

**PCR Digital: aplicació de tècniques ultrasensibles
per la millora de selecció de pacients amb càncer
colorrectal metastàtic a teràpies anti-EGFR**

Daniel Azuara, PhD

17 Maig 2016

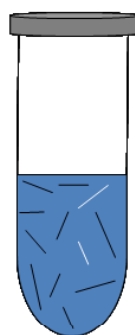
Grup de Biomarcadors en Càncer Gastrointestinal
Laboratori Recerca Translacional
Institut Català d'Oncologia (ICO-IDIBELL)

Seminaris Tecnològics a la Facultat de Farmàcia 2016

For what use is a Digital PCR ??



a) Conventional PCR



— Wild type
— mutant

Split sample
by dilution →

b) Digital PCR



— Wild type
— mutant

The principle of digital PCR

- a) Conventional PCR: The sample contains a heterogeneous mixture of DNA molecules where the target molecule (e.g. DNA mutation) is present at very low levels relative to a large background of normal DNA. Therefore, an average signal is acquired.
- b) Digital PCR: The sample is split into many fractions by dilution (approximately 1 copy of DNA or less per fraction) prior to PCR, thereby, enriching minority targets within individual reactions

Technologies for molecular analysis



	<u>Sensitivity</u>
Next generation sequencig	2%
Quantitative PCR	1%
BEAMing, TamSeq	0.01-0.02%
Droplet digital PCR	0.005%

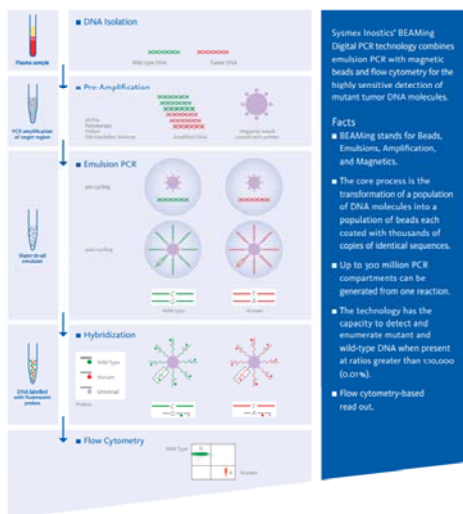
Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de sel.lecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

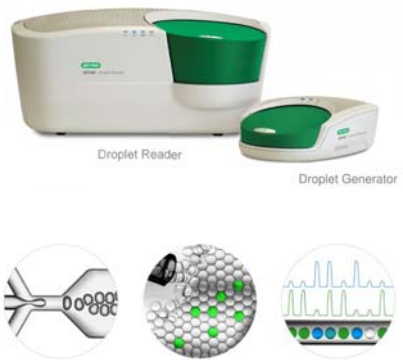
Mètodes PCR Digital



BEAMing Sysmex Inostics



Droplet Digital™ PCR (ddPCR™)



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de sel.lecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

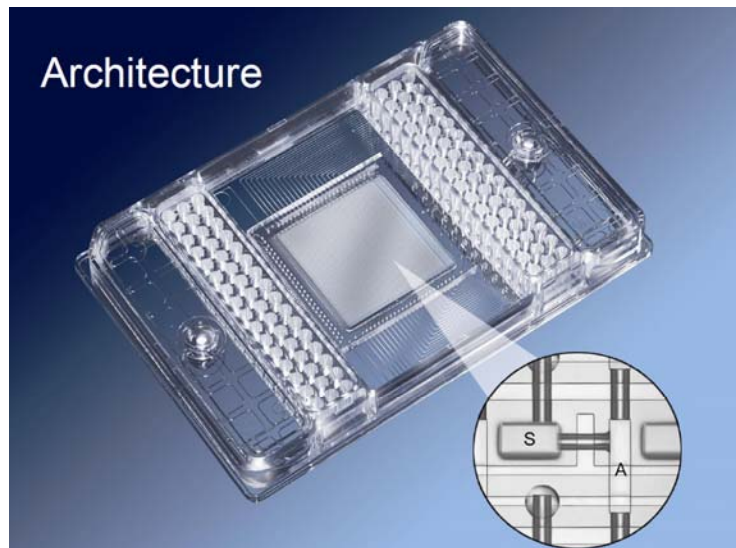
Plataforma BIOMARK



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Nanofluidic Arrays



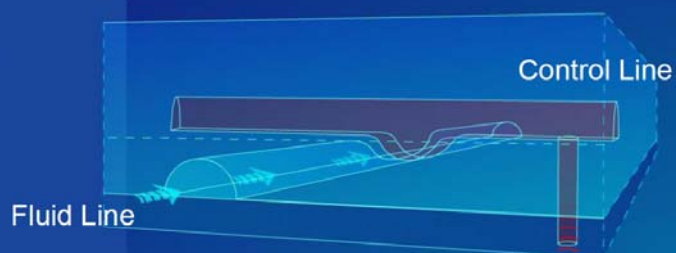
Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

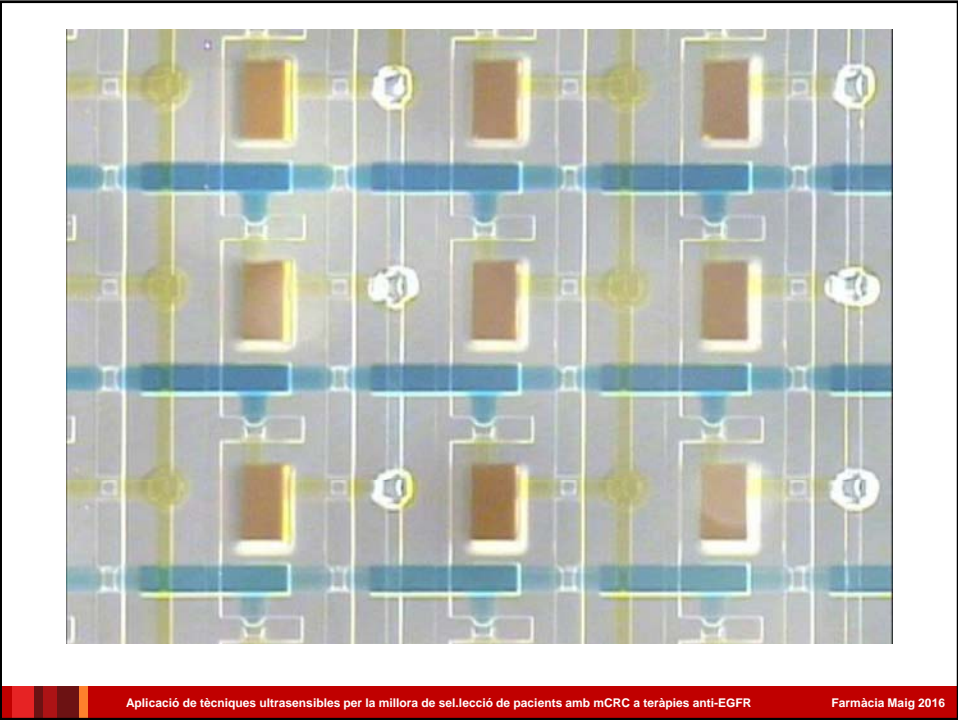
Farmàcia Maig 2016

Open Nanoflex Valve

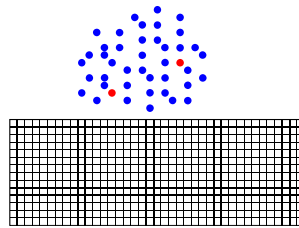
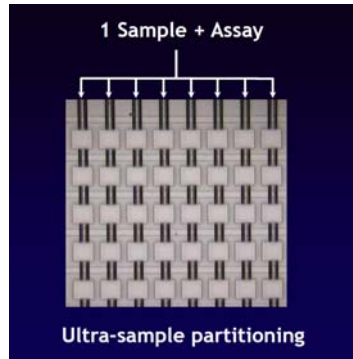


Closed Nanoflex Valve





PCR Digital

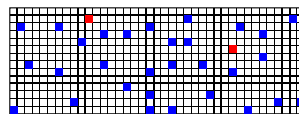
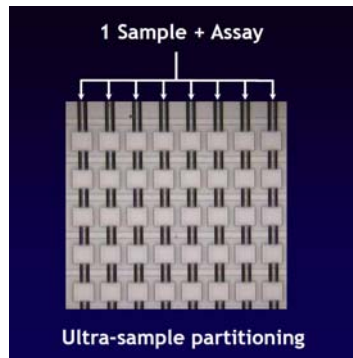


