

Molekularpathologie

HANDLE Classic NGS Panel



AmoyDx® HANDLE Classic NGS Panel

Hintergrundinformationen

Lungenkrebs ist der am häufigsten auftretende Krebs weltweit. Hierbei liegt der Anteil des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) bei 80–85 %. Der Anteil an Treibermutationen in NSCLC liegt für *EGFR* bei 10–35 %, für *KRAS* bei 5–30 %, für *NRAS* bei 1 %, für *PIK3CA* bei 3–5 %, für *BRAF* bei 1–4,9 %, für *HER2* bei 2–4 % und für *MET* bei 1–5 %. Neben den Mutationen findet sich auch ein hoher Anteil an Genfusionen in NSCLC für *ALK* (3–7 %), *ROS1* (2 %), und *RET* (1–2 %) [1–8].

Der Mutationsstatus ist ein sehr wichtiger und effizienter prädiktiver Biomarker für zielgerichtete Therapien. Dies wurde in einer Vielzahl an Studien nachgewiesen und wird in den aktuellen Richtlinien für NSCLC empfohlen [9]. So zeigen etwa *EGFR* mutierte Patienten ein besseres Ansprechen auf *EGFR*-TKI als *EGFR* Wildtyp Patienten [1]. Fusionen in den Genen *ALK* und *ROS1* sind stark mit der Effizienz einer *ALK*/*MET* Inhibitor Therapie korreliert [2–3] und Patienten mit *RET* Fusionen können von einer *MET*/*RET*/*VEGFR* Inhibitor Therapie profitieren [4]. *BRAF* mutierte Patienten profitieren von einer *BRAF* Inhibitor Therapie [5]. Ferner profitieren *HER2* mutierte Patienten von dem Inhibitor Afatinib, und das Vorhandensein von *KRAS*, *NRAS* oder *PIK3CA* Mutationen korreliert mit Primärresistenzen gegen eine *EGFR*-TKI Therapie [6–8].

Kolorektaler Krebs (CRC) ist der dritthäufigste auftretende Krebs weltweit. Der Anteil an metastasierendem CRC ist hoch und liegt bei neu diagnostizierten Patienten bei 40–50 %. Es ist bekannt, dass in kolorektalem Krebs aktivierende Mutationen in den Genen *KRAS* (20–50 %),

NRAS (1–6 %), *PIK3CA* (10–30 %) und *BRAF* (8–15 %) auftreten [10–11]. Die Analyse des genetischen Status dieser vier Gene spielt bei kolorektalem Krebs eine wichtige Rolle und ist entscheidend für die Therapie. Klinische Studien haben gezeigt, dass Patienten mit CRC, bei denen Mutationen in diesen Genen (*KRAS*/*NRAS*/*PIK3CA*/*BRAF*) nachgewiesen wurden, sehr schlecht auf monoklonale Antikörper gegen *EGFR* ansprechen [12–15]. Durch den Einsatz von Next Generation Sequencing (NGS) für genetische Analysen in der Krebsdiagnostik werden immer mehr Biomarker gefunden, die für zielgerichtete Krebstherapien eine wichtige Rolle spielen. So erwiesen sich diverse TRK-Inhibitoren in vielen Krebsarten als sehr effektiv und Patienten mit Rearrangements in den Genen *NTRK1*, *NTRK2* und *NTRK3* können von solchen Inhibitoren profitieren [16–17].

Die Herstellung der NGS-Library des AmoyDx® Classic NGS Panel basiert auf dem HANDLE Verfahren (Halo-shape Annealing and Defer-Ligation Enrichment). Dieses schnelle Protokoll besteht aus lediglich sechs Schritten und kann an nur einem Arbeitstag abgearbeitet werden. Alle Reaktionen finden in nur einem Tube pro Patienten-Probe statt, DNA und die aus RNA generierte cDNA werden vor der Libraryerstellung zusammengeführt. Die Analyse der mit dem HANDLE Classic NGS Panel generierten Daten erfolgt mit dem AmoyDx® NGS Data Analysis System (ANDAS), bestehend aus einer Workstation mit vorinstallierter Analysesoftware. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgt damit lokal und in wenigen Schritten.

Vorteile des AmoyDx® HANDLE Classic NGS Panels

- ▶ Library-Präparation in nur einem Arbeitstag.
- ▶ Geringer Arbeitsaufwand durch Library Präparation in nur 6 Schritten.
- ▶ Nur eine PCR-Aufreinigung am Ende der Library-Präparation nötig.
- ▶ Verwendung von UMI (Unique Molecular Identifier) Sequenzen zur effizienten Identifizierung von PCR-Fehlern während der Datenanalyse.
- ▶ Analyse auf der ANDAS Workstation als unabhängiges lokales stand-alone System für hohe Datensicherheit.

