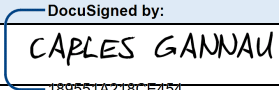


DECLARACIÓN DE PRUEBAS DESARROLLADAS EN LABORATORIO

Parte A. Información sobre la institución de salud fabricante		
Instituto / Laboratorio		
Nombre:	Pangaea Oncology SA	
Departamento:	Biología molecular	
Dirección	Sabino Arana, 5-19 (planta -1, puerta 7), 08028, Barcelona.	
Persona de contacto		
Nombre:	Clara Mayo de las Casas	
Cargo:	Dir. Técnico	
Teléfono:	93.546.01.19	
E-mail:	cmayo@panoncology.com	
Declaración		
La institución mencionada anteriormente establece para todas las pruebas enumeradas en la parte B:		
1) Esta prueba es fabricada o modificada por esta institución de salud bajo la norma ISO 15189 y a su vez esta técnica está acreditada o en proceso de acreditación por ENAC. 2) Esta prueba cumple con las reglas generales de seguridad y rendimiento relevantes, como se describe en el Anexo I del Reglamento (EU) 2017/746 (IVDR) 3) Las desviaciones del Anexo I del Reglamento (EU) 2017/746 (IVDR) se fundamentan y documentan en el sistema de gestión de calidad. 4) La argumentación para el uso de pruebas desarrolladas en laboratorio está documentada en el sistema de gestión de calidad.		
Firmado en nombre de la organización		
Nombre: Carles Gannau	Fecha: 17/10/2023	Firma: 

Parte B. Descripción de las pruebas desarrolladas en el laboratorio*		Identificación
1	Determinación de mutaciones del gen EGFR (exón 19, 20 y 21), BRAF (exón 15) y KRAS (exón 2) mediante las técnicas de secuenciación Sanger y discriminación alélica (5' nucleace PCR assay en presencia de sondas PNA).	Desarrollado internamente
2	Detección de alteraciones somáticas (SNVs, indels, CNVs) en genes relacionados con cáncer mediante secuenciación masiva (NGS). Alteraciones en 30 oncogenes: ALK, ARID1A, BRAF, CDK4, CDK6, EGFR, ERBB2, ERBB4, FAT1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, IDH1, IDH2, KEAP1, KIT, KRAS, MET, MYC, NFE2L2, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, POLD1, POLE, RET, ROS1, SETD2, STK11, TP53.	RUO
3	Detección de reordenamientos de los genes ALK, RET, ROS1 y variantes de splicing de MET exón 14, mediante hibridación génica y recuento digital de la abundancia relativa de transcripciones de ARNm	RUO

*Desarrollado internamente, RUO o test IVD con modificaciones.

**Justificaciones de uso de LDT/RUO vs CE-IV para todos los casos usados en el lab
Pangaea Oncology dispone de la acreditación 15189 para los siguientes análisis**

- Determinación de mutaciones del gen EGFR (exón 19, 20 y 21), BRAF (exón 15) y KRAS (exón 2) mediante las técnicas de secuenciación Sanger y discriminación alélica (5' nucleace PCR assay en presencia de sondas PNA).
- Detección de alteraciones somáticas (SNVs, indels, CNVs) en genes relacionados con cáncer mediante secuenciación masiva. Alteraciones en 20 oncogenes/ Alterations in 30 oncogenes: : ALK, ARID1A, BRAF, CDK4, CDK6, EGFR, ERBB2, ERBB4, FAT1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, IDH1, IDH2, KEAP1, KIT, KRAS, MET, MYC, NFE2L2, NRAS, TP53, PDGFRA, PIK3CA, POLD1, POLE, RET, ROS1, SETD2, STK11.
- Detección de reordenamientos de los genes ALK, RET y ROS1 mediante hibridación génica y recuento digital de la abundancia relativa de transcripciones de ARNm.

En todos estos análisis se utilizan materiales LTD/RUO. Las razones de su uso incluyen una mayor sensibilidad o menos cantidad de muestra de partida, todo ello no alcanzable si se utilizaran las correspondientes técnicas con marca IVD. Se pasa a detallar la justificación de uso para cada análisis.

1- Determinación de mutaciones del gen EGFR (exón 19, 20 y 21), BRAF (exón 15) y KRAS (exón 2) mediante las técnicas de secuenciación Sanger y discriminación alélica (5' nucleace PCR assay en presencia de sondas PNA).