770 nanowells: rtPCR in each nanowell

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

PCR Digital

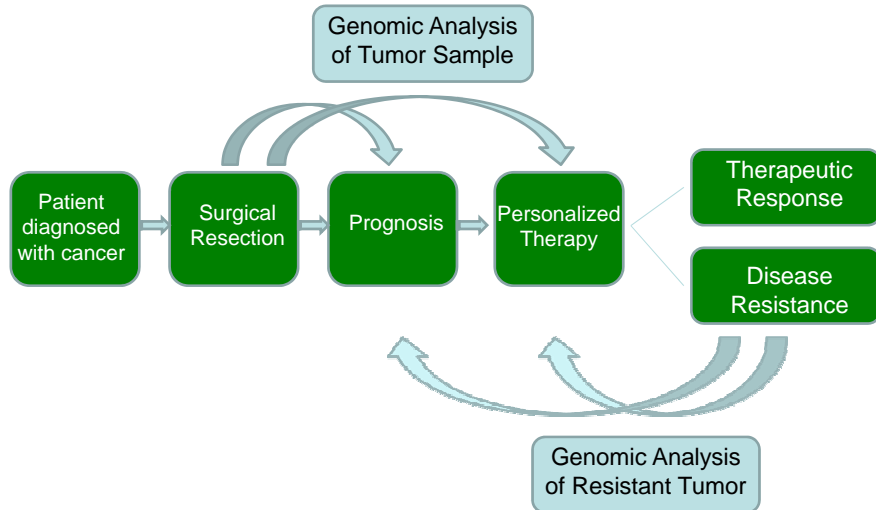


770 nanowells: rtPCR in each nanowell

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Precision medicine in oncology



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Tumor genotyping



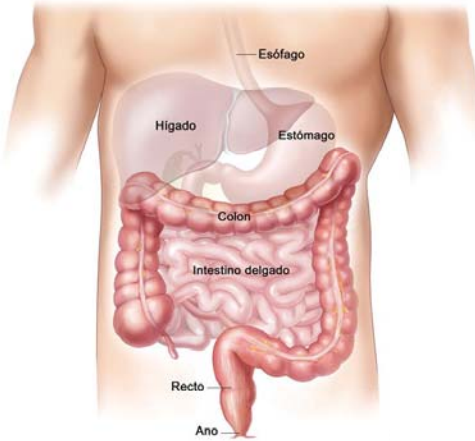
Tumor tissue is the sample of primary interest for genomic analyses. However, some issues:

- Sample quality
- Sample accessibility
- Safety (e.g. Lung)
- Availability (e.g. prostate tissue)
- Painful / invasive procedures (e.g. Bone metastases in prostate cancer)
- Not always feasible to re-biopsy patients to monitor tumor status
- Archival biopsy may not reflect current status of tumor

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Càncer Colorectal



Lung

Colorectal

Prostate

Stomach

Bladder

Pancreas

Breast

Colorrectal

Stomach

Lung

Pancreas

Uterus

El càncer colorectal és un problema sanitari important

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Factors de Risc CCR



Familial Adenomatous Polyposis

Hereditary Non Poliposis Colon Cancer

Family history of Colo Rectal Carcinoma

Previous CA: Colorectal, Ovarian, Endometrial, Breast

Age > 50

Inflammatory Bowel Disease (UC > CD)

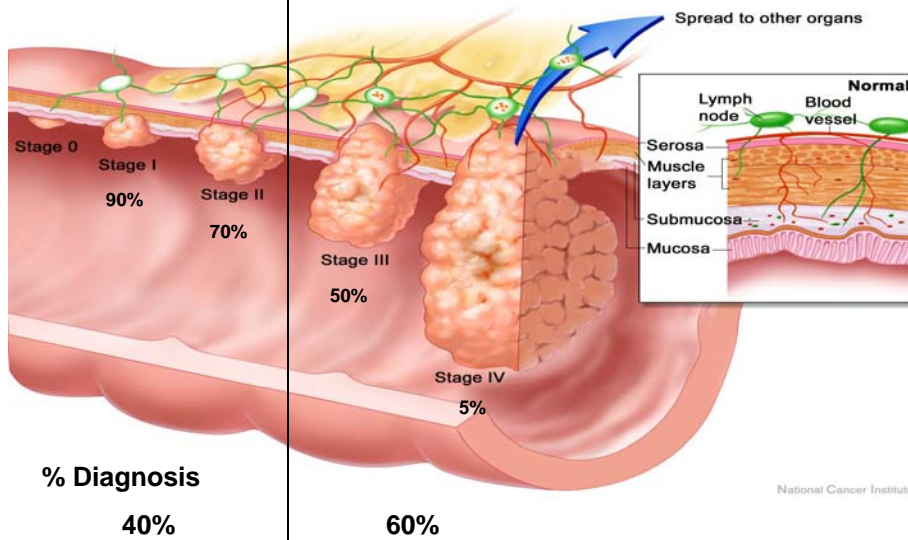
Poor Diet (increased fat, red meat, decreased fibre)

Smoking

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

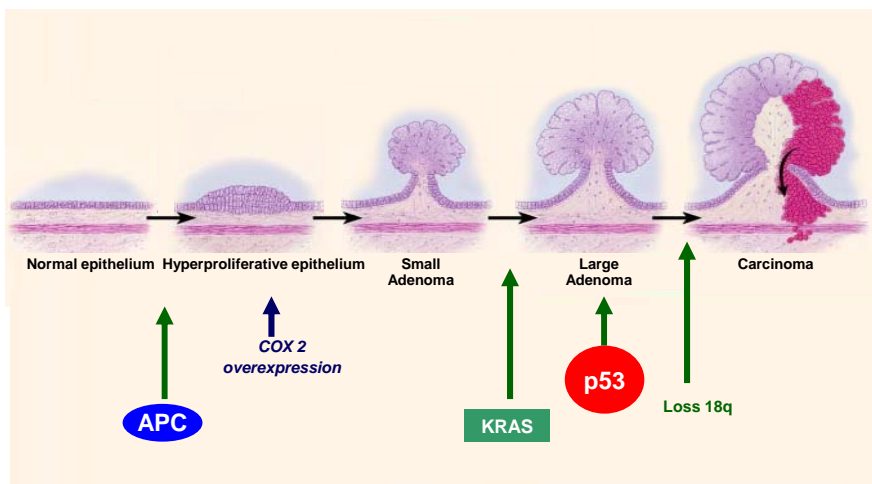
Carcinogènesi colorectal



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Molecular understanding of CRC

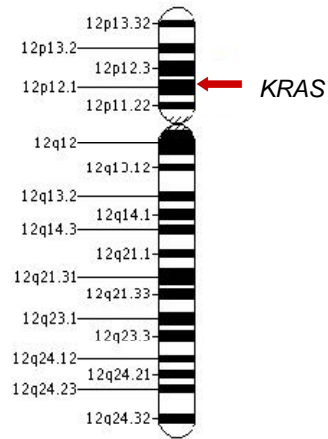


Stepwise accumulation of genetic and epigenetic events leading to adenoma and carcinoma

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

KRAS location



Chromosome 12

TaqMan probes design



EXON 2 KRAS

```
GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGT  
GCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAG
```

TaqMan probes design



EXON 2 KRAS

GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGT
GCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTCTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAG

TaqMan probes design



EXON 2 KRAS

GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGC AAGAG
TGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTCTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAG

WT TTGGAGCTGGTGGCGTA

WT TTGGAGCTGGTGGCGTA

WT TTGGAGCTGGTGGCGTA

MUT TTGGAGCTGTGGCGTA

MUT TTGGAGCTTTGGCGTA

MUT TTGGAGCTGATGGCGTA

G12C

G12V

G12D

WT TTGGAGCTGGTGGCGTA

WT TTGGAGCTGGTGGCGTA

WT TTGGAGCTGGTGGCGTA

MUT TTGGAGCTGCTGGCGTA

MUT TAGTTGGAGCTAGTGGCGTA

MUT TTGGAGCTCGTGGCGTA

G12A

G12S

G12R

Cell lines with known mutations in *KRAS*



Wild type: GGT CONTROL **NP18**

mutation: change GGT to TGT (Gly to **Cys** (G12C)) CONTROL **MIA PaCa-2**

mutation: change GGT to GTT (Gly to **Val** (G12V)): CONTROL **SW480**

mutation: change GGT to GAT (Gly to **Asp** (G12D)): CONTROL **NP9**

mutation: change GGT to GCT (Gly to **Ala** (G12A)): CONTROL **SW1116**

mutation: change GGT to CGT (Gly to **Arg** (G12R)): CONTROL **CAL62**

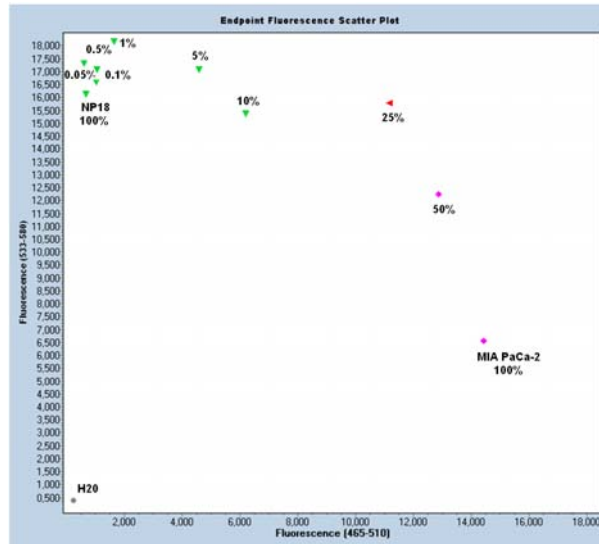
mutation: change GGT to AGT (Gly to **Ser** (G12S)): CONTROL **A549**

Reconstitution experiment



	mut	wt
1	50%	50%
2	25%	75%
3	10%	90%
4	5%	95%
5	1%	99%
6	0.5%	95.5%
7	0.1%	99.9%
8	0.05%	99.95%

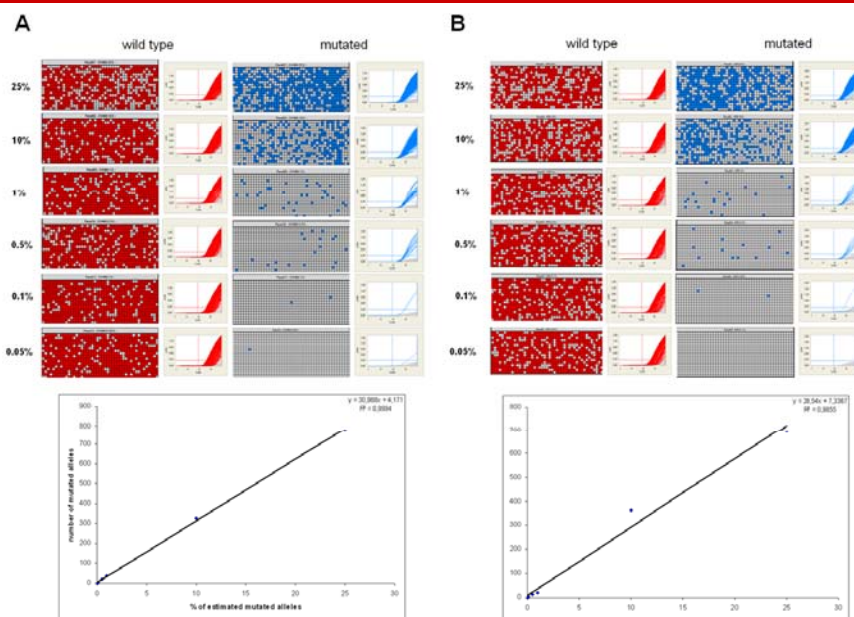
Analytical sensitivity of conventional real-time PCR analysis (G12C)



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

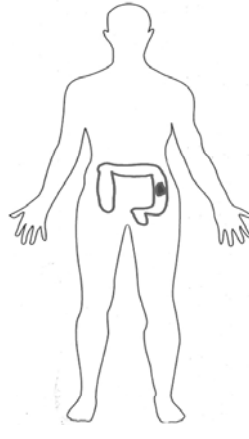
Analytical sensitivity of nanofluidic dPCR for the detection of G12V and G12D KRAS mutations



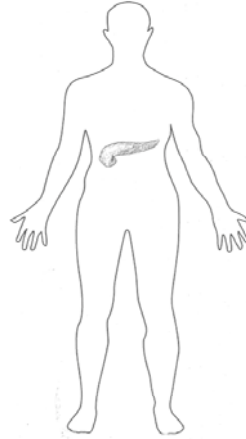
Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Pacients



Controls (N=5)
Adenomes (N=17)
Carcinomes (N=27)

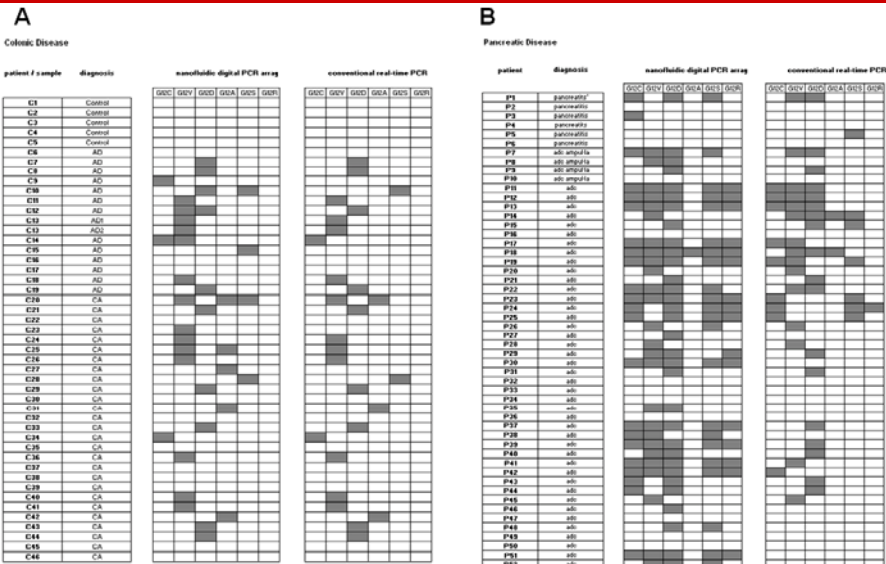


Pancreatic Carcinoma (N=46)
Chronic Pancreatitis (N=6)

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

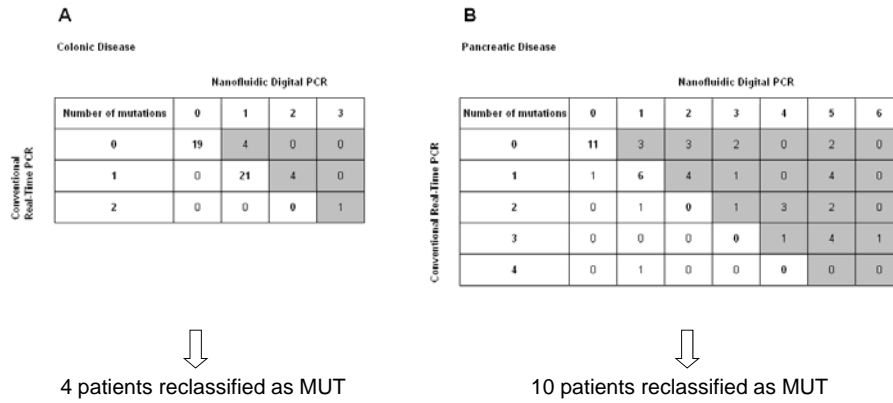
KRAS mutation detection using the nanofluidic digital PCR array vs conventional real-time PCR in colonic (A) and pancreatic (B) disease



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

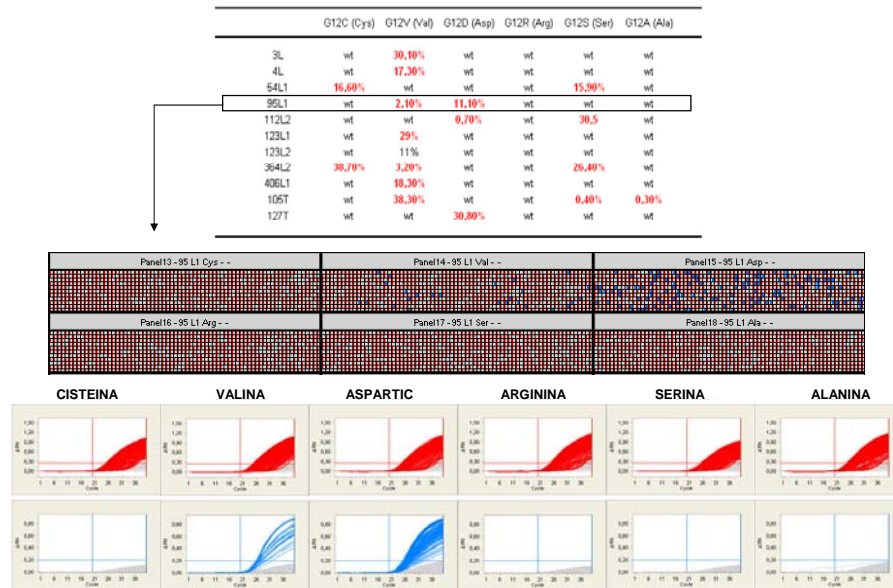
Correlation in *KRAS* mutation detection using the nanofluidic digital PCR array vs conventional real-time PCR in colonic (A) and pancreatic (B) disease



