



# V SIMPOSIO GETHI | 18/19

noviembre de 2019

Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Madrid. Aula Jiménez Díaz. Madrid

## NanoString: ¿en qué consiste y qué nos ofrece?

**Dr. Ferran Losa**

*Hospital Sant Joan Despí – Moises Broggi.  
Institut Català d’Oncologia.  
Barcelona.*

# NanoString: ¿en qué consiste y qué nos ofrece?

- Tecnología Nanostring
- Sistema de Análisis nCounter
- Biología en 3D
- Aplicaciones de Nanostring

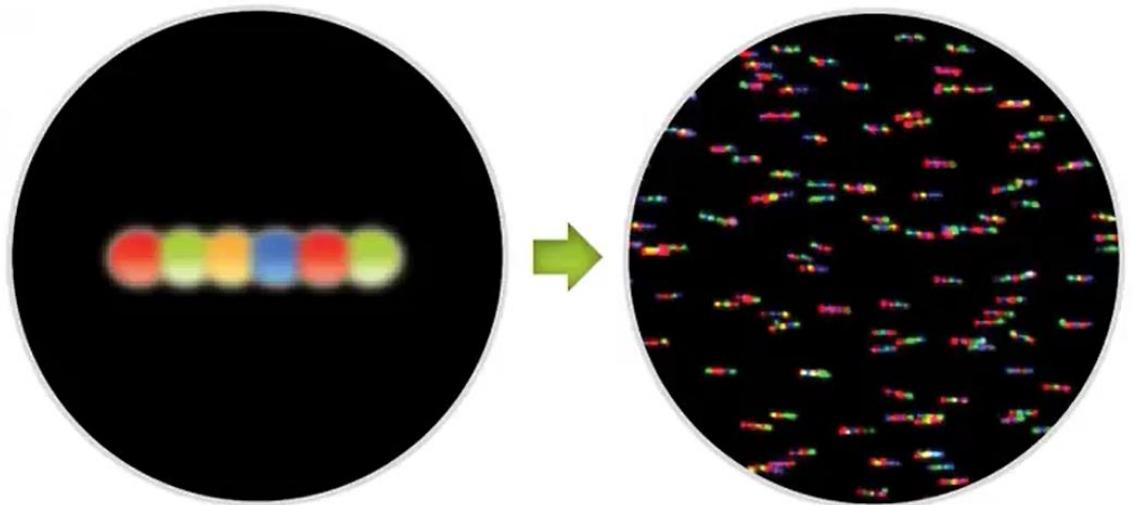
# NanoString: ¿en qué consiste y qué nos ofrece?

- **Tecnología Nanostring**
- Sistema de Análisis nCounter
- Biología en 3D
- Aplicaciones de Nanostring

# ¿Cómo funciona la tecnología Nanostring?

Códigos de barras moleculares™:

1 Molecule = 1 código



**“Códigos de barras” moleculares**, cada uno se pega a una molécula objetivo

“código de barras” molecular formado por la combinación secuencial de seis unidades de fluorocromos de cuatro colores distintos.

# ¿Cómo funciona la tecnología Nanostring?



## Sonda reportera (Reporter Probe)

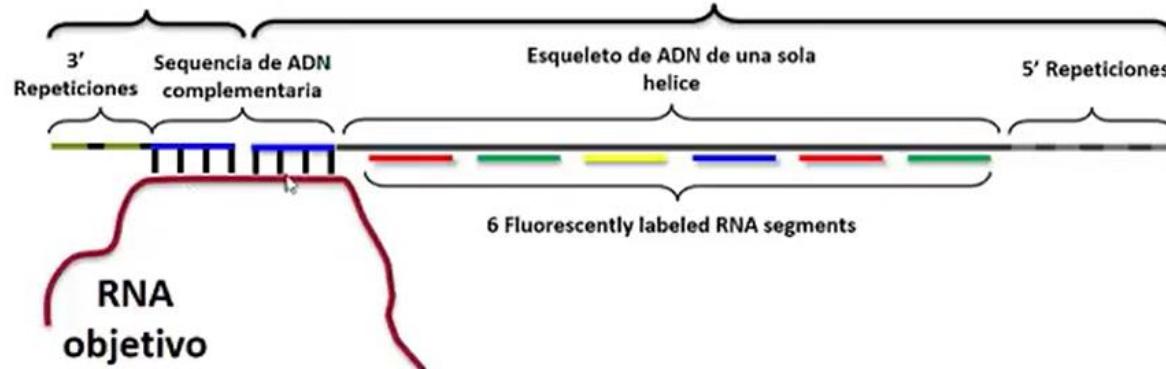
- 6 puntos fluorescentes (RNA)
- “Esqueleto de DNA complementario al código fluorescente y al RNA objetivo
- Secuencias repetidas de DNA (5’)

