

Laboratori Core d'Anàlisi Molecular

FUNCIONAMENT COMITÈ MOLECULAR

Mar Varela Anatomia Patològica, HUB-ICO



INTRODUCCIÓ

Jornada Científica Anual de la Unitat Funcional de Pulmó (UFP) de HUB i ICO - 18/03/2022



ANTECEDENTS



HUB i ICO, en coordinació amb la **Regió Sanitària Metropolitana Sud**, van elaborar una proposta de desenvolupament d'una **UF de Genètica Clínica i Molecular del Campus Bellvitge**.

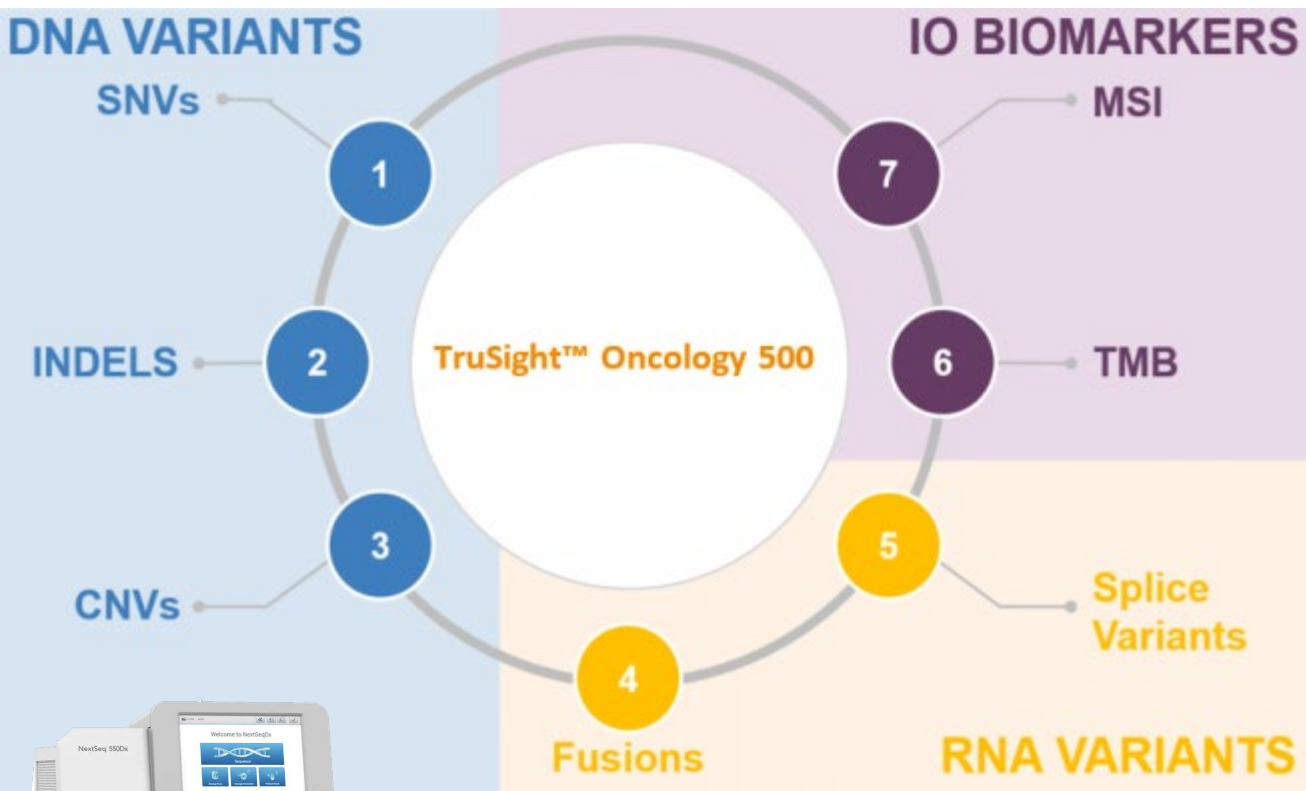
LCAM:

- **Laboratori Clínic** Territorial de la Gerència
- Programa de Càncer Hereditari de l'**ICO** (PCH)
- **Servei d'Anatomia Patològica** de l'Hospital Universitari de Bellvitge (APA)

TruSight Oncology 500 kit - Illumina

Primera etapa: Càncer de Pulmó (algun cas seleccionat d'altres neoplàsies)

Motivació assistencial: Diana terapèutica, mecanisme de resistència



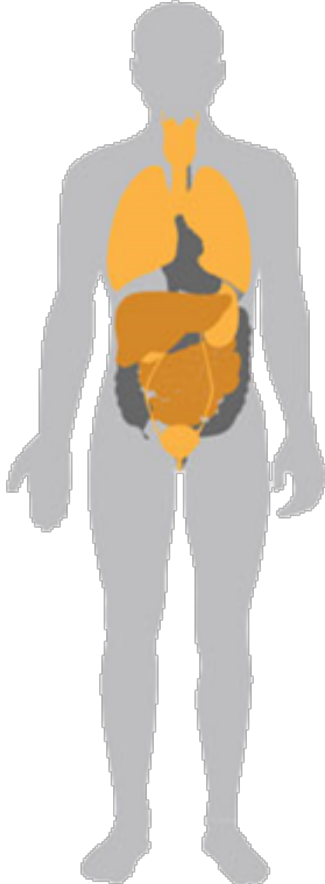
NextSeq 550Dx

- El panell permet analitzar l'ADN i l'ARN
- Analitza un total de **523 gens** per **DNA**, **55 gens** per **RNA**, **59 CNVs** (guanys).
- Determina la càrrega mutacional tumoral (**TMB**) i la inestabilitat dels microsatèl·lits (**MSI**).
- 40 ng DNA, 40-80 ng RNA (2 mm³ FFPE).
- **8 mostres/run**

TruSight Oncology 500 kit - Illumina

Primera etapa: Càncer de Pulmó (alguns casos seleccionats d'altres neoplàsies)

