

Algorithms for using panels of different sizes for different cancer types - Experience in a molecular pathology laboratory

Prof. Dr. Peter Wild



Potential Conflicts of Interest

Company	Interaction
BMS	Fee for lecturing activities
Novartis	Fee for lecturing activities
MSD	Fee for lecturing activities
Qiagen	Fee for lecturing activities
Molecular Health	Fee for lecturing activities, reimbursement of travel and accommodation costs, reimbursement of participation fees
Eli Lilly	Fee for lecturing activities
Roche	Fee for lecturing activities, reimbursement of participation fees
Sanofi Genzyme	Fee for lecturing activities
Thermo Fisher Scientific	Fee for lecturing activities
Myriad	Fee for lecturing activities
Astra Zeneca	Fee for lecturing activities

Disclaimer

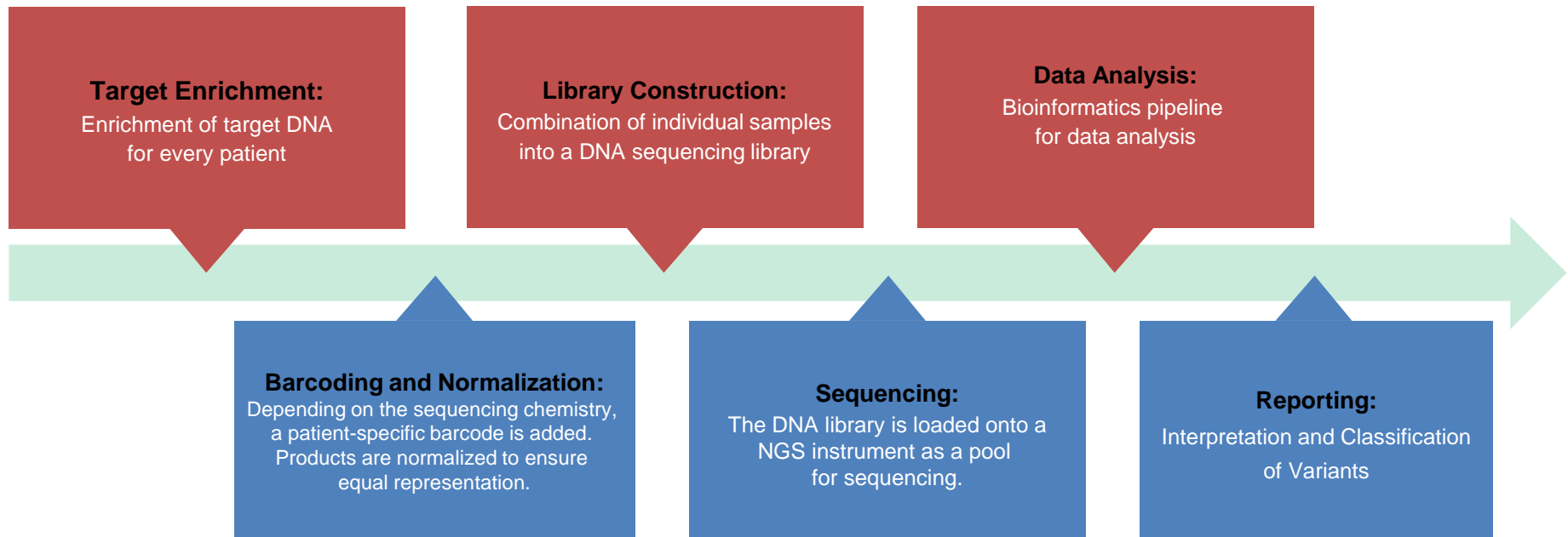
- Thermo Fisher Scientific and its affiliates are not endorsing, recommending, or promoting any use or application of Thermo Fisher Scientific products presented by third parties during this seminar.
- Information and materials presented or provided by third parties are provided as-is and without warranty of any kind, including regarding intellectual property rights and reported results.
- Parties presenting images, text and material represent they have the rights to do so.
- Speaker was provided an honorarium by Thermo Fisher Scientific for this presentation.
- The products from Thermo Fisher Scientific displayed in this presentation are labeled as follows: **"For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures."**

Outline: Algorithms for using panels of different sizes for different cancer types

- **Potential Use of NGS in a Molecular Pathology Lab**
- Molecular Profiling
- Resistance Testing
- Clinical Research in Molecular Pathology Lab in Frankfurt

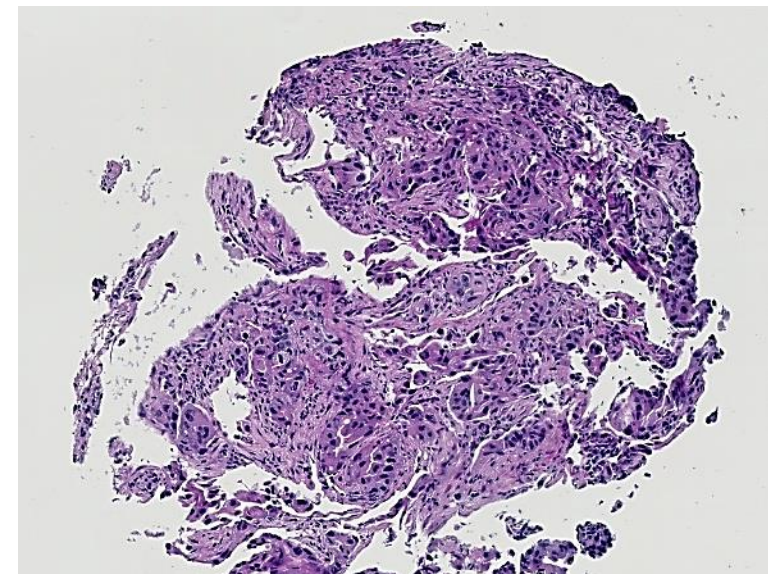
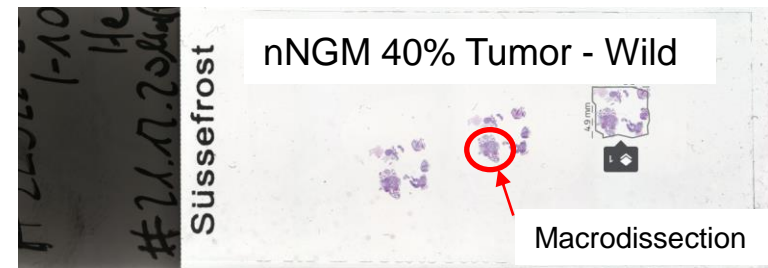
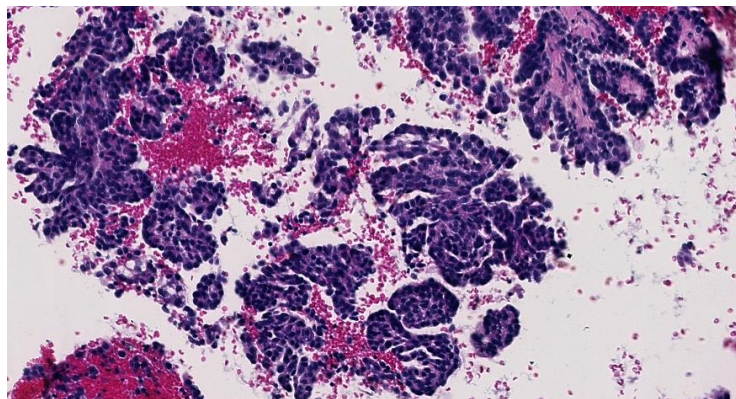
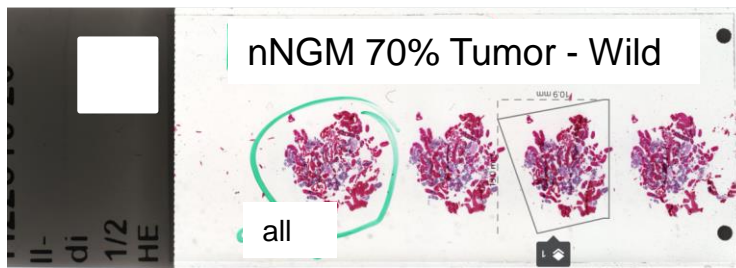