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

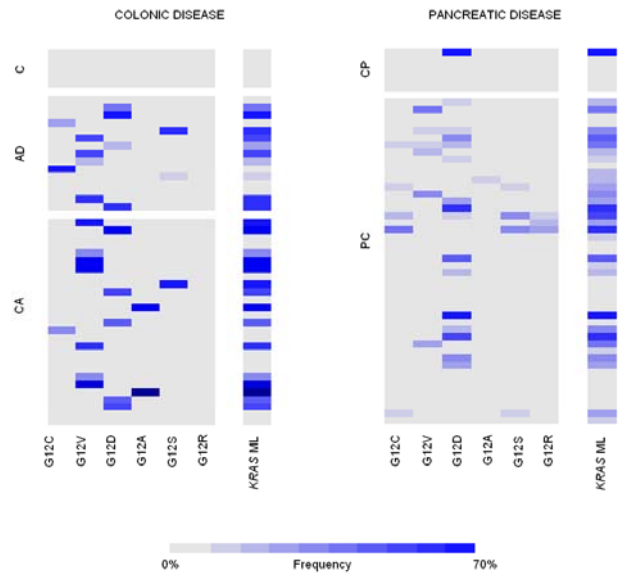
Multiple mutations and quantification



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Quantification of *KRAS* mutations using nanofluidic Digital PCR array



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Correlation of *KRAS* mutational status between pancreatic juice and tumor tissue samples



Patient	Sample	G12C	G12V	G12D	G12A	G12S	G12R
P12	pancreatic juice	2.3	3.8	19.2	0	3.1	1.3
	tumor	2.1	0	0	0	33.8	28.2
P14	pancreatic juice	0	8.8	0	0	0	0
	tumor	0	19.9	0	0	0	0
P15	pancreatic juice	0	0	4.5	0	0	0
	tumor	0	0	5.5	0	0	0
P17	pancreatic juice	2.2	3.6	7.8	0	1.5	2.1
	tumor	0	8.2	8.8	0	0	0
P19	pancreatic juice	4	3.3	7.3	0	6.4	3.8
	tumor	0	0	8.33	0	0	0
P27	pancreatic juice	0	0	6.41	0	0	0
	tumor	0	0	4.3	0	0	0
P28	pancreatic juice	0	1.2	0	0	0	0
	tumor	0	8.8	0	0	0	0
P29	pancreatic juice	0	8.8	74.3	0	0	6.3
	tumor	0	0	18.5	0	0	0
P38	pancreatic juice	4.8	6.4	1.8	0	1.8	6.8
	tumor	0	0	27.2	0	0	0
P31	pancreatic juice	0	0	8.3	0	0	0
	tumor	0	0	14.5	0	0	0

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Digital PCR provides a robust, quantitative measure of the proportion of *KRAS* mutant alleles in routinely obtained samples. It also allows a better classification of tumors, with potential clinical relevance

Clinical Chemistry 58:9
1332–1341 (2012)

Molecular Diagnostics and Genetics

Nanofluidic Digital PCR for *KRAS* Mutation Detection and Quantification in Gastrointestinal Cancer

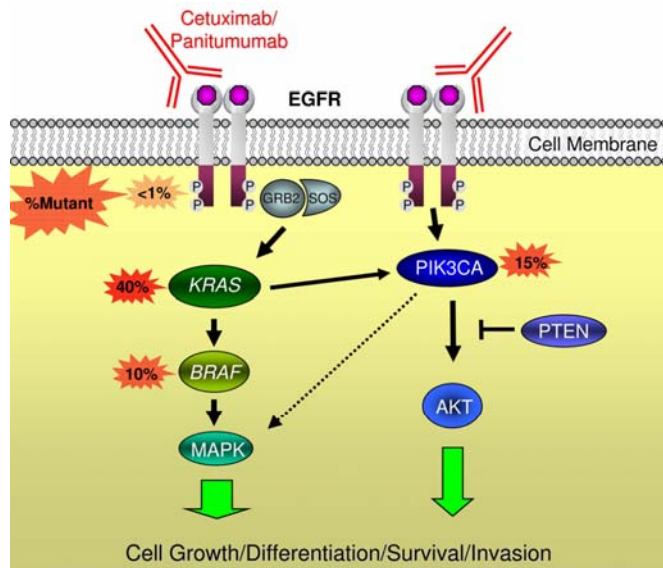
Daniel Azuara,^{1*} Mireia M. Ginesta,^{1*} Mireia Gausachs,¹ Francisco Rodriguez-Moranta,² Joan Fabregat,³ Juli Busquets,³ Nuria Pelaez,³ Jaume Boadas,⁴ Sara Galter,⁴ Victor Moreno,⁵ Jose Costa,⁶ Javier de Oca,⁷ and Gabriel Capella^{1*}

How to apply this knowledge to a clinical benefit?



Concomitant detection of mutations in downstream signalling molecules of the *EGFR* pathway (*KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* and *NRAS*) has been suggested to improve the selection of candidate metastatic colorectal cancer (mCRC) patients that will respond to anti-*EGFR* therapy

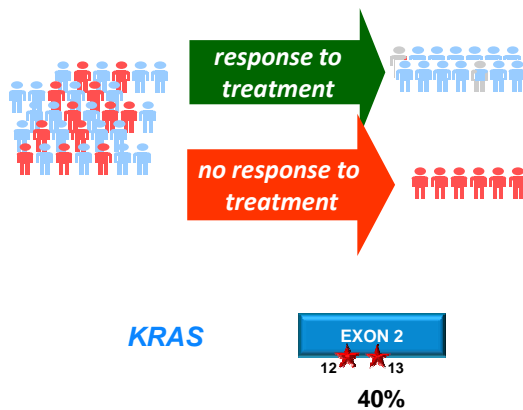
Anti-EGFR Therapy



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

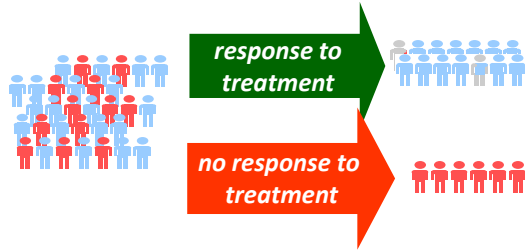
Mutations in *KRAS* and *NRAS* used in daily clinical practice



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Mutations in *KRAS* and *NRAS* used in daily clinical practice



KRAS



40%



4%



6%

NRAS



3%



4%

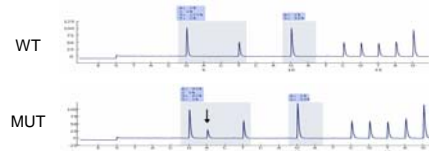
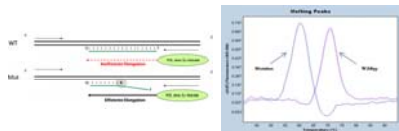


1%

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Mutations in *KRAS* and *NRAS* used in daily clinical practice

