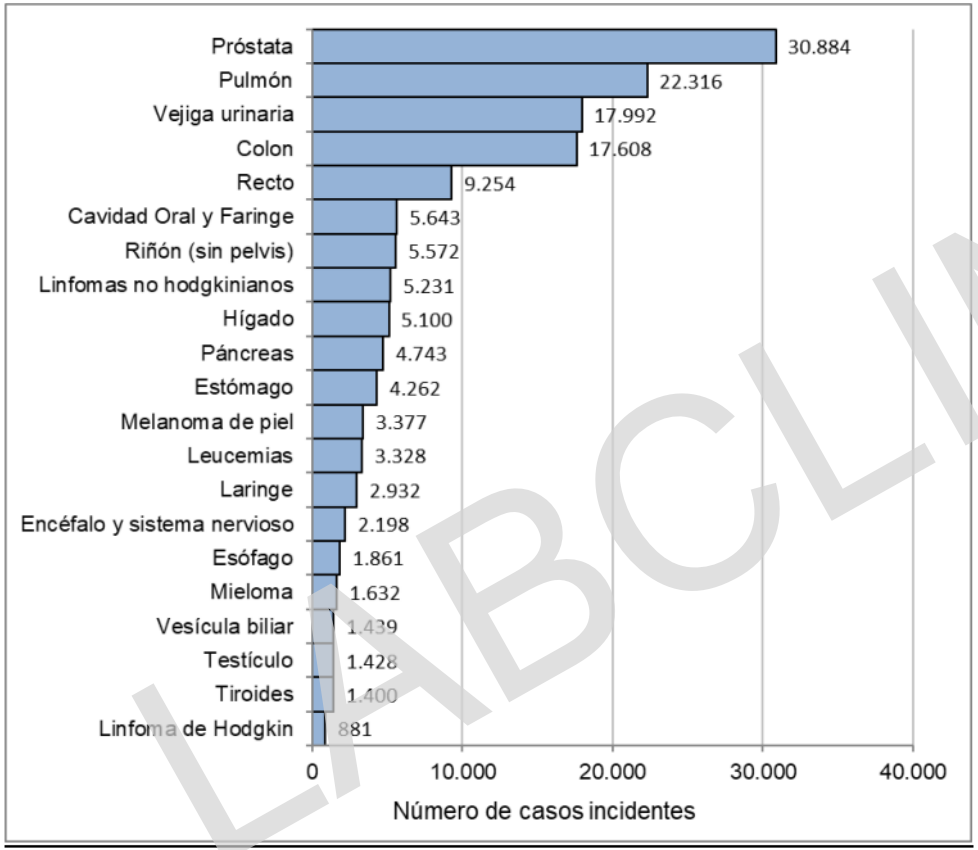
- Oncología de precisión: secuenciación masiva de tumores sólidos
- Secuenciación de biopsias: particularidades
- Equipo multidisciplinar: Comisión de Patología Molecular
- Indicaciones. Casos clínicos

LABCLIN 2022

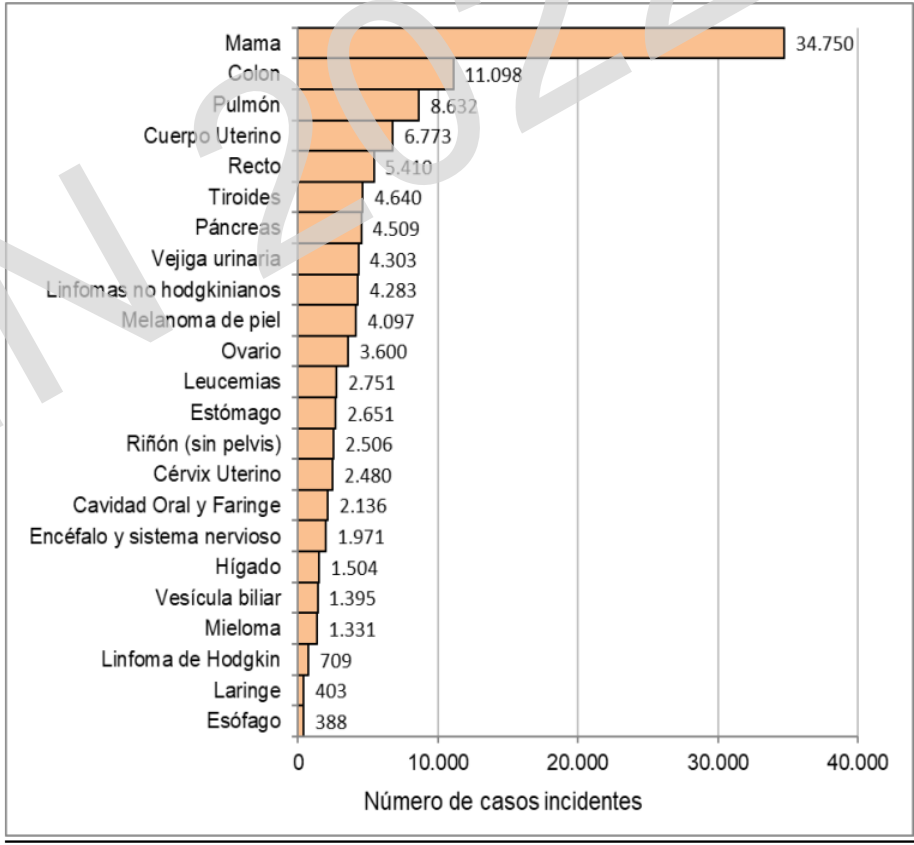
Oncología de precisión

LABCLIN 2022

Número total de casos incidentes estimados para **2022** en **España**: **280.100** (160.066 hombres y 120.035 mujeres)



Fuente: Red Española de Registros de Cáncer



Fuente: Red Española de Registros de Cáncer

LABCLIN 2022

- Clasificación y tratamiento de los tumores: **Cambio de paradigma**

  - Pasado: clasificación histológica

Melanoma

Glioblastoma

Liver cancer

Lung cancer

Colon cancer

Colon cancer (carcinoma)

Kidney cancer

Breast cancer

Prostate cancer

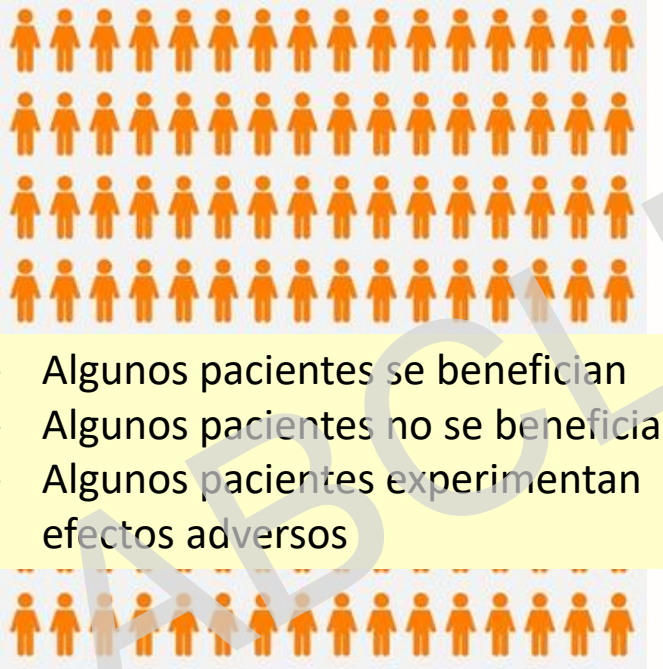
Endometrial cancer

Created with BioRender.com

LABCLIN 2022

- Clasificación y tratamiento de los tumores: **Cambio de paradigma**

- Pasado: clasificación histológica



- Algunos pacientes se benefician
- Algunos pacientes no se benefician
- Algunos pacientes experimentan efectos adversos

Imagen modificada de Roche

Un tipo de tumor: **mismo fármaco** para todos

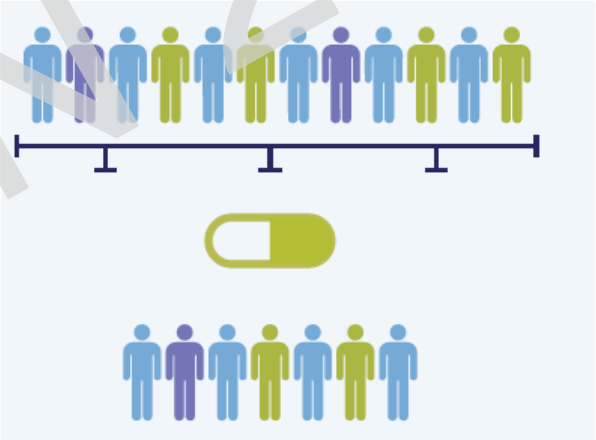


Imagen modificada de ThermoFisher

Cáncer: enfermedad heterogénea

LABCLIN 2022

- Clasificación y tratamiento de los tumores: **Cambio de paradigma**

- Últimos años: clasificación histológica + **biomarcadores** (estudios monogénicos)

Imagen modificada de Roche

Un tipo de tumor, un biomarcador: **un fármaco**

LABCLIN 2022

- Clasificación y tratamiento de los tumores: **Cambio de paradigma**

- Actualidad: clasificación histológica + biomarcadores (secuenciación masiva)

Imagen modificada de Roche

Un paciente, un **perfil molecular**:

Marcadores:

- **Pronósticos**
- Predictivos de **sensibilidad**
- Predictivos de **resistencia**
- Predictivos de **efectos adversos**

Un **tratamiento de precisión**

LABCLIN 2022

- Clasificación y tratamiento de los tumores: **Cambio de paradigma**

- Actualidad: clasificación histológica + biomarcadores (secuenciación masiva)

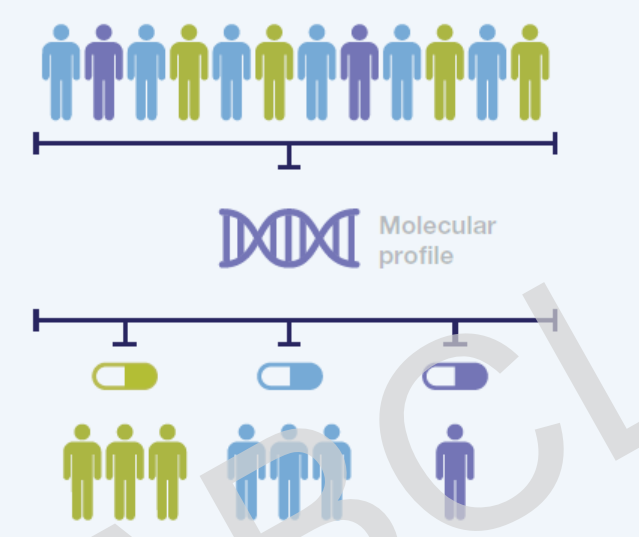


Imagen modificada de ThermoFisher

Un paciente, un **perfil molecular**:

Marcadores:

- **Pronósticos**
- Predictivos de **sensibilidad**
- Predictivos de **resistencia**
- Predictivos de **efectos adversos**

- Cada paciente recibe un **tratamiento personalizado**
- Evitar tratamiento subóptimos

LABCLIN 2022

Tumor agnóstico

Pacientes con el **mismo tipo de alteración genómica**, independientemente del órgano afectado (ej. Fusiones *NTRK*)