Motivació assistencial: Diana terapèutica, mecanisme de resistència

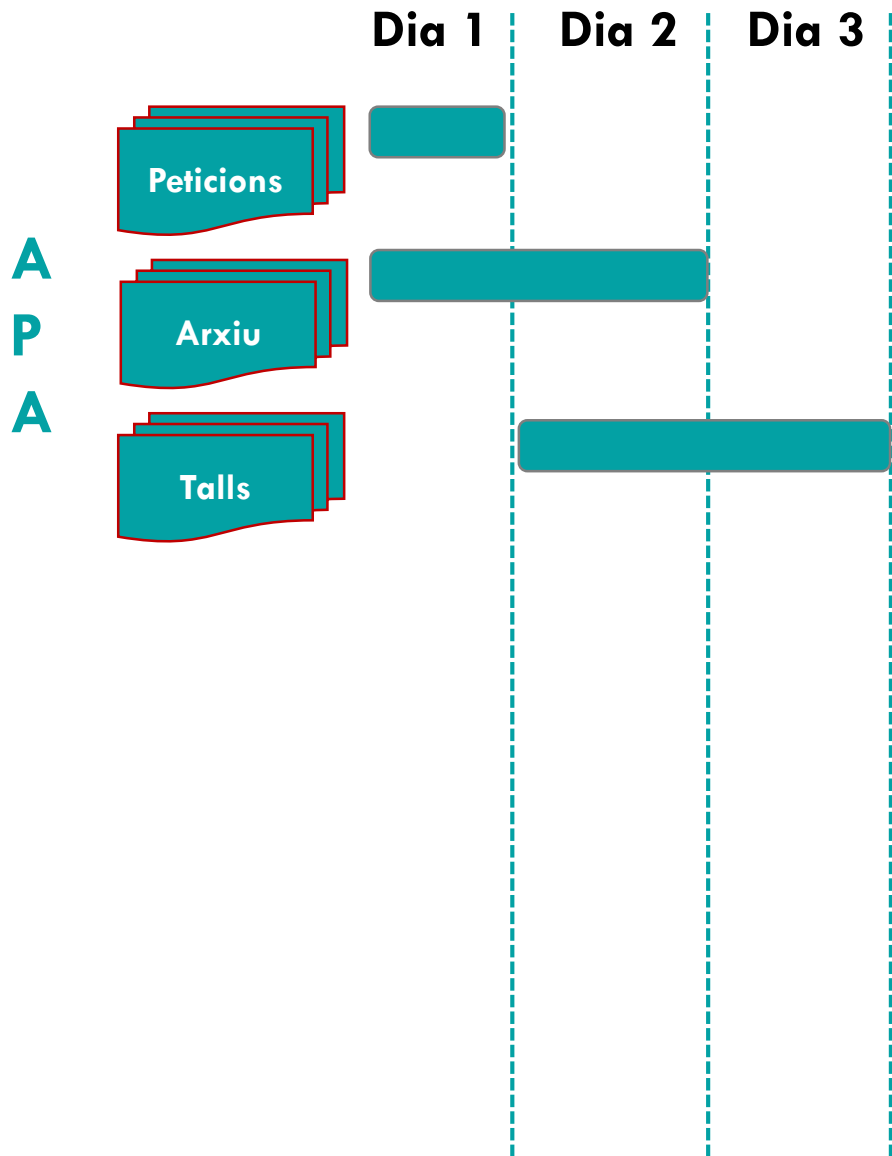


NTRK1, NTRK2, NTRK3 (pan-cancer) MSI (pan-cancer) TMB (pan-cancer)								
Lung	Melanoma	Colon	Ovarian	Breast	Gastric	Bladder	Myeloid	Sarcoma
AKT1 ALK BRAF DDR2 EGFR ERBB2 FGFR1 FGFR3 KRAS MAP2K1 MET NRAS PIK3CA PTEN RET TP53	BRAF CTNNB1 GNA11 GNAQ KIT MAP2K1 NF1 NRAS PDGFRA PIK3CA PTEN TP53	AKT1 BRAF HRAS KRAS MET MLH1 MSH2 MSH6 NRAS PIK3CA PMS2 PTEN SMAD4 TP53	BRAF BRCA1 BRCA2 KRAS PDGFRA FOXL2 TP53	AKT1 AR BRCA1 BRCA2 ERBB2 FGFR1 FGFR2 PIK3CA PTEN	BRAF KIT KRAS MET MLH1 PDGFRA TP53	MSH6 PMS2 TSC1	ABL1 ASXL1 CALR GEBRA ETV6 EZH2 FLT3 GATA2 IDH1 IDH2 JAK2 KIT MPL NPM1 RUNX1 SF3B1 SRSF2 TP53	ALK APC BRAF CDK4 CTNNB1 ETV6 EWSR1 FOXO1 GLI1 KIT MDM2 MYOD1 NAB2 NF1 PAX3 PAX7 PDGFRA PDGFRB SDHB SDHC SMARCB1 TFE3 WT1

NextSeq 550Dx

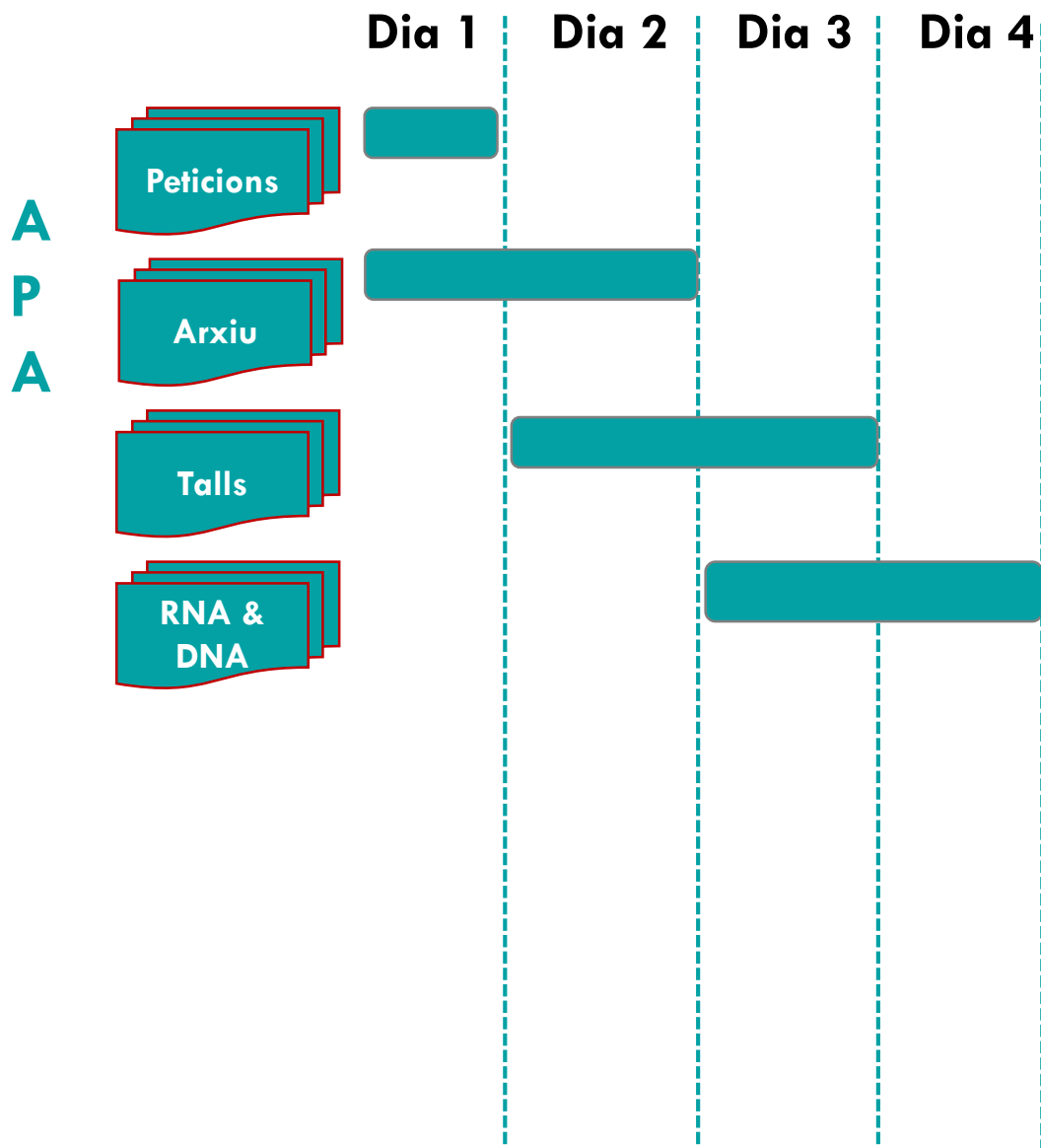


TruSight Oncology 500 kit - Illumina



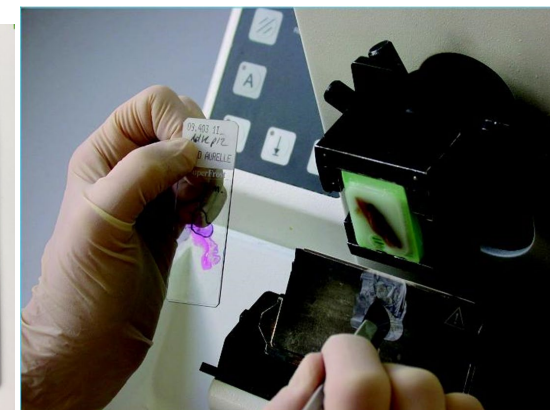
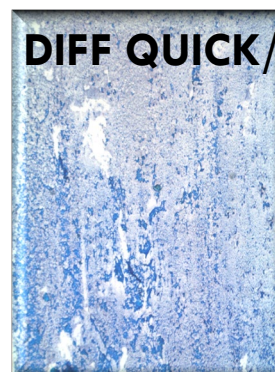
- Sol·licitud per part dels **clínic (UFP)** o de **centres externs**.
- Les **sol·licituds** es cursen en **APA**
- Selecció del material, % cè·lularitat tumoral
- **Extraccions de DNA+RNA.**