NGS Workflow after DNA Extraction



Macrodissection and DNA/RNA Extraction

Enrichment of the invasive tumour tissue by removal of additional non-tumour tissue captured in the tissue section



Challenge for molecular pathology: many separate databases for variant annotation

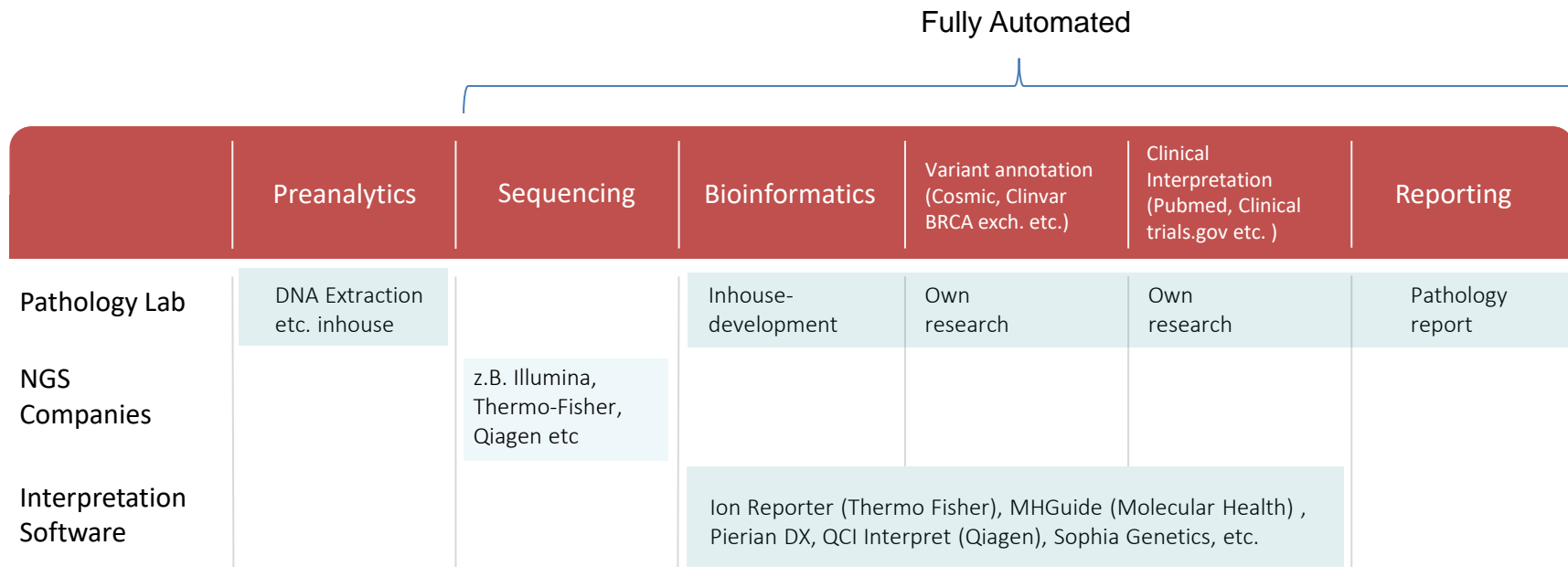
The image displays four separate databases used for variant annotation:

- UMD (Universal Mutation Database):** A database for BRCA1 and BRCA2 mutations, featuring a sidebar with navigation links like 'The Bank', 'The Project', 'The Method', 'Resources', 'Members', 'Submissions', and 'Tools'.
- BRCA Share (formerly UMD-BRCA1 mutations database):** A database for BRCA1 mutations, showing a search bar and a list of variants.
- ENA (European Nucleotide Archive):** A database for nucleotide sequences, featuring a search bar and a list of sequences.
- ClinVar:** A database for clinical variants, showing a search bar and a list of variants. It includes a section for 'Using ClinVar' with links to 'About ClinVar', 'Data Dictionary', 'Downloads/FTP site', 'FAQ', 'Contact Us', and 'Factsheet'. It also has a 'Tools' section with links to 'ACMG Recommendations for Reporting of Incidental Findings', 'ClinVar Submission Portal', 'Submissions', 'Variation Viewer', 'Clinical Remapping - Between assemblies and RefSeqGenes', and 'RefSeqGene/LRG'. Finally, it has a 'Related Sites' section with links to 'ClinGen', 'GeneReviews', 'GTR', 'MedGen', 'OMIM', and 'Variation'.

- For new or rare gene variants, there is often no associated phenotype.
- Accumulation of variants of unclear significance VUS when using large gene panels

NGS Workflows:

Where do you lose the most time?