En el mercado hay varios kits con marcado CE-IV para detectar las mutaciones en estos genes a partir de tejido parafinado, entre ellos cobas® EGFR Mutation Test v2 (CE-IVD, FDA), therascreen® EGFR RGQ PCR Kit, therascreen® BRAF V600E RGQ PCR Kit, therascreen BRAF Pyro Kit, cobas® 4800 BRAF V600. En todos estos kits con marca IVD, se necesitan entre 2 y 10 ng de ADN totales purificados para cada reacción, sin embargo para un parte relevante de casos, que en pulmón puede estar entre el 19-50%, la cantidad de material de tejido parafinado del que se dispone para realizar el análisis es muy escasa. Pangaea oncology puede utilizar macro/microdisecciones directas en las que no es necesario purificar el ADN y la concentración del mismo se encuentra por debajo de estas cantidades y dar resultados fiables con su tecnología RUO. Otra marca comercial con IVD es IDYLLA™ IN VITRO DIAGNOSTIC TESTS que tiene kits para la detección de mutaciones en EGFR, KRAS y BRAF, es una técnica que no requiere una purificación previa, necesita como mínimo una sección de tejido de 5µm con una superficie mínima de 50 mm², la técnica de Pangaea requiere un mínimo de 4 células.

En el caso de la biopsia líquida solo existen en el mercado test para EGFR, entre ellos están cobas® EGFR Mutation Test v2 y therascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit. La técnica de Pangaea Oncology presenta mayor sensibilidad y/o especificidad en comparación con las tecnologías IVD como se puede comprobar en la siguiente tabla, obtenida del artículo “Comprehensive cross-platform comparison of methods for non-invasive EGFR mutation testing: results of the RING observational trial”. Romero A et al. Molecular Oncology 15 (2021) 43–56

Table 5. Sensitivity, specificity positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of each methodology and according to the type of mutation.

Methodology	T790M				Exon 21				Exon 19			
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
BEAMing	54	73	81	42	80	100	100	92	71	100	100	70
dPCR	58	73	82	44	90	100	100	96	62	100	100	64
PNA-Q-PCR	54	73	81	42	70	100	100	89	53	100	100	58
NGS	42	90	91	40	89	100	100	96	62	92	93	60
Oncomine												
NGS	42	82	83	40	70	100	100	89	61	100	100	57
GeneReader												
Cobas	42	91	91	42	80	100	100	92	65	93	100	65
Therascreen	25	90	86	33	50	100	100	82	50	100	100	58

Para el caso de la comparativa con Therascreen la técnica PNA-Q-PCR es mas sensible para todas las mutaciones y en el caso del Cobas la mejora se da en sensibilidad para la T790M.

2- Detección de alteraciones somáticas (SNVs, indels, CNVs) en genes relacionados con cáncer mediante secuenciación masiva (NGS). Alteraciones en 30 oncogenes: ALK, ARID1A, BRAF, CDK4, CDK6, EGFR, ERBB2, ERBB4, FAT1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, IDH1, IDH2, KEAP1, KIT, KRAS, MET, MYC, NFE2L2, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, POLD1, POLE, RET, ROS1, SETD2, STK11, TP53.

Los paneles de NGS con marca IVD-CE para mutaciones somáticas en cáncer sólido utilizando tejido paraafinado de partida que actualmente se comercializan son el Oncomine Dx Target Test, el Oncomine Dx Express Test, TruSight Oncology Comprehensive (EU), el SOLIDaccuTest™ estas metodologías necesitan entre 10-40 ng de ADN totales purificados, Pangaea oncology ha puesto a punto su tecnología para detectar mutaciones con macrodisecciones directas, por lo tanto con menos de 40 ng totales y sin el paso de purificación del ADN, esto es especialmente relevante para pacientes con cáncer de pulmón en los que en muchas ocasiones las biopsias son escasas.

Para el caso de la biopsia líquida tienen marcado IVD Oncomine Dx Express Test y FoundationOne®Liquid CDx del primero no hay datos de sensibilidad ni especificidad públicos por lo que no podemos hacer una comparativa directa y por lo tanto no podemos suponer que es mejor que nuestra tecnología, en segundo test el FoundationOne Liquid CDx presenta una sensibilidad analítica entre el 0,33 y el 0,8 para mutaciones puntuales o pequeñas deleciones e inserciones, nuestra metodología presenta una sensibilidad del 0,5% igualando el test con IVD.