TruSight Oncology 500 kit - Illumina

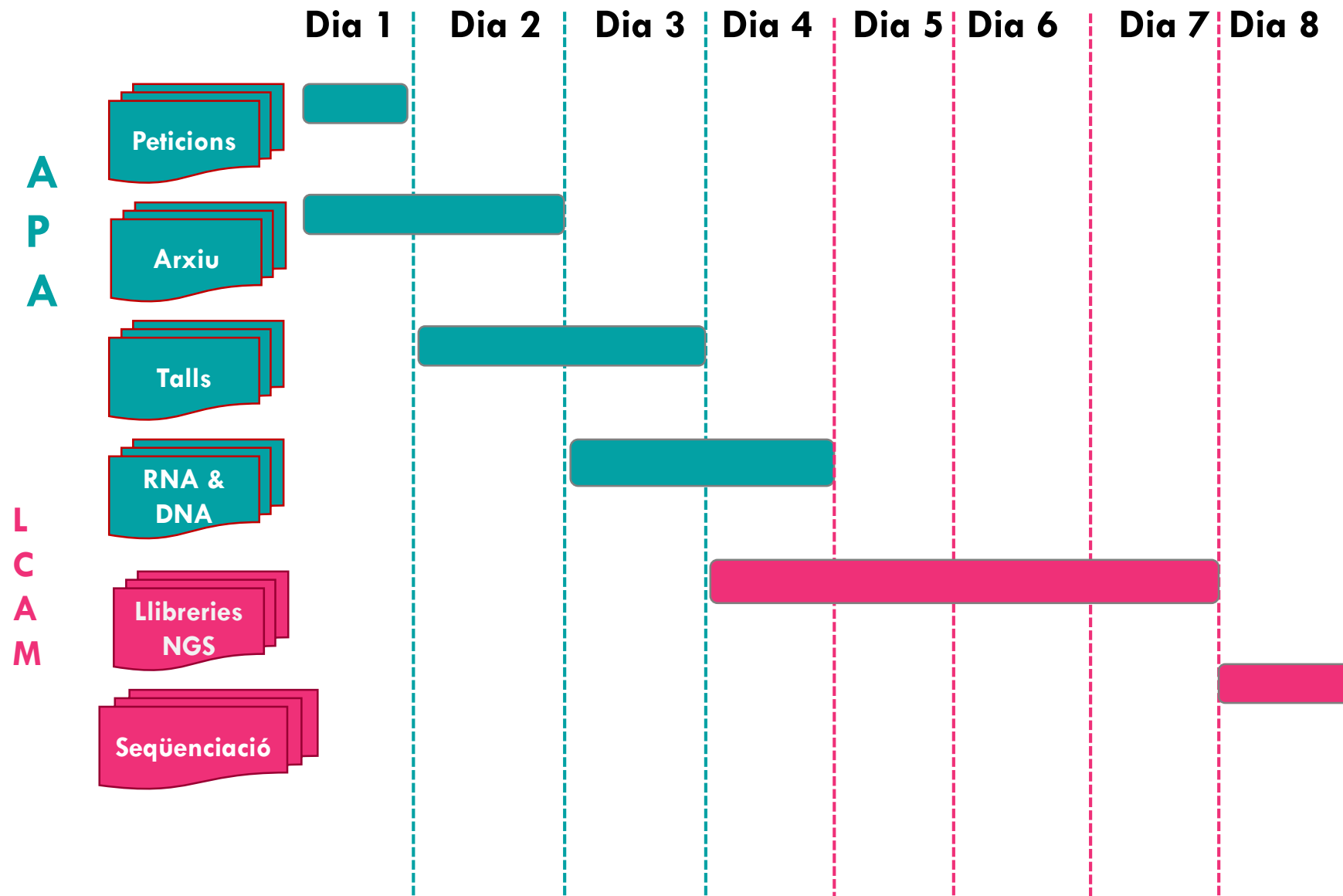


- Sol·licitud per part dels **clínic (UFP)** o de **centres externs**.
- Les **sol·licituds** es cursen en **APA**
- Selecció del material, % cè·lularitat tumoral
- **Extraccions de DNA+RNA**.