LABCLIN 2022

- Evolución de los tratamientos dirigidos: dianas moleculares accionables

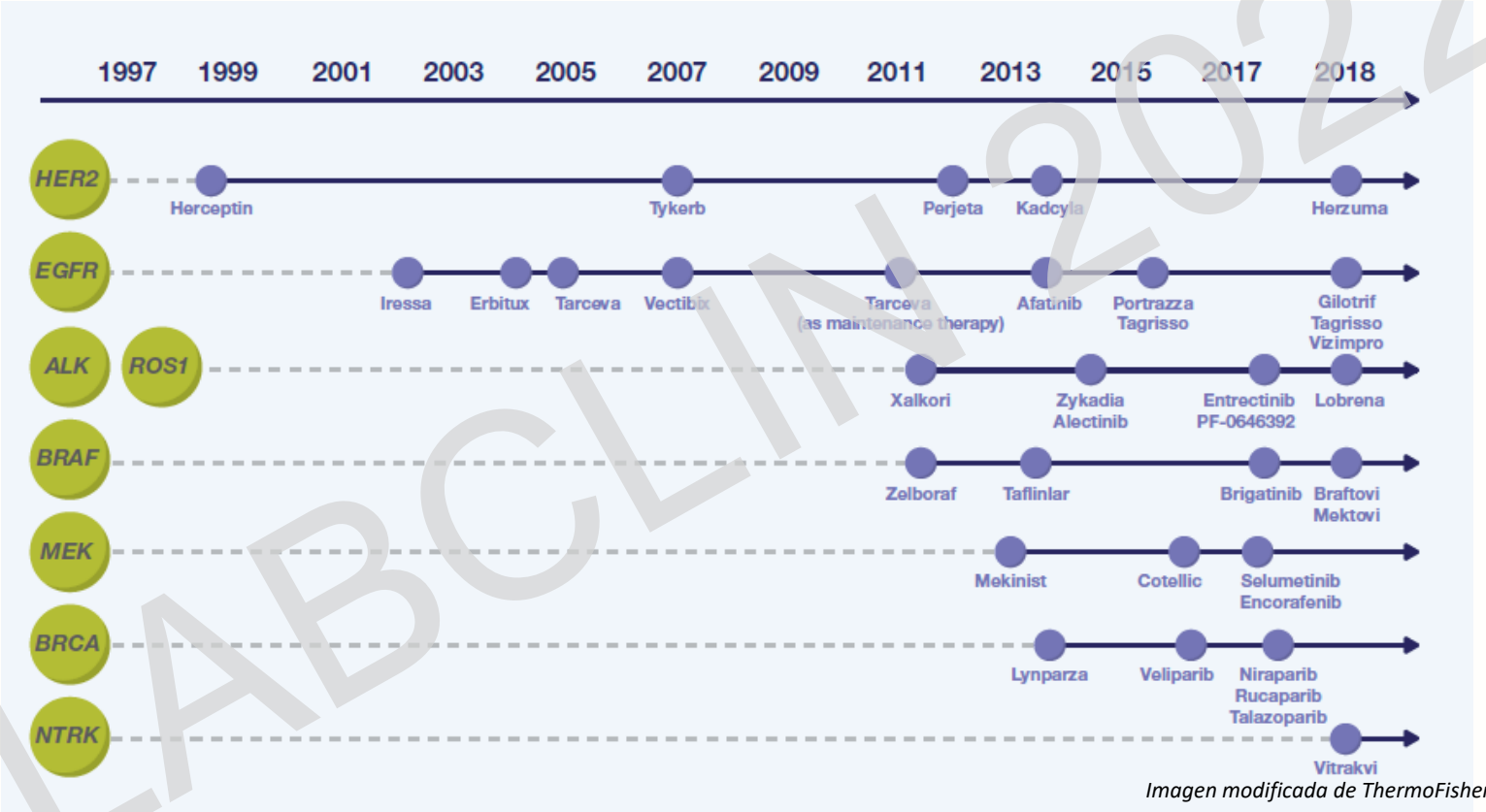


Imagen modificada de ThermoFisher

LABCLIN 2022

- Evolución de los tratamientos dirigidos: dianas moleculares accionables

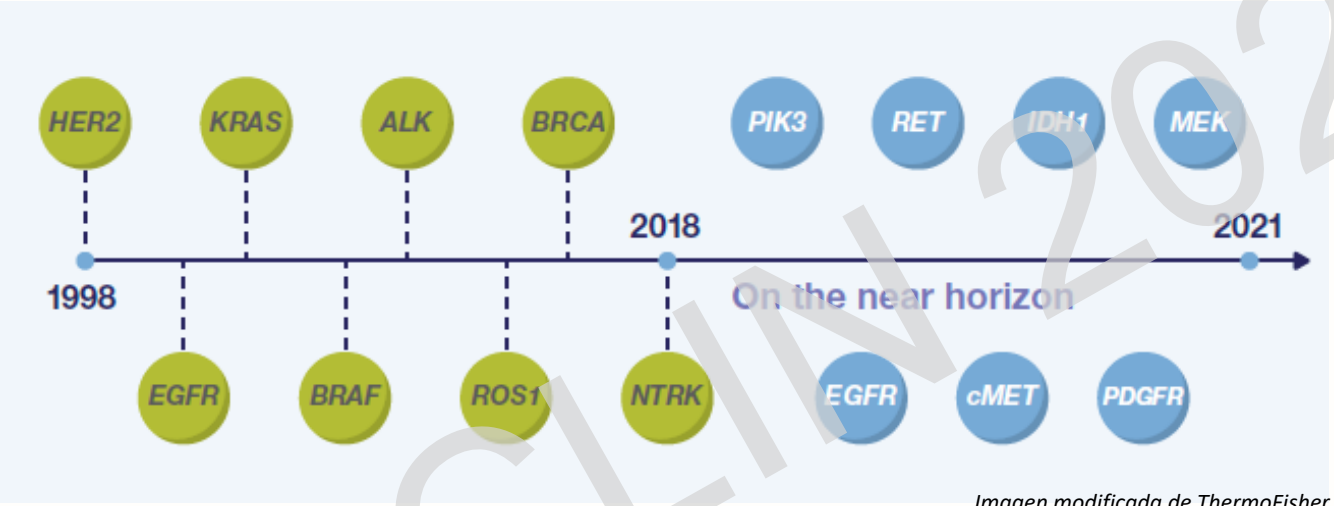


Imagen modificada de ThermoFisher

Últimos años: múltiples tratamientos para gran variedad de dianas moleculares

LABCLIN 2022

Secuenciación masiva: **estudiar todos los biomarcadores relevantes en una única muestra y en un único ensayo**

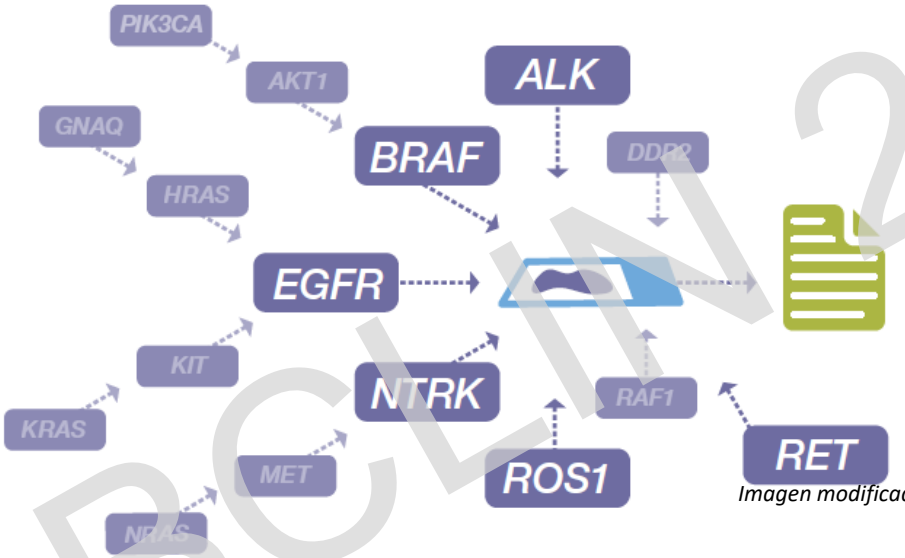


Imagen modificada de ThermoFisher

- Permite identificar las alteraciones más frecuentes para las que existen **tratamientos dirigidos aprobados**
- Permite identificar otras alteraciones para las que existen **tratamientos dirigidos en ensayos clínicos**

LABCLIN 2022

Secuenciación masiva de tumores sólidos tiene como **objetivos**:

- **Tratamiento**: caracterizar el perfil molecular el tumor del paciente para seleccionar el tratamiento dirigido óptimo (**medicina de precisión**)

- **Diagnóstico**: caracterizar el perfil molecular el tumor del paciente contribuye a establecer un **diagnóstico de alta precisión**
Ej. sarcomas (fusiones)

Recomendaciones para el **uso rutinario de secuenciación masiva en función del tipo de tumor:**
- En la actualidad no todos los tipos de tumor obtienen beneficio en realizar rutinariamente NGS en lugar de análisis monogénicos

LABCLIN 2022

Secuenciación masiva de tumores sólidos:

ASPECTOS TÉCNICOS

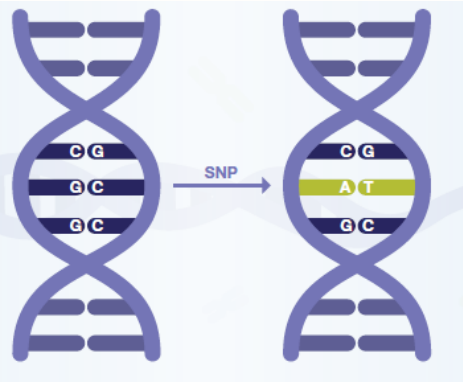
LABCLIN 2022

BENEFICIOS DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA

- Capacidad para detectar **mutaciones en muy baja proporción (alta sensibilidad)**
- Permite la secuenciación de **numerosos genes de forma simultánea**
- En un único análisis podemos detectar **diferentes tipos de alteraciones** genómicas con potencial oncogénico

LABCLIN 2022

Variantes puntuales:



Inserciones y deleciones:

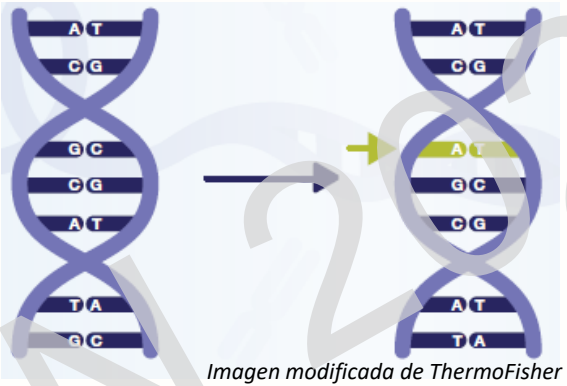
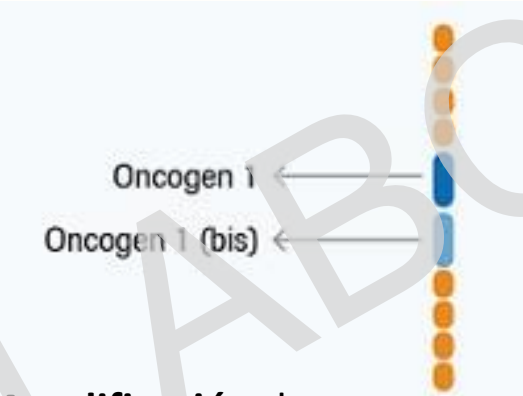
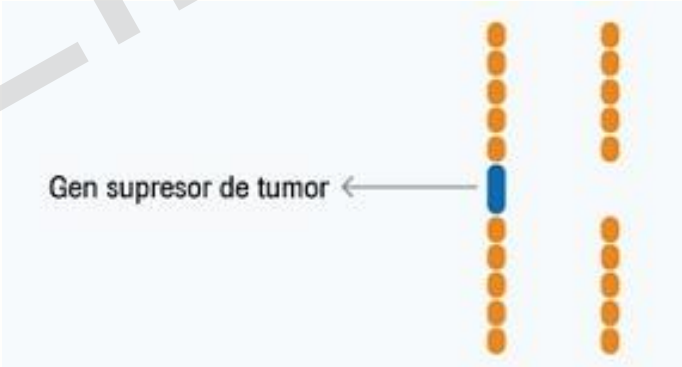


Imagen modificada de ThermoFisher

Variaciones en el número de copias (CNVs):



Amplificación de oncogenes



Pérdida de genes supresores de tumor

LABCLIN 2022

Translocaciones y fusiones génicas

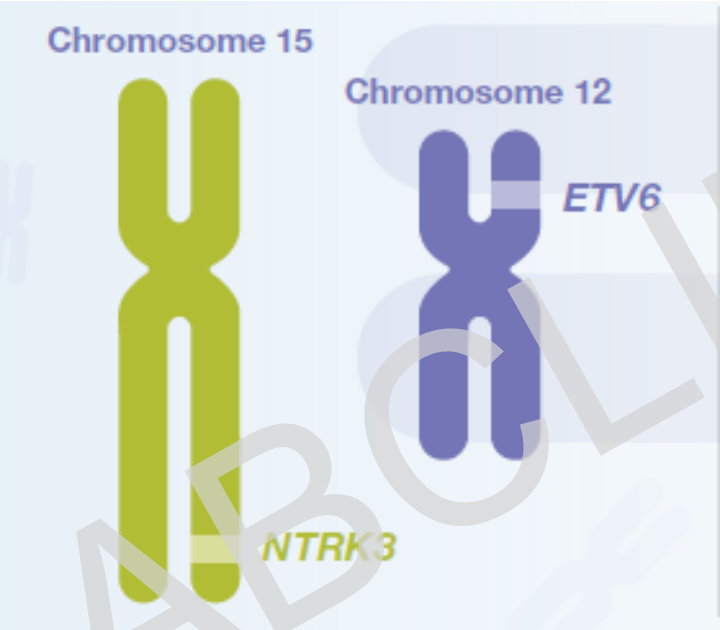


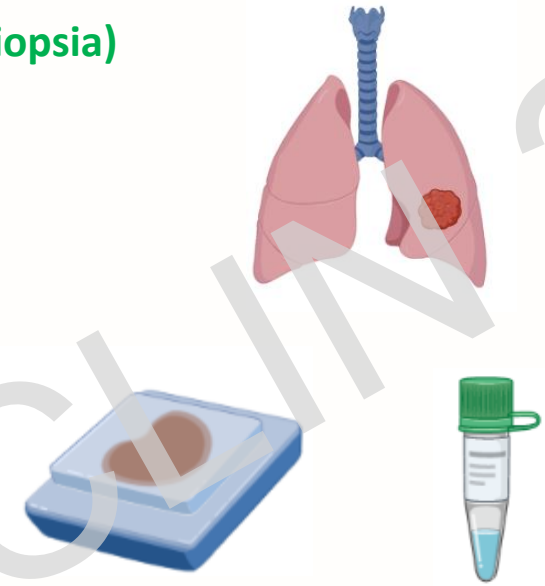
Imagen modificada de ThermoFisher

LABCLIN 2022

PARTICULARIDADES DE NGS EN BIOPSIA SÓLIDA

Poca cantidad de muestra (biopsia)

- Ej. Cáncer de pulmón



LABCLIN 2022

PARTICULARIDADES DE NGS EN BIOPSIA SÓLIDA

Necesidad de cobertura elevada

- Variantes <u>hereditarias</u>:
  - **100 %** (homocigosis)
  - **50 %** (heterocigosis)

Created with BioRender.com

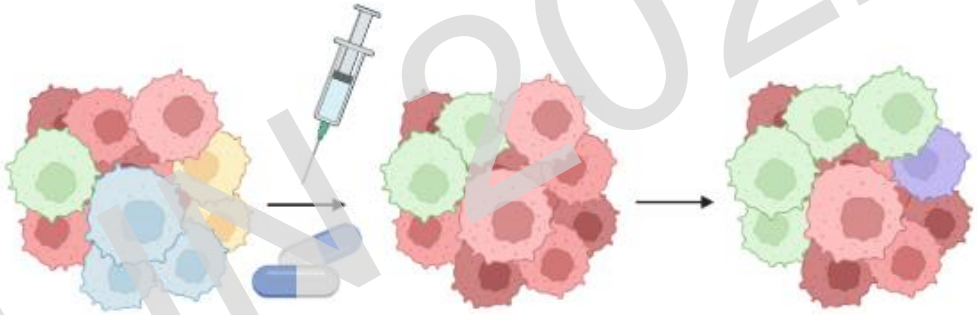
- Variantes <u>somáticas</u>: **1-100%**
  - **Heterogeneidad de la biopsia** (células tumorales + células no tumorales)
  - **Heterogeneidad del tumor** (diferentes **subclones**)

LABCLIN 2022

PARTICULARIDADES DE NGS EN BIOPSIA SÓLIDA

Necesidad de cobertura elevada

- Variantes <u>hereditarias</u>:
  - **100 %** (homocigosis)
  - **50 %** (heterocigosis)



Created with BioRender.com

- Variantes <u>somáticas</u>: **1-100%**
  - **Heterogeneidad de la biopsia** (células tumorales + células no tumorales)
  - **Heterogeneidad del tumor** (diferentes **subclones**)

- Técnicas actuales: detección al **5%**

LABCLIN 2022

PARTICULARIDADES DE NGS EN BIOPSIA SÓLIDA

Necesidad de cobertura elevada

- Recomendaciones:
  - Mínimo 250 x
  - Muestras con elevada heterogeneidad: > **1.000 x**

- Técnicas actuales:
  - > **1.000 x**

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 19, No. 3, May 2017

ELSEVIER

the Journal of Molecular Diagnostics

jmd.amjpathol.org

SPECIAL ARTICLE

Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels

A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists

Lawrence J. Jennings,[*†] Maria E. Arcila,[*‡] Christopher Corless,[*§] Suzanne Kamel-Reid,[*¶‖] Ira M. Lubin,[*,**] John Pfeifer,[*††] Robyn L. Temple-Smolkin,[‡‡] Karl V. Voelkerding,[*§§¶¶] and Marina N. Nikiforova[*‖‖]

LABCLIN 2022

ELECCIÓN DE LA TÉCNICA DE SECUENCIACIÓN MASIVA

Preparación de librerías

1) Métodos basados en **captura por hibridación**
2) Métodos basados en generación de **amplicones**