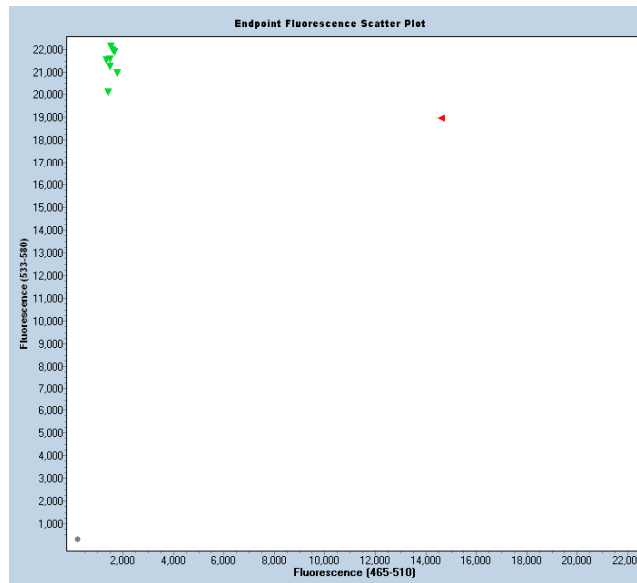


Sensitivity ~ 5%

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

LightCycler genotyping



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Common mutations detected by Cobas® Mutation Test and LightMix® Kit



cobas® Mutation Test	CODONS	MUTATIONS
KRAS	12, 13, 61	G12A, G12D, G12S, G12V, G12R, G12C, G13D Q61L, Q61P, Q61E, Q61R, Q61K, Q61H
BRAF	600 (exon 15)	V600E
PI3KCA	exon 1 exon 4 exon 7 exon 9 exon 20	R88Q N345K C420R E542K, E545A, E545D, E545G, E545K, Q546E, Q546K, Q546L, Q546R M1043I, H1047L, H1047R, H1047Y, G1049R
LightMix® Kit		
NRAS 12-13, 59-61, 117 146	12,13 59,60,61 117 146	G12A, G12D, G12S, G12V, G12R, G12C, G12N, G12P, G12Y G13S, G13R, G13C, G13N, G13Y, G13D, G13A, G13V A59T, A59D, G60R, G60E, Q61K, Q61E, Q61R, Q61L, Q61P, Q61H K117N A146T
KRAS 117, 146	117 146	K117E, K117N, K117N A146T, A146P, A146G, A146V

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Common mutations detected by Therascreen Pyro and Therascreen



THERASCREEN PYRO KIT	CODONS	MUTATIONS
KRAS	12, 13, 61	G12A, G12D, G12S, G12V, G12R, G12C, G13D Q61L, Q61P, Q61E, Q61R, Q61K, Q61H
NRAS	12, 13, 61	G12D, G12S, G12C, G12V, G12A, G12R G13D, G13R, G13V, G13C, G13A, G13S Q61L, Q61P, Q61E, Q61R, Q61K, Q61H
RAS EXTENSION		
KRAS	59, 117, 146	T58I, T58T, T58T, A59T, A59S, A59G, A59E, A59L, A59A, A59A, A59A K117E, K117N, C118S, A146T, A146P, A146V, A146G, A146A, A146A, A146A, K147N
NRAS	59, 117, 146	T58A, T58P, T58S, T58I, T58T, A59T, A59P, A59G, A59D, A59V, A59A K117N A146T, A146P, A146S, A146V, A146G
BRAF	600 (exon 15) 464-469 (exon 11)	V600E, V600G, V600A, V600M, V600E, V600D, V600K, V600R G469E, G469A, G469V, G469S G466E, G466V G464E, G464V
PI3KCA	exon 20 Not Available by PYRO exon 9	H1047R E542K, E545D, E545K

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

ICORAS Panel – LightCycler and Fluidigm



	EXON	CODON	CHANGE	PROT
KRAS	2	12	35G>C	G12A
			34G>T	G12C
			35G>A	G12D
			34G>C	G12R
			34G>A	G12S
			35G>T	G12V
	2	13	38G>A	G13D
			3	58
	176 C>G	A59G		
	175 G>A	A59T		
	61	183A>C		Q61H
		182 A>T		Q61L
	182 A>G	Q61R		
	4	117	181 C>A	Q61K
			351 A>C	K117N
		351 A>T	K117N	
		146	436G>A	A146T
	437 C>T		A146V	
436 G>C	A146P			

38 mutations (RAS+BRAF+PI3KCA)

	EXON	CODON	CHANGE	PROT		
BRAF	15	600	1799T>A	V600E		
	20	1043	3129G>T	M1043I		
PI3KCA			1047	3140A>G	H1047R	
				3140A>T	H1047L	
	3139C>T	H1047Y				
NRAS	2	12	35 G>C	G12A		
			34 G>T	G12C		
			35 G>T	G12V		
			35 G>A	G12D		
			3	13	37 G>C	G13R
					59	175 G>A
	61	181C>A				Q61K
		182A>G				Q61R
	4	117			183 A>T	Q61H
					182 A>T	Q61L
			146	351 A>C	K117N	
				436G>A	A146T	
437 C>T				A146V		
436 G>C			A146P			

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Nanofluidic Digital PCR: The Biomark platform

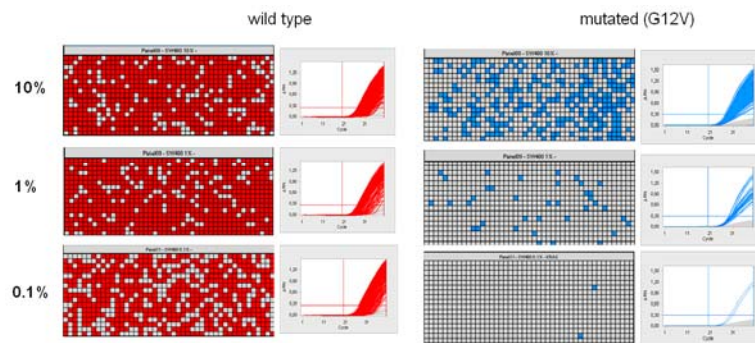


Clinical Chemistry 58:9
1332-1341 (2012)

Molecular Diagnostics and Genetics

Nanofluidic Digital PCR for *KRAS* Mutation Detection and Quantification in Gastrointestinal Cancer

Daniel Azuara,^{1†} Mireia M. Ginesta,^{1†} Mireia Gausachs,¹ Francisco Rodriguez-Moranta,² Joan Fabregat,³ Juli Busquets,³ Nuria Pelaez,³ Jaume Boada,⁴ Sara Galter,⁴ Victor Moreno,⁵ Jose Costa,⁶ Javier de Oca,⁷ and Gabriel Capella^{1*}



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Predictive value of mutations in low frequency detected by ultrasensitive techniques



Which is the clinical significance of low fraction of mutant alleles detected with highly sensitive techniques?

These very low mutant alleles confer resistance to anti-*EGFR* treatment?

What is the optimal threshold with clinical significance?

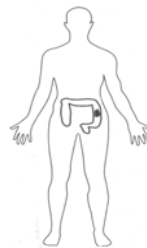
Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016



To evaluate if the added value of extended *RAS* pathway genotyping using a highly sensitive nanofluidic digital PCR may improve the prediction of response to anti-*EGFR* therapy in mCRC

Patients and Methods



102 FFPE metastatic Colorectal Cancer (mCRC) patients treated with anti-*EGFR* therapy both as monotherapy and in combination with chemotherapy



Conventional qPCR LightCycler (Sensitivity 1-10%)



Fluidigm Digital PCR (Sensitivity 0.1%)

Hot-spots



	EXON	CODON	CHANGE	PROT	
KRAS	2	12	35G>C	G12A	
			34G>T	G12C	
			35G>A	G12D	
			34G>C	G12R	
			34G>A	G12S	
			35G>T	G12V	
		2	13	38G>A	G13D
	3	58	173 C>T	T58I	
			176 C>G	A59G	
	59	61	175 G>A	A59T	
			183A>C	Q61H	
	4	117	182 A>T	Q61L	
			182 A>G	Q61R	
			181 C>A	Q61K	
			351 A>C	K117N	
			351 A>T	K117N	
	146		436G>A	A146T	
			437 C>T	A146V	
436 G>C			A146P		

	EXON	CODON	CHANGE	PROT
BRAF	15	600	1799T>A	V600E
	20	1043	3129G>T	M1043I
PIK3CA		1047	3140A>G	H1047R
			3140A>T	H1047L
			3139C>T	H1047Y
NRAS	2	12	35 G>C	G12A
			34 G>T	G12C
			35 G>T	G12V
			35 G>A	G12D
	3	13	37 G>C	G13R
			175 G>A	A59T
	3	59	181C>A	Q61K
			182A>G	Q61R
	61		183 A>T	Q61H
			182 A>T	Q61L
4	117	351 A>C	K117N	
		436G>A	A146T	
		437 C>T	A146V	
		436 G>C	A146P	