EXTRACCIONS DNA+RNA MANUAL I AUTOMÀTIQUES

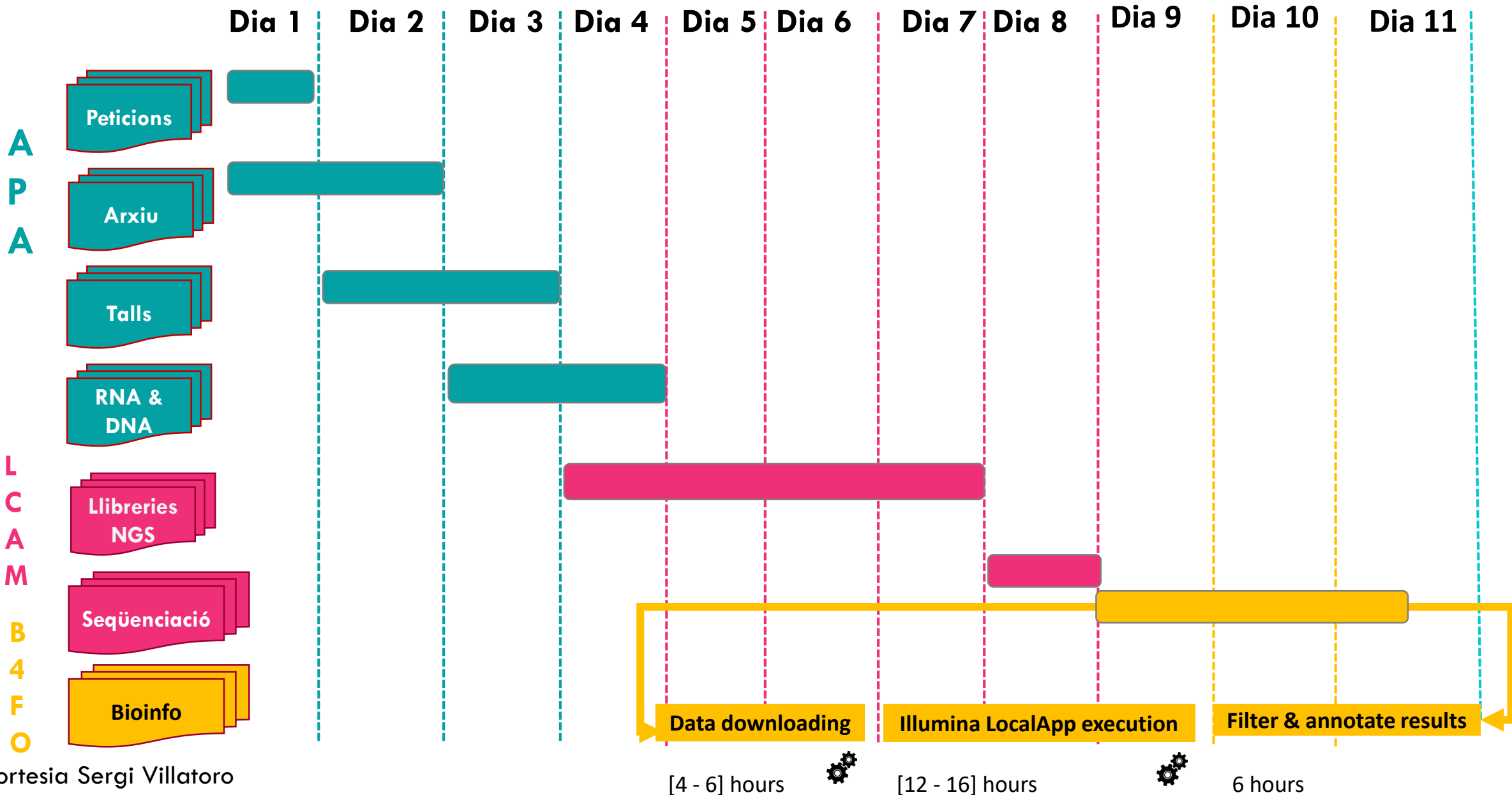


TruSight Oncology 500 kit - Illumina



SEMI AUTOMATITZAT EN ROBOT SICLONE PERKIN ELMER

TruSight Oncology 500 kit - Illumina



Categorització de la variant:

ESCAT

ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets



Welcome to OncoKB

MSK's Precision Oncology Knowledge Base

An FDA-Recognized Human Genetic Variant Database*

682

Genes

5685

Alterations

127

Cancer Types

104

Drugs



CatSalut Tier 1 (Finançat per CatSalut)				
Gens	Alteració	ESCAT	Tractaments finançats	Línia tractament
EGFR	exó 19, L858R T790M adquirida no comunes (no ins ex20)	IA	Osimertinib	1L estadi IV 2L estadi IV
		IB	Afatinib, osimertinib	1L estadi IV
ALK	Fusions Mutacions (MoR)	IA	Alectinib, brigatinib	1L estadi IV
ROS1	Fusions	IB	Crizotinib	1L estadi IV
CatSalut Tier 2 (aprovat EMA, sense preu)				
Gens	Alteració	ESCAT	Tractaments finançats	Línia tractament
EGFR	exó 19, L858R	IA	Osimertinib (malaltia precoç)	Adjuvència
RET	Fusions Mutacions (MoR)	IB	Pralsetinib, Selpercatinib	2L estadi IV
BRAF	V600E	IB	Dabrafenib + Trametinib	1L estadi IV
NTRK	Fusions Mutacions (MoR)	IC	Larotrectinib	2L+ estadi IV
KRAS	G12C	IIB	Sotorasib	2L estadi IV
CatSalut Tier 3 (assaig clínic o pendent EMA)				
Gens	Alteració	ESCAT	Tractaments finançats	Línia tractament
EGFR	inserció exó 20	IB	Amivantamab Mobocertinib	2L estadi IV
MET	exon skipping 14	IB	Tepotinib Capmatinib	2L estadi IV
ERBB2	mutacions exó 20	IB	Trastuzumab deruxtecan poziotinib	2L estadi IV
ERBB2	amplificació	IIB	Trastuzumab emtansina	2L estadi IV
MET	amplificació o fusions	IIB	Tepotinib Capmatinib	2L+ estadi IV
FGFR1-3	fusions o mutacions	IIIA	Erdafinib	2L+ estadi IV
KRAS	no G12C	IIIA	Diversos composts	2L+ estadi IV
HRAS	codons 12, 13 i 61	IIIA	Diversos composts	2L+ estadi IV
PI3KCA	mutacions hotspots	IIIA	Diversos composts	2L+ estadi IV
NRG1	fusions	IIIA	Zenocutuzumab	2L+ estadi IV

ONCOMINE™ PRECISION ASSAY GX

Segona etapa (Instrucció CatSalut): Càncer de Pulmó