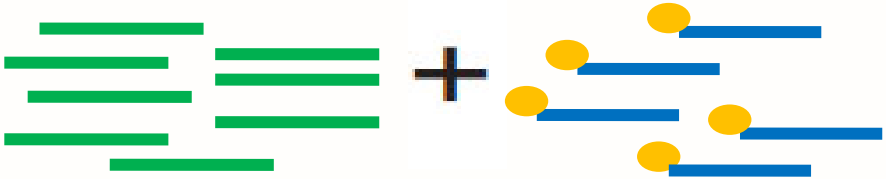
Técnica de secuenciación

1) Illumina
2) IonTorrent

LABCLIN 2022

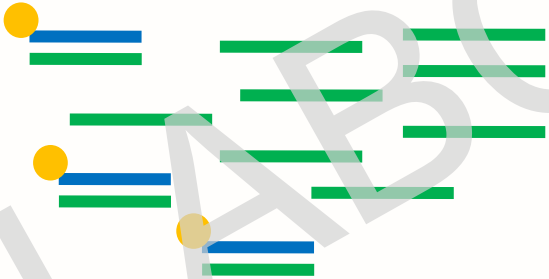
Preparación de librerías

- **Captura por hibridación**



Fragmentos de DNA del paciente

Sondas sintetizadas **complementarias a las regiones de interés**



- **Métodos basados en amplicones**

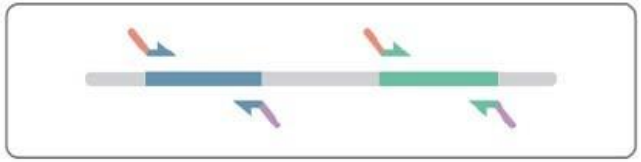
Diseño de cientos de **primers para amplificar las regiones de interés**

Pool de primers: PCR múltiple (una única reacción)

Millones de amplicones procedentes de las regiones de interés

LABCLIN 2022

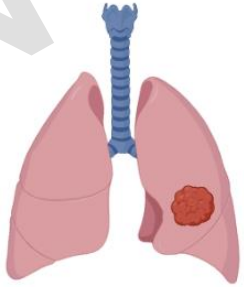
Métodos basados en amplicones:



Ventajas:

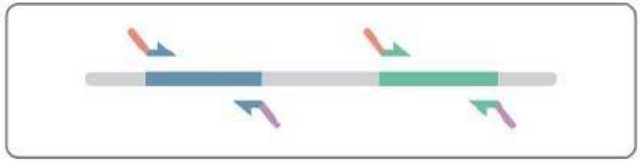
- **Menor** requerimiento de **material inicial**

10 ng DNA



LABCLIN 2022

Métodos basados en amplicones:



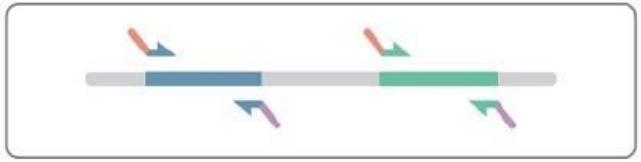
Ventajas:

- **Menor** requerimiento de **material inicial**
- Mejor rendimiento en **regiones con alta homología (pseudogenes)**
    - Amplicones: diseño de primers consigue diferenciar las regiones homólogas

- Detección de alteraciones que disrumpen la secuencia original
    - **Fusiones**
    - Regiones hipervariables

LABCLIN 2022

Métodos basados en amplicones:



Problema:

Variantes en la zona de hibridación de los primers: **no amplificación** (*allele drop-out*)

LABCLIN 2022

Técnica de secuenciación 1) Illumina

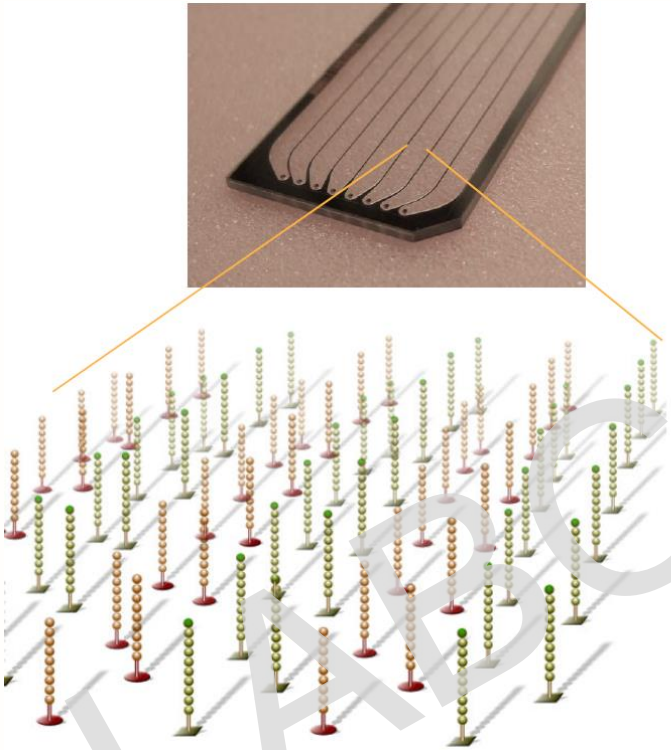
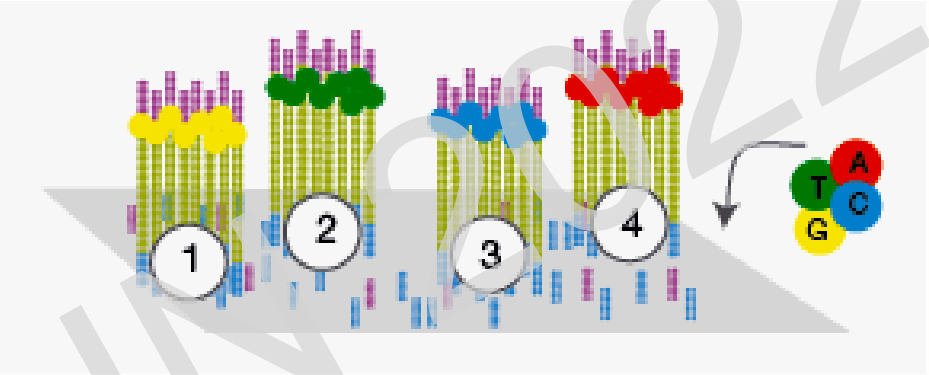


Imagen modificada de Illumina



4 nucleótidos en cada ciclo:

- Marcados con **fluorescencia**: cada base de un color
- Con un **terminador**: sólo una base es añadida en cada ciclo

LABCLIN 2022

Técnica de secuenciación 1) Illumina

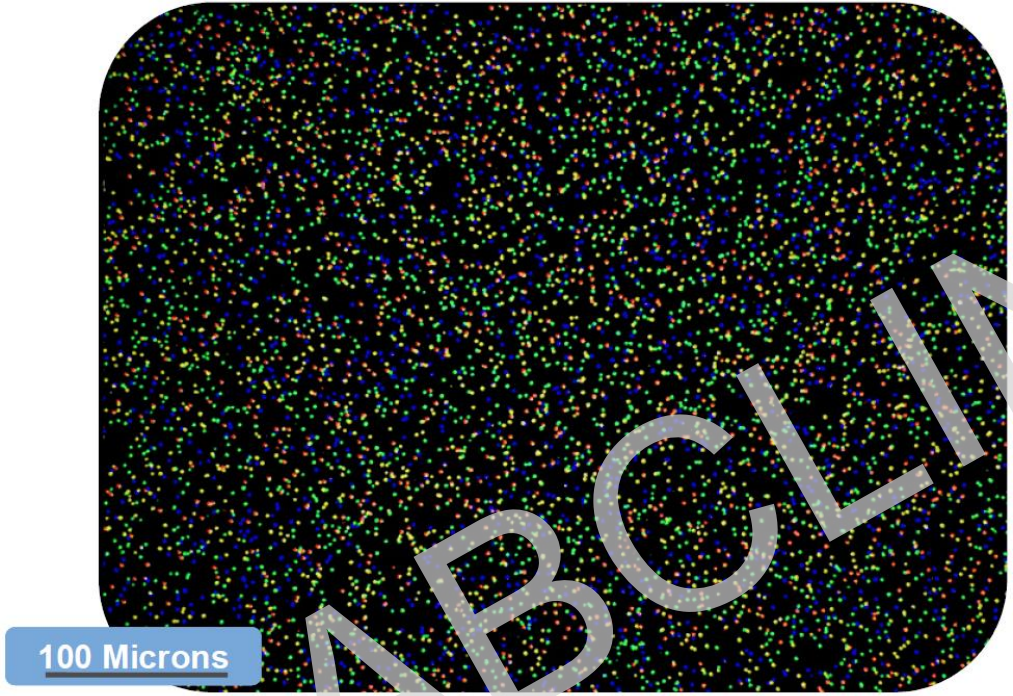


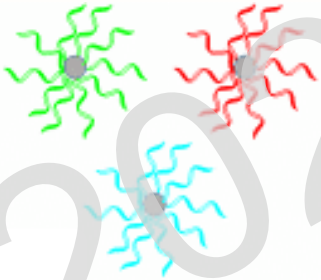
Imagen modificada de Illumina

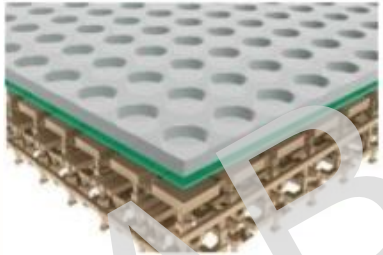
- Calidad de secuenciación elevada
- Librerías: hibridación o amplicones
- Secuenciación: elevada duración

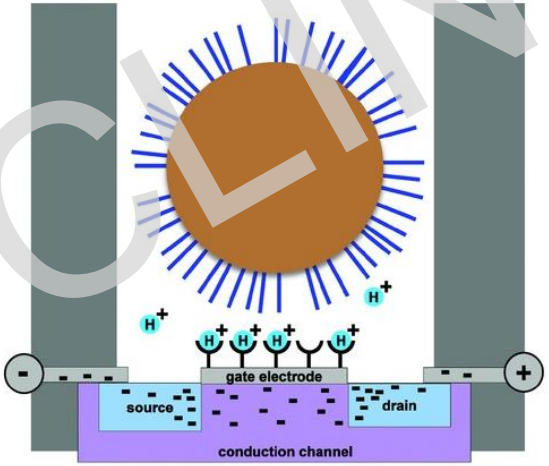
LABCLIN 2022

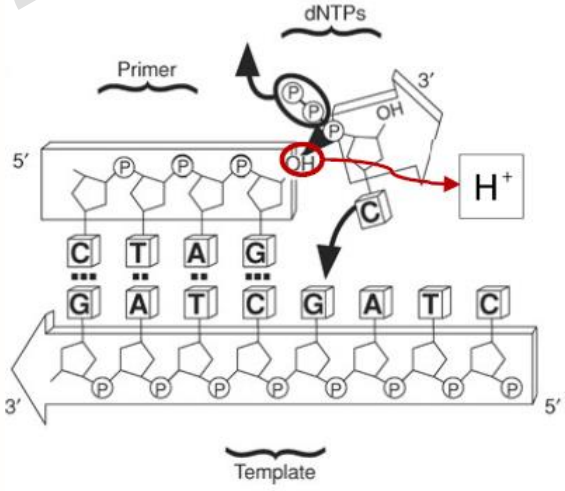
Técnica de secuenciación 2) IonTorrent

Librería: **amplicones**



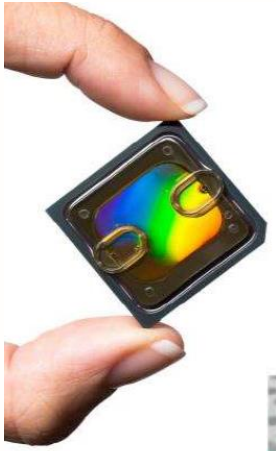




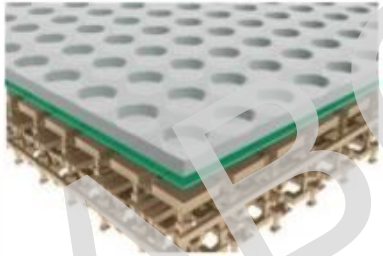


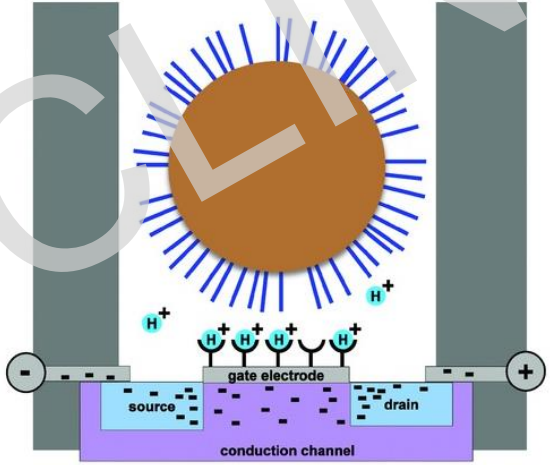
LABCLIN 2022

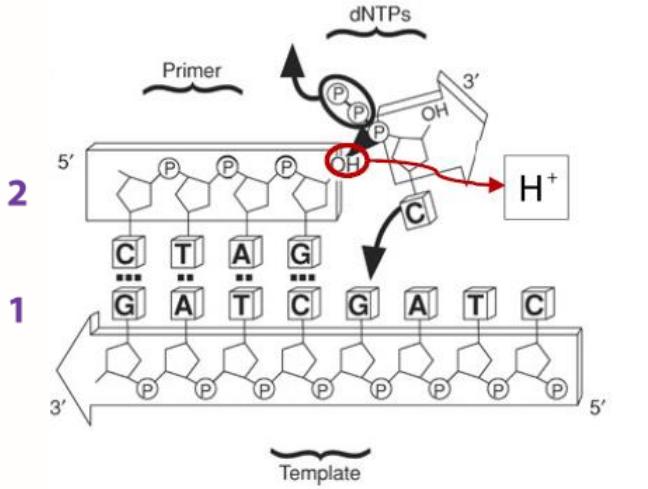
Técnica de secuenciación 2) IonTorrent



- Secuenciación más rápida (2 horas)
- Dificultad con homopolímeros







LABCLIN 2022

Hospital San Pedro (Logroño)

NGS para estudios hereditarios: Illumina

Miseq

- Paneles custom
- Tipaje HLA de alta resolución

NextSeq 500

- Exomas clínicos
- NIPT (Test Prenatal No invasivo)

LABCLIN 2022

Hospital San Pedro (Logroño)

NGS para estudios somáticos (biopsia sólida): IonTorrent (ThermoFisher)

S5 + Servidor para análisis de datos

Ion Chef

- Proceso completamente **automatizado**
- Amplicones:
  - **10 ng** de DNA inicial
  - DNA / **RNA** (fusiones)
- Análisis bioinformático (**bases de datos**)