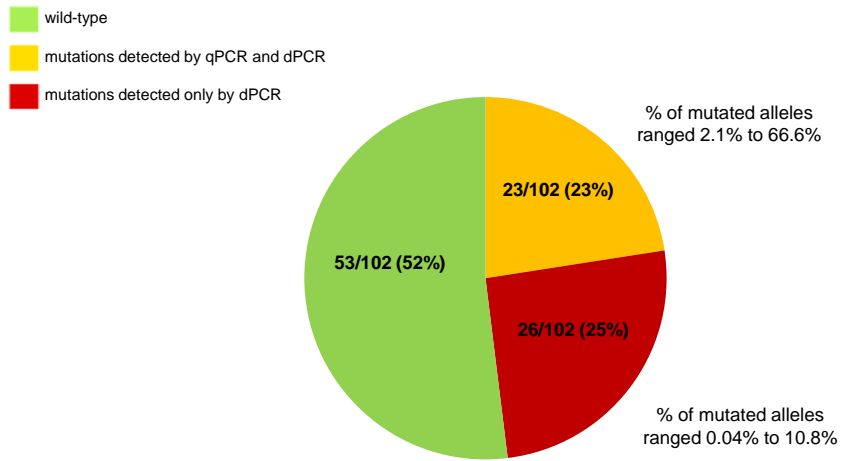
38 mutations (RAS+BRAF+PIK3CA)

Example of analysis - patient mutation status



Patient	Response	conventional qPCR		highly-sensitive digital PCR		
		mutation status	mutation status-main clone	% mutation	minor clones	% mutation
HB 8	PD	KRAS c.35G>A (p.G12D)	KRAS c.35G>A (p.G12D)	7.45	PIK3CA c.3140A>G (p.H1047R)	0.22
HB 10	PD	NRAS c.182A>G (p.Q61R)	NRAS c.182A>G (p.Q61R)	47.05	KRAS c.35G>A (p.G12D)	5.11
HB 16	SD	NRAS c.436G>A (p.A146T)	NRAS c.436G>A (p.A146T)	9.9		
HB 20	PD	KRAS c.436G>A (p.A146T)	KRAS c.436G>A (p.A146T)	15.99		
HB 24	SD	KRAS c.35G>T (p.G12V)	KRAS c.35G>T (p.G12V)	12.88		
HB 26	SD	KRAS c.35G>T (p.G12V)	KRAS c.35G>T (p.G12V)	18.93	NRAS c.35G>A (p.G12D)	0.64
HB 38	PD	KRAS c.35G>A (p.G12D)	KRAS c.35G>A (p.G12D)	21.78		
HVH1	PD	BRAF c.1799T>A (p.V600E)	BRAF c.1799T>A (p.V600E)	57.87	KRAS c.35G>A (p.G12D)	0.81
HVH3	NE	NRAS c.35G>A (p.G12D)	NRAS c.35G>A (p.G12D)	13.73	KRAS c.179G>A (p.A59T)	4.98
					PIK3CA c.3139C>T (p.H1047Y)	3.02
HVH5	NE	NRAS c.436G>A (p.A146T)	NRAS c.436G>A (p.A146T)	2.72		
HVH6	PD	BRAF c.1799T>A (p.V600E)	BRAF c.1799T>A (p.V600E)	55.09		
HVH9	PD	NRAS c.181C>A (p.Q61K)	NRAS c.181C>A (p.Q61K)	66.64		
HVH13	PD	KRAS c.34G>T (p.G12C)	KRAS c.34G>T (p.G12C)	30		
HVH18	PD	BRAF c.1799T>A (p.V600E)	BRAF c.1799T>A (p.V600E)	52.59		
HM3	PR	KRAS 179C>T (p.T58I)	KRAS 179C>T (p.T58I)	2.15	NRAS c.182A>G (p.Q61R)	0.3
HM11	PD	KRAS c.35G>T (p.G12V)	KRAS c.35G>T (p.G12V)	35.84	KRAS 179C>T (p.T58I)	0.1
HM14	PD	BRAF c.1799T>A (p.V600E)	BRAF c.1799T>A (p.V600E)	25.75		
HM16	PD	KRAS c.436G>A (p.A146T)	KRAS c.436G>A (p.A146T)	42.36		
HM24	PD	KRAS c.35G>T (p.G12V)	KRAS c.35G>T (p.G12V)	17.48		
HM25	SD	KRAS c.436G>A (p.A146T)	KRAS c.436G>A (p.A146T)	57.74		
HM26	NE	PIK3CA c.3140A>G (p.H1047R)	PIK3CA c.3140A>G (p.H1047R)	30		
HM30	PD	NRAS c.37G>C (p.G13R)	NRAS c.37G>C (p.G13R)	50	KRAS c.34G>A (p.G12S)	1.19
					KRAS c.35G>A (p.G12D)	0.04
HM35	PD	BRAF c.1799T>A (p.V600E)	BRAF c.1799T>A (p.V600E)	49.78		
HB 1	SD	WT	KRAS c.179G>A (p.A59T)	0.88		
HB 2	PD	WT	KRAS c.436G>A (p.A146T)	3.6		
HB 4	SD	WT	NRAS c.35G>T (p.G12V)	0.43		
HB 6	PD	WT	KRAS c.34G>A (p.G12S)	3.69	NRAS c.35G>A (p.G12D)	0.3
HB 12	PD	WT	KRAS c.436G>A (p.A146T)	3.88	NRAS c.35G>A (p.G12D)	2.47

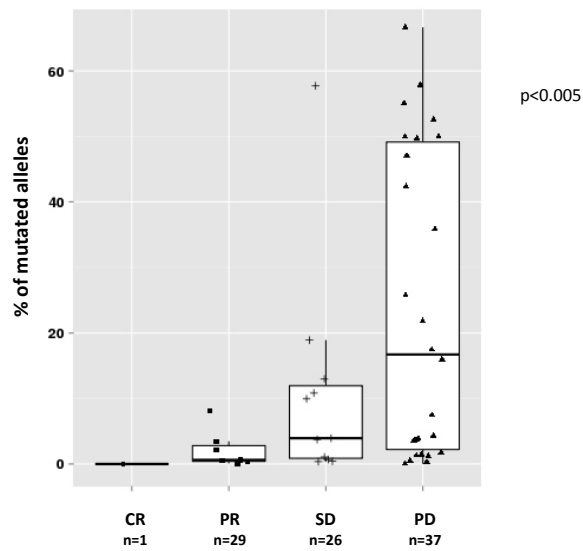
Summary of total mutations detected



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Response to anti-EGFR according to fraction of mutant alleles



Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

ROC curves to evaluate the best threshold to predict response



we calculated ROC curves, comparing them by bootstrap using the R library *pROC*

	AUC	cutoff	0%	0.5%	1%	1.5%	2%
KRAS (exon 2)	0.6569	0%	1	0,68	0,29	0,041	0,023
	0.6491	0.5%		1	0,3	0,031	0,016
	0.6303	1%			1	0,07	0,03
	0.5859	1.5%				1	0,29
	0.5734	2%					1
RAS (KRAS exons 2/3/4 + NRAS exons 2/3/4)	0.6597	0%	1	0,83	0,59	0,09	0,051
	0.6564	0.5%		1	0,604	0,074	0,04
	0.6479	1%			1	0,073	0,038
	0.6081	1.5%				1	0,3
	0.597	2%					1
RAS+BRAF	0.7389	0%	1	0,617	0,666	0,15	0,08
	0.7317	0.5%		1	0,96	0,17	0,096
	0.7312	1%			1	0,112	0,05
	0.7013	1.5%				1	0,31
	0.6902	2%					1
RAS+BRAF+PIK3CA	0.7389	0%	1	0,62	0,67	0,14	0,079
	0.7317	0.5%		1	0,96	0,18	0,09
	0.7312	1%			1	0,124	0,06
	0.7013	1.5%				1	0,31
	0.6902	2%					1