Spezifikationen des AmoyDx® HANDLE Classic NGS Panels

Regulatorischer Status	CE/IVD
Anzahl erfasster Gene	40 + MSI
Genomische Abdeckung	ca. 42 kb
Probenmaterial	DNA und RNA aus FFPE Gewebe
Geeignete Sequenzier-Plattformen	CE/IVD: Illumina MiSeqDx® und NextSeq 550Dx®* RUO: Illumina MiniSeq®, MiSeq® und NextSeq500/550®*
Benötigte DNA Menge / RNA Menge	50 ng - 100 ng DNA / 30 ng - 400 ng RNA
Erfasste Parameter/Varianten	SNVs, InDels, Fusionen, CNAs, MSI (55 Mononukleotidmarker)
Anzahl der PCR Pools pro Probe	1
Amplicon-Größe	150 – 400bp
Sensitivität	bis zu 1% Hotspot, 5% non-Hotspot
Output pro Probe	ca. 0,38 Gb MiSeqDx®/ 1,0 Gb NextSeq 550Dx®
Arbeitstage für die Library-Herstellung	1
Technologie	HANDLE
Daten-Analyse	Lokale Workstation mit AmoyDx® Analysesoftware (ANDAS)

▶ Zweckbestimmung

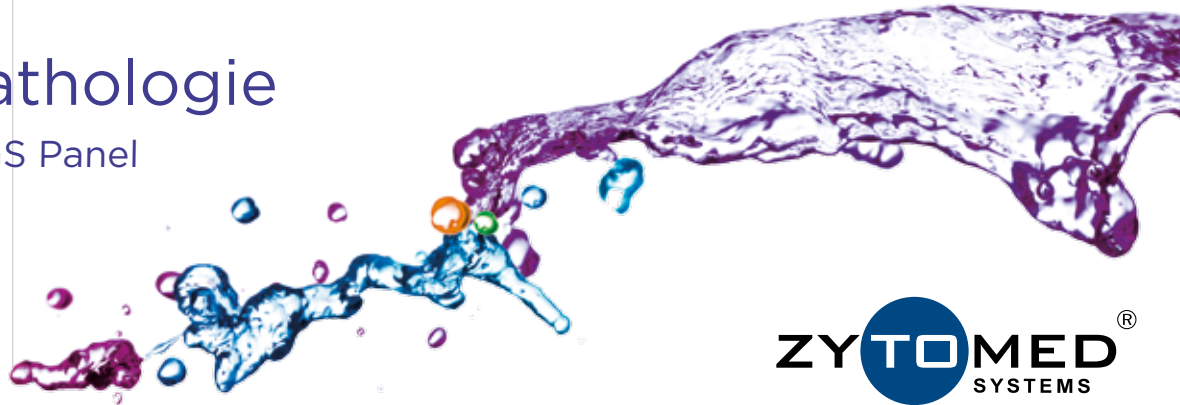
Das AmoyDx® HANDLE Classic NGS Panel ist ein Next-Generation Sequencing (NGS)-basierter in-vitro-Diagnostiktest, der für die Detektion von Varianten in 40 Schlüsselgenen sowie für die Ermittlung des MSI-Status in soliden Tumoren bestimmt ist. Das Kit ermöglicht die qualitative Bestimmung von Punktmutationen (SNVs), Insertionen und Deletionen (InDels), Genfusionen und Kopienzahlveränderungen (CNAs) sowie des MSI-Status aus DNA- und RNA-Isolaten von FFPE-Tumorproben.

Das Kit ist ausschließlich zur Verwendung durch ausgebildetes Laborpersonal bestimmt.

* MiSeqDx®, NextSeq 550Dx®, MiniSeq®, MiSeq® und NextSeq500/550® sind eingetragene Markennamen der Firma Illumina, Inc., 92122 San Diego, US.