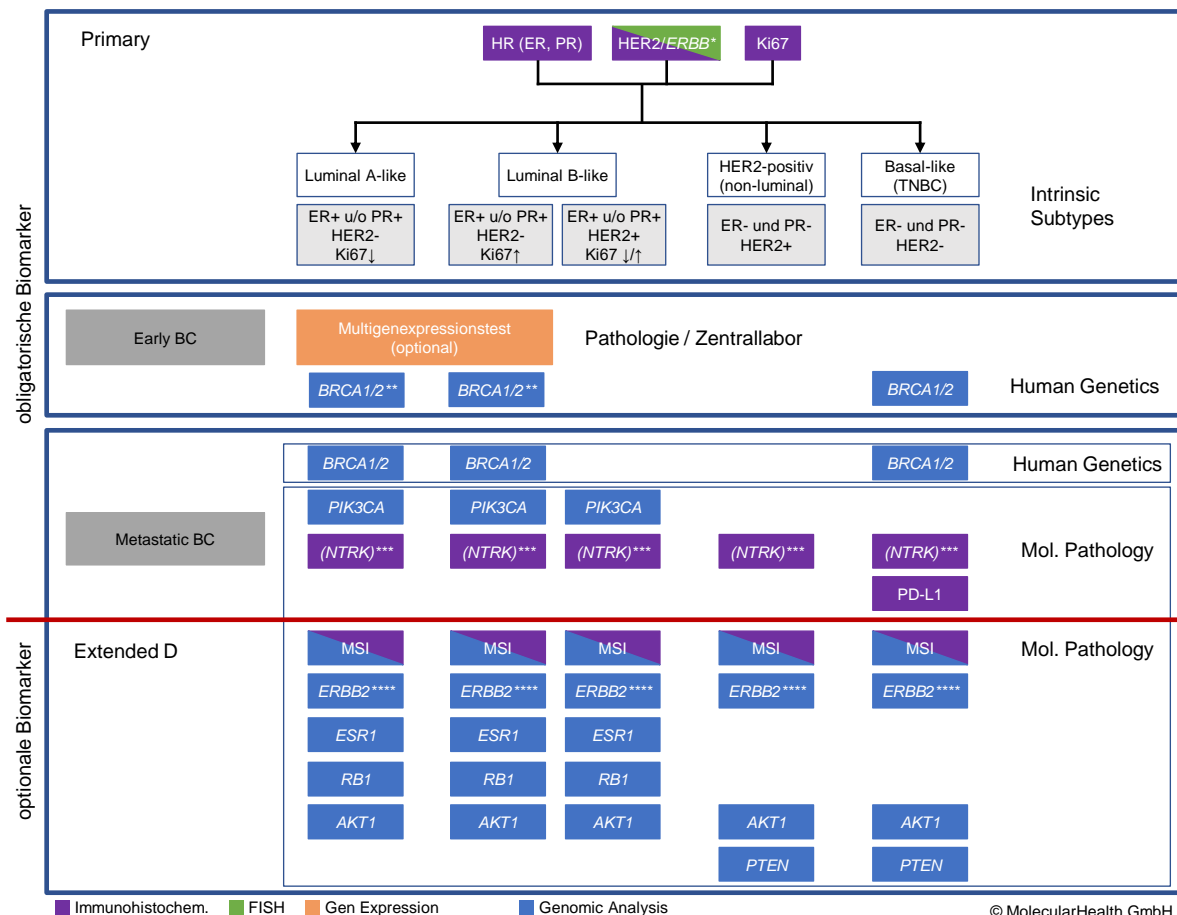
- Molecular testing should be performed in a molecular pathology lab.
- For comprehensive genome analyses, evaluation software is always necessary.
- The software must provide transparent, quality-assured and up-to-date evaluations.

Outline: Algorithms for using panels of different sizes for different cancer types

- Potential Use of NGS in a Molecular Pathology Lab
- **Molecular Profiling**
- Resistance Testing
- Clinical Research in Molecular Pathology Lab in Frankfurt



Breast Cancer Biomarkers: OCA v3



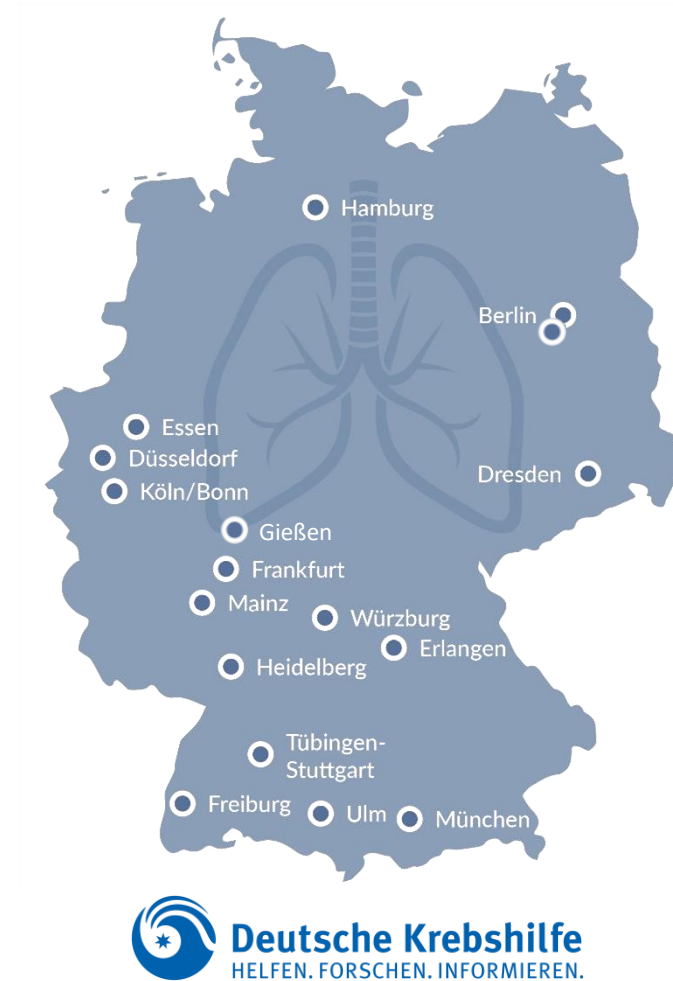
References

1. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms Langversion 4.3 – _Februar 2020 AWMF-Registernummer: 032-045OL.
2. https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/leitlinien/kommission_mamma/2021/PDF_DE/2021D%2005_Prognostische%20und%20praediktive%20Faktoren.pdf.
3. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. The Cancer Genome Atlas Network. *Nature* volume 490, pages61–70(2012).
4. Goldhirsch et al, *Annals of Oncology* 24: 2206–2223, 2013 doi:10.1093/annonc/mdt303 (St Gallen Empfehlung).

National Network Genomic Medicine (nNGM)

Lung Cancer

- National network of currently 22 cancer centers, coordinated by University Hospital Cologne
- Motto: „**test centrally, treat decentrally**“



nNGM - Molecular Pathology

1. EMA approved markers

- Activating *EGFR* mutation
- *BRAF* V600 mutation
- *ALK* translocation
- *ROS1* translocation
- *RET* translocation
- *NTRK1-3* translocation
- PD-L1 status (quantification of membrane positive tumour cells and immune cells)

2. Markers related to Clinical research Trials within nNGM

nNGM Panel v2.0

**1. nNGM Lung Cancer DNA Panel
v2.0 (26 genes)
Ion AmpliSeq Panel, Thermo Fisher**

**2. Archer FusionPlex
Lung Cancer Panel
(*ALK*, *ROS1*, *RET*, *MET*, *NTRK1-3*,
etc.)**

Panel 2.0 (Indikation: AC, PC)