Motivació assistencial: Diana terapèutica

Seqüenciador integrat **Genexus** realitza:

- Preparació de la llibreria
- Seqüenciació
- Anàlisi

Flux de treball automatitzat de mostra a resultat que ofereix resultats en tan sols un dia.

- **10 ng DNA, 10 ng RNA**
- **4-8-12-16 mostres/run**
- Panell de 50 gens

Ion Torrent™ Genexus™ Integrated Sequencer (Available November 2019)

Ion Torrent™
GX5™ Chip:
12–15M
reads/lane



14 hours for a single-lane run
(approx. 24 to 30 hours for full chip)
Up to 32 Samples per run

ONCOMINE™ PRECISION ASSAY GX

Segona etapa (Instrucció CatSalut): Càncer de Pulmó

Motivació assistencial: Diana terapèutica, mecanisme de resistència

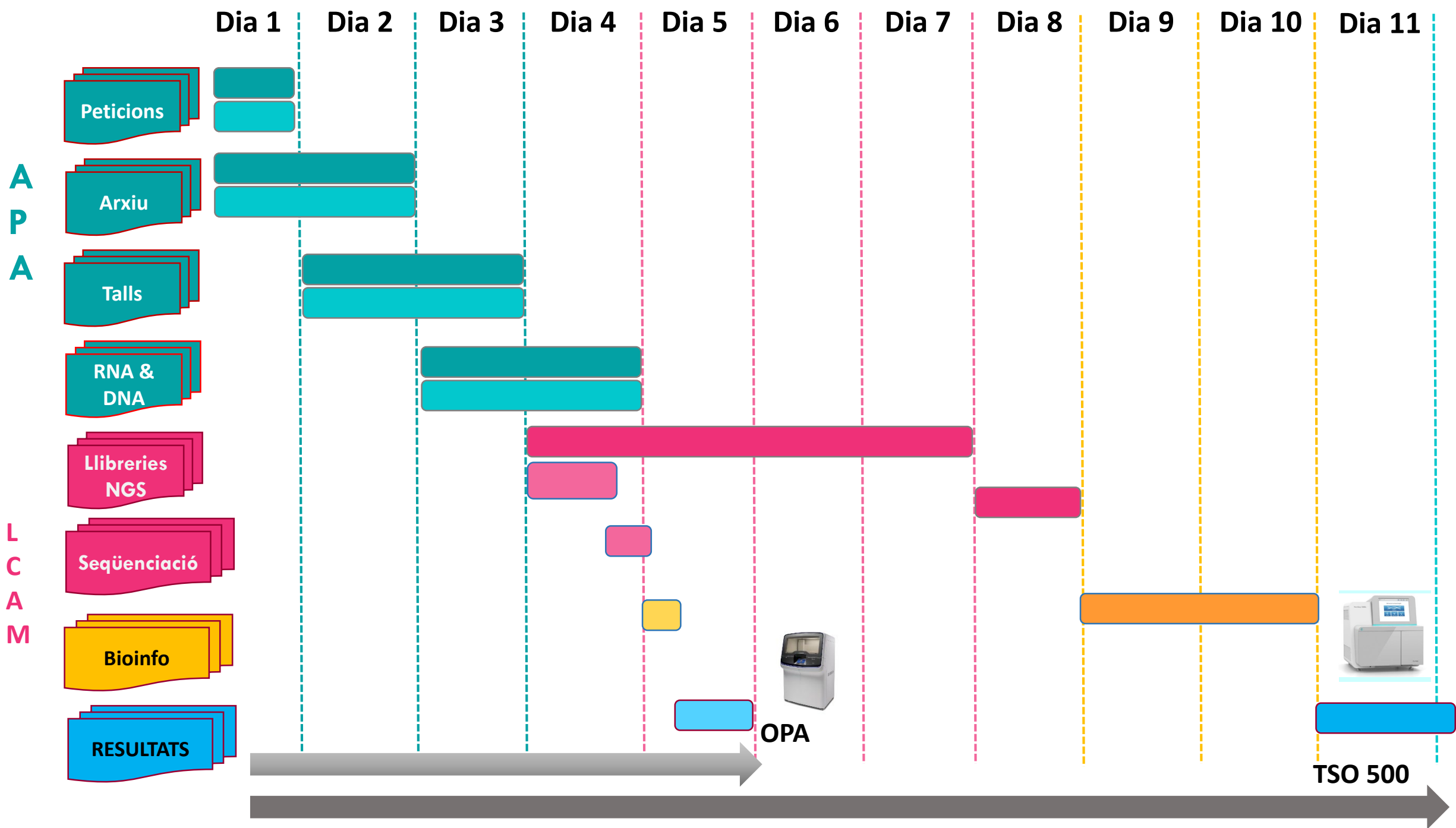
DNA hotspots					CNVs		Inter-genetic fusions		Intra-genetic fusions
<i>AKT1</i>	<i>CHEK2</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KIT</i>	<i>NTRK3</i>	<i>ALK</i>	<i>FGFR1</i>	<i>ALK</i>	<i>NTRK1</i>	<i>AR</i>
<i>AKT2</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>FGFR4</i>	<i>KRAS</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>AR</i>	<i>FGFR2</i>	<i>BRAF</i>	<i>NTRK2</i>	<i>EGFR</i>
<i>AKT3</i>	<i>EGFR</i>	<i>FLT3</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>CD274</i>	<i>FGFR3</i>	<i>ESR1</i>	<i>NTRK3</i>	<i>MET</i>
<i>ALK</i>	<i>ERBB2</i>	<i>GNA11</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>PTEN</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>KRAS</i>	<i>FGFR1</i>	<i>NUTM1</i>	
<i>AR</i>	<i>ERBB3</i>	<i>GNAQ</i>	<i>MET</i>	<i>RAF1</i>	<i>EGFR</i>	<i>MET</i>	<i>FGFR2</i>	<i>RET</i>	
<i>ARAF</i>	<i>ERBB4</i>	<i>GNAS</i>	<i>MTOR</i>	<i>RET</i>	<i>ERBB2</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>FGFR3</i>	<i>ROS1</i>	
<i>BRAF</i>	<i>ESR1</i>	<i>HRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>ROS1</i>	<i>ERBB3</i>	<i>PTEN</i>	<i>MET</i>	<i>RSPO2</i>	
<i>CDK4</i>	<i>FGFR1</i>	<i>IDH1</i>	<i>NTRK1</i>	<i>SMO</i>			<i>NRG1</i>	<i>RSPO3</i>	
<i>CDKN2A</i>	<i>FGFR2</i>	<i>IDH2</i>	<i>NTRK2</i>	<i>TP53</i>					