## Sonda de captura (Capture Probe)

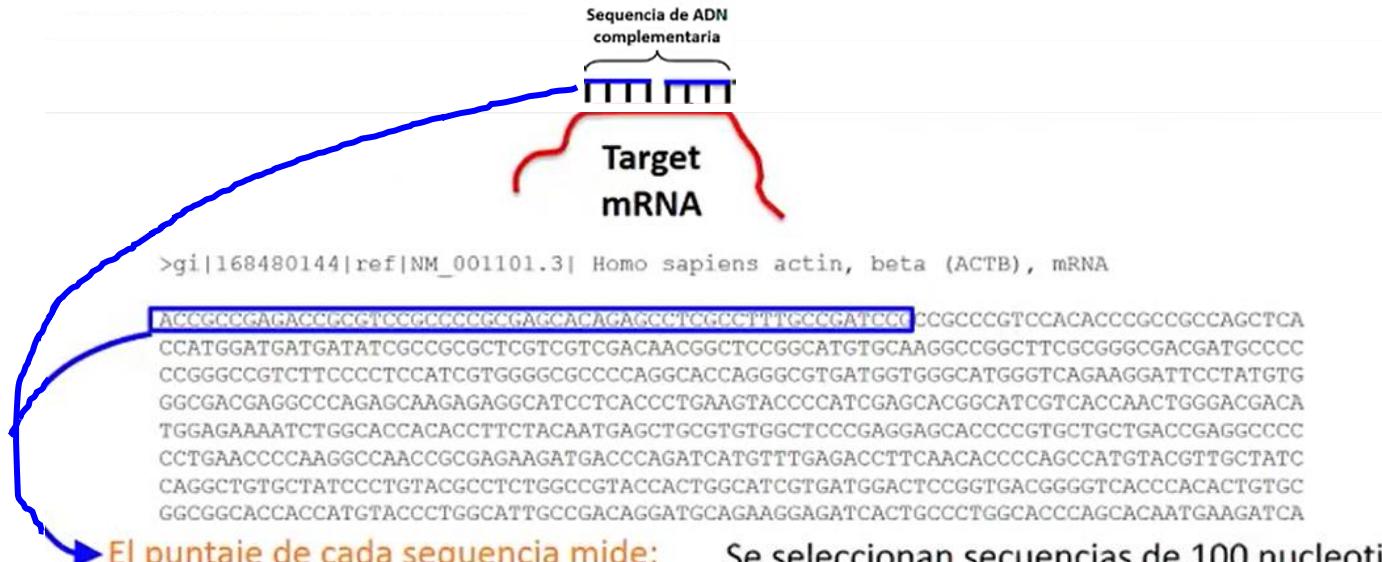
- DNA complementario al RNA a analizar
- Secuencias repetidas de DNA (3’)

### Sonda de captura

### Sonda reportera



## Selección de la sonda

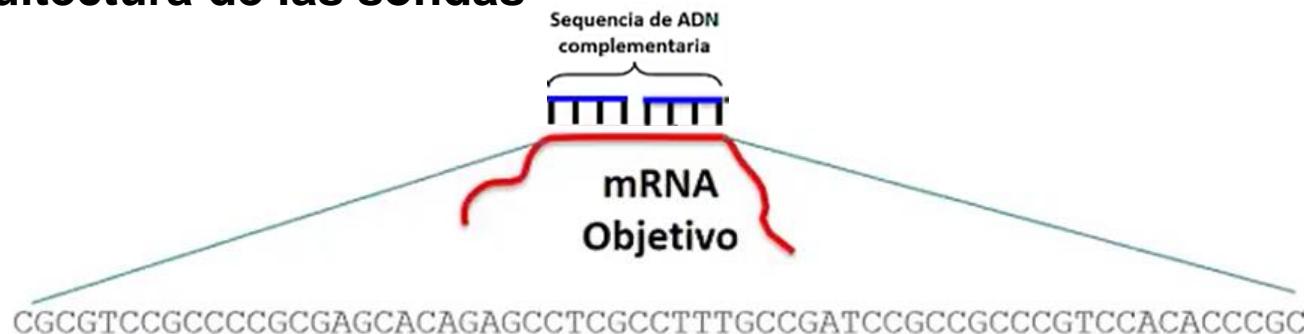


El puntaje de cada secuencia mide:

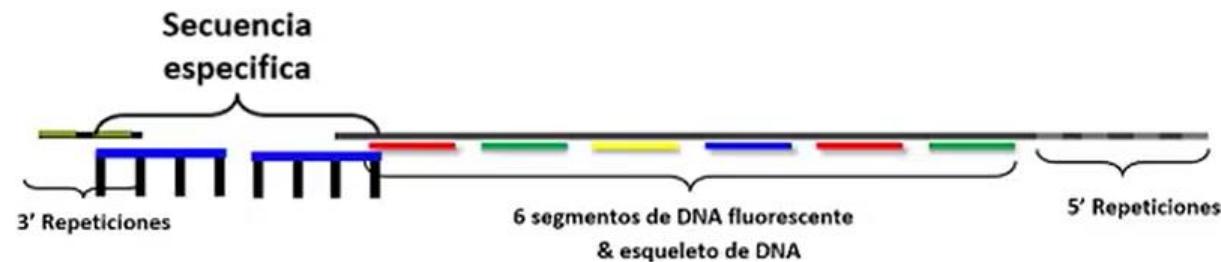
- Unicidad (a nivel transcriptoma)
- Propiedades termodinamicas

Se seleccionan secuencias de 100 nucleotidos que se analizan. Si se encuentran problemas, se continua con la siguiente secuencia hasta que se encuentra la secuencia con mejor puntaje de acuerdo con un algoritmo.