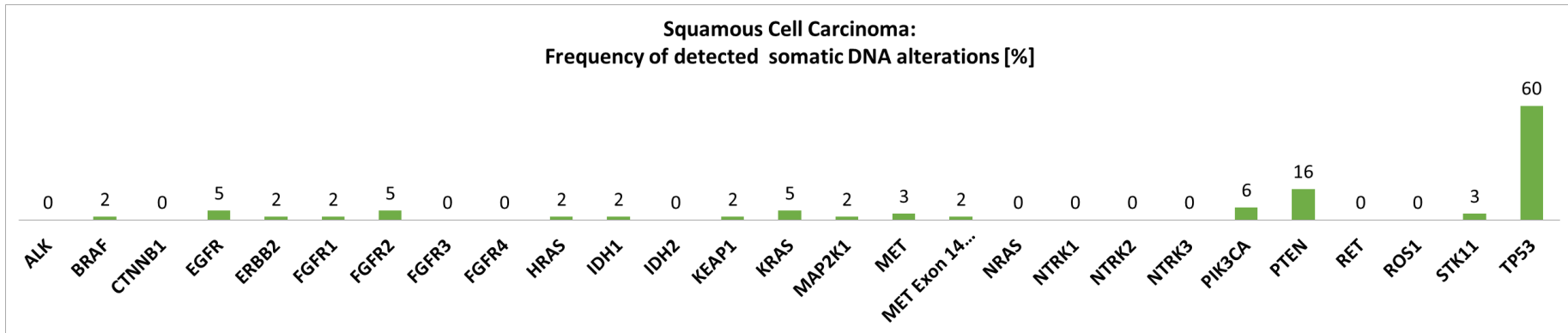
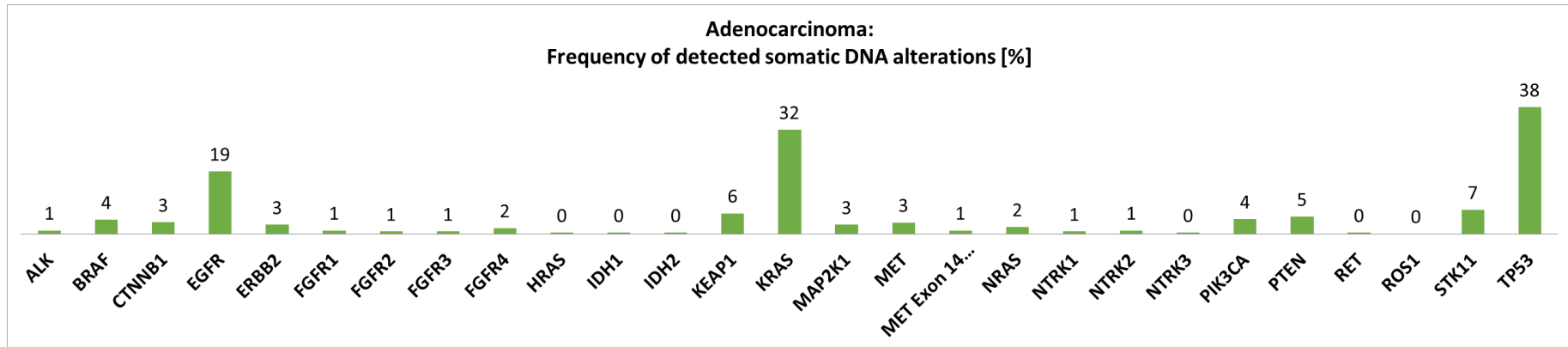
Gen	NCBI	Ensembl	Exone
ALK	NM_004304.4	ENST00000389048	22, 23, 24, 25
BRAF	NM_004333.4	ENST00000288602.6	11, 15
CTNNB1	NM_001904.3	ENSG00000168036	3
EGFR	NM_005228.3	ENST00000275493.2	18, 19, 20, 21
ERBB2	NM_004448.2	ENST00000269571.5	8, 19, 20
FGFR1	NM_023110.2	ENST00000447712.2	4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15
FGFR2	NM_000141.4	ENST00000358487.9	6, 7, 8(b), 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18
FGFR2	NM_022970.3	ENST00000457416.2	8(a)
FGFR3	NM_000142.4	ENST00000440486.2	3, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 16, 18
FGFR4	NM_213647.1	ENST00000292408.4	3, 6, 9, 12, 13, 15, 16
IDH1	NM_005896.2	ENST00000345146.2	4
IDH2	NM_002168.2	ENST00000330062.3	4
KRAS	NM_033360.2	ENST00000256078.4	2, 3, 4
MAP2K1	NM_002755.3	ENST00000307102.5	2, 3
MET	NM_001127500.2	ENST00000397752.3	14, 16, 17, 18, 19
MET	NM_001127500.2	ENST00000397752.3	Intron 13, ersten 100 bp von Intron 14
NRAS	NM_002524.4	ENST00000369535.4	2, 3, 4
PIK3CA	NM_006218.2	ENST00000263967.3	8, 10, 21
PTEN	NM_000314.4	ENST00000371953.3	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
ROS1	NM_002944.2	ENST00000368508.3	34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41
TP53	NM_000546.5	ENST00000269305.4	4, 5, 6, 7, 8
NTRK1	NM_002529.3	ENST00000524377.5	13, 14, 15, 16, 17
NTRK2	NM_006180.3	ENST00000277120.7	14, 15, 16, 17, 18, 19
NTRK3	NM_001012338.2	ENST00000360948.6	15, 16, 17, 18, 19, 20
RET	NM_020975.6	ENST00000355710.8	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
HRAS	NM_005343.4, NM_001130442.1	ENST00000311189.8	2, 3, 4
STK11	NM_000455.4	ENST00000326873.11	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
KEAP1	NM_203500.2	ENST00000171111.10	2, 3, 4, 5, 6

2018/2019

Update 2020

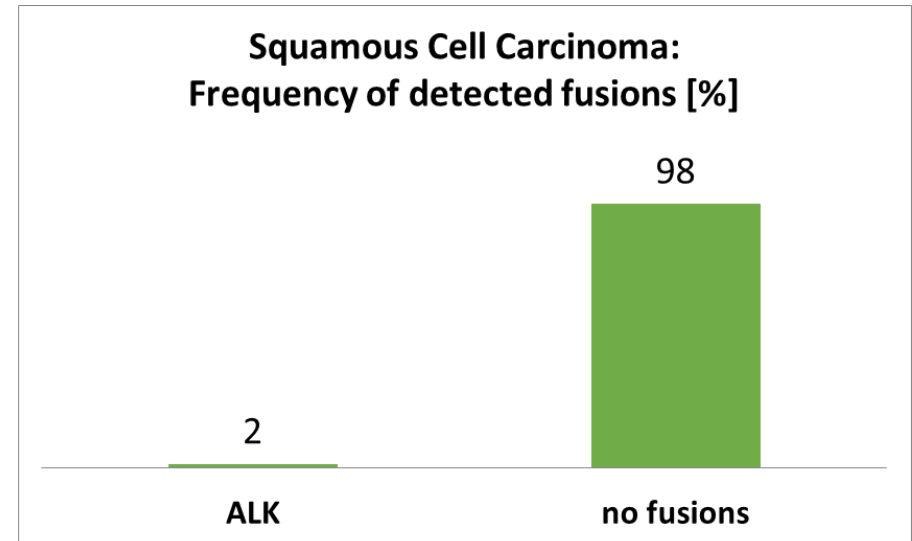
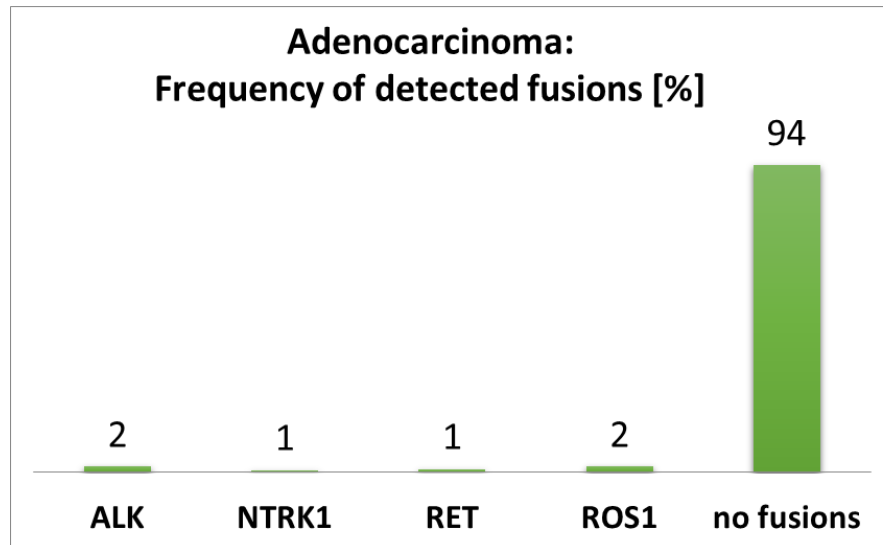
The list of markers is revised annually at the meetings of the Task Force.