LABCLIN 2022

Hotspot genes				Full-length genes			Copy number genes		Gene fusions (inter- and intragenic)		
AKT1	FOXL2	MET	AKT2	ATM	TP53	MSH6	AKT1	PPARG	ALK	RET	NF1
ALK	GATA2	MTOR	AKT3	BAP1	TSC1	NBN	AR	TERT	AXL	ROS1	NOTCH1
AR	GNA11	MYD88	AXL	BRCA1	TSC2	NOTCH2	CCND1	AKT2	BRAF	AKT2	NOTCH4
ARAF	GNAQ	NFE2L2	CCND1	BRCA2	ARID1A	NOTCH3	CCNE1	AKT3	EGFR	AR	NRG1
BRAF	GNAS	NRAS	CDK6	CDKN2A	ATR	PALB2	CDK4	ALK	ERBB2	BRCA1	NTRK2
BTK	HNF1A	PDGFRA	ERCC2	FBXW7	ATRX	PMS2	CDK6	AXL	ERG	BRCA2	NUTM1
CBL	HRAS	PIK3CA	FGFR4	MSH2	CDK12	POLE	EGFR	BRAF	ETV1	CDKN2A	PDGFRB
CDK4	IDH1	PPP2R1A	H3F3A	NF1	CDKN1B	RAD50	ERBB2	CCND2	ETV4	ERBB4	PIK3CA
CHEK2	IDH2	PTPN11	HIST1H3B	NF2	CDKN2B	RAD51	FGFR1	CCND3	ETV5	ESR1	PRKACA
CSF1R	JAK1	RAC1	MAP2K4	NOTCH1	CHEK1	RAD51B	FGFR2	CDK2	FGFR1	FGR	PRKACB
CTNNB1	JAK2	RAF1	MDM4	PIK3R1	CREBBP	RAD51C	FGFR3	CDKN2A	FGFR2	FLT3	PTEN
DDR2	JAK3	RET	MYC	PTCH1	FANCA	RAD51D	FGFR4	CDKN2B	FGFR3	JAK2	RAD51B
EGFR	KDR	RHEB	MYCN	PTEN	FANCD2	RNF43	FLT3	ESR1	NTRK1	KRAS	RB1
ERBB2	KIT	RHOA	NTRK1	RB1	FANCI	SETD2	IGF1R	FGF19	NTRK3	MDM4	RELA
ERB83	KNSTRN	SF3B1	NTRK2	SMARCB1	MLH1	SLX4	KIT	FGF3	PDGFRA	MET	RSPO2
ERBB4	KRAS	SMO	PDGFRB	STK11	MRE11A	SMARCA4	KRAS	NTRK1	PPARG	MYB	RSPO3
ESR1	MAGOH	SPOP	PIK3CB				MDM2	NTRK2	RAF1	MYBL1	TERT
EZH2	MAP2K1	SRC	ROS1				MDM4	NTRK3			
FGFR1	MAP2K2	STAT3	SMAD4				MET	PDGFRB			
FGFR2	MAPK1	U2AF1	TERT				MYC	PIK3CB			
FGFR3	MAX	XPO1	TOP1				MYCL	RICTOR			
FLT3	MED12						MYCN	TSC1			
							PDGFRA	TSC2			
							PIK3CA				

Figure 1. List of gene targets in Oncomine Comprehensive Assay v3. Genes in blue are additional targets in the Oncomine Comprehensive Assay v3 that were not included in the first version.

Estudio de diferentes tipos de alteración en un único análisis

LABCLIN 2022

Table 1. Oncomine Childhood Cancer Research Assay Content.

Comprehensive mutation coverage (86)					CNV (28)		Full exon coverage (44)			Fusion and expression (97)					Gene expression
ABL1	CSF1R	GATA2	MAP2K2	RAF1	ALK	IGF1R	APC	GATA3	RUNX1	ABL1	FGFR2	MEF2B	NUP214	SSBP2	BCL2
ABL2	CSF3R	GNAQ	MET	RET	BRAF	JAK1	ARID1A	GNA13	SMARCA4	ABL2	FGFR2	MET	NUP98	STAG2	BCL6
ALK	CTNNB1	H3F3A	MPL	RHOA	CCND1	JAK2	ARID1B	ID3	SMARCB	AFF3	FGFR3	MKL1	NUTM1	STAT6	FGFR1
ACVR1	DAXX	HDAC9	MSH6	SETBP1	CDK4	JAK3	ATRX	IKZF1	SOCS2	ALK	FLT3	MLLT10	NUTM2B	TAL1	FGFR4
AKT1	DNMT3A	HIST1H3B	MTOR	SETD2	CDK6	KIT	CDKN2A	KDM6A	SUFU	BCL11B	FOSB	MN1	PAX3	TCF3	IGF1R
ASXL1	EGFR	HRAS	NCOR2	SH2B3	EGFR	KRAS	CDKN2B	KMT2D	SUZ12	BCOR	FUS	MYB	PAX5	TFE3	MET
ASXL2	EP300	IDH1	NOTCH1	SH2D1A	ERBB2	MDM2	CEBPA	MYOD1	TCF3	BCR	GLI1	MYBL1	PAX7	TP63	MYCN
BRAF	ERBB2	IDH2	NPM1	SMO	ERBB3	MDM4	CHD7	NF1	TET2	BRAF	GLIS2	MYH11	PDGFB	TSLP	MYC
CALR	ERBB3	IL7R	NRAS	STAT3	FGFR1	MET	CRLF1	NF2	TP53	CAMTA1	HMGA2	MYH9	PDGFRA	TSPAN4	TOP2A
CBL	ERBB4	JAK1	NT5C2	STAT5B	FGFR2	MYC	DDX3X	PHF6	TSC1	CCND1	JAK2	NCOA2	PDGFRB	UBTF	
CCND1	ESR1	JAK2	PAX5	TERT	FGFR3	MYCN	DICER1	PRPS1	TSC2	CIC	KAT6A	NCOR1	PLAG1	USP6	
CCND3	EZH2	JAK3	PDGFRA	TPMT	FGFR4	PDGFRA	EBF1	PSMB5	WHSC1	CREBBP	KMT2A	NOTCH1	RAF1	WHSC1	
CCR5	FASLG	KDM4C	PDGFRB	USP7	GLI1	PIK3CA	EED	PTCH1	WT1	CRLF2	KMT2B	NOTCH2	RANBP17	YAP1	
CDK4	FBXW7	KDR	PIK3CA	ZMYM3	GLI2		FAS	PTEN	XIAP	CSF1R	KMT2C	NOTCH4	RECK	ZMYND11	
CIC	FGFR2	KIT	PIK3R1				GATA1	RB1		DUSP22	KMT2D	NPM1	RELA	ZNF384	
CREBBP	FGFR3	KRAS	PPM1D							EGFR	LMO2	NR4A3	RET		
CRLF2	FLT3	MAP2K1	PTPN11							ETV6	MAML2	NTRK1	ROS1		
										EWSR1	MAN2B1	NTRK2	RUNX1		
										FGFR1	MECOM	NTRK3	SS18		

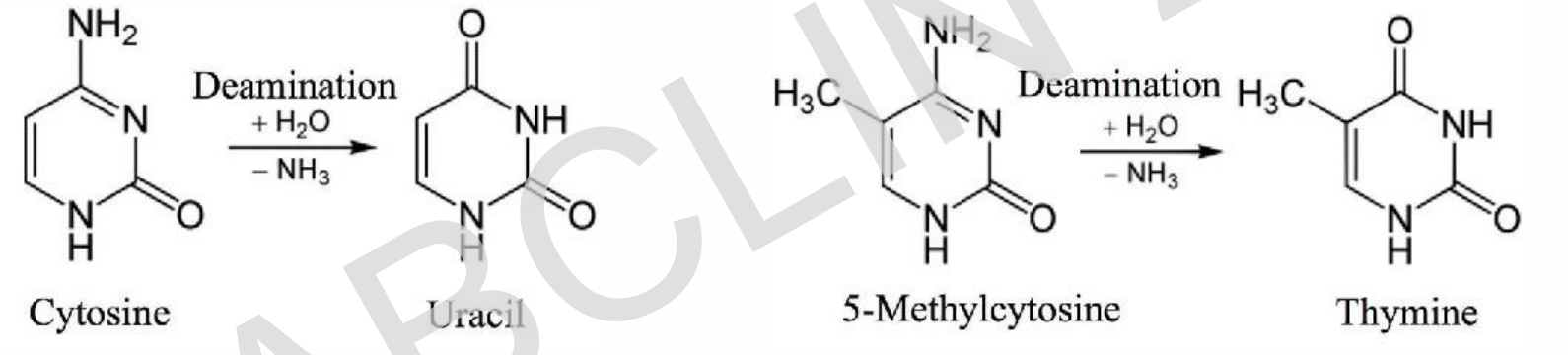
Sarcomas: fusiones

LABCLIN 2022

BIOPSIAS: ASPECTOS A TENER EN CUENTA

Tejido fijado en formalina e impregnado en parafina (FFPE)

- Ácidos nucleicos fragmentados y químicamente alterados
- Paso crítico: Fijación con formalina (12-24 horas)
- **Desaminación** de citosina: formación de uracilo



- Variantes artefactuales (**falsos positivos**) : C>T o G>A con una frecuencia generalmente inferior al 15%

LABCLIN 2022

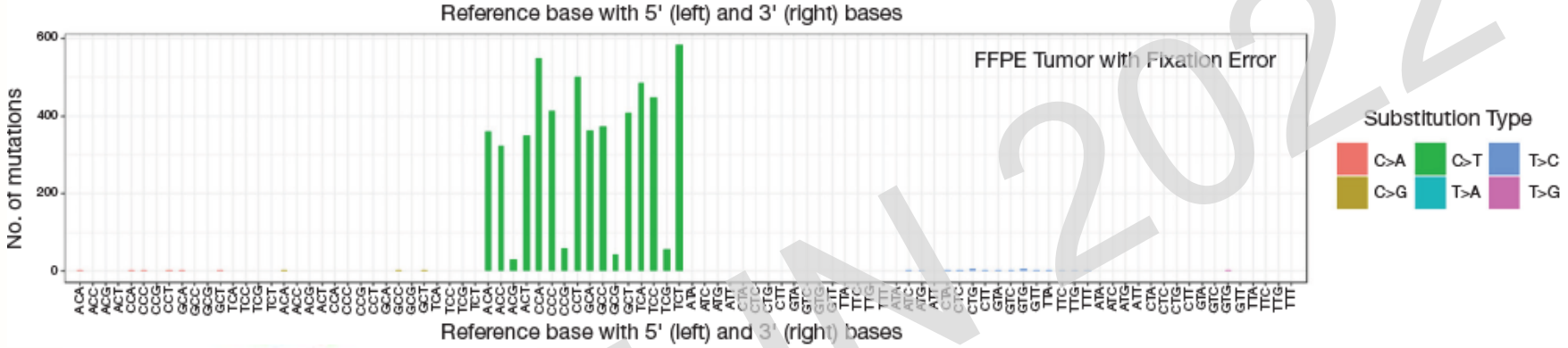
Locus	Oncomine Variant Class	Oncomine Gene Class	Genes	Amino Acid Change	Copy Number	Read Counts	Genotype
chr1:27100357	Truncating	Loss-of-Function	ARID1A	p.Gln1357Ter			C/T
chr2:25966115	Truncating	Loss-of-Function	ASXL2	p.Gln1031Ter			G/A
chr2:26022344	Truncating	Loss-of-Function	ASXL2	p.Gln105Ter			G/A
chr2:29443589	Hotspot	Gain-of-Function	ALK	p.Glu1210Lys			C/T
chr4:1976666							C/T
chr4:106155931							C/T
chr5:35873648							G/A
chr5:112177901	Truncating	Loss-of-Function	APC	p.Arg2204Ter			C/T
chr6:157100543	Truncating	Loss-of-Function	ARID1B ...(2)	p.Gln577Ter			C/T
chr6:157519994							C/T
chr7:140481411	Hotspot	Gain-of-Function	BRAF	p.Gly466Glu			C/T
chr8:61654553	Truncating	Loss-of-Function	CHD7	p.Gln188Ter			C/T
chr8:61754270	Truncating	Loss-of-Function	CHD7	p.Trp1534Ter			G/A
chr8:61764694	Truncating	Loss-of-Function	CHD7	p.Gln1928Ter			C/T
chr9:98209637	Truncating	Loss-of-Function	PTCH1	p.Gln1301Ter			G/A
chr9:98231143	Truncating	Loss-of-Function	LOC100507346 ...(2)	p.Gln714Ter			G/A
chr9:139399229	Truncating	Loss-of-Function	NOTCH1	p.Trp1638Ter			C/T
chr9:139399303	Truncating	Loss-of-Function	NOTCH1	p.Gln1614Ter			G/A
chr10:43609937	Hotspot	Gain-of-Function	RET	p.Cys630Tyr			G/A
chr11:32456318	Truncating	Loss-of-Function	WT1 ...(2)	p.Gln197Ter			G/A

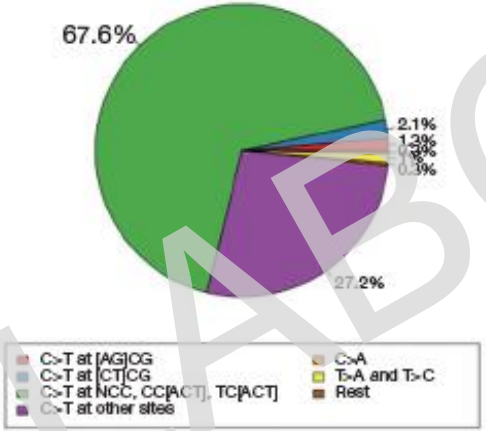
- Muestra de FFPE con 5 años de antigüedad
- 42 variantes: todas C/T o G/A con frecuencia <3%

¿Variantes reales o artefactos?