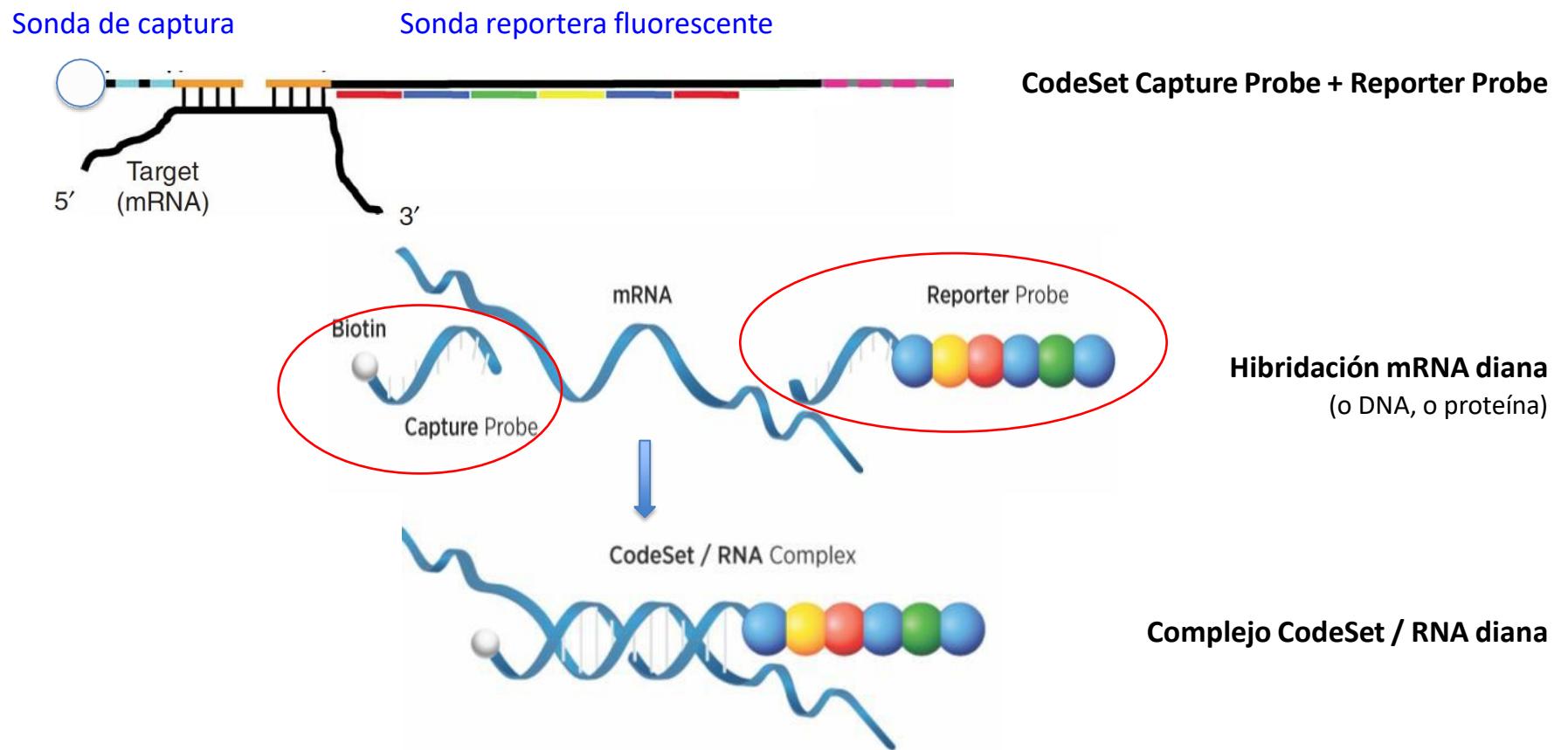
## Arquitectura de las sondas



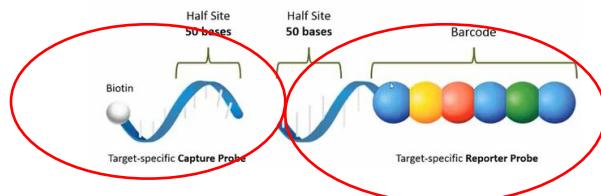
CGCGTCCGGCCCCGCGAGCACAGAGCCTC  
GCCTTTGCCGATCCGCCGCCGCCGTCCACACCCGC



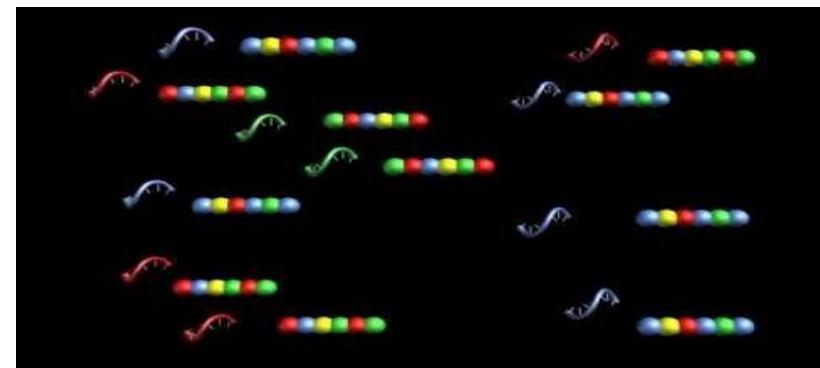
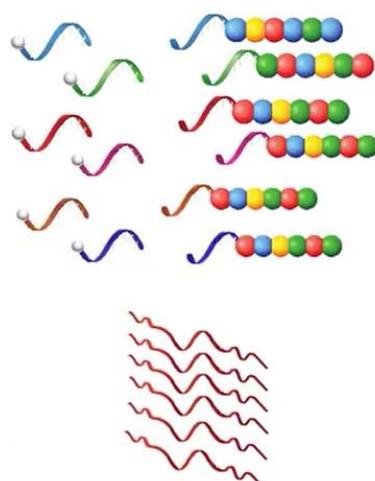
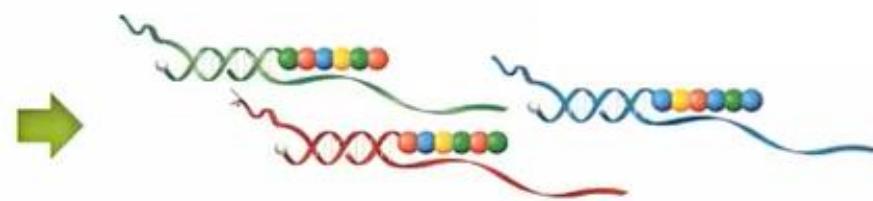
## Resultado final