SIP: Somatic DNA Alterations (nNGM 2020)





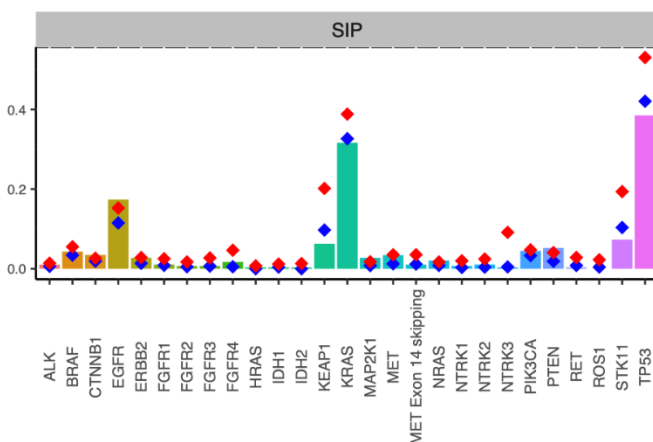
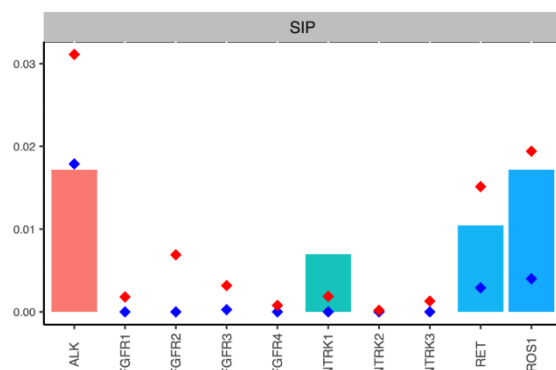
SIP: RNA Fusions (nNGM 2020)



Gene Alterations SIP vs. other nNGM sites (2020)

ADCA

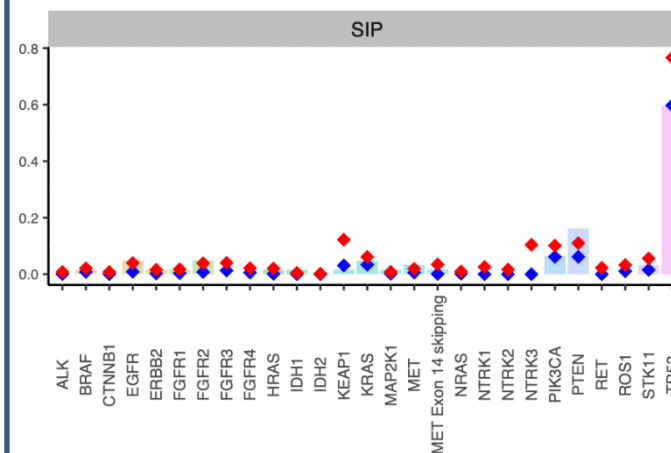
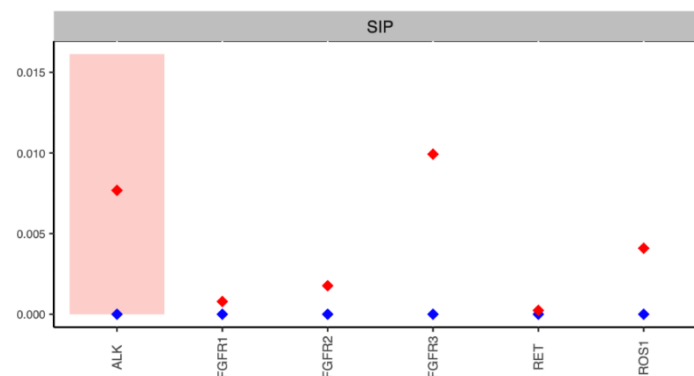
Outlier



KEAP1 low
KRAS low
TP53 low

PECA

Outlier



KEAP1 low
TP53 low



Muripedia Database

Task Force 3: Standardized Reporting



Gen wählen
EGFR

Volltextsuche

PDF

ZWEI (oder mehr) therapeutisch relevante Varianten.

Wann immer in einem Befund zwei Varianten vorliegen, die beide eine potentiell klinische Konsequenz haben (erkennbar an der ausführlichen klinischen Information mit „Klinischen Studien“, „Off-Label“, „Zulassungen“), fügen Sie dem pathologischen Befund bitte KEINEN der beiden Textbausteine hinzu. Stattdessen fügen Sie bitte DIESEN Textbaustein ein.

Liste Details Details Raw

Subject EGFR - p.T790M letzte Änderung 18.05.2020 12:39

ID 2779 Gen EGFR Version 2779.9

Literaturauswertung

In den AURA-Studien (zuletzt Phase-III AURA3) wurde der Nutzen des Drittgenerations-TKI Osimertinib nach initialer EGFR-Therapie bei unter Therapie erworbener T790M-Mutation nachgewiesen [2-4] (nNGM Evidenzgrad m1A). Ebenso zeigte sich eine im Vgl. zu einer platinbasierten Kombinations-Chemotherapie deutlich höhere Ansprechrate von ZNS-Metastasen bei gleichzeitig besserer Verträglichkeit. Gelegentlich (1-2%) kommt es zum Nachweis einer T790M-Mutation bei der Primärdiagnostik EGFR-naiver Patient*innen, was mit einer Resistenz gegen Erst- und Zweitgenerations TKI verbunden ist. Diese treten in der Regel in Kombination mit L858R oder Exon 19 Deletionen auf. Auch hier zeigt sich ein gutes Ansprechen unter Osimertinib [5, 6] (nNGM Evidenzgrad m1B/C).