LABCLIN 2022

Patrón mutacional: Estudio del tipo de sustituciones y su contexto nucleotídico

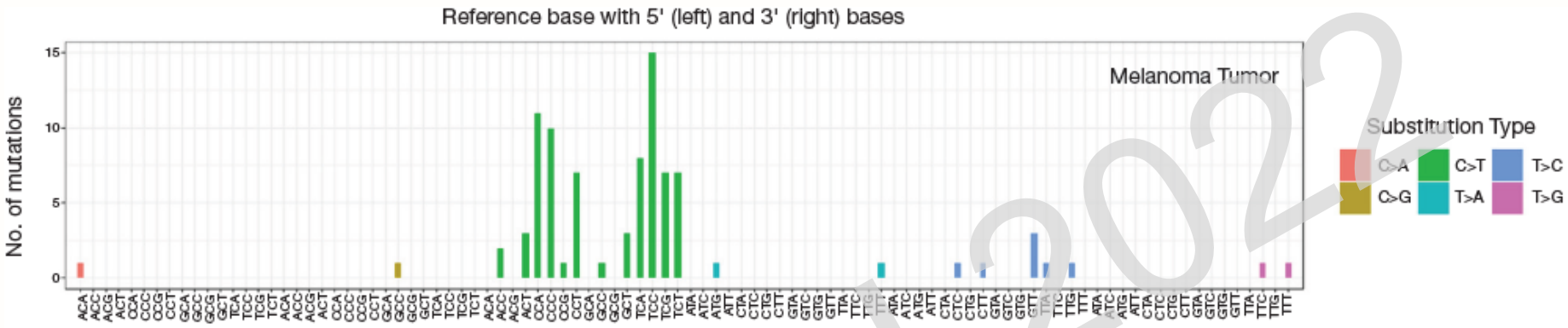


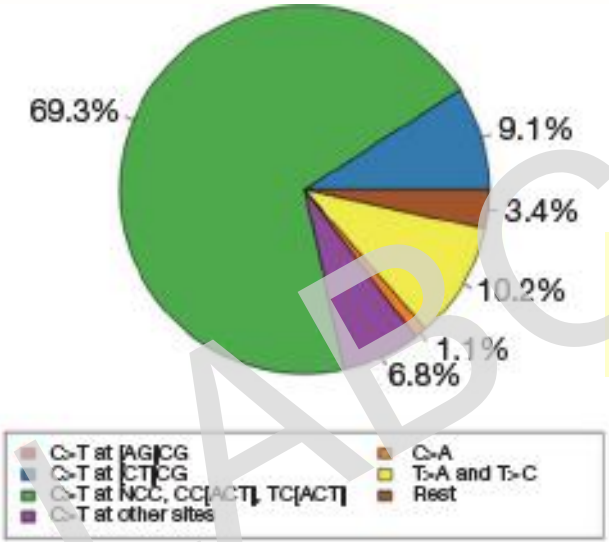


Artefacto debido a fijación por formalina

Transl Lung Cancer Res 2018;7(6):616-630

LABCLIN 2022

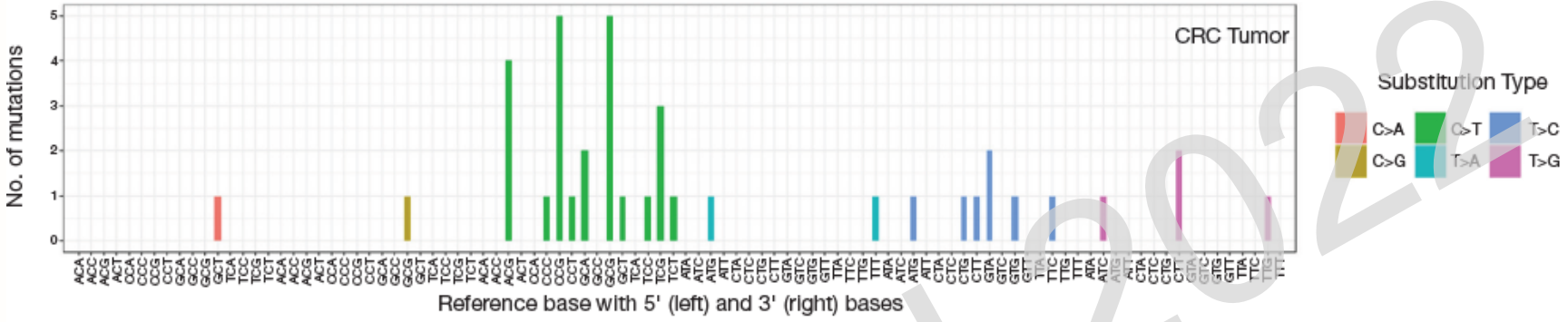


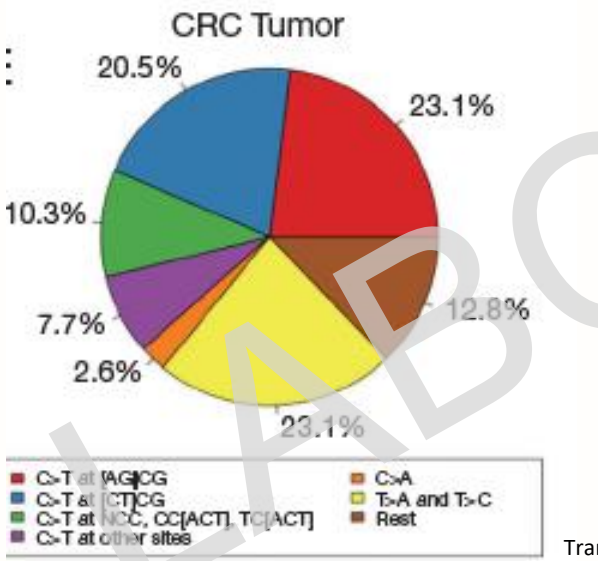


Patrón mutacional del daño por UV: melanoma

Transl Lung Cancer Res 2018;7(6):616-630

LABCLIN 2022

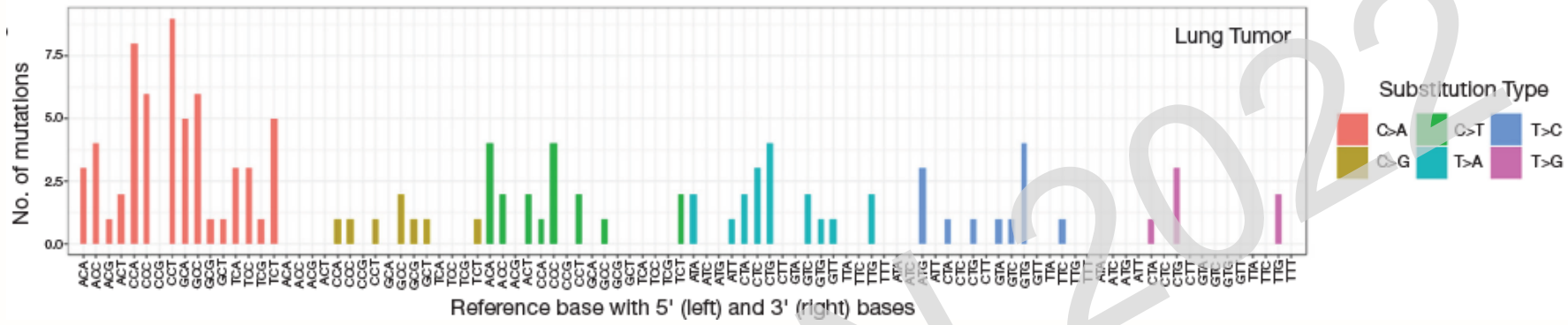


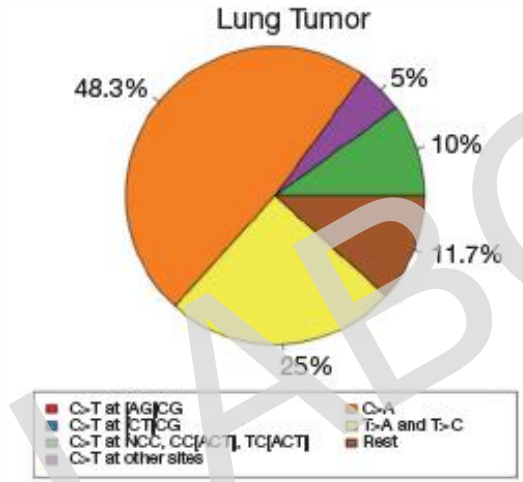


Desaminación espontánea de 5-metilcitosina: cáncer colorrectal

Transl Lung Cancer Res 2018;7(6):616-630

LABCLIN 2022





Patrón mutacional del daño por tabaco: cáncer de pulmón

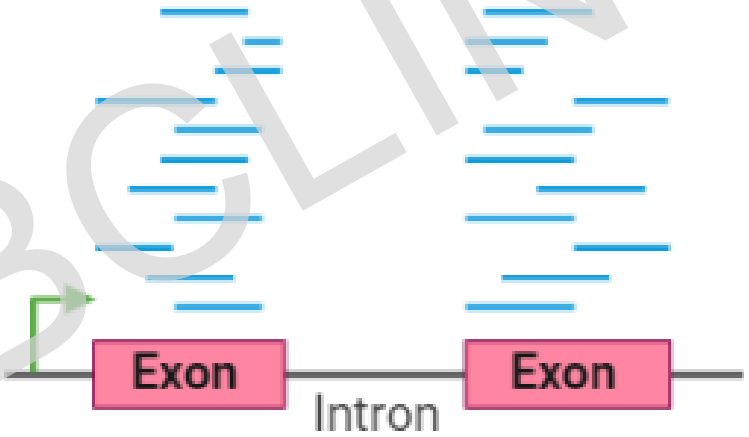
Transl Lung Cancer Res 2018;7(6):616-630

LABCLIN 2022

BIOPSIAS: ASPECTOS A TENER EN CUENTA

Detección de fusiones ¿DNA o RNA?

- **DNA:**
  - Largas regiones intrónicas



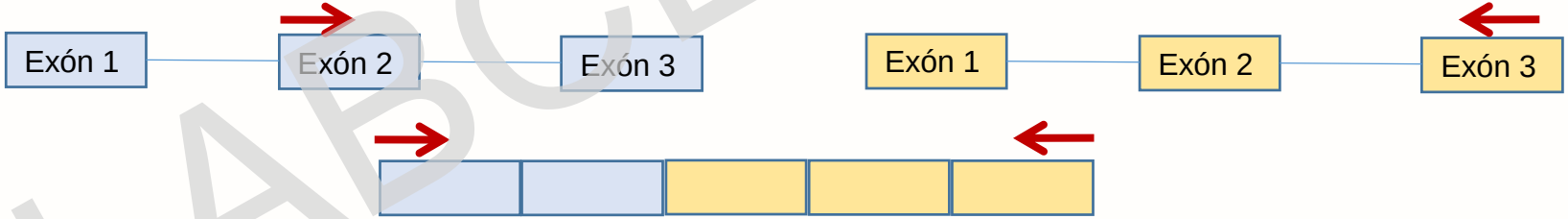
Created with BioRender.com

LABCLIN 2022

BIOPSIAS: ASPECTOS A TENER EN CUENTA

Detección de fusiones ¿DNA o RNA?

- **DNA:**
  - Largas regiones intrónicas
  - No es necesario conocer el otro gen implicado en la fusión
- **RNA:**
  - Primers en exones: no es necesario secuenciar toda la zona intrónica



LABCLIN 2022

BIOPSIAS: ASPECTOS A TENER EN CUENTA

Detección de fusiones ¿DNA o RNA?

- **DNA:**
  - Largas regiones intrónicas
  - No es necesario conocer el otro gen implicado en la fusión
- **RNA:**
  - Primers en exones: no es necesario secuenciar toda la zona intrónica

  - Es necesario conocer los otros genes implicados en las fusiones
  - Información sobre el nivel de expresión del transcrito
  - Sólo detecta fusiones que se transcriben (con potencial oncogénico)

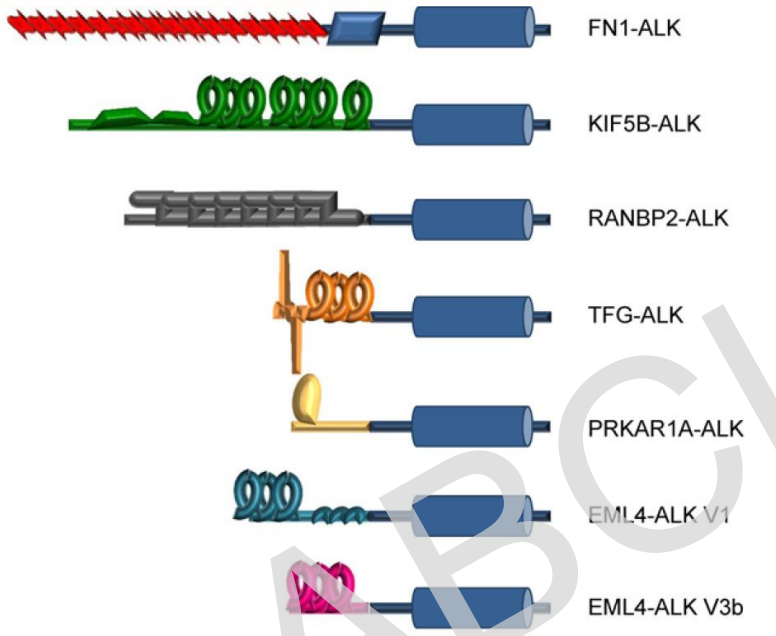
LABCLIN 2022

***ALK*:**

- Fusión ***EML4-ALK*** en el 2-7% de los **adenocarcinomas de pulmón**
- Tratamiento: **inhibidores** dirigidos frente a ALK (**crizotinib, ceritinib**)

LABCLIN 2022

- Múltiples compañeros de fusión (más de 50 descritos)
- Múltiples puntos de rotura de *EML4-ALK*



Mol Cancer Res; 16(11) November 2018

Tradicionalmente los reordenamientos de *ALK* se detectan mediante **FISH**: no información sobre el gen compañero de fusión ni los puntos de corte

60% de los pacientes tratados con inhibidor de ALK: tratamiento fracasa

NGS: información sobre los genes compañeros de fusión puntos de corte EML4-ALK: ¿diferente respuesta a los inhibidores?

LABCLIN 2022

Fusiones *EWSR1*: tumores de partes blandas

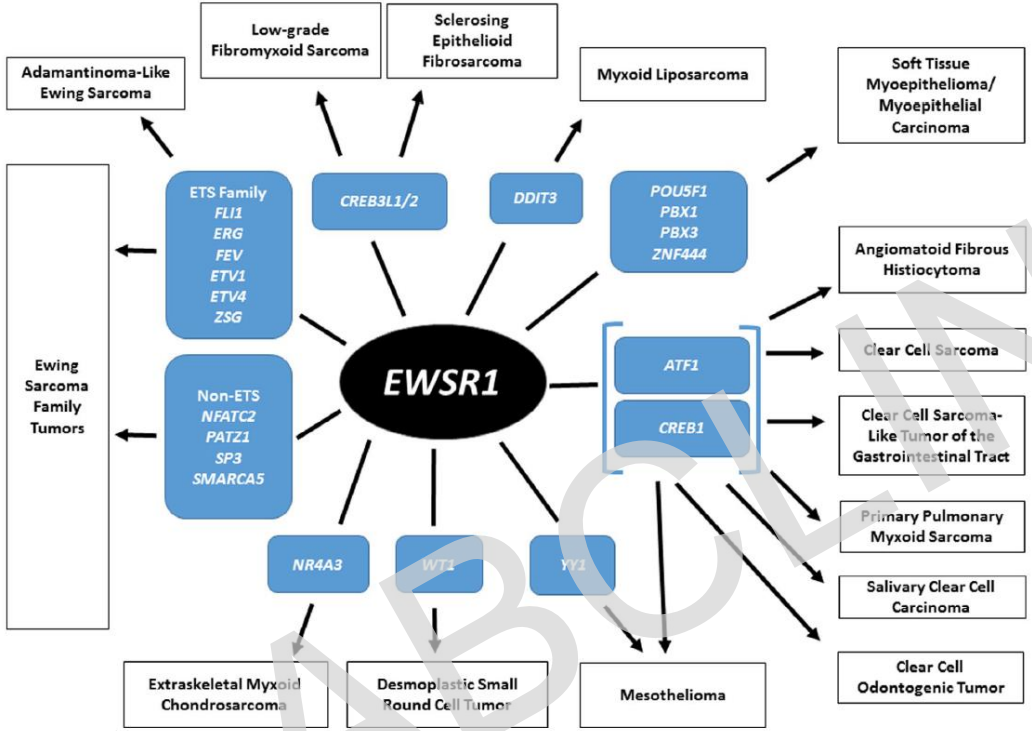


Figure 1. Ewing sarcoma breakpoint region 1 gene (*EWSR1*) fusion variants in sarcomas and in other tumor types. *FLI1* indicates friend leukemia virus integration 1 gene.