## Códigos de barras moleculares™: 1 Molecula = 1 código



## Resultado final

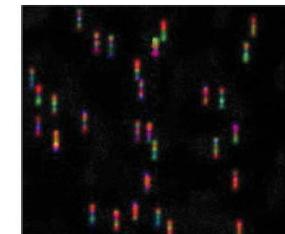
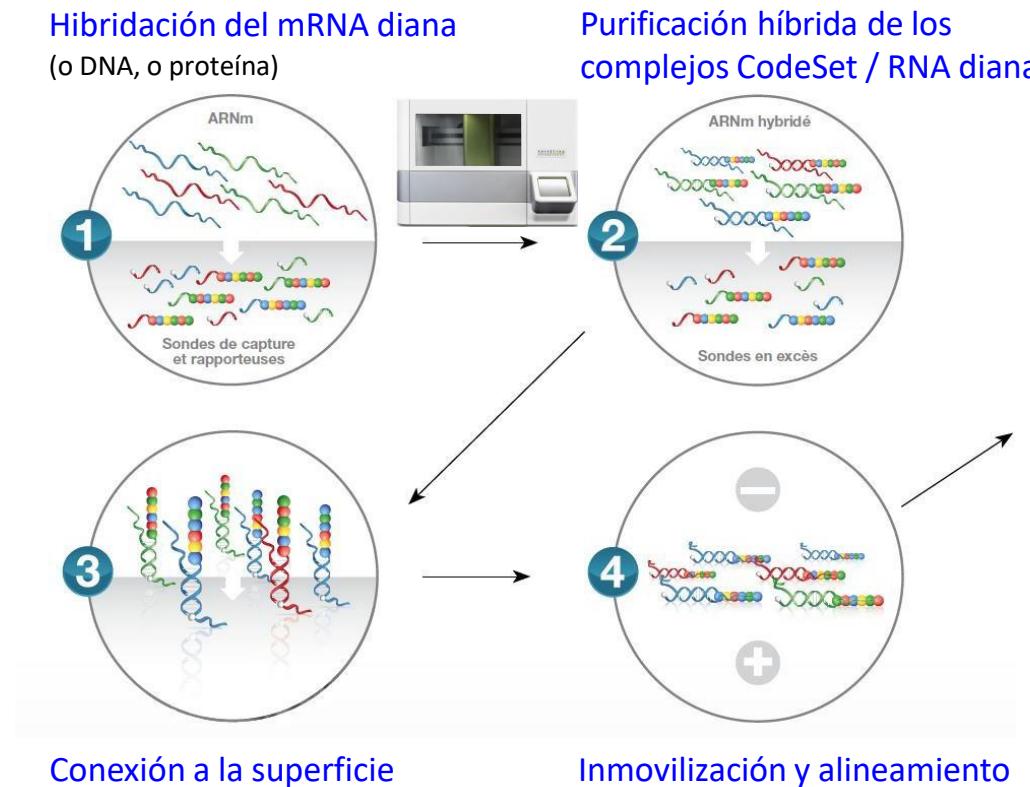


“Códigos de barras” moleculares, cada uno se pega a una molécula objetivo

# NanoString: ¿en qué consiste y qué nos ofrece?

- Tecnología Nanostring
- **Sistema de Análisis nCounter**
- Biología en 3D
- Aplicaciones de Nanostring

# Proceso de escaneo y recuento



The surface is imaged and reporter probes are decoded

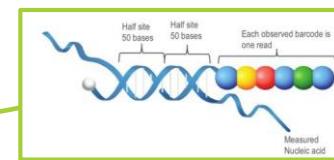
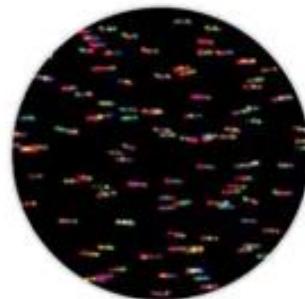
Identity	Color code	Counts
Gene 1		3
Gene 2		2
...		
Gene <i>n</i>		1

