



UDD

Facultad de Medicina
Clínica Alemana - Universidad del Desarrollo



Diagnóstico Molecular



Annemarie Ziegler B., Ph.D.

Oncología Molecular
Agosto 2020

Objetivos

- Conocer las metodologías utilizadas más frecuentemente para diagnóstico molecular del cáncer
- Comprender el alcance, las ventajas y limitaciones de estas metodologías
- Conocer ejemplos de aplicaciones para cada metodología

¿Cómo se Llega a un Biomarcador?

Key issues/challenges

- Clearly defined research question, clinical context of application
- Study design (sample size, clinical follow-up)
- Type of specimens (source, storage,...)

- Choice of assay platform
- Assay reproducibility
- Assay standardization
- Sample availability

- Study design (sample size, clinical follow-up)
- Cost of clinical assessment/trial
- Sample/patient cohort availability

- Ever-changing regulation/legislation
- Ever-changing assay technology
- Timely clinical deployment
- Intellectual property
- Engagement of multidisciplinary groups
- Big data analysis infrastructure
- Physician/patient education



~15-20 años
desarrollo y
validación

Biomarker discovery



Assay development
Analytical validation



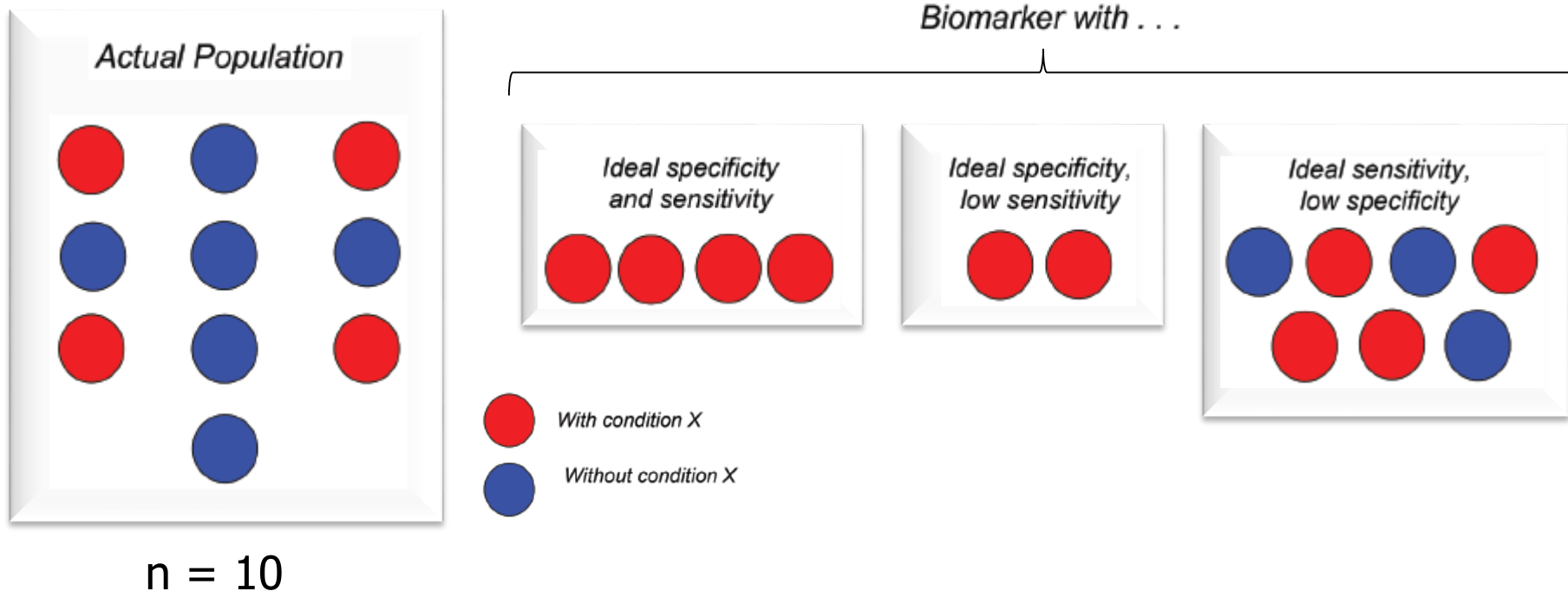
Clinical utility validation



Clinical implementation

- Regulatory approval
- Commercialization
- Health insurance coverage/reimbursement
- Incorporation into practice guidelines

Especificidad / Sensibilidad



Determinantes de Validez Analítica:

Does the person actually have the biomarker or condition being tested for?	Test Result	
	Positive (yes)	Negative (no)
Yes	True positive	False negative
No	False positive	True negative

Parámetros a Considerar

El desempeño de un biomarcador molecular puede verse afectado por varios factores:

- Heterogeneidad tumoral: dónde se tomó la muestra
- Variación poblacional: frecuencia de la alteración molecular, susceptibilidad
- Diferencias metodológicas: p.ej. diferentes plataformas de secuenciación; uso de fijadores en FFPE

Aplicación de la Biología Molecular

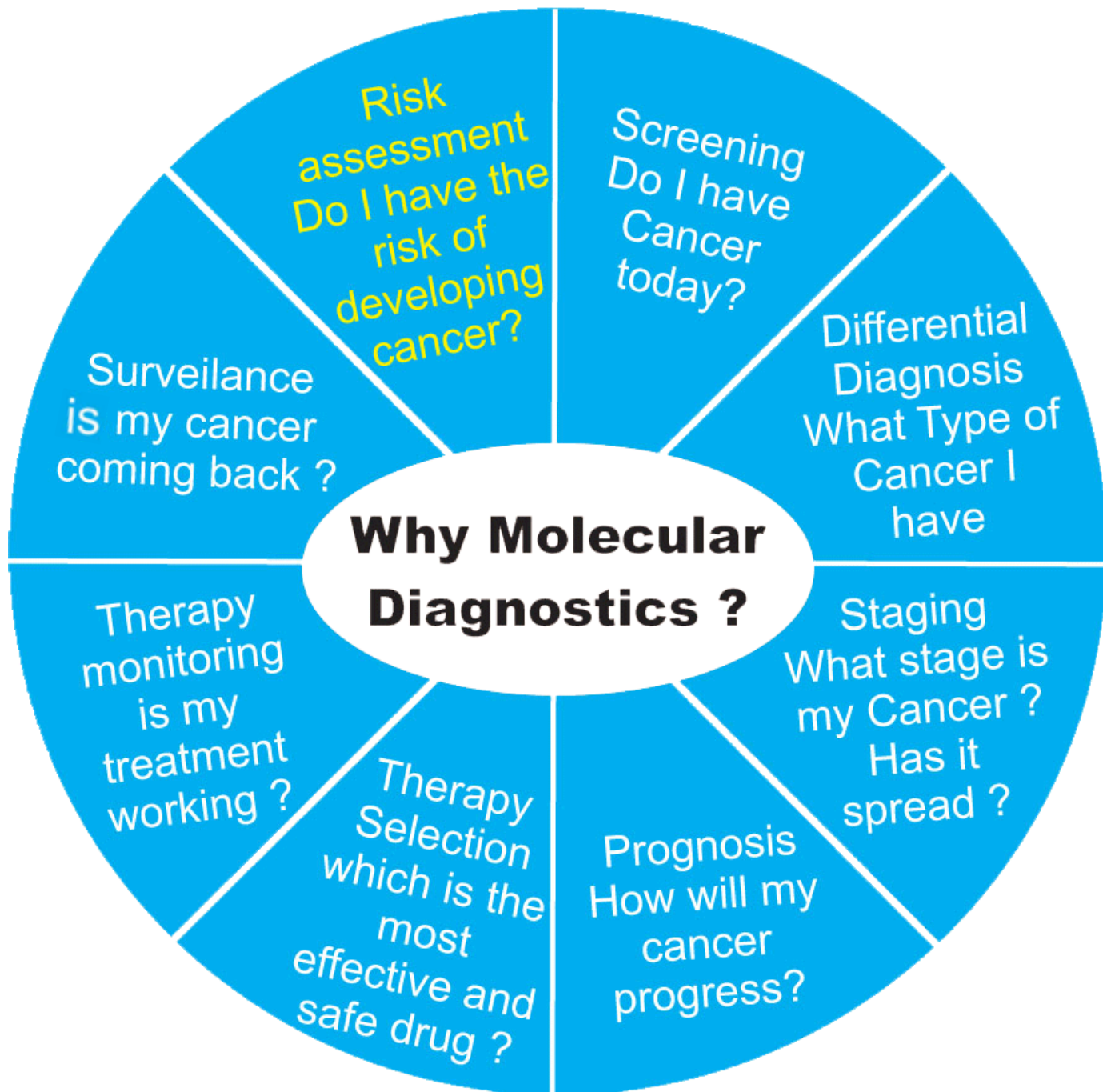
Identificación de alteraciones (genéticas, epigenéticas, cromosómicas, transcriptoma, proteoma) asociadas con la enfermedad



Elucidar mecanismos moleculares para comprender el impacto de las alteraciones a nivel biológico y patológico



Aplicar este conocimiento para nuevos conceptos diagnósticos, pronósticos, y predictivos



Muestras para Análisis Molecular

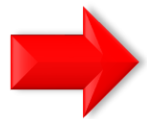
Fluidos

- Sangre y derivados (suero/plasma)
- Orina
- Saliva
- Ascites



Tejidos

- Tumor
- Biopsias
- Tejido de archivo (FFPE "Formalin-fixed paraffin-embedded")



Considerar nivel de invasividad para obtención de muestra (costos, morbilidad)

Criterios y Calidad Muestral



- Suficiente tejido para análisis histopatológico y molecular
- Cumplir con cantidad mínima de células tumorales en la muestra compatible con análisis molecular
- Contaminación con células normales e inflamatorias en rango aceptable
- Considerar pasos para concentrar o purificar células tumorales (microdissección, filtración)
- Conservación del tejido: evitar degradación de ácidos nucleicos, sobrefijación