Copy

Klinische Information

Molekularpathologische Wertung

Es handelt sich um die häufigste Resistenzmutation unter Therapie mit Erst- und Zweitgenerations-TKI. Alle Patient*innen mit EGFR-positivem NSCLC erwerben im Verlauf unter TKI-Therapie eine Resistenz gegenüber dem eingesetzten EGFR. In über der Hälfte der Fälle findet sich bei Progress nach Einsatz von Erst- und Zweitgenerations EGFRi eine T790M-Resistenzmutation [1]. Gelegentlich (1-2%) kommt es zum Nachweis einer T790M-Mutation bei der Primärdiagnostik EGFR-naiver Patient*innen, was mit einer Resistenz gegen Erst- und Zweitgenerations TKI verbunden ist. Diese treten in der Regel in Kombination mit L858R oder Exon 19 Deletionen auf.

Klinische Studien

In der Resistenzsituation nach Erstlinien-TKI ist eine Therapie im Rahmen der Studie CEGF816V2102 (Köln und Essen) möglich: Studienpatienten erhalten zunächst eine Monotherapie mit dem Drittgenerationsinhibitor EGF816 (vergleichbar zu Osimertinib). Nach etwa 4 Monaten erfolgt eine Rebiopsie mit Untersuchung möglicher Resistenzmechanismen, an die sich mehrere rational ausgewählte Kombinationsbehandlungen auf Basis von EGF816 anschließen. Das Ziel der Studie ist, durch diesen Ansatz die Zeit der Krankheitskontrolle mit zielgerichteter Therapie zu verlängern.

Es sind u.U. weitere Studienoptionen möglich. Wir bieten mit den molekularpathologischen Ergebnissen einer Rebiopsie oder Liquid Biopsy eine Vorstellung im molekularen Tumorboard an.

Zulassungen zielgerichtete Substanzen / Immuntherapie

Osimertinib

Off Label Optionen

Es ergeben sich keine Indikationen für den Einsatz einer Off-Label-Therapie.

Zusammenfassung

Bei Nachweis einer T790M-Resistenzmutation ist unter den zugelassenen EGFR-TKI einzig Osimertinib wirksam und unabhängig von der Therapielinie zugelassen.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2246> (1) [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30508-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30508-3) (2) <https://doi.org/10.1002/cncr.31891> (3) <https://doi.org/10.1056/NEJMc1703339> (4) <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.03.005> (5) <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.09.1963> (6)
nNGM-Information (Stand 18.05.2020)

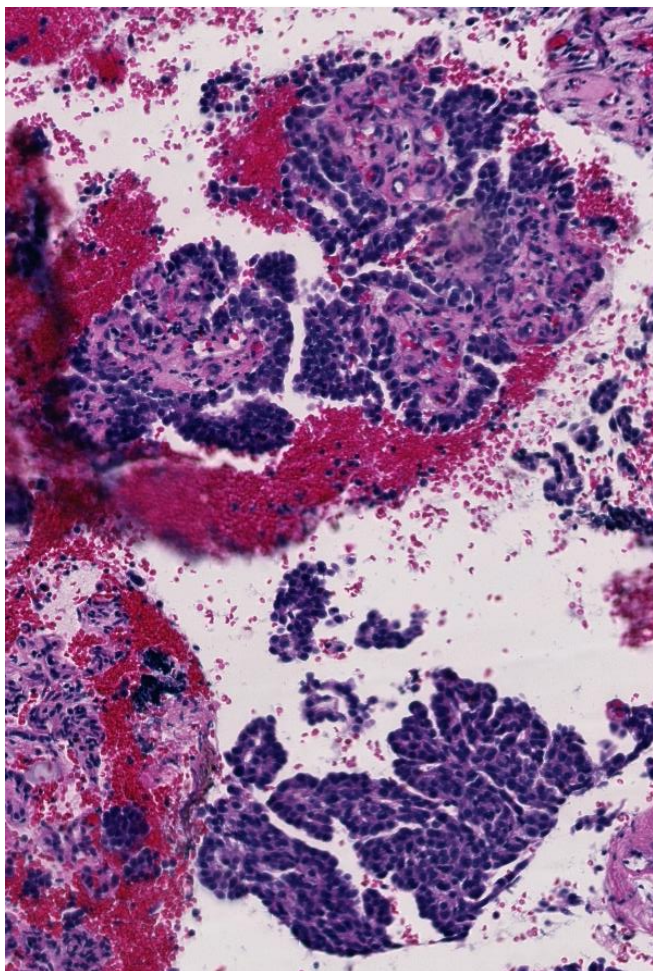
Bitte beachten Sie, dass die Übernahme der Behandlungskosten bei einer Behandlung außerhalb der Zulassung (Off-Label) bei der Krankenkasse beantragt werden muss. Wir unterstützen Ihren Kostenübernahmeantrag gerne durch ein Gutachten unseres molekularen Tumorboards und stehen Ihnen für Fragen jederzeit zur Verfügung.

Im Falle eines Progresses sollte grundsätzlich die erneute molekularpathologische Analyse einer Rebiopsie erwogen werden.

Die klinischen Informationen werden in interdisziplinärer Zusammenarbeit der Netzwerkzentren des nationalen Netzwerk Genomische Medizin (nNGM) erarbeitet und konsentiert und orientieren sich an den aktuellen Leitlinien und der aktuellen Studienlage.

Christian Brandts
Sonja Loges
Martin Wermke

Example Report: *RET*-Fusion Positive ADCA of the Lung



Next-Generation Sequencing (DNA nNGM2.0, RNA ARCHER FusionPlex Lung):

1. Mutation:

-> Kein Nachweis einer Mutation, bei ausreichender DNA-Sequenzierqualität.

2. Amplifikation:

-> Kein Nachweis einer Amplifikation, bei ausreichender DNA-Sequenzierqualität.

3. Fusion/Translokation:

-> Nachweis einer Fusion der Gene *KIF5B* und *RET*, Locus: chr10:32311776,chr10:43612032, Read Counts: 9864, Variant ID: 6940 (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology).