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

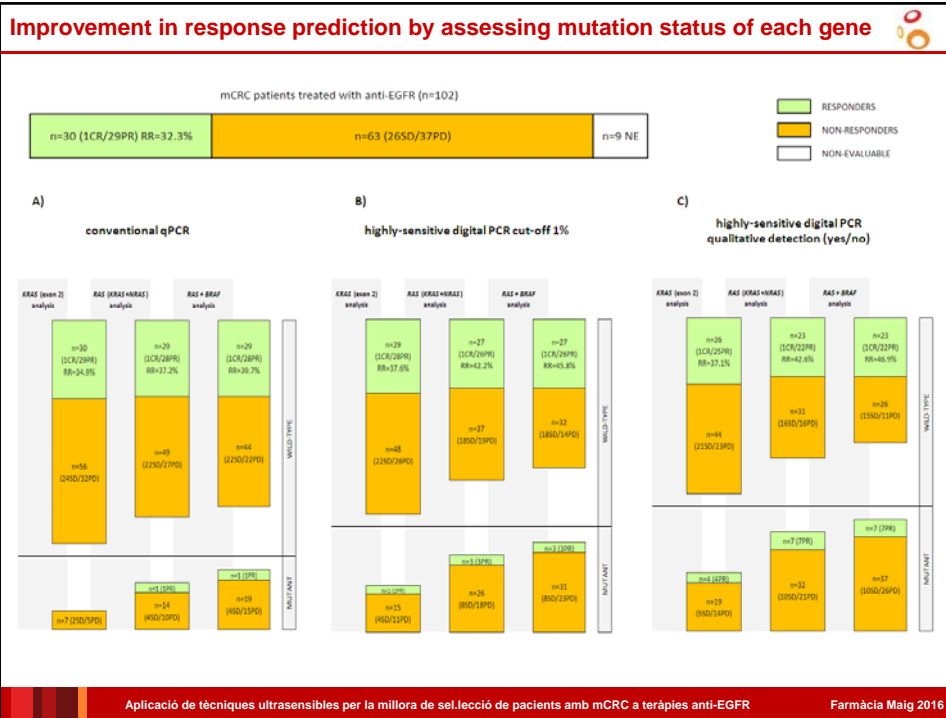
Progression Free Survival and Overall Survival after anti-EGFR treatment



	conventional qPCR qualitative detection (yes/no)	high-sensitive digital PCR cut-off 1%	high-sensitive digital PCR qualitative detection (yes/no)
mutated/wild-type (n/n)	7/95	19/83	27/75
KRAS (exon 2)	PFS, months median (mut/wt) HR (95%CI) P-value	3 / 36.3 2.88 (1.05-7.82) 0.064	3.1 / 36.3 3.48 (1.67-7.02) 0.002
	OS, months median (mut/wt) HR (95%CI) P-value	7.8 / 15.1 2.88 (1.19-6.72) 0.04	10.5 / 16.5 2.91 (1.4-4.91) 0.004
	mutated/wild-type (n/n)	16/86	32/70
RAS (KRAS exons 2/3/4 + NRAS exons 2/3/4)	PFS, months median (mut/wt) HR (95%CI) P-value	2.8 / 36.5 3.21 (1.44-7.13) 0.009	3.5 / 36.5 2.94 (1.52-5.89) 0.002
	OS, months median (mut/wt) HR (95%CI) P-value	8.5 / 15.1 1.84 (0.98-3.32) 0.08	12.5 / 16.7 2.08 (1.25-3.29) 0.006
	mutated/wild-type (n/n)	22/80	37/65
RAS + BRAF	PFS, months median (mut/wt) HR (95%CI) P-value	2.8 / 36.3 5.36 (2.57-11.18) 0.001	3.2 / 36.3 4.52 (2.25-9.07) 0.001
	OS, months median (mut/wt) HR (95%CI) P-value	6.6 / 16.3 2.63(1.49-4.66) 0.002	10.5 / 18.7 2.91(1.56-4.02) 0.001
	mutated/wild-type (n/n)	22/80	37/65

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016



Conclusion

Analysis of an extended gene panel including RAS and BRAF with highly sensitive nanofluidic dPCR and a threshold of 1% improved the prediction of response to anti-EGFR therapy

Validation in large studies are needed to define the optimal cut-off for the clinical setting

Published OnlineFirst April 1, 2016; DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0820

Companion Diagnostics and Cancer Biomarkers

Molecular Cancer Therapeutics

Nanofluidic Digital PCR and Extended Genotyping of RAS and BRAF for Improved Selection of Metastatic Colorectal Cancer Patients for Anti-EGFR Therapies

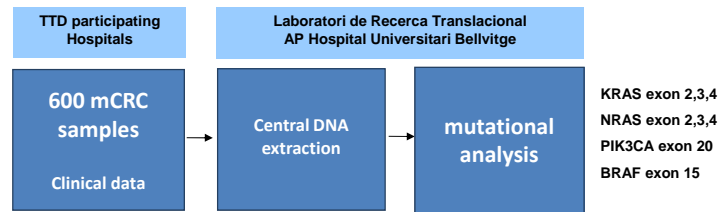
Daniel Azuara¹, Cristina Santos^{1,2}, Adriana Lopez-Doriga³, Julieta Grasselli^{2,4}, Marga Nadal¹, Xavier Sanjuan⁵, Fátima Marin¹, Joana Vidal⁶, Robert Montal², Victor Moreno⁵, Beatriz Bellosillo⁷, Guillem Argiles⁴, Elena Elez⁴, Rodrigo Dienstmann⁴, Clara Montagut⁶, Josep Taberner⁴, Gabriel Capellá^{1,2}, and Ramon Salazar^{1,2}

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR Farmàcia Maig 2016

Ultraselection of mCRC patients for anti-EGFR therapy



PLATFORM project



Cobas 4800 (ROCHE)
Cobas Kits



PyroMark (QIAGEN)
TherascreenPyro Kits

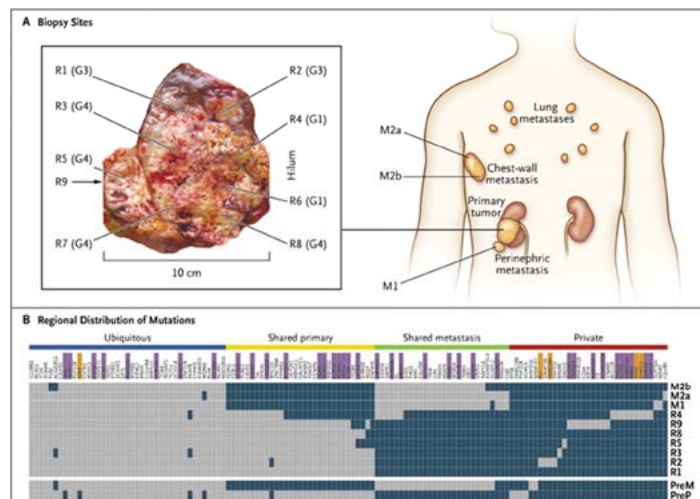


BioMark
Digital PCR Arrays (Fluidigm)

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Specimen Selection: How representative is a tissue biopsy?

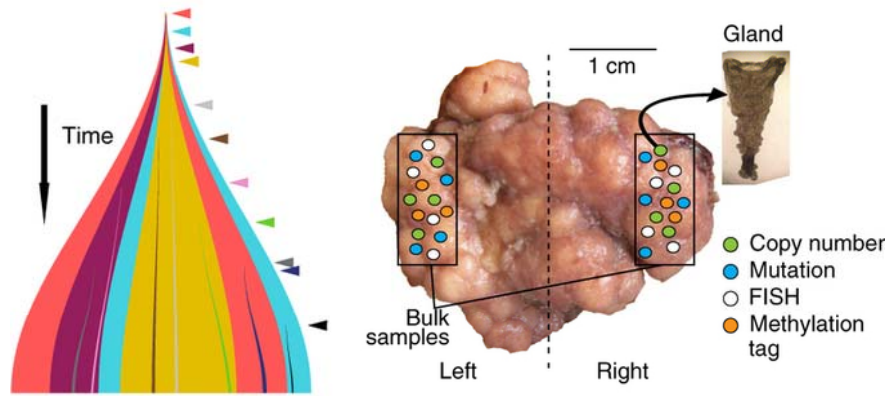


Gerlinger M et al. N Engl J Med 2012;366:883-892

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

A Big Bang model of colorectal tumor growth

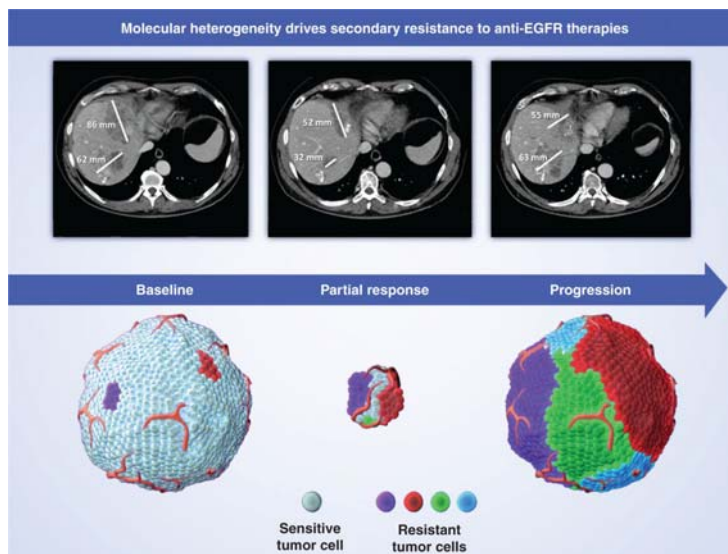


Sottoriva A et al. Nature Genetics 47, 209–216 (2015)

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

Molecular heterogeneity drives secondary resistance to anti-EGFR therapies in mCRC



Sandra Misale et al. Cancer Discovery 2014;4:1269-1280

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

How to capture the heterogeneity of (metastatic) disease and measure clinically relevant biomarkers?