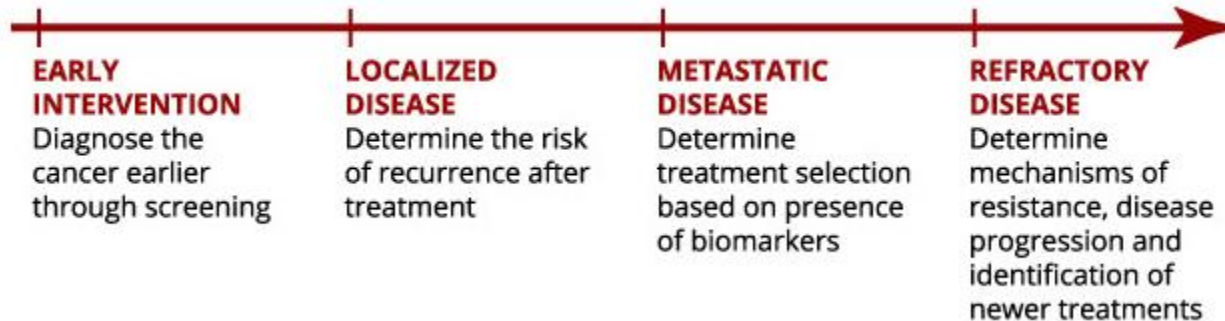
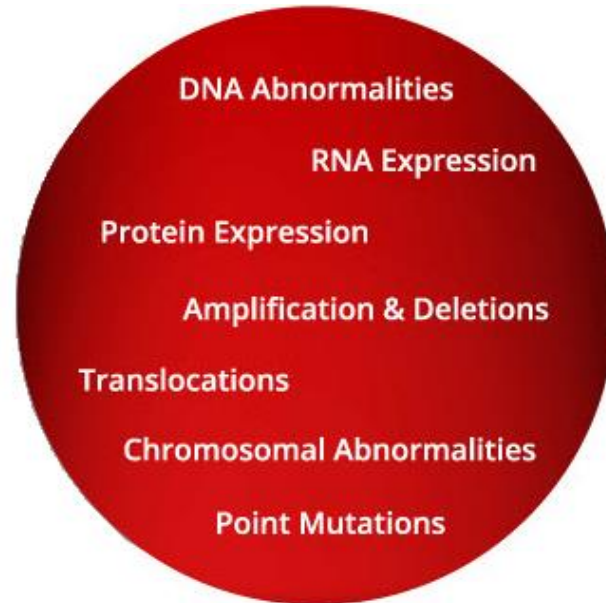
Biopsias Líquidas

Sangre = fuente de linfocitos (tejido control no-tumoral); suero/plasma para medición de algunas proteínas



Pero:

- 1  Circulating Tumor Cells
- 2  Cell-free DNA (cfDNA)
- 3 **Exosomas**



Biopsias Líquidas

Ventajas

- No-invasiva
- Precio
- Alteraciones representativas de células tumorales
- Presencia de mutaciones driver (?)
- Posibilidad de muestras consecutivas (seguimiento)
- ADN bien preservado

Desventajas

- Posibilidad de no detectar alteración presente en tumor
- Sensibilidad/especificidad variable
- Pocas células tumorales circulantes, frágiles, heterogéneas
- Técnicas no estandarizadas

Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer:
American Society of Clinical Oncology and College of
American Pathologists Joint Review

Merker et al 2018. DOI: <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.8671>

- Evidence shows discordance between the results of ctDNA assays and genotyping tumor specimens
- There is **no evidence of clinical utility** and **little evidence of clinical validity** of ctDNA assays in early-stage cancer, treatment monitoring, or residual disease detection
- There is no evidence of clinical validity and clinical utility to suggest that ctDNA assays are useful for cancer screening, outside of a clinical trial

Biopsias Líquidas: Aprobación FDA

Tests aprobados por FDA, como "Companion Diagnostics" (CDx)

- **2016: Cobas Test:** Mutación de EGFR, cancer de pulmón (NSCLC), pacientes que podrían recibir erlotinib en primera línea.
- **2020: Guardant360 CDx:** tecnología de secuenciación masiva, mutaciones en 55 genes. Mutaciones en EGFR para pacientes que podrían recibir osimertinib.
- **2020: FoundationOne Liquid CDx test:** Mutaciones en BRCA1 y BRCA2, cáncer de próstata metastásico resistente a castración, elegibles para tto. con rucaparib.

FoundationOne

FoundationOne CDx (F1CDx) (Foundation Medicine)

Detects substitutions, indels, and copy number alterations in 324 genes and select gene rearrangements, and 2 genomic signatures, MSI and TMB, in DNA from FFPE tumor tissue

Companion diagnostic:

NSCLC:

- Drugs targeted at *EGFR* exon 19 deletions, exon 21 L858R alterations, or exon 20 T790M alterations
- *ALK* rearrangements
- *BRAF* V600E mutations

Melanoma:

- *BRAF* V600E mutations
- *BRAF* V600E and V600K

Breast

- *ERBB2* (HER2) amplifications

CRC:

- *KRAS* wild-type in codons 12 and 13
- *KRAS* wild-type in exons 2,3, and 4, and *NRAS* wild-type in exons 2,3, and 4

Ovarian cancer:

- *BRCA1/2* alterations:

NSCLC:

- Afatinib (Gilotrif), erlotinib (Tarceva), gefitinib, osimertinib (Tagrisso)
- Alectinib (Alecensa), crizotinib, ceritinib (Zykadia)
- Dabrafenib + trametinib

Melanoma:

- Dabrafenib, vemurafenib (Zelboraf)
- Trametinib or cobimetinib (Cotellic) + vemurafenib

Breast:

- Trastuzumab (Herceptin), ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla), pertuzumab (Perjeta)

CRC:

- Cetuximab (Erbix) (Erbix)
- Panitumumab

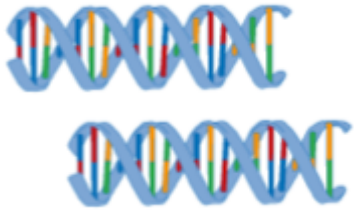
Ovarian:

- Rucaparib

CRC indicates colorectal cancer; FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded; MSI, microsatellite instability; NGS, next-generation sequencing; NSCLC, non-small cell lung cancer; TMB, tumor mutation burden.

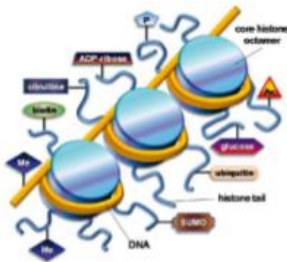
Alteraciones Moleculares Medibles

GENOMA



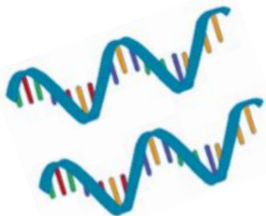
Alteraciones en la secuencia/estructura del ADN (mutaciones, alteraciones cromosómicas)

EPIGENOMA



Alteraciones epigenéticas (metilación ADN, acetilación histonas)

TRANSCRIPTOMA



Cambios en la expresión génica (mARN, ARNs no codificantes), variantes de splicing

Análisis Molecular

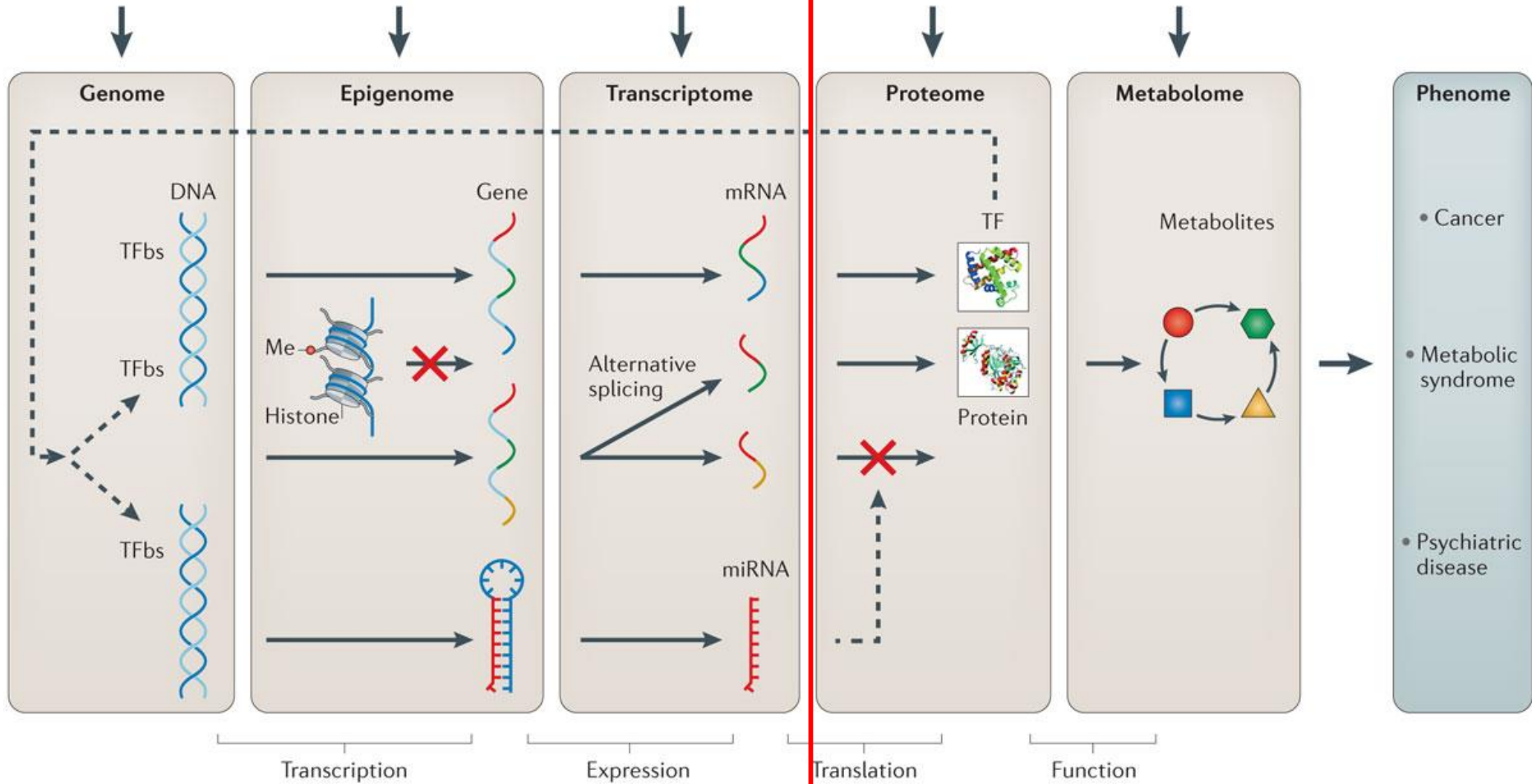
- SNP
- CNV
- LOH
- Genomic rearrangement
- Rare variant

- DNA methylation
- Histone modification
- Chromatin accessibility
- TF binding
- miRNA

- Gene expression
- Alternative splicing
- Long non-coding RNA
- Small RNA

- Protein expression
- Post-translational modification
- Cytokine array

- Metabolite profiling in serum, plasma, urine, CSF, etc.