3 Detección de reordenamientos de los genes ALK, RET y ROS1 y variantes de splicing de MET exón 14, mediante hibridación génica y recuento digital de la abundancia relativa de transcripciones de ARNm.

FFPE:

Para la detección de reordenamientos existen varias técnicas en el mercado con marca IVD, entre ellas dos de secuenciación masiva, TruSight Oncology Comprehensive (EU) y Oncomine Dx Target Test y una basada en RT-qPCR que es el Idylla™ GeneFusion Assay.

TruSight Oncology Comprehensive (EU) requiere un mínimo de 40 ng totales de ARN purificado mientras que la tecnología de detección de reordenamientos acreditada por Pangaea Oncology necesita un mínimo de 6 ng totales. Por lo que, para el caso de pacientes con biopsias muy escasas, permite una mayor posibilidad de detectar reordenamientos en genes que determinaran su tratamiento. Oncomine Dx Target Test requiere 10 ng de ARN purificado, sin embargo, la técnica mediante hibridación masiva requiere un mínimo de 6 ng Idylla™ GeneFusion Assay requiere como mínimo tres secciones de tejido de 5µm con una superficie mínima de < 20 mm² sin embargo la tecnología RUO de Pangaea requiere como mínimo una sección de 4µm y una superficie mínima de 1mm². Por lo tanto, presenta una ventaja para aquellas muestras con poco material.

Biopsia líquida:

La detección de fusiones génicas y variantes de splicing en biopsias líquidas todavía no es una práctica clínica habitual en muchos hospitales y el rendimiento de las plataformas de NGS suele ser inferior en comparación con las biopsias tisulares FFPE, lo que pone de manifiesto la necesidad de nuevos enfoques metodológicos que puedan aplicarse con éxito en este entorno de manera que no existen opciones en el campo de la biopsia líquida y usando el ARN.

Para seleccionar el tratamiento de los pacientes en cáncer de pulmón, existe una creciente necesidad de desarrollar técnicas útiles para la biopsia líquida y clínicamente aplicables que puedan determinar simultáneamente, los reordenamientos de los genes ALK, RET y ROS1 y la variante de splicing de METΔex14 en biopsia líquida. Esto es debido a:

Existe un número de pacientes con CPCNP que no pueden someterse a biopsia o el tejido disponible es insuficiente para el análisis genético. En este caso, las biopsias líquidas representan una alternativa mínimamente invasiva, segura y fácil de obtener.

De forma general, obtener biopsias de tejido repetidas en el tiempo para seguir la evolución de la enfermedad o detectar la aparición de resistencias es prácticamente imposible. En este contexto, las biopsias líquidas representan la mejor alternativa mínimamente invasiva, que se utiliza cada vez más para monitorizar al paciente durante la enfermedad.

Las plataformas existentes en el mercado como Guardant360 CDx, Foundation One Liquid CDx, Resolution Bioscience, ThermoFisher, etc, tienen un coste muy elevado y plazos de entrega de resultados superior a 15 días. Además, requiere enviar la muestra a un laboratorio central por lo que la implementación de la técnica en la práctica clínica es muy limitada.

La mayoría de los kits comerciales existentes en el mercado como Oncomine Lung cfTNA assay de la casa comercial ThermoFisher, Resolution ctDx Lung Resolution Bioscience etc, han sido exclusivamente validadas en líneas celulares y no disponen de sensibilidad ni especificidad diagnósticas.

Respecto a la sensibilidad diagnóstica, de los métodos existentes en el mercado, Foundation One Liquid CDx, tiene una sensibilidad para reordenamientos del gen ALK del 84% pero para el resto de reordenamientos ROS1, RET y variantes de splicing de MET Δ ex14 la sensibilidad diagnóstica es inferior al método aquí descrito.

En la bibliografía se han reportado estudios por RT-PCR que han sido validadas en muestras de pacientes, pero esta técnica tiene la desventaja de que no permite multiplexado, por lo que lo es necesario un volumen de muestra mayor y provoca un elevado coste si se quiere determinar todas las fusiones de ALK, RET, ROS1 y variante de splicing de MET Δ ex14