DOI: 10.1002/cncy.22239

- **Tumores morfológicamente idénticos se caracterizan por diferentes fusiones de *EWSR1***
- **Recomendación: NGS para detectar fusiones**

LABCLIN 2022

BIOPSIAS: ASPECTOS A TENER EN CUENTA

Clasificación de las variantes

- **Hereditario (germinal):**

1) Patogénica
2) Probablemente Patogénica
3) Significado Incierto
4) Probablemente Benigna
5) Benigna

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 19, No. 3, May 2017

ELSEVIER

the Journal of Molecular Diagnostics

jmd.amjpathol.org

SPECIAL ARTICLE

Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels

CrossMark

A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists

Lawrence J. Jennings,*† Maria E. Arcila,*‡ Christopher Corless,*§ Suzanne Kamel-Reid,*¶‖ Ira M. Lubin,*,** John Pfeifer,*†† Robyn L. Temple-Smolkin,‡‡ Karl V. Voelkerding,*§§¶¶ and Marina N. Nikiforova*‖‖

From the Next-Generation Sequencing Analytical Validation Working Group of the Clinical Practice Committee, Association for Molecular Pathology,‡‡*

LABCLIN 2022

BIOPSIAS: ASPECTOS A TENER EN CUENTA

Clasificación de las variantes encontradas

- **Somático:**

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 19, No. 1, January 2017

ELSEVIER

the Journal of Molecular Diagnostics

jmd.amjpathol.org

SPECIAL ARTICLE

Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer

CrossMark

A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists

Marilyn M. Li,*† Michael Datto,*‡ Eric J. Duncavage,*§ Shashikant Kulkarni,*¶ Neal I. Lindeman,*‖ Somak Roy,*,** Apostolia M. Tsimberidou,*†† Cindy L. Vnencak-Jones,*‡‡ Daynna J. Wolff,*§§ Anas Younes,*¶¶ and Marina N. Nikiforova*,**

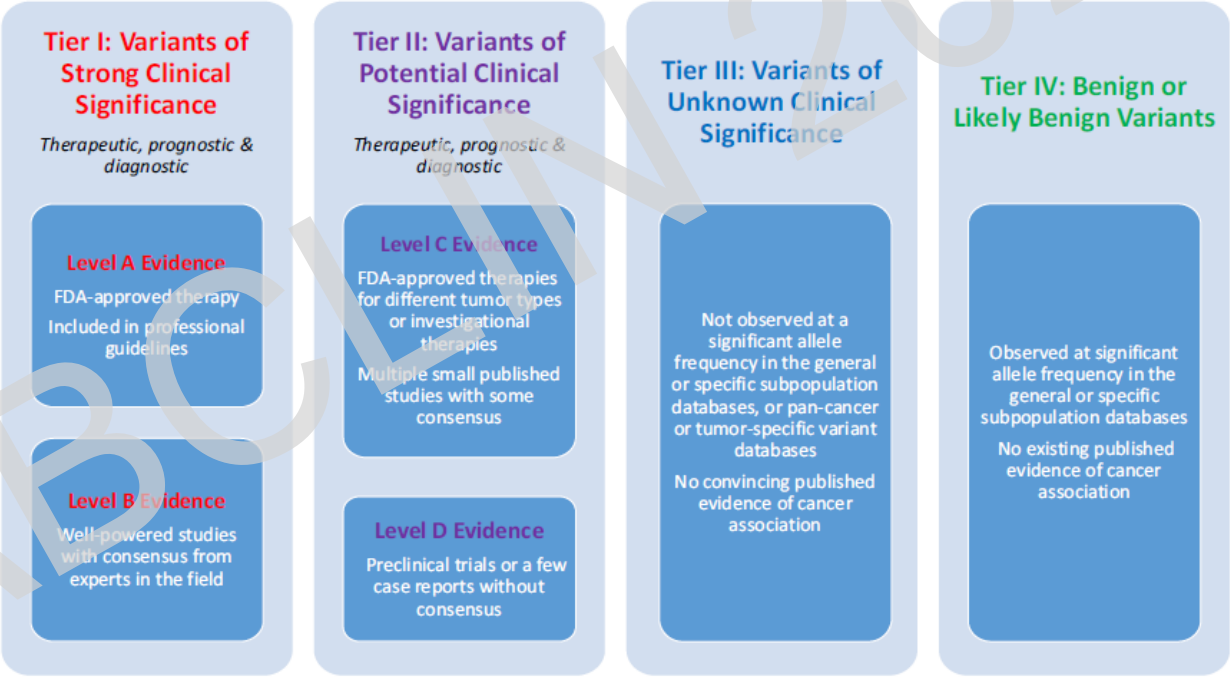
From the Interpretation of Sequence Variants in Somatic Conditions Working Group of the Clinical Practice Committee, Association for Molecular Pathology, Bethesda, Maryland; the Department of Pathology and Laboratory Medicine,† Division of Genomic Diagnostics, the Children's Hospital of Philadelphia, University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania; the Duke University School of Medicine,‡ Durham, North Carolina;*

LABCLIN 2022

BIOPSIAS: ASPECTOS A TENER EN CUENTA

Clasificación de las variantes encontradas

- **Somático:**



LABCLIN 2022

COMISIÓN DE PATOLOGÍA MOLECULAR

Estrategia del Hospital San Pedro (Logroño) para abordar la secuenciación masiva de tumores sólidos

LABCLIN 2022

La secuenciación se realiza en el **laboratorio de Genética del Servicio de Análisis Clínicos**.

- Mayoría de centros: secuenciación en el servicio de Anatomía Patológica
- Análisis Clínicos: experiencia previa con NGS a nivel germinal

Creación de una **Comisión de Patología Molecular**. Equipo multidisciplicar:

- Anatomía Patológica
- Oncología
- Análisis Clínicos
- Farmacia
- Hematología

- Conocimiento sobre paneles de genes: selección de casos
- Explicación de variantes detectadas

LABCLIN 2022

Estrategia en Cáncer del Sistema Nacional de Salud, en el **Objetivo 13**:

La decisión terapéutica debe estar basada en las guías de práctica clínica y protocolos de cada centro hospitalario, para cada tipo de tumor. Los pacientes diagnosticados de cáncer serán tratados en el marco de un ***equipo multidisciplinar*** *e integrado, preferentemente en un comité de tumores, y con un profesional que actúe como referente para el paciente.*

LABCLIN 2022

Funciones de la Comisión de Patología Molecular:

- **Analizar los casos clínicos** en los que puede haber un **beneficio** añadido de **determinaciones genéticas**

- **Asesoramiento clínico y molecular**: decidir qué determinaciones van a implicar un cambio en la prevención, diagnóstico y tratamiento de los pacientes:

- valorar si existe una diana terapéutica o de diagnóstico y su nivel de evidencia según escala ESCAT (ESMO) u OncoKB (MSKCC)

- Protocolizar y **automatizar** aquellos casos que por la experiencia necesitan poca discusión para dar **agilidad** al proceso

- **Analizar resultados** de decisiones

LABCLIN 2022

Funcionamiento de la Comisión de Patología Molecular:

- Reunión cada **15 días**
- **Selección de 8 pacientes** para incluir en tanda de NGS
- Determinación del **tipo de panel** a realizar

Tipo de tumores seleccionados por la Comisión.

ESMO GOOD SCIENCE BETTER MEDICINE BEST PRACTICE

ANNALS OF ONCOLOGY driving innovation in oncology

REVIEW

Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group

LABCLIN 2022

Cáncer de pulmón no microcítico no escamoso

Table 3A. List of genomic alterations level I/II/III according to ESCAT in advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (NSCLC)

Gene	Alteration	Prevalence	ESCAT	References
EGFR	Common mutations (*Del19, L858R*)	15% (50%–60% Asian)	IA	Midha A, et al. *Am J Cancer Res.* 2015
ALK				
MET				
BRAF^{V600E}				
ROS1				
NTRK				
RET				
KRAS^{G12C}				
ERBB2				
BRCA 1/2	Mutations	1.2%	IIIA	Balasubramaniam S, et al. *Clin Cancer Res.* 2017
PIK3CA	Hotspot mutations	1.2%–7%	IIIA	Cancer Genome Atlas Research Network. *Nature.* 2014[60] Vansteenkiste J, et al. *J Thorac Oncol.* 2015[62]
NRG1	Fusions	1.7%	IIIB	Duruisseaux M, et al. *J Clin Oncol.* 2019[59]

NGS para detectar en un único test*:*

- Mutaciones en ***EGFR:***
- Exones 19 (deleciones) y 21 (L858R): predictoras de eficacia de inhibidores tirosina-quinasa
- Exón 20 (T790M): adquisición de resistencia

- **Fusiones *ALK***: biomarcador predictivo de respuesta a inhibidores como crizotinib

- **Fármacos específicos** para las siguientes alteraciones: *MET* (mutaciones exón 14 skipping), *BRAF* V600E, fusiones *ROS1*, fusiones *RET*, fusiones *NTRK*

LABCLIN 2022

Cáncer de mama metastásico

NGS para detectar en un único test*:*

- **Mutaciones *BRCA1/2***: predictivas de beneficio clínico a inhibidores de la PARP (olaparib)

- Alteraciones de ***ERBB2***:
- Amplificaciones: predictivas de beneficio clínico de terapias anti-HER2
- Mutaciones: predictivas de respuesta a neratinib (inhibidor de tirosina-quinasa)

- Mutaciones en ***PIK3CA***: predictivas de respuesta a Alpelisib *HR+/HER2–*

LABCLIN 2022

Colangiocarcinoma avanzado

Gene	Alteration type	Frequency
IDH1		
FGFR2		
ERBB2		
PIK3CA		
BRAF V600E		
BRCA1 and *BRC*		
MET		
NTRK	Gene fusions	2%

NGS para detectar en un único test*:*

- Mutaciones puntuales en ***IDH1***: diana molecular accionable
- Inmunohistoquímica: anticuerpo frente a la proteína IDH con la mutación común R132. No identifica las mutaciones menos frecuentes

- **Fusiones *FGFR***: biomarcador predictivo de respuesta a Pemigatinib

LABCLIN 2022

Cáncer de próstata avanzado (metastásico resistente a castración)

NGS para detectar*:*

- Alteraciones en los **genes de la vía de recombinación homóloga** de reparación de DNA (20-30 % de los pacientes)
- **Inhibidores de la PARP** (olaparib): mayor beneficio si la alteración es en ***BRCA1/2***

- Alteraciones en ***PTEN***:
- Pérdida de expresión de *PTEN* es **predictor de beneficio clínico en pacientes tratados con inhibidor de AKT** (ipatasertib) en combinación con abiraterone

LABCLIN 2022

Cáncer colorrectal metastásico

NGS no necesaria en la práctica diaria*:*

- **Mutaciones hotspots en *KRAS/NRAS*** (predicen resistencia a anticuerpos monoclonales frente a EGFR) y ***BRAF* V600E**: análisis mediante PCR a tiempo real
- Alteraciones en las proteínas reparadoras (**MLH1, MSH2, MSH6, PMS2**): se pueden identificar por inmunohistoquímica
- **Inestabilidad de microsatélites**: mediante PCR y análisis de fragmentos

LABCLIN 2022

ESMO GOOD SCIENCE BETTER MEDICINE BEST PRACTICE

ANNALS OF ONCOLOGY
driving innovation in oncology

SPECIAL ARTICLE

Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up☆

A. Oaknin[1], T. J. Bosse[2], C. L. Creutzberg[3], G. Giornelli[4], P. Harter[5], F. Joly[6,7], D. Lorusso[8,9], C. Marth[10], V. Makker[11,12], M. R. Mirza[13], J. A. Ledermann[14,15] & N. Colombo[16,17], on behalf of the ESMO Guidelines Committee*

[1]Gynaecologic Cancer Programme, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Barcelona, Spain; Departments of [2]Pathology; [3]Radiation Oncology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; [4]Department of Oncology, Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires, Argentina; [5]Department of Gynecology & Gynecologic Oncology, Ev. Kliniken Essen-Mitte, Essen, Germany; [6]ANTICIPE, Cancer and Cognition Platform, Normandie University, Caen; [7]Medical Oncology Department, Centre François Baclesse, Caen, France; [8]Department of Life Science and Public Health, Catholic University of Sacred Heart, Largo Agostino Gemelli, Rome; [9]Department of Women and Child Health, Division of Gynaecologic Oncology, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS, Rome, Italy; [10]Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University Innsbruck, Innsbruck, Austria; [11]Gynecologic Medical Oncology Service, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York; [12]Department of Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, USA; [13]Department of Oncology, Rigshospitalet, Copenhagen University Hospital, Copenhagen, Denmark; [14]Cancer Institute, University College London (UCL), London; [15]Department of Oncology, UCL Hospitals, London, UK; [16]Department of Gynecologic Oncology, Istituto Europeo di Oncologia IRCCS, Milan; [17]Department of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca, Milan, Italy

Available online XXX

LABCLIN 2022

Cáncer de endometrio:

- Clasificación tradicional: en función de características **histopatológicas** (subtipo 1 y subtipo 2)