Figure 2. Oncomine Precision Assay gene list. **Panell de 50 gens**

L'assaig **OPA** analitza a través de 50 gens clau **mutacions (45 gens)**, **CNV (14 gens)** i variants de fusió **(19 gens)**.

S'inclouen gens supressors de tumors com ara TP53, gens accionables i mutacions de resistència.





Seqüenciadors NGS



MiSeq



NextSeq 550Dx



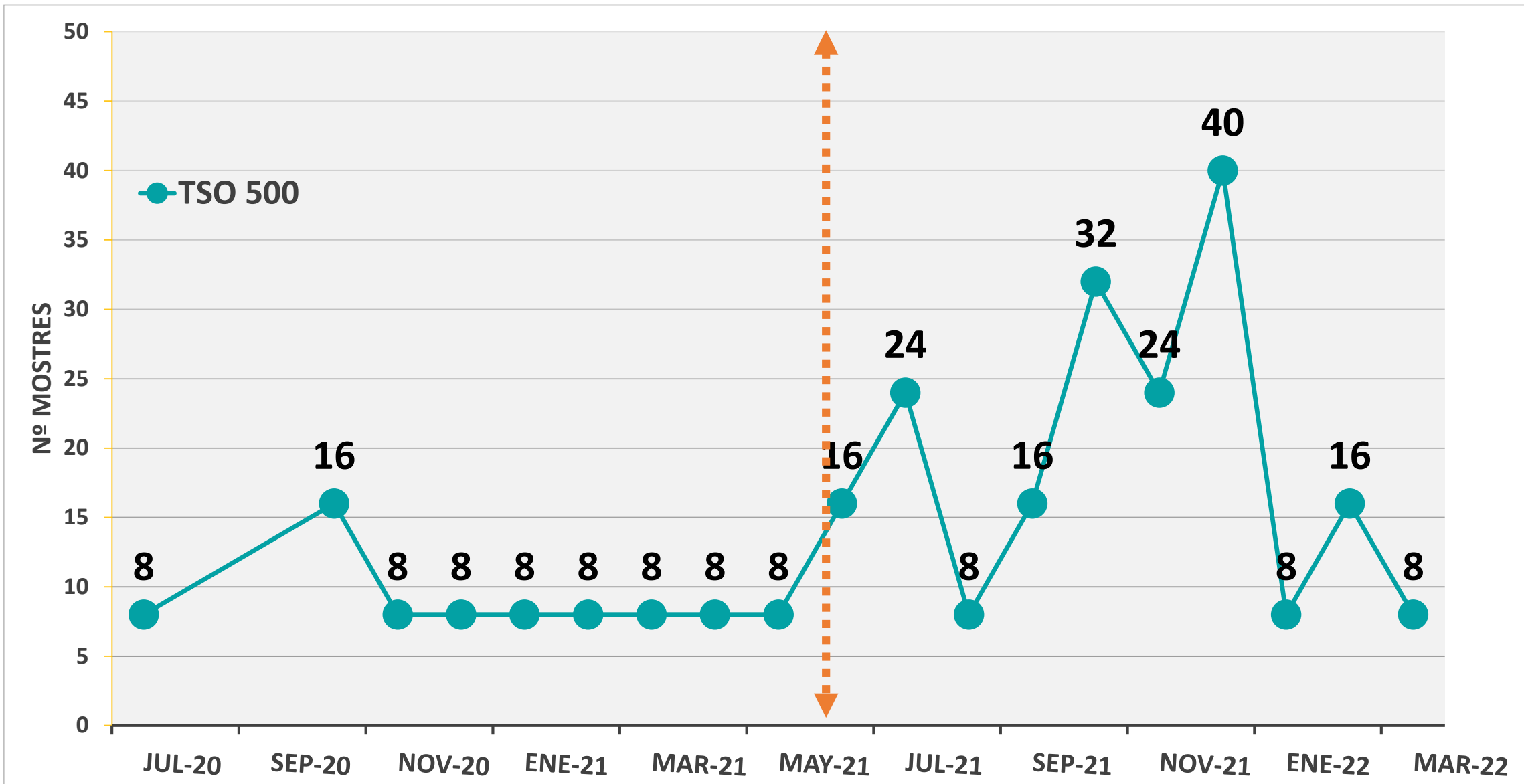
Genexus

ACTIVITAT LCAM

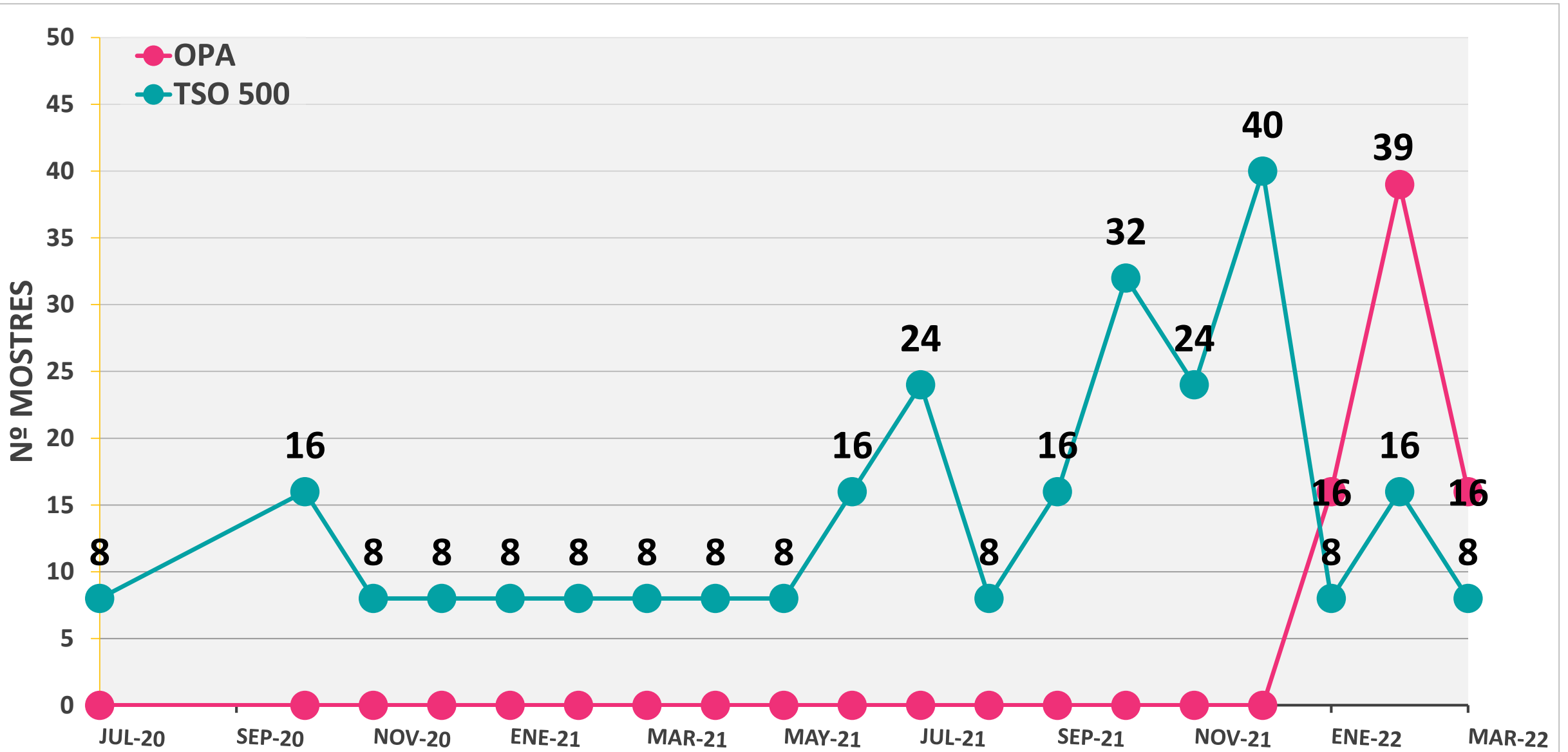
Jornada Científica Anual de la Unitat Funcional de Pulmó (UFP) de HUB i ICO - 18/03/2022