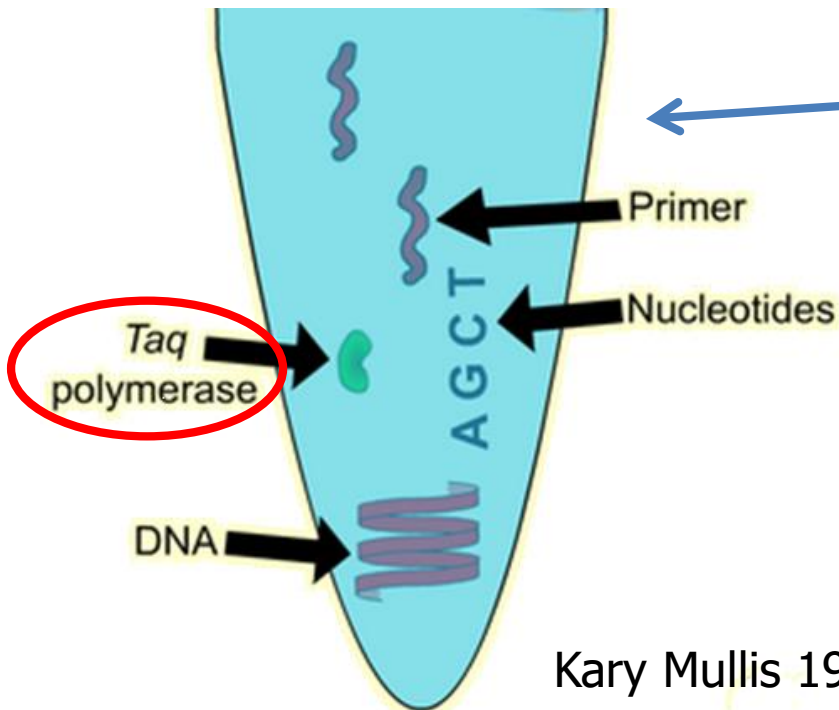
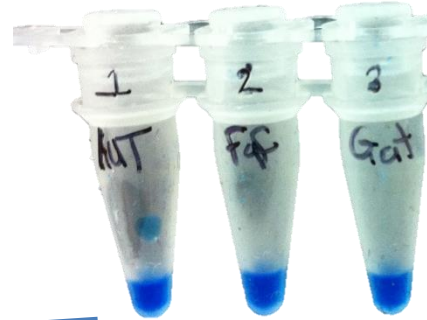
1. Análisis del Genoma

- Mutaciones / Variantes raras (poco frecuentes)
- Rearreglos cromosómicos
- Pérdida/ganancia de material genético
- Polimorfismos

Análisis del Genoma: PCR y Secuenciación

Paso 1: PCR (Polymerase Chain Reaction)

- Selección de segmento específico de ADN y su amplificación

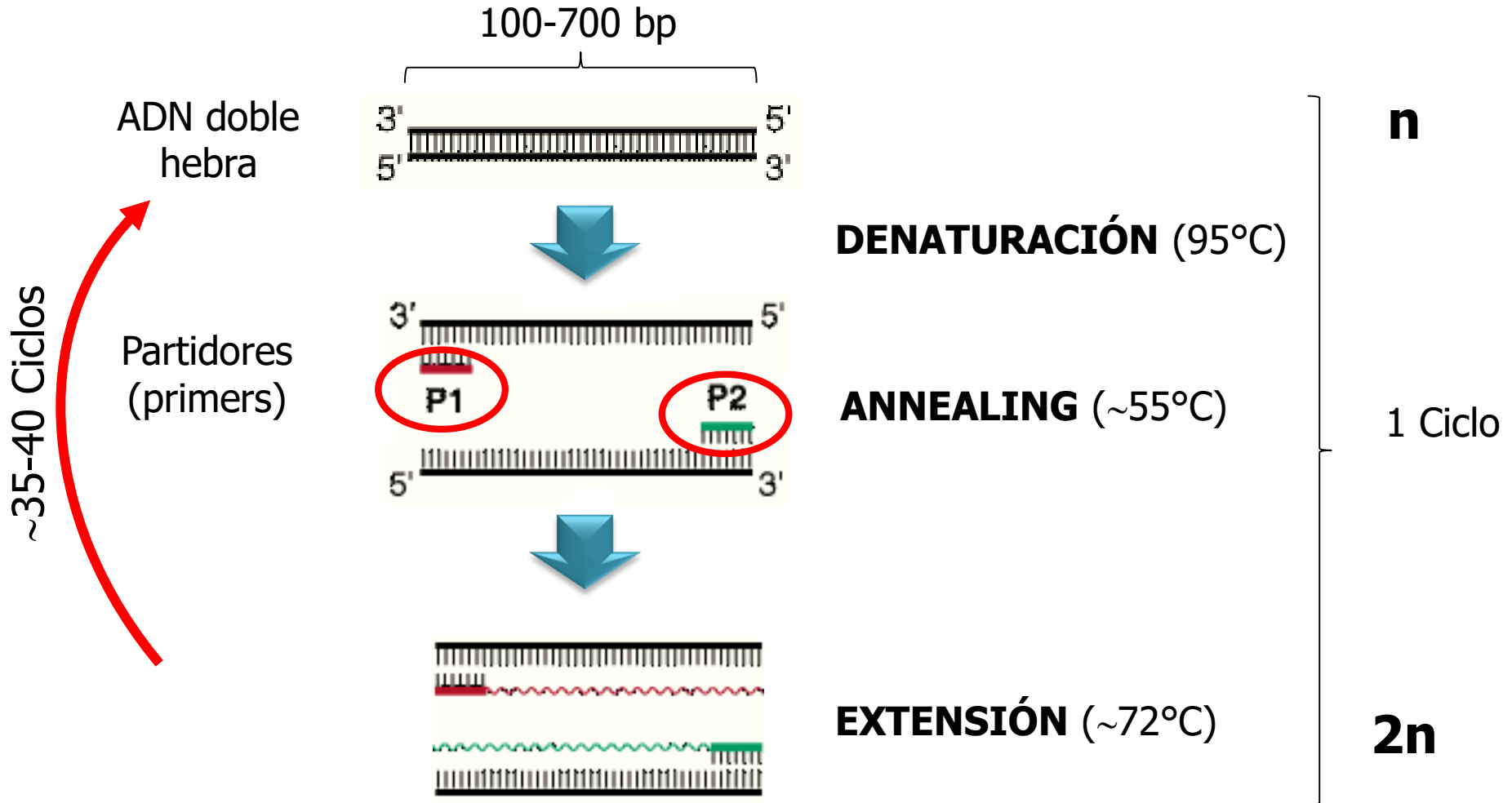


Kary Mullis 1983

Termociclador



PCR



Aumento exponencial: para 40 ciclos, 2^{40} copias del fragmento seleccionado de ADN

PCR

<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>

<https://www.youtube.com/watch?v=2KoLnIwoZKU>

Paso 2: Secuenciación por Sanger

5'- CTGACTATTA ACTGAA-3'

Secuencia por analizar

+

3'-ACTT-5'

Partidor único

+

ddA ddT ddG ddC

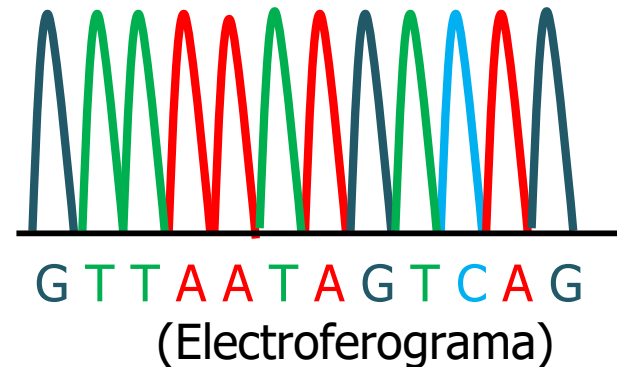
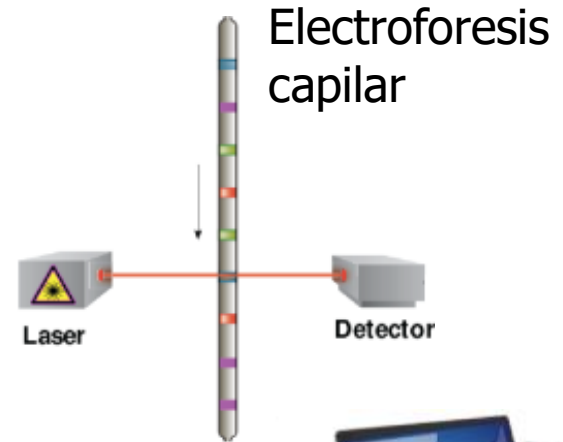
Deoxinucleótidos

ddA ddT ddG ddC

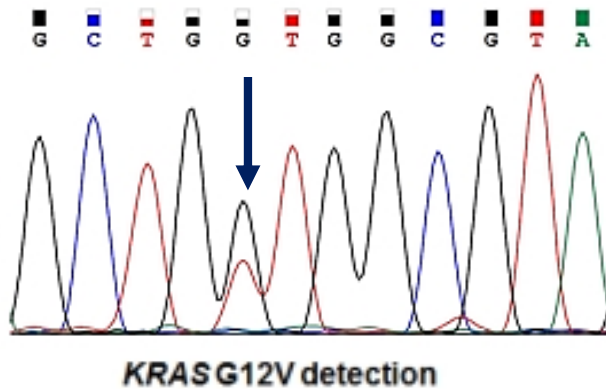
Dideoxinucleótidos

ddGACTGATAATTGACTT
ddACTGATAATTGACTT
ddCTGATAATTGACTT
ddTGTGATAATTGACTT
ddGATAATTGACTT
ddATAATTGACTT
ddTAATTGACTT
ddAATTGACTT
ddATTGACTT
ddTTGACTT
ddTGACTT
ddGACTT