Molekularpathologie

HANDLE Classic NGS Panel



► Target-Gene des AmoyDx® HANDLE Classic NGS Panels

AKT1	IDH2	POLE	NKX2-1	ROS1
BRAF	KEAP1	PTEN	ALK	NRG1
CTNNB1	KIT	RB1	FGFR1	DPYD
DDR2	KRAS	STK11	FGFR2	UGT1A1
EGFR	MAP2K1	TP53	FGFR3	MSI
ESR1	NFE2L2	ERBB2	NTRK1	
FGFR4	NRAS	MET	NTRK2	
HRAS	PDGFRA	CDK4	NTRK3	
IDH1	PIK3CA	MYC	RET	

SNV, InDel
SNV, InDel, CNA
SNV, InDel, Exon14 Skipping, CNA
CNA
Fusion, SNV, InDel
Fusion
SNPs
55 Mononukleotid-Marker

► Lokale Auswertung der Sequenzdaten und Bestimmung des Genomic Scar Scores mit dem AmoyDx® NGS Data Analysis System

Bezeichnung	Status	Menge	Bestell-Nr.
ANDAS (AmoyDx® NGS Data Analysis System) Paket aus Server (Dell OEM Ready PowerEdge Server mit Linux CentOS Betriebssystem) und vorinstallierter ANDAS Analyse-Software.	CE/IVD	1 System	ANDAS-1

► Produktinformation: Library Preparation Kit

Bezeichnung	Status	Format	Menge	Bestell-Nr.
AmoyDx® HANDLE Classic NGS Panel Nachweis von Varianten in 40 tumorrelevanten Genen sowie des MSI Status an genomischer DNA und RNA aus FFPE Gewebe solider Tumore	CE/IVD	Bulk	1 Kit (24 Tests)	ADX-HCNP01

► Workflow des HANDLE Classic NGS Panels: 6 Schritte - 6 Stunden - 1 Tube

1	Reverse Transkription	Proben RNA, Puffer, RT-Enzym für cDNA-Synthese	60 min
2	Hybridisierung	Zugabe von genomischer DNA, Puffer, CP-Probes für die Hybridisierung	125 min
3	Extension/Ligation	Zugabe des CP-Extension-Ligation Master Mix; Erzeugung von zirkulären Produkten	10 min
4	Exonuklease-Verdau	Zugabe von CP-Exonuklease A und B zur Entfernung nicht-zirkulärer DNA	40 min
5	PCR-Amplifikation	Zugabe von CP-PCR Master Mix, H ₂ O, CP-S5 und CP-N7 Primer zur Library-Amplifikation	40 min
6	Aufreinigung	Aufreinigung über „Magnetic Beads“	40 min

Gesamt: ca. 6 h

↓
QC & Sequenzierung

► Literatur

- [1] Reungwetwattana T, Dy DK. Targeted therapies in development for non-small cell lung cancer. *J Carcinog.* 12:22, 2013
- [2] Gridelli C, Peters S, *et al.* ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer Treat Rev.* 40:300-6, 2014
- [3] Katayama R, Kobayashi Y, *et al.* Cabozantinib overcomes crizotinib resistance in ROS1 fusion-positive cancer. *Clin Cancer Res.* 21:166-74, 2015
- [4] Drilon A, Wang L, *et al.* Response to Cabozantinib in Patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov.* 3:630-5, 2013
- [5] Sánchez-Torres JM, Viteri S, *et al.* BRAF mutant non-small cell lung cancer and treatment with BRAF inhibitors. *Transl Lung Cancer Res.* 2:244-50, 2013
- [6] Califano R, Landi L, *et al.* Prognostic and predictive value of KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Drugs.* 72 Suppl:28-36, 2012
- [7] Stephens P, Hunter C, *et al.* Lung cancer: Intragenic ERBB2 kinase mutations in tumors. *Nature.* 431:525-6, 2004
- [8] Chen JY, Cheng YN, *et al.* Predictive value of KRAS and PIK3CA in non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs: a systemic review and meta-analysis. *Cancer Biol Med.* 12:126-39, 2015
- [9] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Non-Small Cell Lung Cancer. Version 6. 2017. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp
- [10] Chan. E. 2015. Molecular Profiling of Colorectal Cancer. *My Cancer Genome.* <http://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/> (Updated February 6)
- [11] Douillard JY, Oliner KS, *et al.* Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 369:1023-34, 2013
- [12] Di Bartolomeo M, Pietrantonio F, *et al.* Lack of KRAS, NRAS, BRAF and TP53 mutations improves outcome of elderly metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab, oxaliplatin and UFT. *Target Oncol.* 9:155-62, 2014
- [13] Heinemann V, von Weikersthal LF, *et al.* FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomized, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15:1065-75, 2014
- [14] De Roock W, Claes B, *et al.* Effects of KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 11:753-62, 2010
- [15] National Comprehensive Cancer Network: NCCN Guidelines Colon Cancer (version 1.2015). http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp
- [16] Drilon A. TRK inhibitors in TRK fusion-positive cancers. *Ann Oncol* 2019 Nov 1;30:viii23-viii30.