- Clasificiación actual: subgrupos **moleculares**

Pronóstico excelente

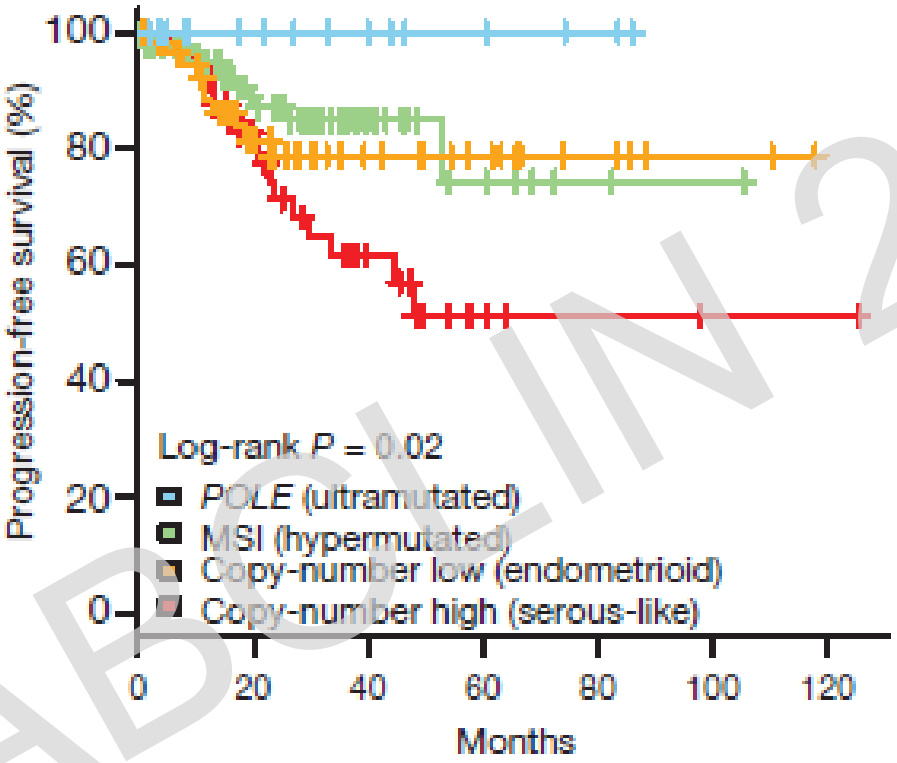
- Mutaciones en ***POLE*** + Tasa de **ultramutado** (>100 mutaciones/megabase)

- **Inestabilidad de microsatélites** + Tasa de **hipermutación** (10-100 mutaciones/megabase)

- **Muchos CNVs** somáticos + mutaciones en ***TP53***

- **Pocos CNVs** somáticos + no mutaciones en *TP53*

LABCLIN 2022



doi:10.1038/nature12113

LABCLIN 2022

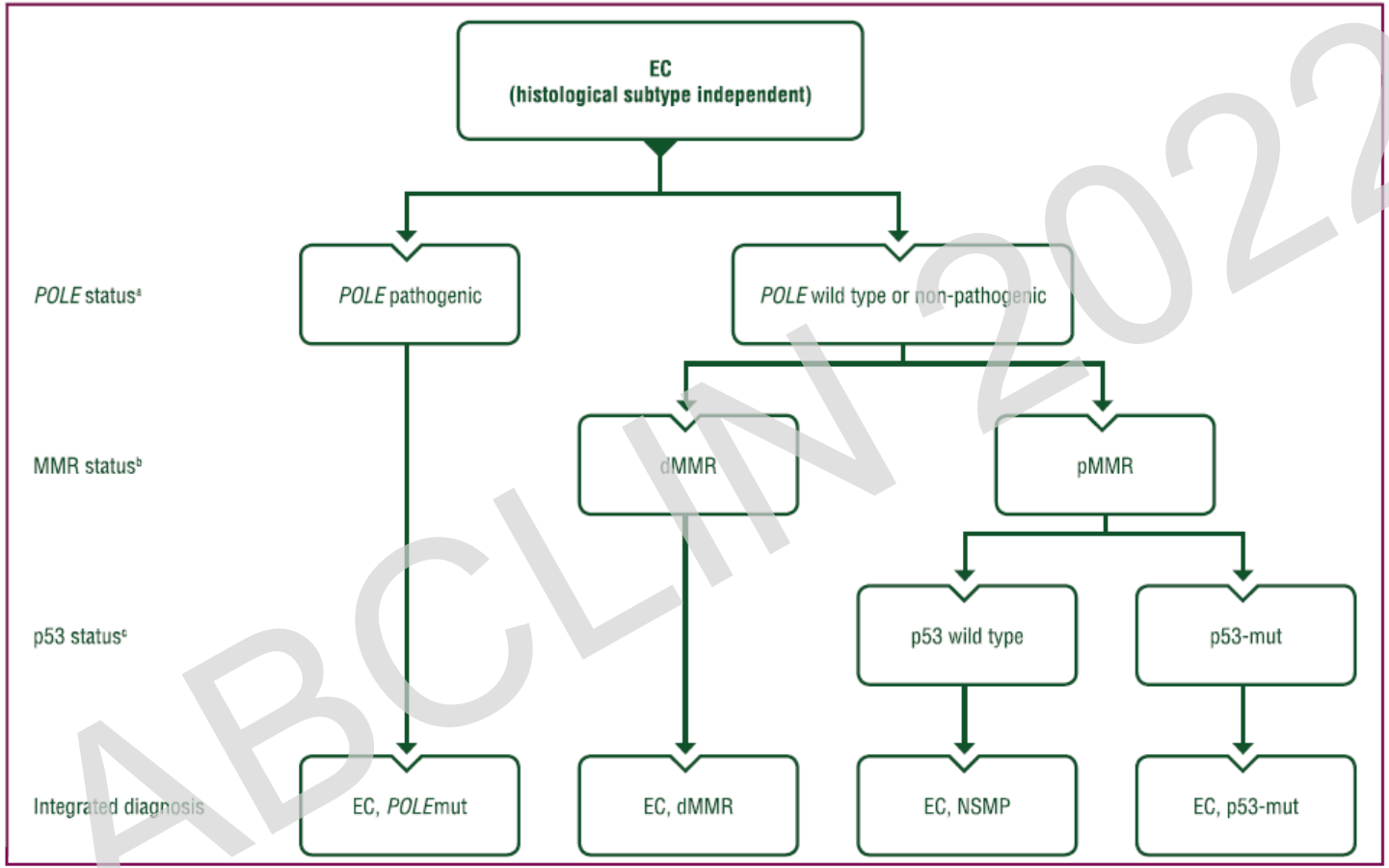


Figure 1. Diagnostic algorithm for the integrated molecular EC classification.
This algorithm can be applied to all histological subtypes of EC (including carcinosarcomas). Please refer to manuscript for further information on *POLE*mut analysis indication.
dMMR, mismatch repair deficient; EC, endometrial cancer; MMR, mismatch repair; NSMP, no specific molecular profile; p53-mut, p53-mutant; pMMR, mismatch repair-proficient; *POLE*, polymerase epsilon; *POLE*mut, polymerase epsilon-ultramutated.
[a]Pathogenic *POLE* variants include p.Pro286Arg, p.Val411Leu, p.Ser297Phe, p.Ala456Pro and p.Ser459Phe.[25]

LABCLIN 2022

Stage I-IVA EC: adjuvant therapy for low- and intermediate-risk patients[a]

Low risk

Patients with stage IA (G1 and G2) with EEC (MMRd or NSMP) and no or focal LVSI

- Adjuvant therapy is not recommended [I, E]

Patients with stage I-II *POLE*mut cancers

- Adjuvant therapy is not recommended [III, D]

Intermediate risk

For patients with stage IA G3 EEC (dMMR or NSMP) and no or focal LVSI

- Adjuvant VBT is recommended [I, A]
- Omission of adjuvant brachytherapy can be considered, especially for patients aged <60 years [III, C]

For patients with stage IB G1-G2 EEC (dMMR or NSMP) and no or focal LVSI

- Adjuvant VBT is recommended [I, A]
- Omission of adjuvant brachytherapy can be considered, especially for patients aged <60 years [III, C]

For patients with Stage II G1 EEC (dMMR or NSMP) and no or focal LVSI

- Adjuvant VBT is recommended [II, B]
- Omission of adjuvant brachytherapy can be considered, especially for patients aged <60 years [III, C]

For patients with Stage IA p53-abn tumours not infiltrating the myometrium or restricted to a polyp

- Adjuvant therapy is not recommended [III, E]

LABCLIN 2022

Sarcomas (tumores de tejidos blandos):

- **Difícil de diferencial histológicamente**: comparten características morfológicas muy similares
- Detección de **fusiones génicas patognomónicas**

Cáncer de ovario:

- Genes de la vía de **reparación homóloga**

Otros tipos de tumores (infrecuentes):

- Consenso de la Comisión de Patología Molecular

LABCLIN 2022

CASOS CLÍNICOS

LABCLIN 2022

Caso 1:

- Mujer de 45 años con **tumoración pélvica** de gran tamaño (9.5 cm) entre recto y vagina.

Tumor gastrointestinal (**GIST**) dependiente de recto, de bajo grado, de 9.5 cm de diámetro máximo que respeta la mucosa y los bordes quirúrgicos.

Estudio mutacional (Sanger):

- **No se detecta ninguna mutación en *KIT*** ni en *PDGFRA*
- Mutaciones en *KIT* se detectan en el 80% de los tumores GIST. Buena respuesta a Imatinib

Se decide tratamiento neoadyuvante con Imatinib y posterior reevaluación

- Diarreas intensas, **se suspende tratamiento con Imatinib**

LABCLIN 2022

NGS:

- Mutación en el gen ***KIT*** (NM_000222.3): c.1671_1679delGAAGGTTGT (p.Trp557_Val560delinsCys)
- Mutaciones en el exón 11 de *KIT* son típicamente sensibles a Imatinib

Se **reintroduce Imatinib** a dosis más baja

LABCLIN 2022

Caso 2:

- Mujer de 44 años con **carcinoma ductal infiltrante de mama (metástasis hepática)**.
- Receptor hormonal (HR) positivo y HER2 negativo.

- **NGS**: ***PIK3CA*** (NM_006218.4): c.3140A>G (p.His1047Arg)

- 40% de tumores avanzados de mama HR+/HER2- presentan mutaciones en *PIK3CA*, siendo p.H1047R la más común (dominio quinasa)

- Alpelisib: **tratamiento dirigido** a mutaciones en ***PIK3CA*** en tumores de mama metastásicos HR+/HER2-

LABCLIN 2022

Caso 3:

- Mujer de 72 años con carcinoma papilar de tiroides, variante de células fusiformes

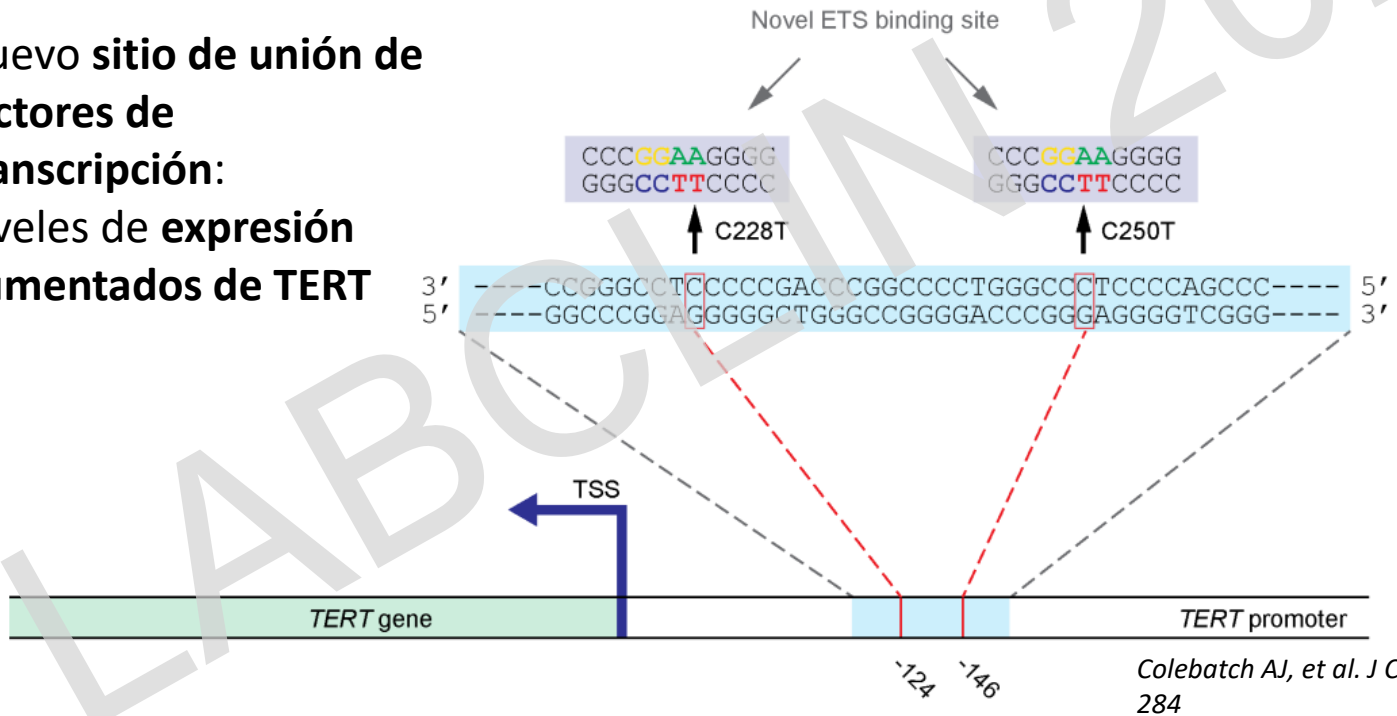
- **NGS**:
- ***BRAF* V600E**
- **Promotor *TERT* c.-124C>T (C228T)**

LABCLIN 2022

Caso 3:

- Mujer de 72 años con carcinoma papilar de tiroides, variante de células fusiformes

Nuevo **sitio de unión de factores de transcripción**: niveles de **expresión aumentados de TERT**



*Colebatch AJ, et al. J Clin Pathol 2019;**72**:281–284*

LABCLIN 2022

Caso 3:

- Mujer de 72 años con carcinoma papilar de tiroides, variante de células fusiformes