12 productos de secuenciación

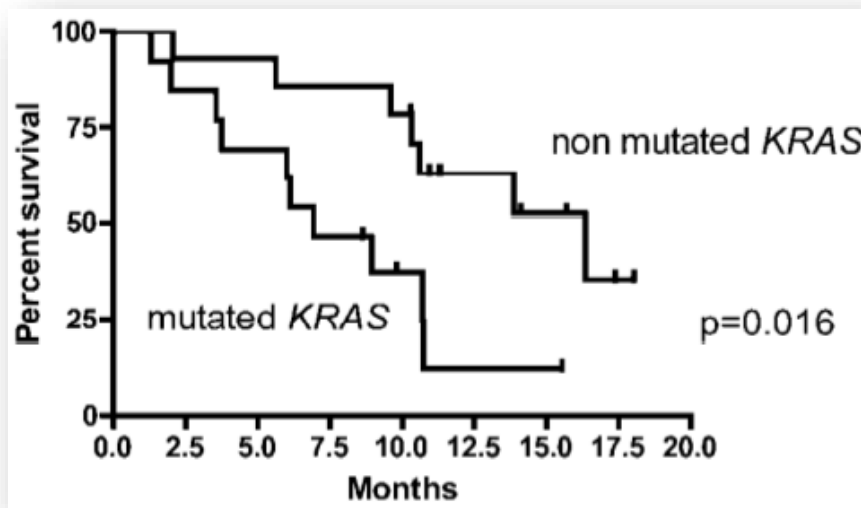


Ejemplo: Análisis de Mutaciones en *KRAS*



- Mutaciones en 3 codones (12, 13, 15, 18)
- Cercanas, acotadas

- Mutaciones en *KRAS* se asocian con resistencia a terapia dirigida a EGFR (p.ej. en cáncer colorrectal)



Cancer Res 2006. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0191

Determinación Masiva de Mutaciones

- Para algunas aplicaciones (p.ej. elección terapéutica), el análisis de una sola mutación puede no ser suficiente



Metodologías masivas que permitan análisis simultáneo de varias mutaciones (panel)

- Secuenciación masiva o Next Generation Sequencing (NGS)

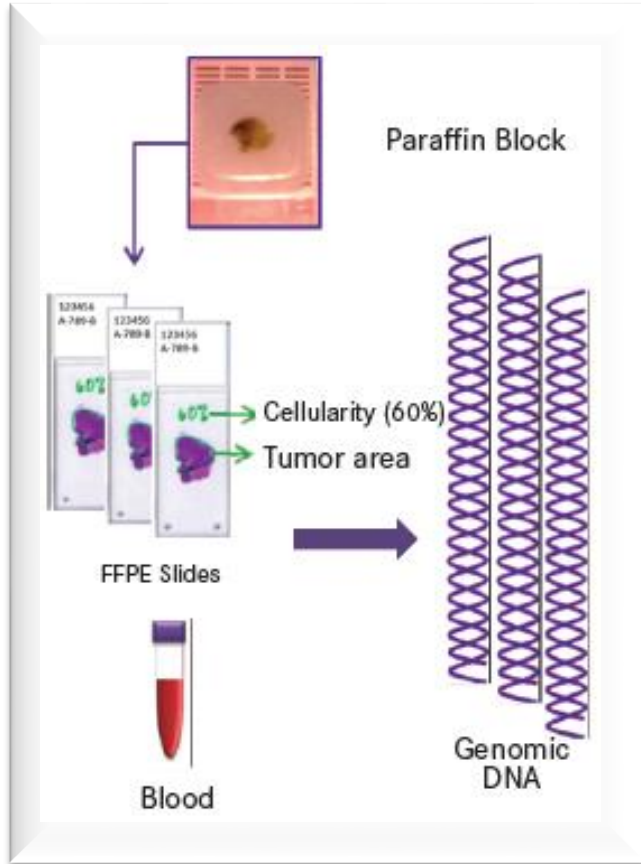


Secuenciación Masiva

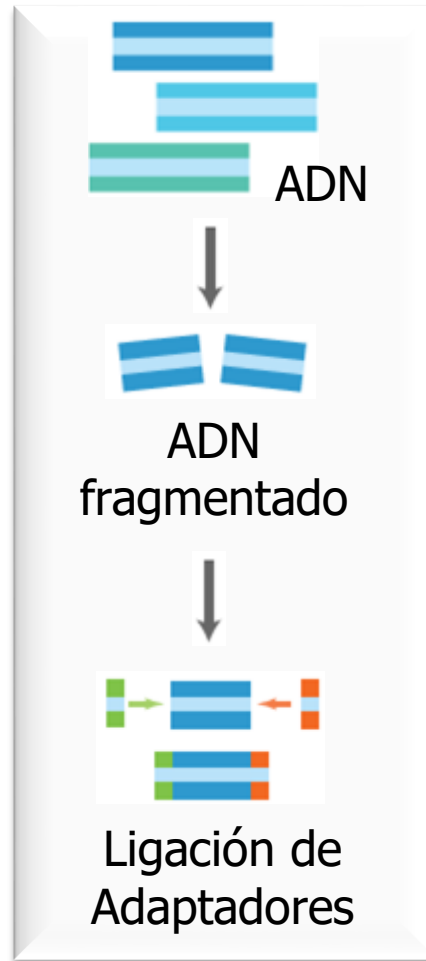
Permite secuenciar:

- Un genoma completo
- Un exoma completo (todos los exones codificantes para proteínas)
- Un panel de varios genes (ej: cáncer de mama)
- Genes de gran tamaño (>10 exones)

NGS (1)



1
Purificación de ADN



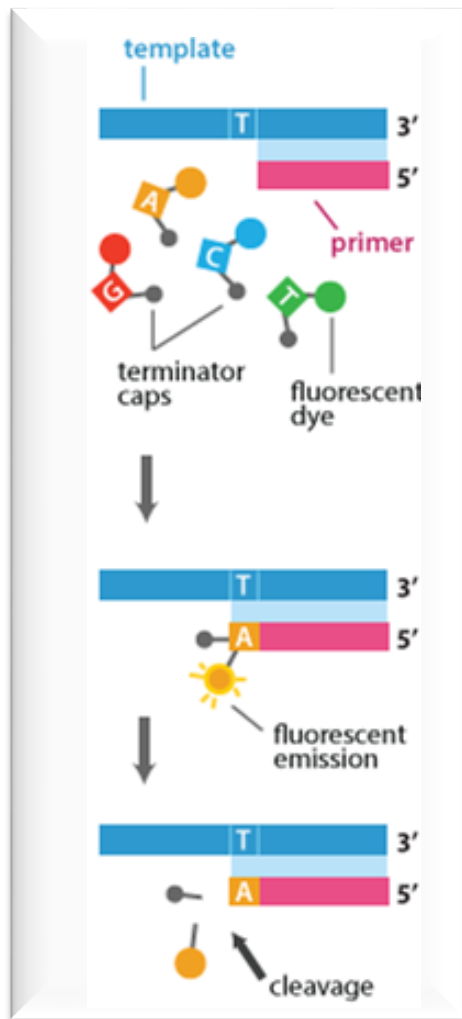
2
Preparación de Librerías



3
Amplificación clonal

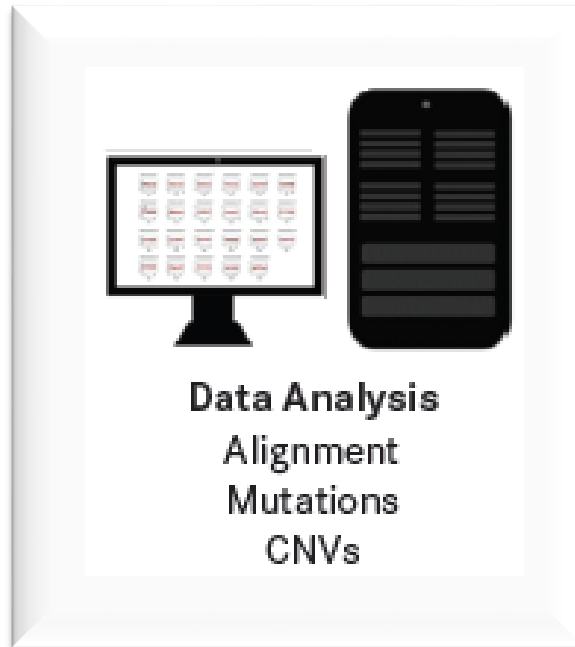


NGS (2)