ACTIVITAT TSO500



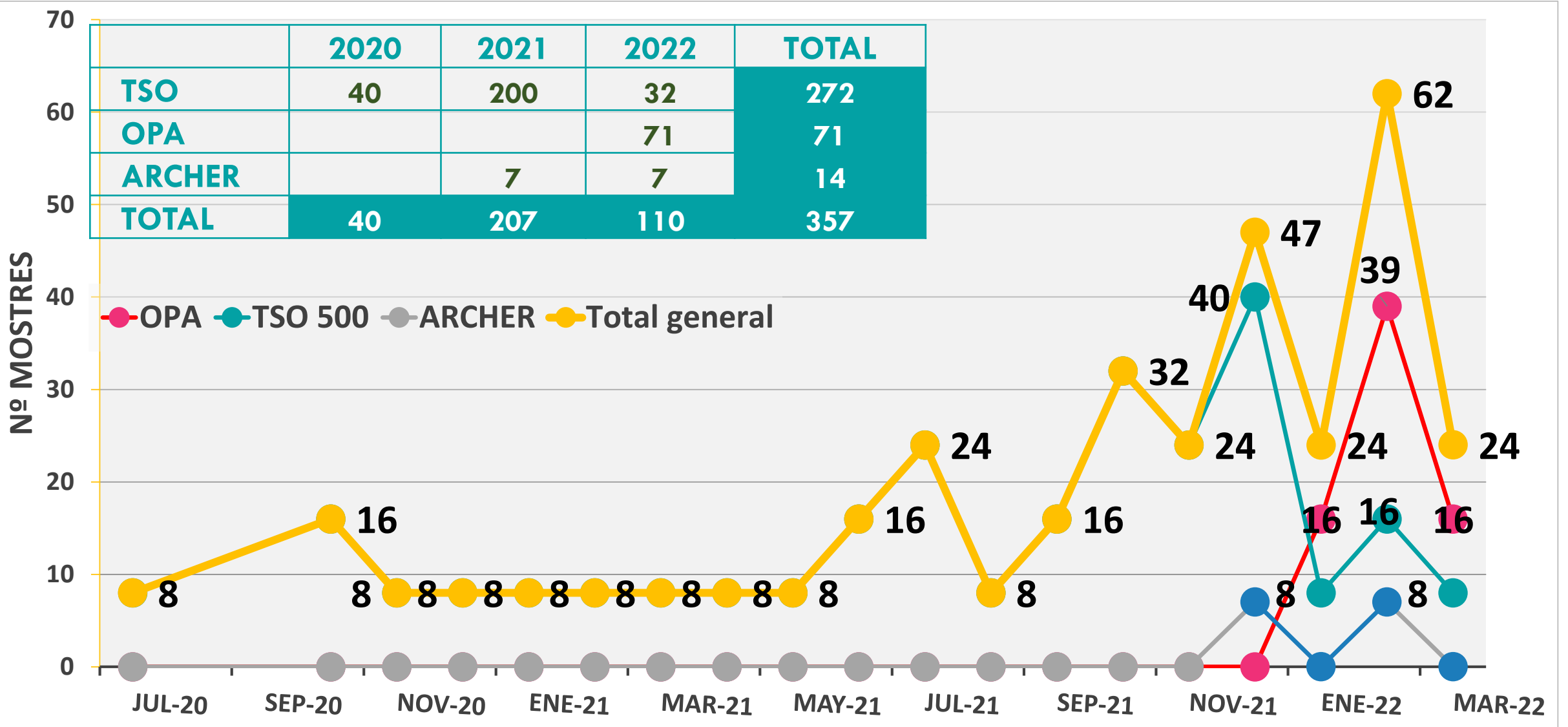
ACTIVITAT TSO500 + OPA



ACTIVITAT TSO500 + OPA



	2020	2021	2022	TOTAL
TSO	40	200	32	272
OPA			71	71
ARCHER		7	7	14
TOTAL	40	207	110	357



COMITÈ MOLECULAR

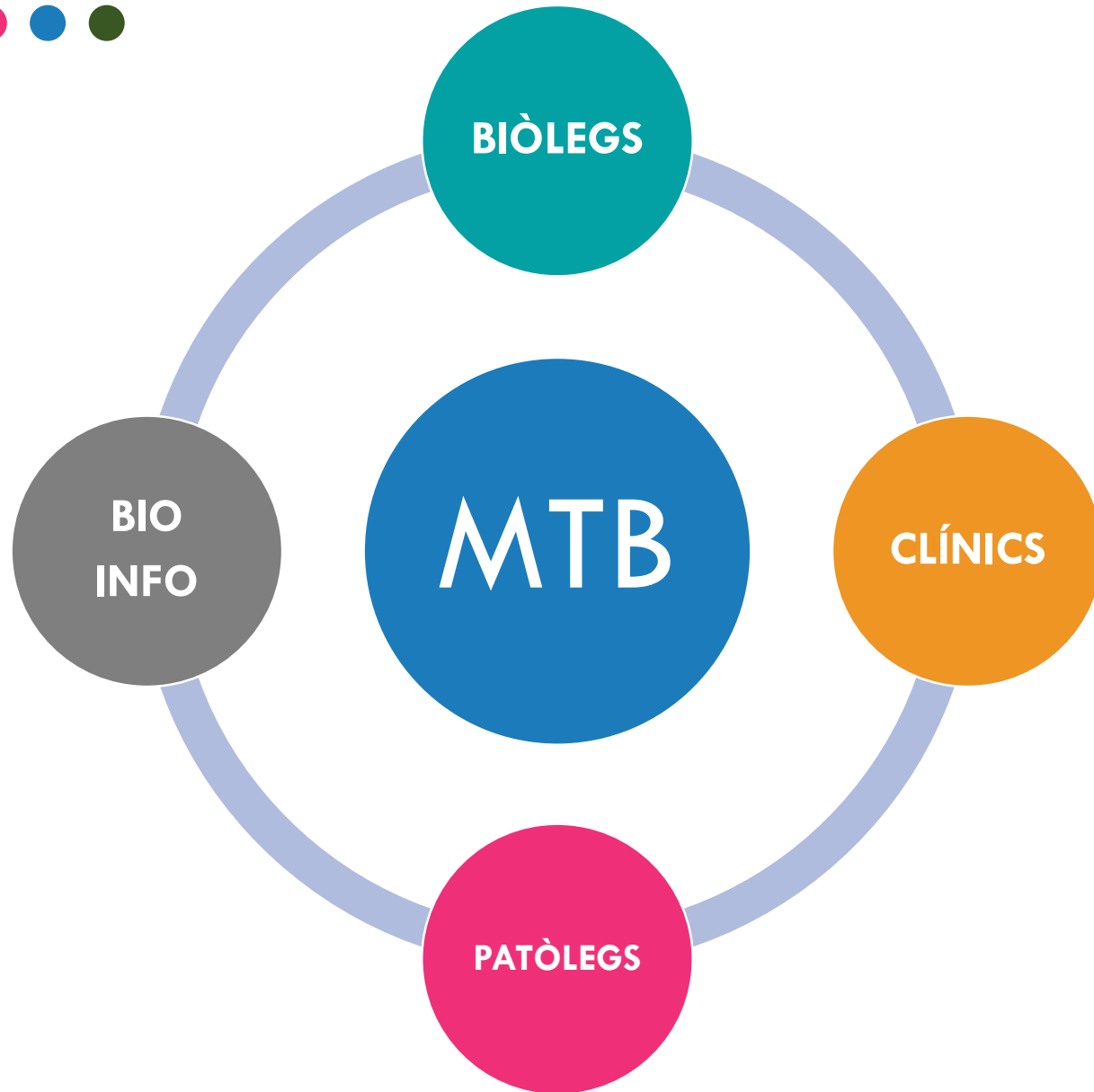
Jornada Científica Anual de la Unitat Funcional de Pulmó (UFP) de HUB i ICO - 18/03/2022



Comitè multidisciplinari



- Presentació setmanal dels resultats de seqüenciació per tal d'identificar **teràpies dirigides** específiques pels pacients.
- Integració de les **dades clíniques, anatomopatològiques i moleculars**.
- Classificació de variants segons **CatSalut** en **TIER** i **ESCAT**.
- Identificació de portadors de mutacions en **línia germinal**.
- Disponibilitat d'**assajos clínics**.



Comitè multidisciplinar



20211027_R22_Somatic_report - Microsoft Excel

Archivo Inicio Insertar Diseño de página Fórmulas Datos Revisar Vista

Calibri 12 A A Ajustar texto General Normal Buena Incorrecto Neutral Cálculo Autosuma Rellenar Ordenar y filtrar Buscar y seleccionar

G30 40

		Percent.Unstable.MSI.Sites		Usable.MSI.Sites	Total.MSI.Sites.Unstable	MSI_cutoff_2
run	sample					
20211027_R22	14930740	3,28	122	4	MSI-low	

		Total.TMB	Coding.Region.Size.in.Megabases	Number.of.Passing.Eligible.Variants	TMB_cutoff_10mut.Mb
run	sample				
20211027_R22	14930740	5,5	1,27	7	TMB-low

run	sample	gene	cDNAAnnotation	chr	pos	ref	alt	c.dot.notation	p.dot notation	allele.frequency	depth	White List	Put_germline_mut	AF_GenomeD	cgi.exon_hange	cgi.cadd_phred
20211027_R22	14930740	ALK	c.1464C>T	chr2	29543699	G	A	NM_004304.4:NM_004304.4:	0,4681	673	NSCLC	NO	0,0067	7	G/G	32 M
20211027_R22	14930740	ARID1B	c.4563T>G	chr6	157522171	T	G	NM_00134681:NM_00134681:	0,6131	566	NSCLC	NO	0,00318	12	P/P	32 M
20211027_R22	14930740	ROS1	c.1293T>C	chr6	117710979	A	G	NM_002944.2:NM_002944.2:	0,4064	342	NSCLC	NO	0,00414	7	I/I	37 N
20211027_R22	14930740	TP53	c.726C>A	chr17	7577555	G	T	NM_000546.5:NP_000537.3:	0,1851	551	NSCLC	NO	0,00414	18	C/*	32 M
20211027_R22	14930740	ARID2	c.1718C>T	chr12	46243365	C	T	NM_152641.3:NP_689854.2:	0,5342	322	NO	NO	0,00414	1	T/M	28,2 M
20211027_R22	14930740	CSF1R	c.2398G>C	chr5	149435826	C	G	NM_005211.3:NP_005202.2:	0,1683	416	NO	NO	0,00414	18	A/P	32 M
20211027_R22	14930740	DDX41	c.25A>T	chr5	176943922	T	A	NM_016222.3:NP_057306.2:	0,0336	745	NO	NO	0,00414	1	K/*	36 N
20211027_R22	14930740	LRP1B	c.3590G>T	chr2	141660665	C	A	NM_018557.2:NP_061027.2:	0,2021	391	NO	NO	0,0116	23	C/F	25,4 M
20211027_R22	14930740	NOTCH4	c.2504G>T	chr6	32180623	C	A	NM_004557.3:NP_004548.3:	0,4783	391	NO	NO	0,0116	16	G/V	32 M
20211027_R22	14930740	PBRM1	c.1031C>A	chr3	52676026	G	T	NM_018313.4:NP_060783.3:	0,4207	435	NO	NO	0,0000611	11	A/E	29,5 M

run	sample	gene	Fold.Change	CopyNum	purity_tumor	cna	predicted_in_tumors	gene_role	driver	driver_state
20211027_R22	14930740	CCND3	2,167	8	40	AMP	COREAD;LUAD Act	known	known in: CANCER	
20211027_R22	14930740	FGFR1	2,214	8	40	AMP	HNSC;PAAD;PR Act	known	known in: ED;HNC;BRCA	

Clinical_candidates Quality_Metrics 16977962 13952952 13298822 14930740 14259517 10492757 11307244 10088727

MTB NGS Run22 3406

R Palmero (...)