- **NGS**:
- ***BRAF* V600E**
- **Promotor *TERT* c.-124C>T (C228T)**

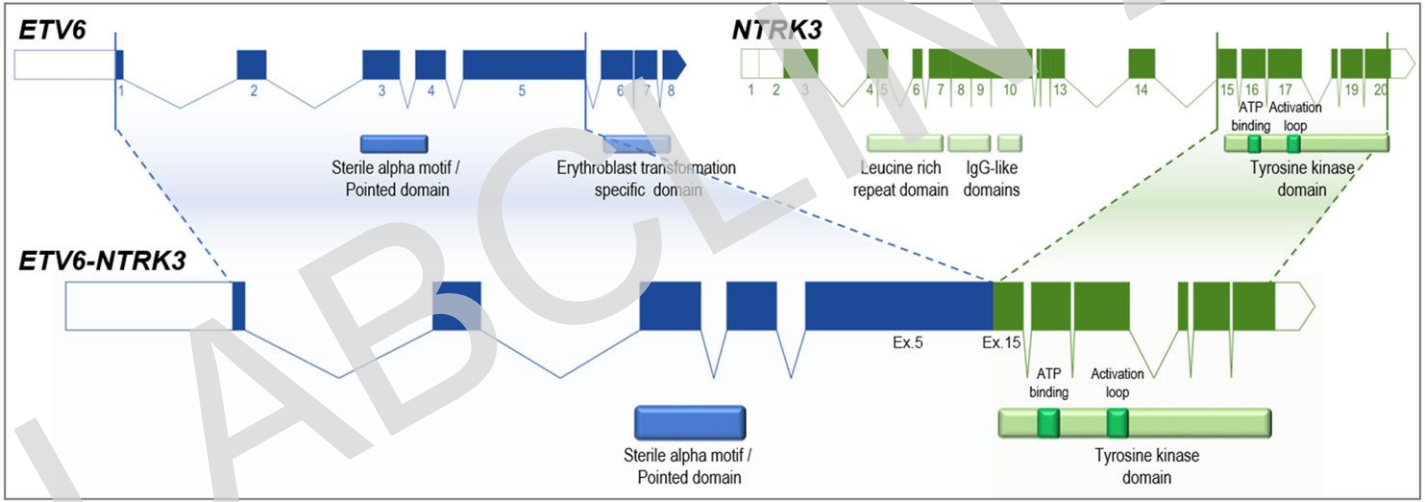
- **Coexistencia de ambas mutaciones**: potente efecto sinérgico que aumenta la agresividad del carcinoma papilar de tiroides (**recurrencia y mortalidad elevada**)
- Mutación del promotor *TERT* aislada: poco impacto

LABCLIN 2022

Caso 4:

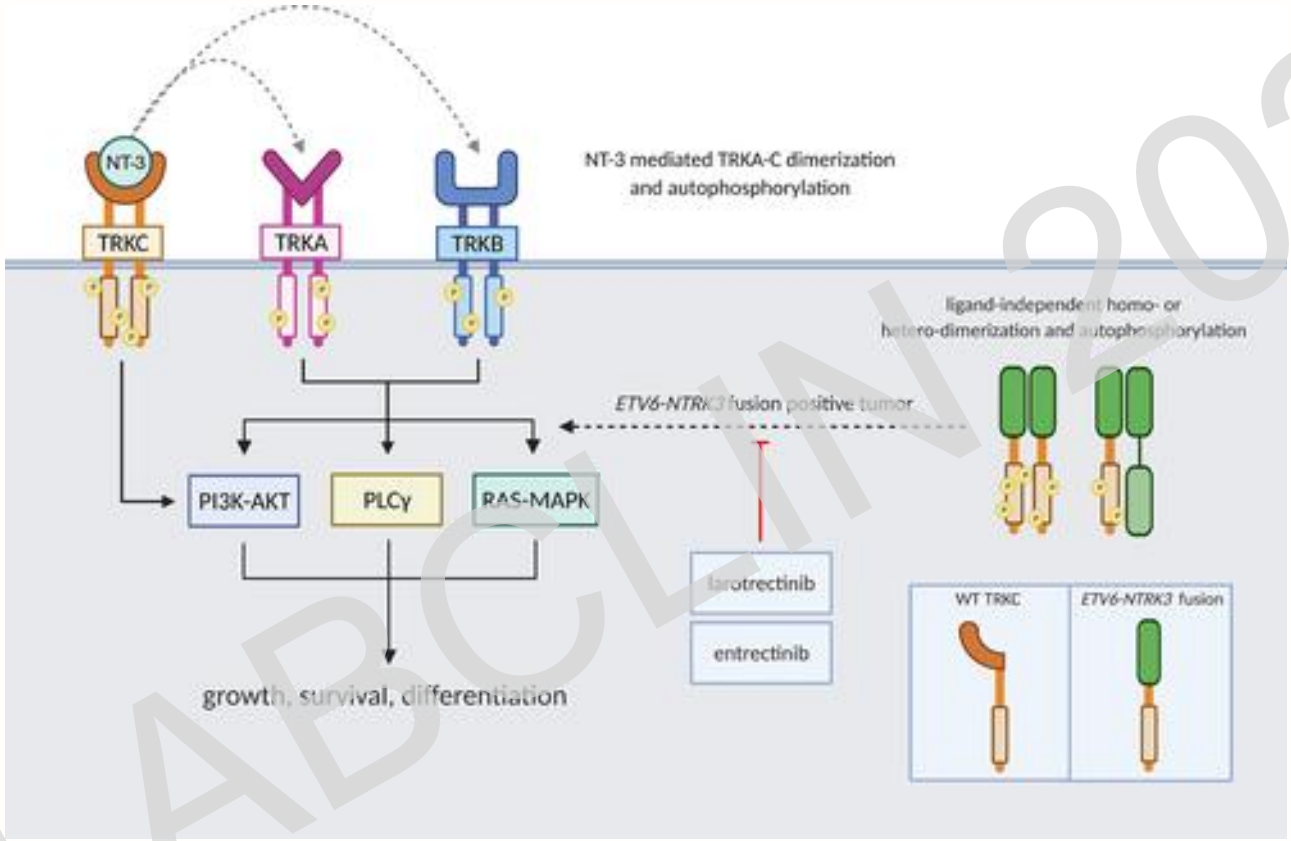
- Mujer de 56 años con carcinoma secretor de mama triple negativo, sin metástasis

- **NGS**:
- **Fusión *ETV6* (exón5)-*NTRK3* (exón15)**



https://doi.org/10.1002/onco.13880

LABCLIN 2022



https://doi.org/10.1002/onco.13880

LABCLIN 2022

Caso 4:

- Mujer de 56 años con carcinoma secretor de mama triple negativo, sin metástasis

- **NGS**:
- **Fusión *ETV6* (exón5)-*NTRK3* (exón15)**

- Carcinoma secretor de mama constituye menos del 0.15% de todos los carcinomas de mama: el 92% presentan el gen de fusión *ETV6-NTRK3*

Cáncer de mama metastásico con la fusión *ETV6-NTRK3*: **tratamiento dirigido con inhibidores (larotrectinib, entrectinib)**

Larotrectinib: primer fármaco aprobado en la Unión Europea con una **indicación agnóstica** (sin especificación del tipo o localización del tumor)

LABCLIN 2022

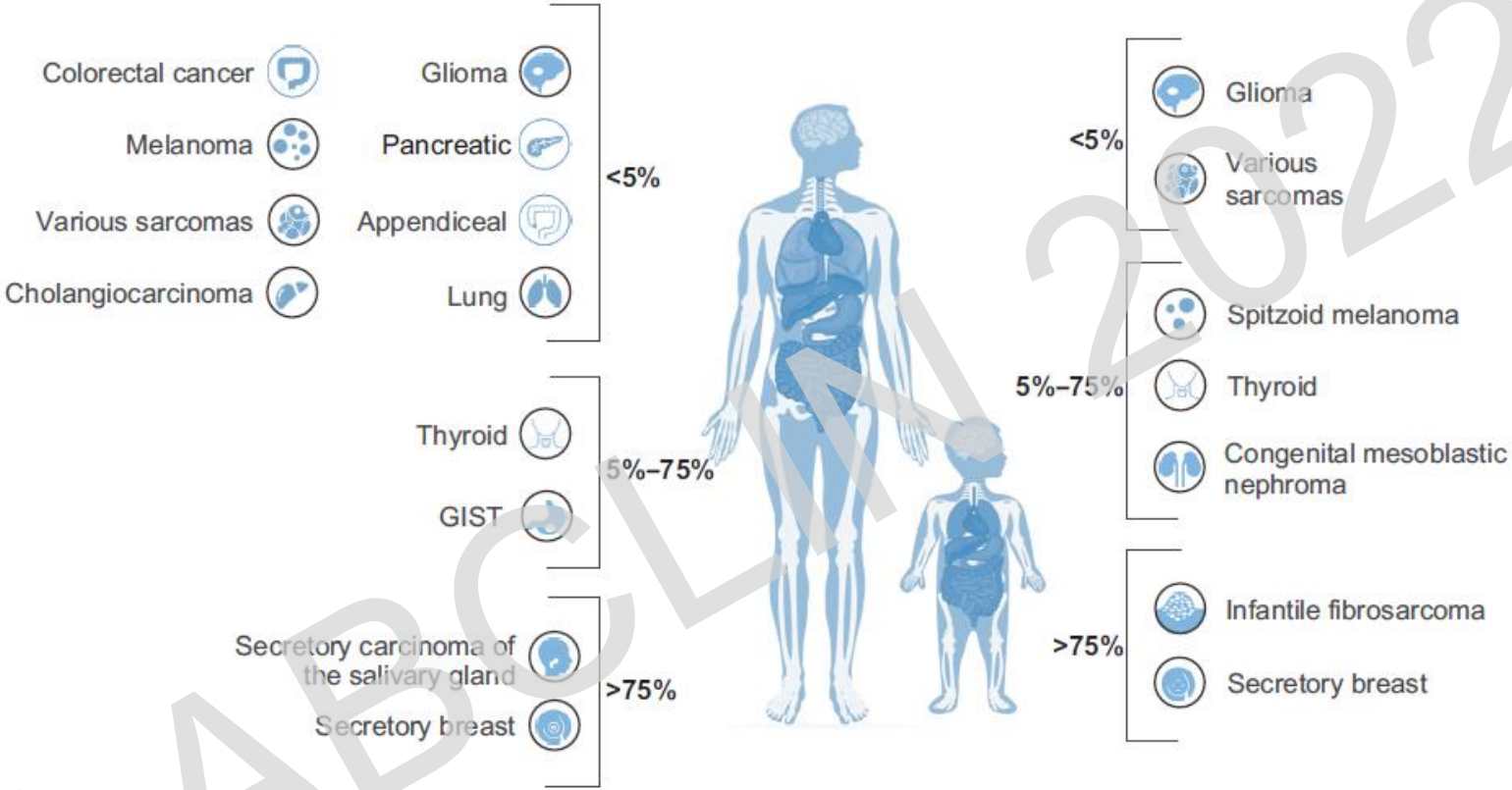


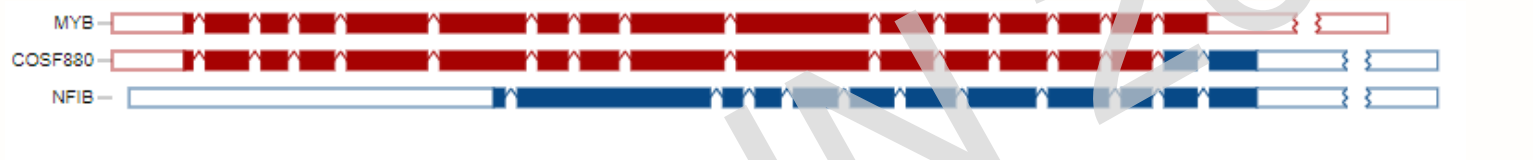
Figure 2 Spectrum of adult and pediatric tumors harboring *NTRK* gene fusions. GIST, gastrointestinal stromal tumor.

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 21, No. 4, July 2019

LABCLIN 2022

Casos con utilidad diagnóstica (genes de fusión):

- Carcinoma **adenoide quístico** de mama izquierda
- Fusión ***MYB*** (exón15) - ***NFIB*** (exón11)



- Hombre de 46 años con tumoración en segundo dedo de pie derecho
- Fusión ***COL1A1*** (exón 37) – ***PDGFB*** (exón 2): **Dermatofibrosarcoma Protuberans**

LABCLIN 2022

Casos con utilidad diagnóstica (genes de fusión):

- Mujer de 67 años. **Sarcoma endometrial** de alto grado
- Fusión ***FUS*** (exón 9) – ***CREM*** (exón 7)

- Hombre de 48 años. Tumoración en piel a nivel torácico
- Fusión ***MYH9*** (exón 1) - ***USP6*** (exón 1): **Fascitis nodular**

- Tumor benigno de crecimiento rápido que suele afectar al tejido celular subcutáneo, músculo y fascia
- **Diagnóstico diferencial con sarcoma**

LABCLIN 2022

CONCLUSIONES

LABCLIN 2022

- La secuenciación masiva de tumores sólidos permite analizar **diferentes tipos de alteraciones genómicas en un único ensayo**: <u>respuesta rápida</u>

- Para algunos tumores, las guías clínicas ya recomiendan la **utilización rutinaria de NGS** para economizar tiempo y optimizar recursos

- Caracterizar las alteraciones del tumor a nivel molecular permite:
- Seleccionar un **tratamiento personalizado (oncología de precisión)**
- Contribuir a un **diagnóstico de precisión**

- La participación del **analista clínico** en comisiones hospitalarias de tumores permite brindar un **asesoramiento molecular al resto de profesionales**

LABCLIN 2022

Cancer-specific variant databases	Catalog of Somatic Mutations in Cancer[19]	http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
	My Cancer Genome	http://www.mycancergenome.org
	Personalized cancer therapy, MD Anderson Cancer Center	https://pct.mdanderson.org
	cBioPortal, Memorial Sloan Kettering Cancer Center[20]	http://www.cbioportal.org
	Intogen[21]	https://www.intogen.org/search
	ClinicalTrials.gov	https://clinicaltrials.gov
	IARC (WHO) TP53 mutation database[22]	http://p53.iarc.fr
	Pediatric Cancer Genome Project (St. Jude Children's Research Hospital—Washington University)	http://explorepcgp.org
	International Cancer Genome Consortium[23]	https://dcc.icgc.org

- **CIVic (Clinical Interpretations of Variants in Cancer)**
- Base de datos de colaboración colectiva: genes, tipos de tumor, fármacos
- Abierta (Universidad de Washington)

- **PMKB (Precision Medicine Knowledgebase)**
- Información sobre las interpretaciones clínicas de variantes en tumore
- Colaborativa: puede editarse la información. Los cambios son revisados por un panel de expertos

LABCLIN 2022

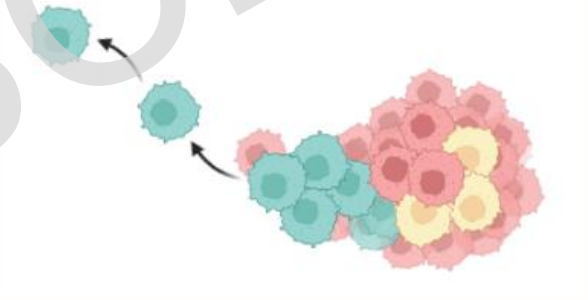
Otras utilidades de la NGS a nivel oncológico:

- Carga mutacional (TMB = tumor mutational burden):
- Número de mutaciones somáticas por Megabase de DNA tumoral (**nº mutaciones/Mb**)
- **TMB elevado: predictor de buena respuesta** a anticuerpos monoclonales frente a PD-L1 (pembrolizumab)
- A nivel técnico: **necesario secuenciar gran cantidad de genes para que sea representativo** (exoma completo o paneles con más de 500-600 genes)

- Biopsia líquida:
- No invasiva. Representación de todas las células tumorales

LABCLIN 2022

GRACIAS



LABCLIN 2022