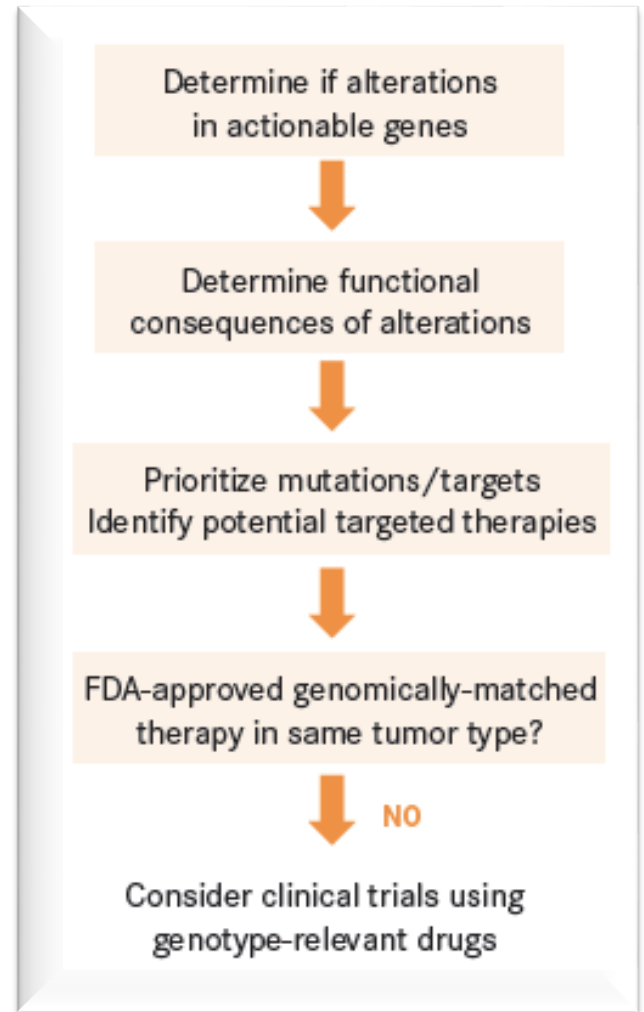


4

Secuenciación



Data Analysis
Alignment
Mutations
CNVs



6

Decisión terapéutica

NGS: Ventajas y Limitaciones

Clinical molecular
diagnostics of tumors
with the NGS methods

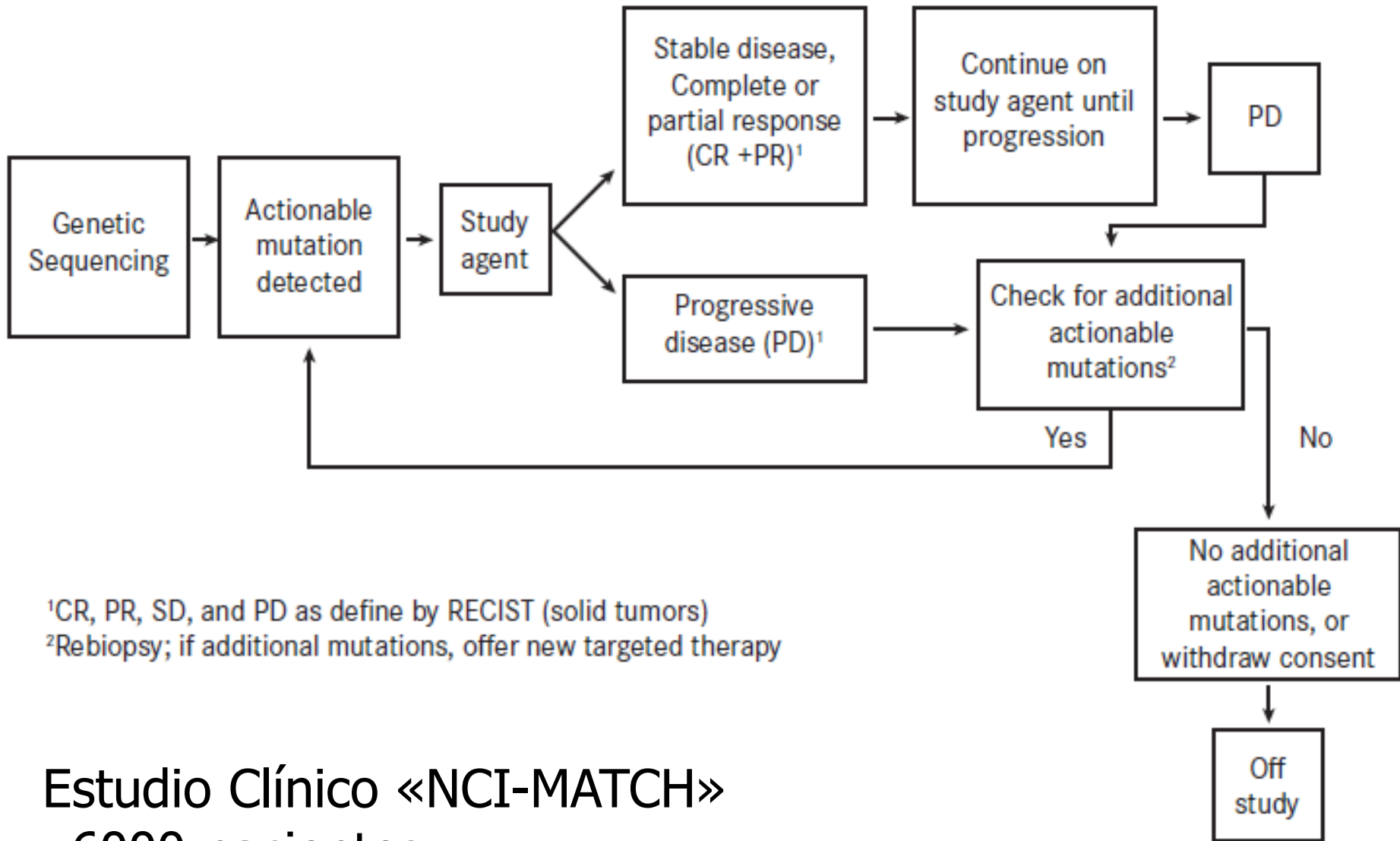
Benefits

- Low input of DNA/RNA
- Simultaneous screening of multiple genes in multiple samples
- Massively parallel DNA/RNA sequencing
- Deeper investigation of tumor heterogeneity
- Quantitative and sensitive detection of genomic alterations
- Decreased sequencing cost/gene

Critical points

- Selection of the sequencing platform and of the most accurate genes for NGS panel
- Validation studies required
- High-complexity workflow and results
- Bioinformatic tools for analysis
- Long-term storage of data

Validación de NGS: Estudios



¹CR, PR, SD, and PD as define by RECIST (solid tumors)

²Rebiopsy; if additional mutations, offer new targeted therapy

Estudio Clínico «NCI-MATCH»
~6000 pacientes

Algunos Aprobados para Clínica

- Oncomine DX Target Test (aprobado FDA 2017 como «companion diagnostic»): NSCLC, 369 variantes en 23 genes, decisión terapéutica
- GeneDx Comprehensive Cancer Panel: diagnóstico de síndromes hereditarios
- UW OncoPlex Cancer Gene Panel: mutaciones en 262 genes relevantes en cáncer

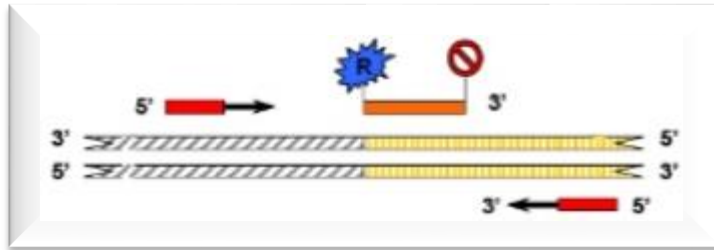


Ejemplos Aprobados por FDA

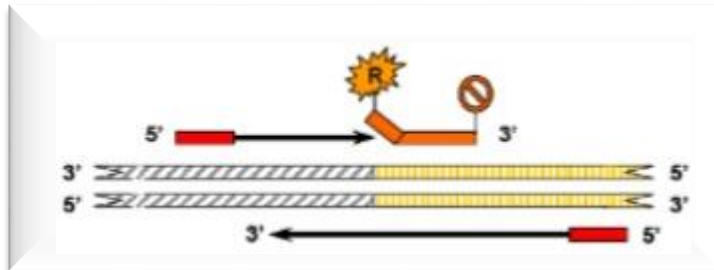
Description	Indication	Drugs
Oncomine Dx Target Test (Thermo Fisher Scientific)		
Detects single nucleotide variants and deletions in 23 genes from DNA and fusions in <i>ROS1</i> from RNA isolated from FFPE tissue from NSCLC tumors	Companion diagnostic for NSCLC drugs targeting <i>BRAF</i> V600E, <i>ROS1</i> fusions, and <i>EGFR</i> exon 19 L858R deletions	Dabrafenib (Tafinlar) plus trametinib (Mekinist), crizotinib (Xalkori), gefitinib (Iressa)
MSK-IMPACT (Memorial Sloan Kettering Cancer Center)		
Identifies mutations in 468 genes, including somatic single nucleotide variants, insertions, deletions, and MSI in DNA from FFPE tumor tissue matched with normal specimens	Provides information on somatic mutations in solid tumors and MSI status for clinicians to use in accordance with guideline recommendations	Not conclusive or prescriptive for labeled use of any specific drug
FoundationFocus CDxBRCA Assay (Foundation Medicine)		
Detects sequence alterations in <i>BRCA1/2</i> genes in FFPE ovarian tumor tissue	Companion diagnostic	Rucaparib (Rubraca)
Praxis Extended RAS Panel (Illumina)		
Detects 56 specific mutations in <i>RAS</i> genes (<i>KRAS</i> exons 2,3, and 4 plus <i>NRAS</i> exons 2,3, and 4) in DNA from FFPE samples from CRC tissue	Companion diagnostic for patients with CRC with wild-type <i>RAS</i>	Panitumumab (Vectibix)