NADAL ALFORJA, ERNESTO SAMUEL

09:30 05/11/2021

Comitè multidisciplinar



ONCOLOGY DATA ANALYTICS PROGRAM

([ODAP](#))/(B4PO)

ALAY BADOSA, ANIA

CORDERO ROMERA, DAVID

DEPARTAMENT D'ONCOLOGIA

NADAL ALFORJA, ERNESTO SAMUEL

RAMÓN PALMERO

MARIA JOVÉ

NOELIA VILARIÑO

JC RUFFINELLI

CONSELL GENÈTIC

TEULE VEGA, ALEXANDRE

SOLANES CABUS, ARES

DEPARTAMENT D'ANATOMIA PATOLÒGICA

XAVIER MATIAS-GUIU

NÚRIA BAIXERAS

LARA PIJUAN

LCAM

DANI AZUARA

SERGI VILLATORO

MAR VARELA

CONXI LÁZARO

MIREIA GAUSACHS

CRISTINA SANTOS

MÒNICA GONZÁLEZ

SUSANA PADRONES

M^a NEUS GUIONNET

BERTA LAQUENTE

MARIA PLANA

RAMÓN SALAZAR

MÒNICA SALINAS

V. VALENTÍ

MIGUEL MOSTEIRO

LAIA CAPDEVILA

VÍCTOR FUMANAL

JESÚS BRENES

FERRAN LOSA

JUAN JOSÉ SOTO

BRENES CASTRO

Comitè multidisciplinar



ESTUDI PANELL SEQÜENCIACIÓ MASSIVA EN MOSTRA TUMORAL

Laboratori CORE d'Anàlisi Molecular

Nom i cognoms:	Sol·licitud patologia molecular: BE22P
NHC:	Codi de la mostra rebuda: BE21B
CIP:	Tipus de mostra: PARAFINA
Edat: 59 anys	Data de sol·licitud: 11/02/2022
Sexe: Dona	Data de recepció de la mostra: 11/02/2022
Professional sol·licitant: Dr/a. Ernest Nadal	Codi de la mostra L-CAM:
Centre sol·licitant: ICO HOSPITALET	Data de recepció de la mostra L-CAM: 22/02/2022

Motiu de l'estudi: Estudi del perfil mutacional amb finalitat terapèutica
Diagnòstic patològic: Adenocarcinoma de pulmó (20% d'infiltració tumoral)
Estudi sol·licitat: TruSight Oncology 500 (TSO500)

RESULTATS (alteracions genòmiques potencialment rellevants a nivell clínic) ⁽¹⁾:
S'ha identificat la variant G12C en el gen KRAS
<small>(1) Segons la instrucció del CatSalut 03/2021: "Implantació del Programa d'oncologia de precisió en el sistema sanitari públic de Catalunya".</small>

INTERPRETACIÓ:
S'ha detectat la mutació c.34G>T.p.(Gly12Cys) del gen KRAS (NM_033360.3) amb una freqüència al·lèlica del 7,24%. La mutació KRAS G12C està present en un 10-15% dels pacients amb adenocarcinoma pulmonar. Segons consens CatSalut correspon a una alteració TIER-2 i segons la classificació ESCAT (Mosele et al. Annals of Oncology 2020) correspon a una classe IIB ja que aquesta alteració s'associa a sensibilitat als inhibidors directes de KRAS G12C com sotorasib i adagrasib que es troben actualment en fase d'investigació i han demostrat una activitat prometedora en assajos clínics no aleatoritzats (Hong et al. New Engl J Med 2020). Actualment estan en marxa assajos clínics aleatoritzats per aquest subgrup de pacients.
La mostra analitzada presenta càrrega mutacional baixa (TMB: 1.6 muts/Mb) i no es va detectar inestabilitat de microsatèl·lits.

Alteracions genòmiques identificades sense tractament /no accionables actualment:		
SNVs:		
Gen	Descripció de la variant	Freqüència al·lèlica
ARID1B	NM_001346813.1:c.5135A>G; p.(Asn1712Ser)	44,58%
STK11	NM_000455.4:c.924G>A; p.(Trp308Ter)	10,32%

METODOLOGIA: Extracció de DNA i RNA de la mostra rebuda. Generació d'una llibreria de DNA i RNA amb el panell TruSight Oncology 500 d'Illumina (Llistat de gens inclosos al panell https://www.illumina.com). Seqüenciació a la plataforma Illumina NextSeq 550 Dx. Anàlisi dels resultats mitjançant la TruSight Oncology 500 Local App versió 2.2.0. Criteris mínims de qualitat de la seqüenciació: DNA: mida mínim de lectures ≥ 70 pb, cobertura mediana dels exons $\geq 150X$ i percentatge d'exons coberts al menys a $50X \geq 90\%$. RNA: mediana del coeficient de variació per a gens coberts al menys a $500X \geq 93\%$, total de lectures a l'objectiu $\geq 9.000.000$ i mida insert ≥ 80 pb. Es reporten variants puntuals amb freqüència al·lèlica superior $\geq 3\%$, CNVs superior ≥ 4 còpies i gens de fusió representats per més $\geq 3\%$ de lectures. Es considera TMB alta quan la mostra té ≥ 10 mut/Mb. Genoma de referència: Homo sapiens GRCh37/hg19. Les variants s'anomenen seguint nomenclatura HGVS i es classifiquen segons l'escala d'accionabilitat ESCAT (Mateo J et al, Ann Oncol 2018;29:1695e902). Bases de dades de referència: OncoKB, GnomAD, Varsome, ClinVar, COSMIC, cBioPortal.
--

Limitacions i consideracions:
<ul style="list-style-type: none">• Poden existir variants reals no informades si estan sota el llindar de sensibilitat establert o degut a que es localitzen en una regió complexa (com regions repetitives, homopolimers o regions riques en GC).• La sensibilitat analítica de la metodologia permet un anàlisi optimitzat quan a la mostra existeix un percentatge de cèl·lules tumorals \geq al 20%.• El fabricant del kit utilitzat recomana una cobertura mínima de 1000 lectures per base per a reportar una variant de nucleòtid, amb un límit de detecció de freqüència al·lèlica del 0.5%.• No es reporten les variants descrites en població general amb una MAF $\geq 1\%$ ni aquelles classificades com variants benignes o probablement benignes.• Poden existir variants amb significat clínic en altres gens no inclosos en aquest estudi. No s'han estudiat variants en el DNA no codificant, pseudogens, expansions repetitives de trinucleòtids o alteracions epigenètiques.• Aquesta metodologia només permet identificar els gens de fusió inclosos en el panell. No permet detectar grans insercions i delecions.• No s'han confirmat les variants per metodologies alternatives.• L'estudi s'ha realitzat a partir de mostra tumoral i no s'han realitzat estudis específics per a descartar o confirmar si les alteracions trobades són somàtiques o germinals.• La interpretació de variants es realitza en funció del coneixement existent en el moment d'emissió d'aquest informe. L'aparició de nova informació científica podria canviar en el futur aquesta interpretació. La informació d'aquest informe s'ha de considerar conjuntament amb tota la resta d'informació rellevant del pacient pels professionals especialistes en diagnòstic genètic i/o clínic. Les dades obtingudes en aquest estudi són confidencials i es regulen segons la Llei de Protecció de Dades Personals i garantia dels drets digitals (Llei orgànica 3/2018, de 5 de desembre).

L'Hospitalet de Llobregat, 09/03/2022

Laboratorio Core de Análisis Molecular

Dra. Conxi Lázaro, **coordinadora del Laboratori**

Dr. Xavier Matias-Guiu, **cap del Servei d'Anatomia Patològica**

Dra. Núria Llecha, **directora clínica del Laboratori Clínic Territorial Metropolitana Sud**

Facultatius

Dra. Sara González

Dra. Ariadna Padró

Dr. Sergi Villatoro

Dr. Dani Azuara

Dra. Mar Varela

Súper Tècnics

Carlos Navas

Mónica Carrattini

Eva Montes





GRÀCIES