C. Biologische Bewertung

-> *RET* ist ein Protoonkogen und kodiert eine Rezeptor-Thyrosinkinase (PMID: 24561444), die normalerweise in der Embryonalentwicklung exprimiert wird und für die Entwicklung von neuronale und neuroendokrinen Zellen verantwortlich ist (PMID: 8306871). Mutationen in diesem Gen, die zu einer andauernden Enzymaktivität führen, sind mit einer Reihe von Tumoren assoziiert. *KIF5B* (Kinesin-1 heavy chain) kodiert ein Mikrotubull-abhängiges Motorprotein, welches beteiligt ist an der Regulation von Zentrosomen und der Kernposition während des Eintritts in die Mitose (PMID: 20386726). Die vorliegende *KIF5B-RET* Fusion ist als onkogen bekannt (OncoKB). Ca. 1,36 % der Patienten mit Lungenkrebs weisen eine *KIF5B-RET* Fusion auf (PMID: 31269444). Derzeit laufen vielversprechende klinische Studien mit *RET*-Inhibitoren bei Patienten mit NSCLC und *RET*-Fusion: BLU-667-1101 (ARROW), Phase 1/2-Studie, BLU-667 (=Pralsetinib, spez. *RET*-Inhibitor), Einschluss: alle Linien, Studienzentren: Essen, München, Heidelberg, Oldenburg. LOXO-RET-17001, Phase 1/2-Studie, LOXO-292 (Selpercatinib = spez. *RET*-Inhibitor), Einschluss: nach Standardtherapie, Standorte: Köln, Würzburg. Sofern Zugang zu einer der genannten Studien mit einem neuen spezifischen *RET*-Inhibitor besteht, sollte eine Studienteilnahme aufgrund der vielversprechenden vorläufigen Daten unabhängig von der Therapielinie dringend erwogen werden. Darüber hinaus existieren für fortgeschrittene Therapielinien Compassionate Use Programme für Loxo-292 (Selpercatinib) und Blu-677 (Pralsetinib). Quelle: *Muripedia*

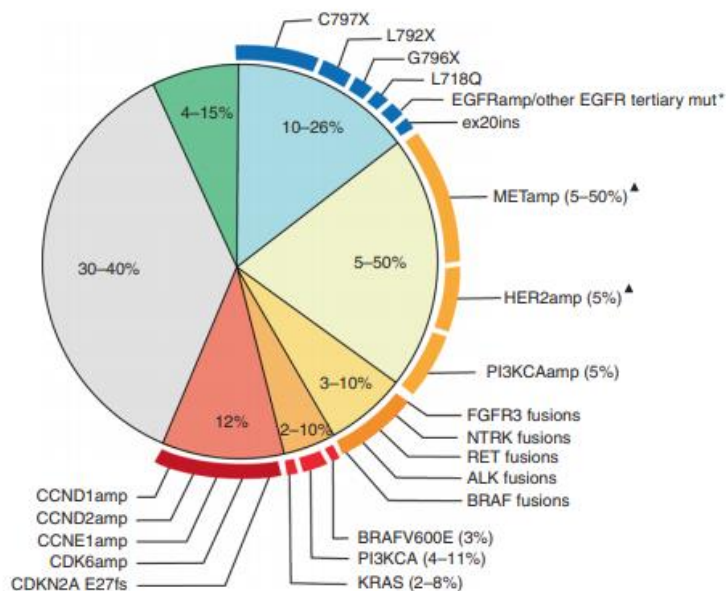
Outline: Algorithms for using panels of different sizes for different cancer types

- Potential Use of NGS in a Molecular Pathology Lab
- Molecular Profiling
- **Resistance Testing**
- Clinical Research in Molecular Pathology Lab in Frankfurt



Resistance mechanisms reported for osimertinib

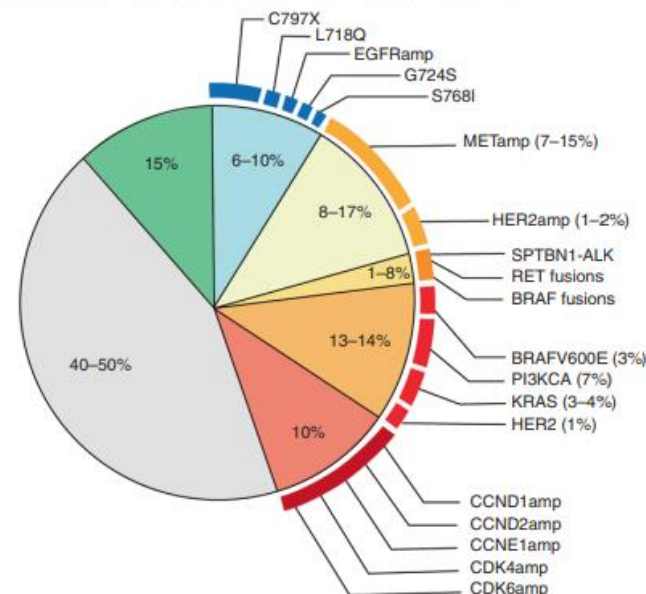
Resistance mechanisms to second-line osimertinib



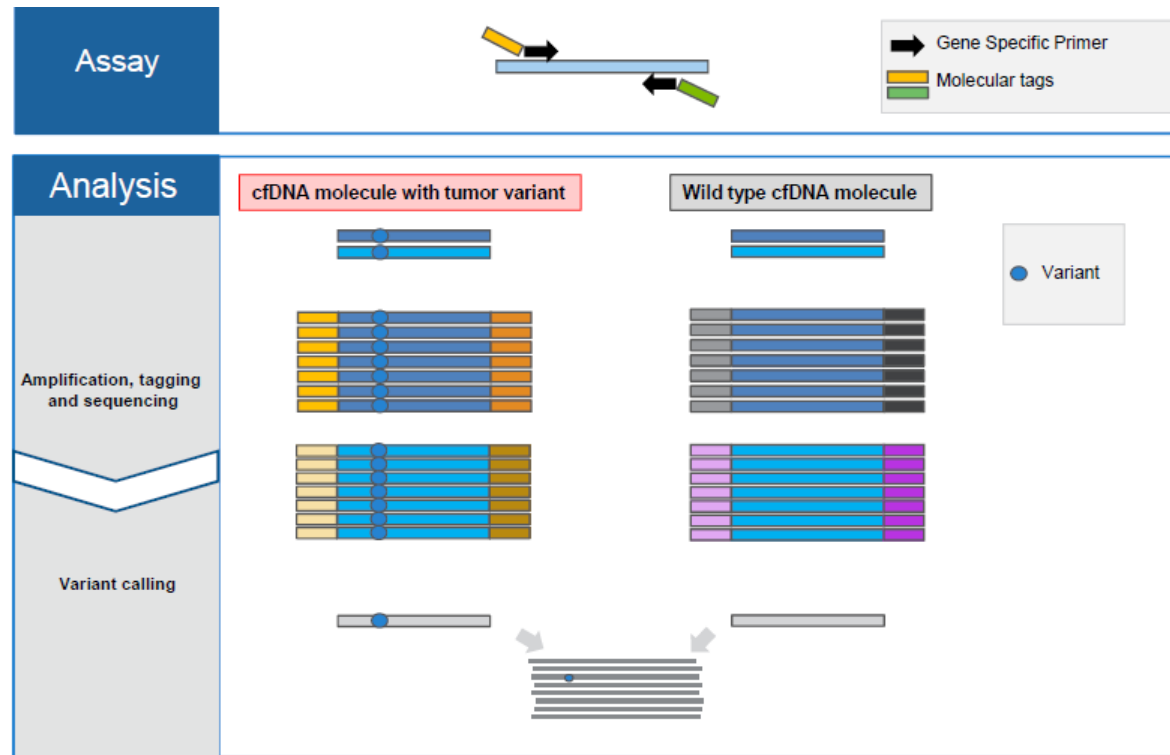
* Other EGFR tertiary mutations include G719X, G724S AND S768I