PCR en Tiempo Real

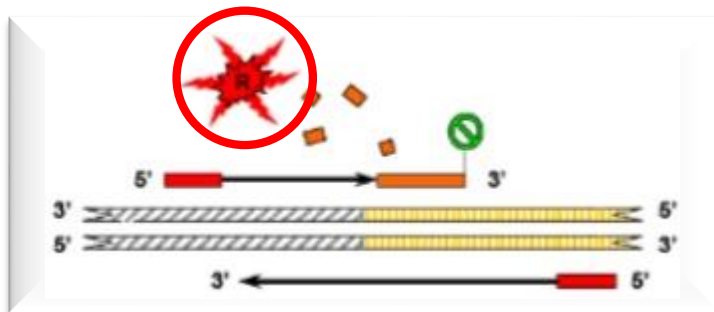
- Específica, cuantitativa; ADN y ARN



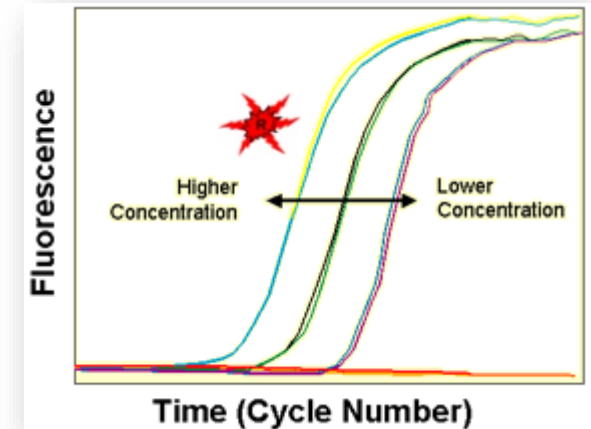
1 Annealing



2 Desplazamiento de la sonda

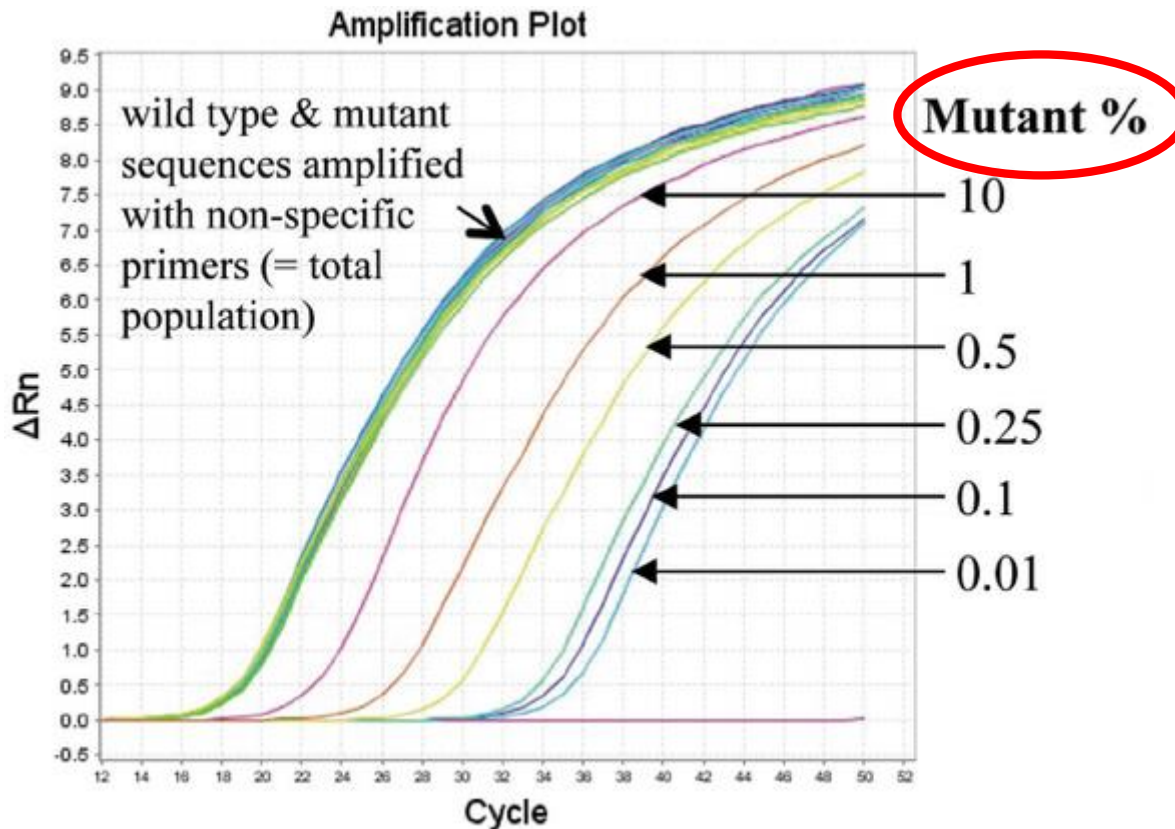


3 Degradación de la sonda; Emisión de fluorescencia



PCR en Tiempo Real: Mutaciones

- PCR alelo-específico
- Sensibilidad $\sim 1/1.000$
- Sencillo, rápido, requiere poco material (muestra)



Posibilidad de medir varias mutaciones en la misma reacción («multiplexing»)

Ensayos por qPCR Aprobados en USA

Companion Diagnostic Assays (listed in alphabetic order of drug trade name)

Drug trade name (generic name)	Device trade name	Disease
ERBITUX (cetuximab); VECTIBIX (panitumumab)	The cobas KRAS Mutation Test	Colorectal cancer
ERBITUX (cetuximab); VECTIBIX (panitumumab)	<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit	Colorectal cancer
GILOTRIF (afatinib)	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit	Non-small cell lung cancer
GLEEVEC (imatinib mesylate)	<i>KIT</i> D816V Mutation Detection by PCR for Gleevec Eligibility in Aggressive Systemic Mastocytosis (ASM)	Aggressive systemic mastocytosis
IRESSA(gefitinib)	<i>therascreen</i> EGFR RGQ PCR Kit	Non-small cell lung cancer
LYNPARZA (olaparib)	BRACAnalysis CDx	Ovarian cancer
MEKINIST (trametinib); TAFINLAR(dabrafenib)	THxID BRAF Kit	Melanoma
TAGRISSO (osimertinib)	cobas EGFR Mutation Test v2	Non-small cell lung cancer
ZELBORAF (vemurafenib)	COBAS 4800 BRAF V600 Mutation Test	Melanoma

2. Análisis del Transcriptoma

- Identificación de variantes de splicing
- Análisis cuantitativo de ARNm, ARNnc (no codificante): niveles y perfiles de expresión

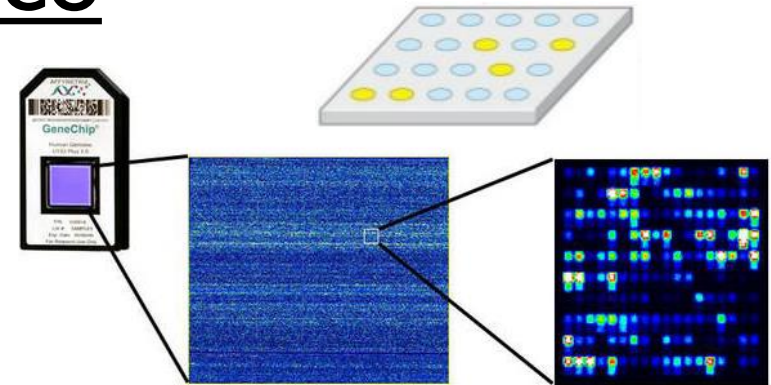
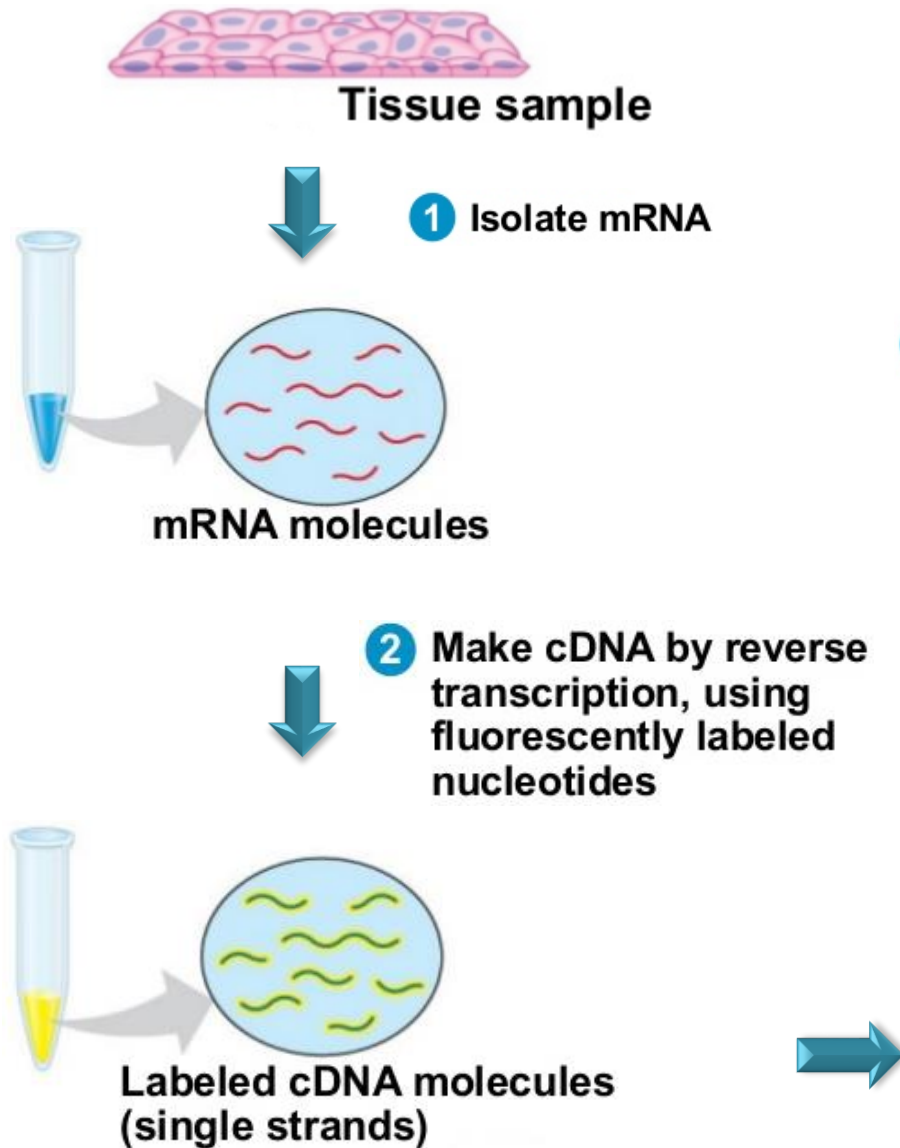
Arrays de Expresión Génica

- Medición simultánea de transcritos (mARN)
- Técnicas masivas (transcriptómica: microarrays y RNAseq)
- También ARNs no codificantes
- Permiten crear perfiles de expresión génica: diferenciar subgrupos tumorales
- Ej: diagnóstico diferencial en tumores primarios de origen desconocido ("carcinoma of unknown primary", CUP); pronóstico