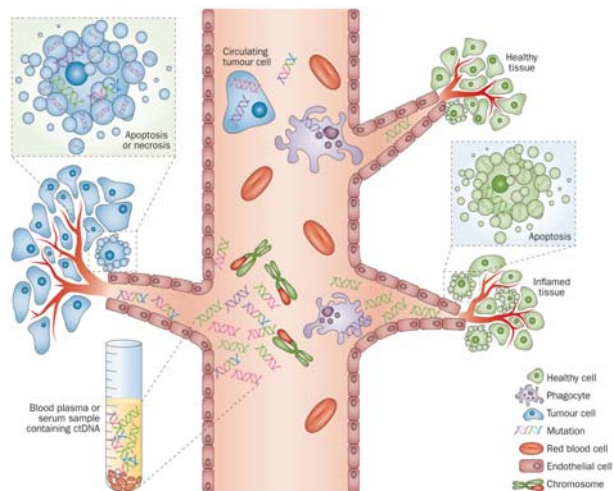
Liquid Biopsies

TUMOR GENOTYPING
prognostic and predictive biomarkers

SURGERY & MINIMAL RESIDUAL DISEASE
detection of ctDNA in the circulation

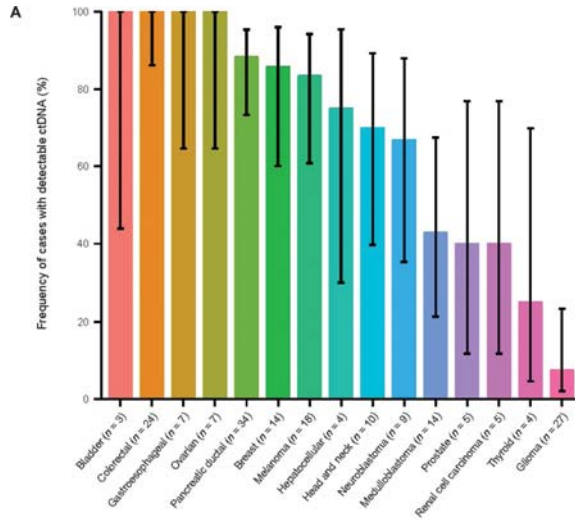
TREATMENT & FOLLOW UP
analysis of ctDNA for real time monitoring of response to treatment

RESISTANCE
emergence of molecular alterations associated with drug resistance in ctDNA



Crowley, E. et al. *Nat Rev Clin Oncol* (2013)

Cell-free circulating tumor DNA levels in different cancer types

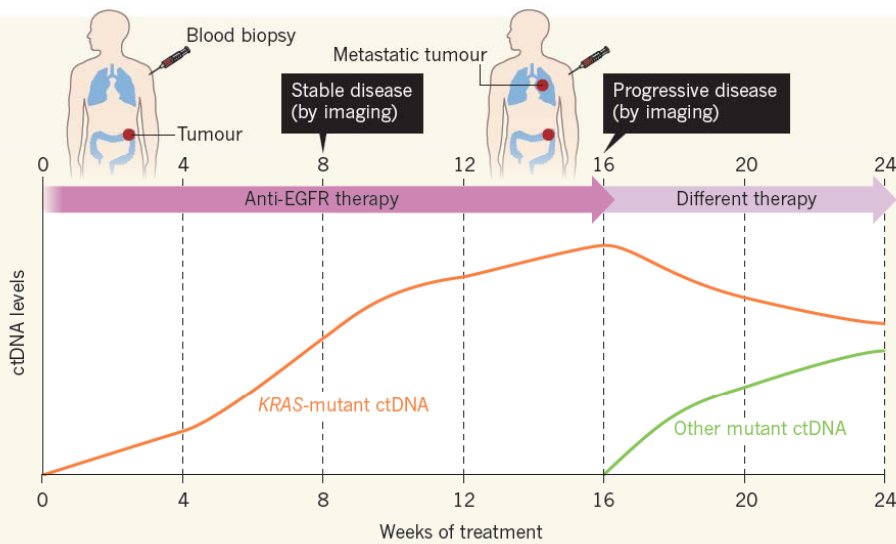


Bettgowda C et al. Sci Transl Med 2014 Feb 19;6(224)

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

“Under pressure” clonal selection vs evolution

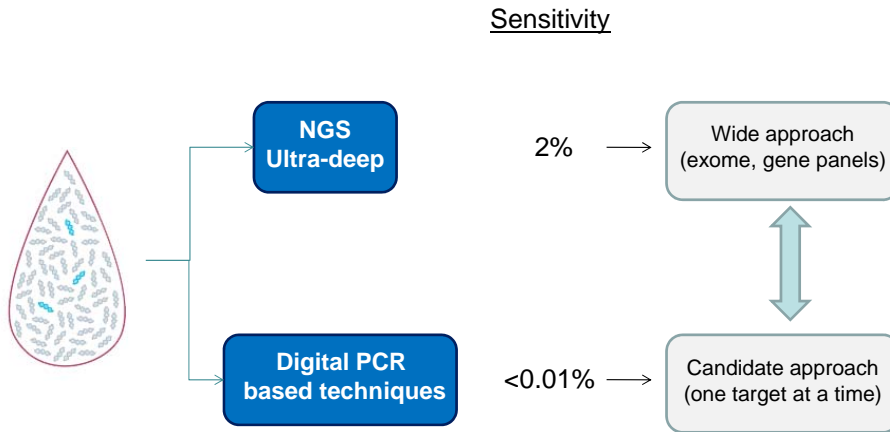


Vilar E & Tabernero J, Nature 2012

Aplicació de tècniques ultrasensibles per la millora de selecció de pacients amb mCRC a teràpies anti-EGFR

Farmàcia Maig 2016

ctDNA analysis is limited by the presence of non tumoral cfDNA

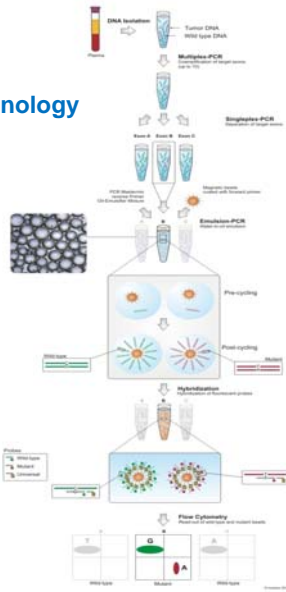


CONCORDANCE project VHIO-ICO

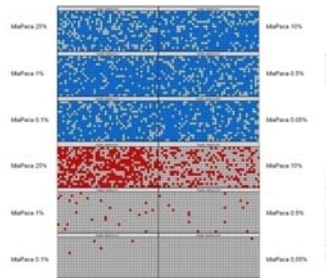
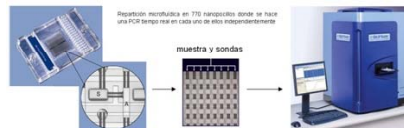


BEAMing technology

Beads / Emulsification / Amplification / Magnetics



Fluidigm technology



Acknowledgements



Bellvitge
Hospital



IDIBELL
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

ICO
Institut Català d'Oncologia
Hospital Duran i Reynals

RICC
Red Temàtica de
Investigació Cooperativa
en Càncer

aec
Càncer i Càncer

TTD

Grupo de Tratamiento de
los Tumores Digestivos



Unión Europea
Fondo Europeo de
Desarrollo Regional
"Una manera de hacer Europa"

FIS 12/01589

Gràcies

dazuara@iconcologia.net