▲ Mutations have also been reported

Resistance mechanisms to first-line osimertinib



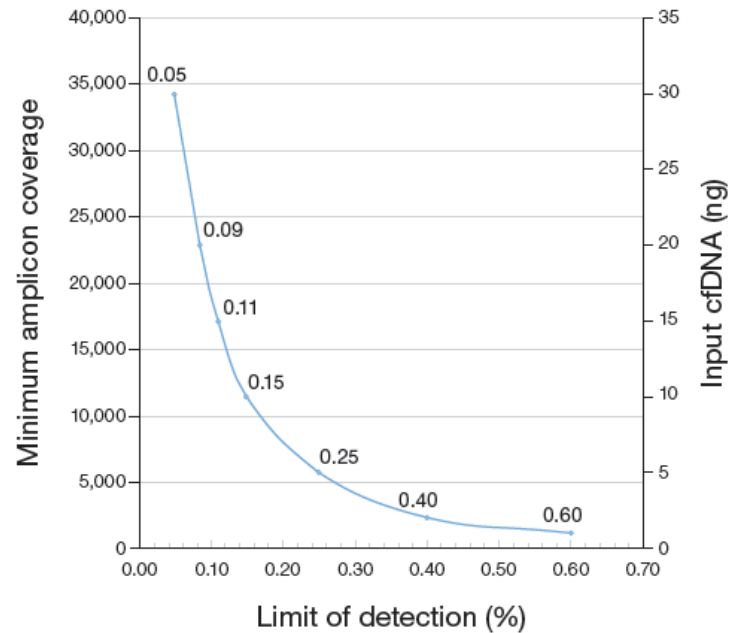
Core Technology: Molecular Barcoding



Molekulares Barcoding / Sensitivität erfordern eine hohe Sequenziertiefe, machen aber die Analyse teuer

Limit of Detection

0.1% LoD
= detecting 1 variant
allele in the background
of 1000 WT



1 ng cfDNA–0.6% LOD
5 ng cfDNA–0.25% LOD
10 ng cfDNA–0.15% LOD
20 ng cfDNA–0.1% LOD
30 ng cfDNA–0.05% LOD

20 ml blood sample in a suitable blood tube (e.g. 2 Stretch tubes from Becton Dickinson), which we will be happy to provide

Turn-Around-Times (DNA & RNA NGS)

2021

90% of NGS reports finished after 10 days

2020

90% of NGS reports finished after 26 days

2019

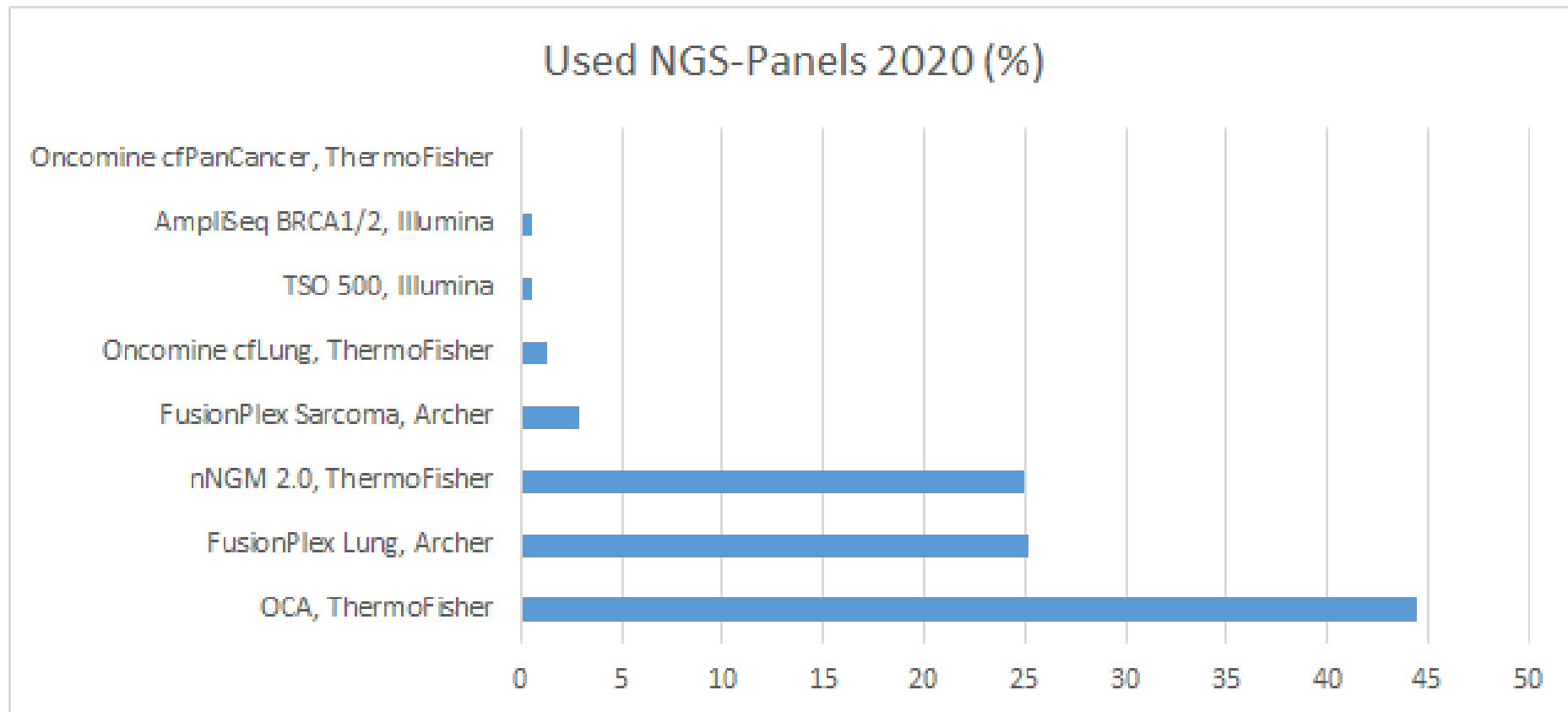
90% of NGS reports finished after 33 days

Outline: Algorithms for using panels of different sizes for different cancer types

- Potential Use of NGS in a Molecular Pathology Lab
- Molecular Profiling
- Resistance Testing
- **Clinical Research in Molecular Pathology Lab in Frankfurt**



SIP: Used NGS Panels 2020



Thermo Fisher Genexus System in Frankfurt



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



Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures.

- Short turnaround time (14 hours for a single lane run, 32 samples per run)
- Automated sample purification, library prep, sequencing, and analysis reporting
- E.g. Oncomine Comprehensive Assay v3 Panel

Summary

- The selection of panels of different sizes depends on the timing of testing during the disease as well as on the EMA approval.
- Other influencing factors are the possibility of automation of the workflow and the DNA and RNA quality / quantity of the sample.
- Comprehensive genomic profiling (CGP) using WES / RNA-seq or very large gene panels (including TMB, HRD, MSI) is the future, although not possible in every situation.

Thank you very much for your attention!



DR. SENCKENBERGISCHES
INSTITUT FÜR PATHOLOGIE



Wildlab