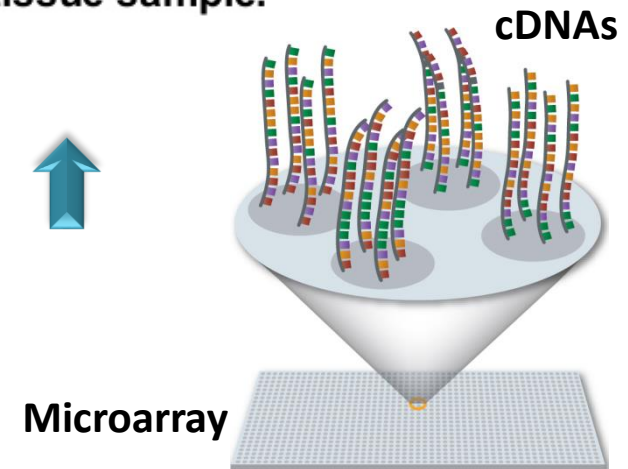
Principios Microarrays

<https://www.youtube.com/watch?v=6ZzFihESjp0>

Análisis Transcriptómico



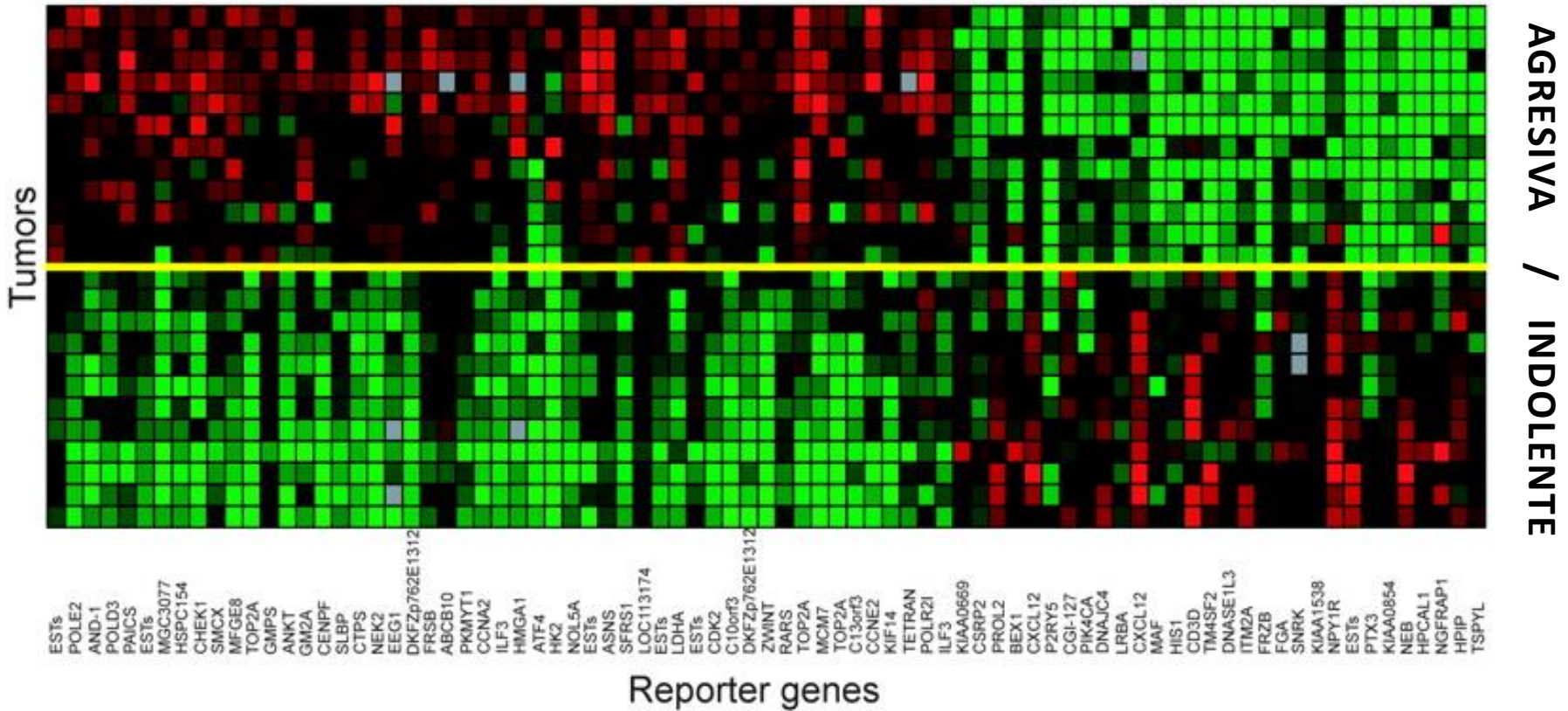
- 4 Rinse off excess cDNA; scan microarray for fluorescence. Each fluorescent spot (yellow) represents a gene expressed in the tissue sample.**



- 3 Apply the cDNA mixture to a microarray, a different probe in each spot. The cDNA hybridizes with any complementary DNA on the microarray.**

"Tumor Profiling"

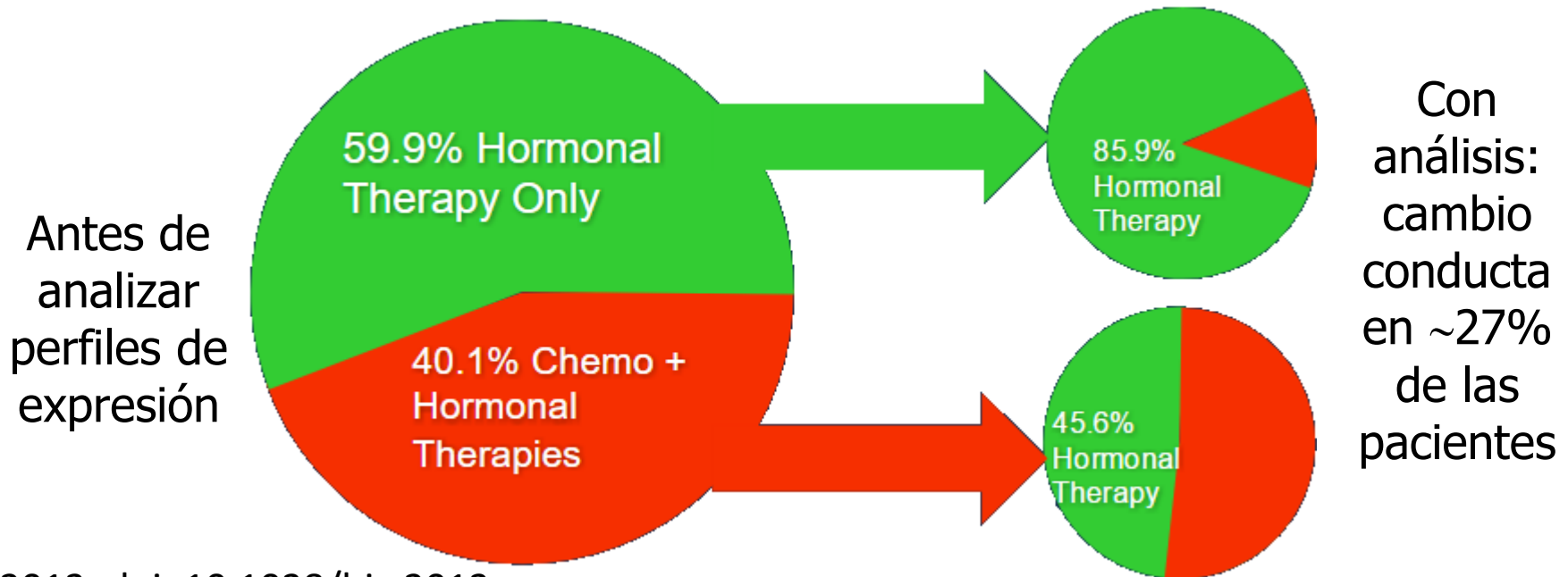
Perfiles de expresión génica, 81 genes permiten diferenciar tumores



Linfoma folicular; distinción pronóstica

Uso Clínico

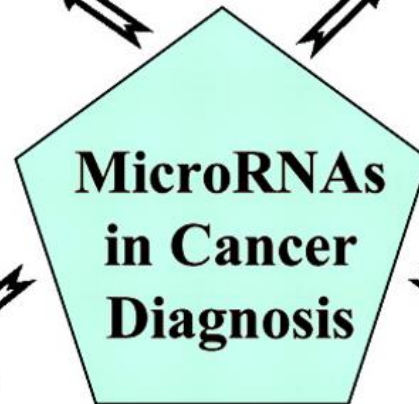
- Oncotype DX: cáncer de mama
- Expresión de 21 genes, cálculo de riesgo de recurrencia; decisión terapéutica
- Reducción del número de pacientes que reciben terapia: sólo las de alto riesgo



Micro-ARNs como Biomarcadores

Utilizing a signature of altered miRNA expression to differentiate cancer tissue from normal tissue

Use of miRNA based classifier to identify tissue of origin for cancers of unknown primaries



Profiling circulating blood or tumor derived exosomal miRNAs, surpassing the invasive procedures to aid in early detection of cancers

Distinguishing tumor subtypes using a panel of miRNAs that show differential expression within one cancer type

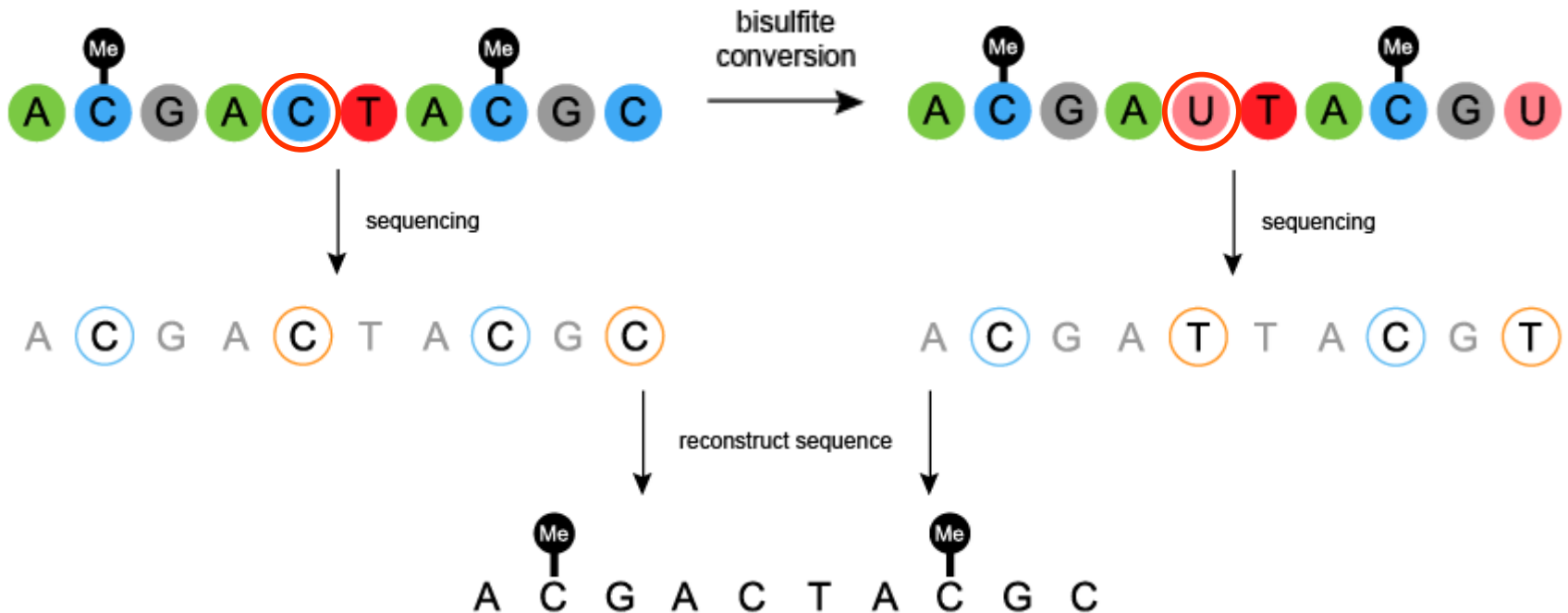
Study SNPs in the miRNA genes, miRNA binding sites in the target mRNA genes or in the miRNA processing/machinery pathway genes to predict cancer predisposition

3. Análisis del Epigenoma

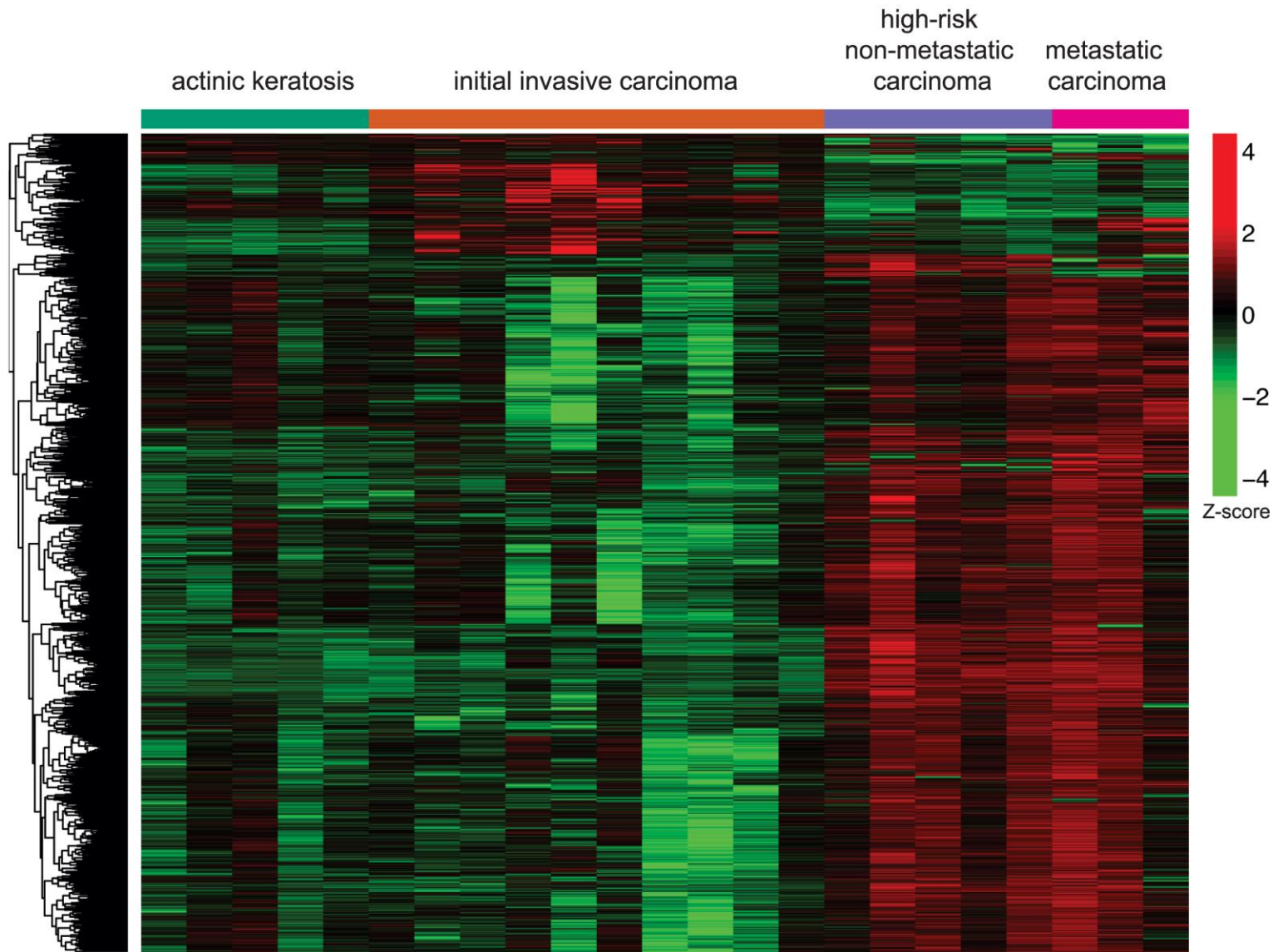
- Principalmente Metilación del ADN: perfiles de metilación

Epigenoma

- Genes bajo control epigenético alterados en cáncer: metilación del ADN
- Técnicas masivas, microarrays
- Detección: tratamiento con bisulfito



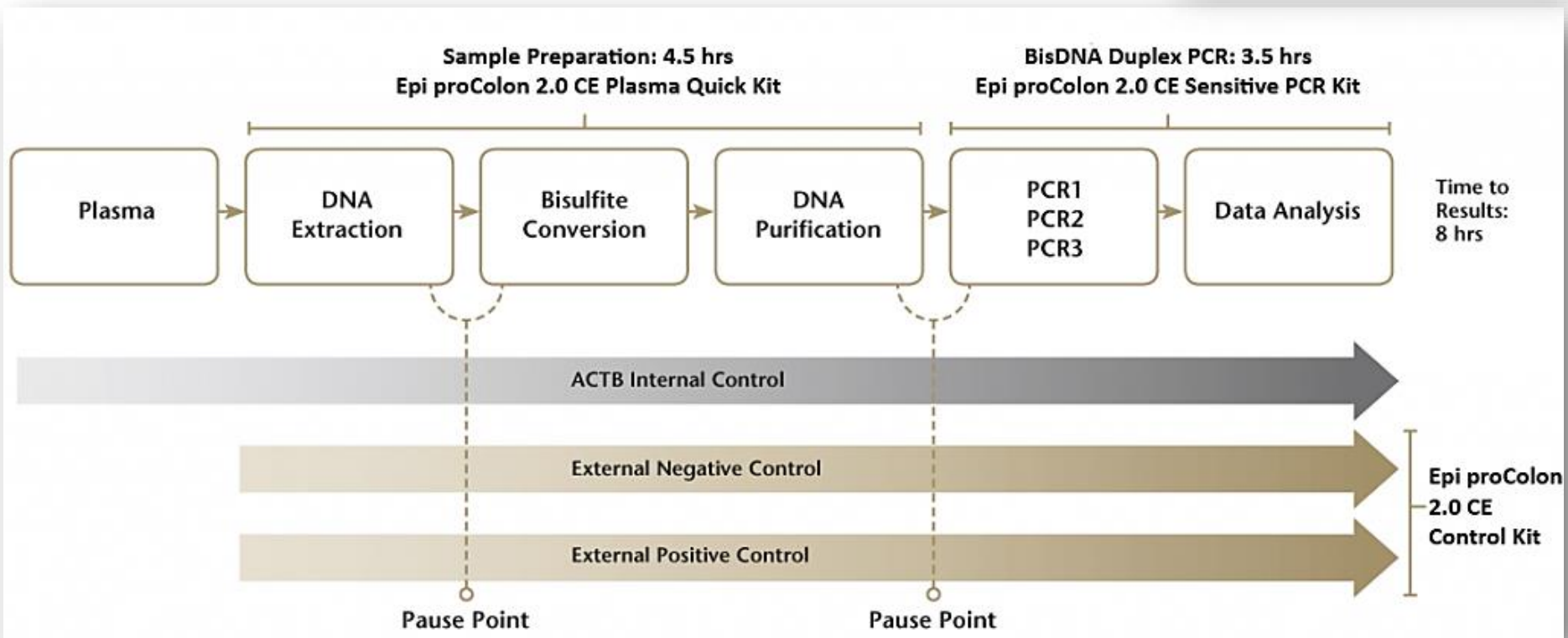
Perfiles de Metilación ("Heatmap")



Ejemplo: Detección Cáncer Colorectal

- Análisis de metilación en genes seleccionados
- PCR en tiempo real, simultáneo para varios genes
- Utiliza **biopsia líquida**

Epi proColon[®]



Resumen

- Las técnicas moleculares permiten analizar diferentes compartimentos de la célula (genoma, epigenoma, transcriptoma, entre otros)
- Existen técnicas para medir desde cambios aislados hasta las que interrogan el compartimento completo
- El diagnóstico molecular es un componente cada vez más relevante en el manejo de las enfermedades oncológicas (detección, pronóstico, predicción)

Contenidos de Interés

- Molecular Diagnostics in Cancer, Research Advocacy Network

(<http://www.researchadvocacy.org/sites/default/files/resources/MolecularDiagnosticsTutorialFinal.pdf>)

- Preventive, predictive, and personalized medicine for effective and affordable cancer care

(Janssens et al. 2018; <https://doi.org/10.1007/s13167-018-0130-1>)