## Sistema de Analisis nCounter

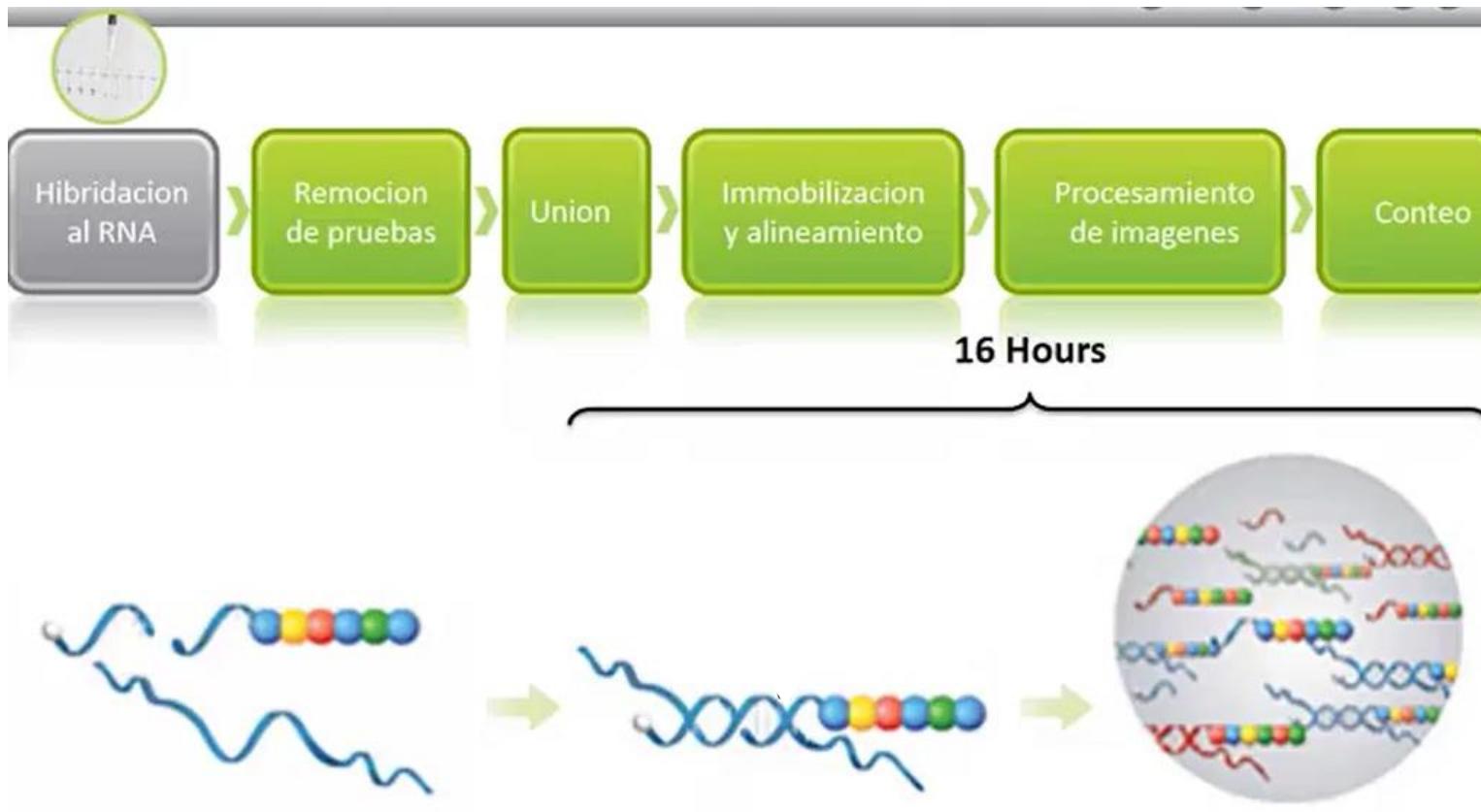


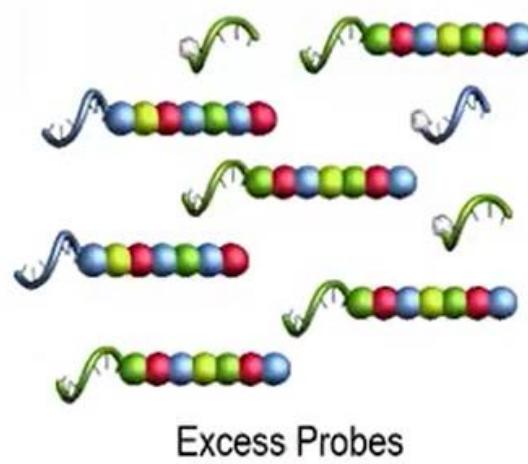
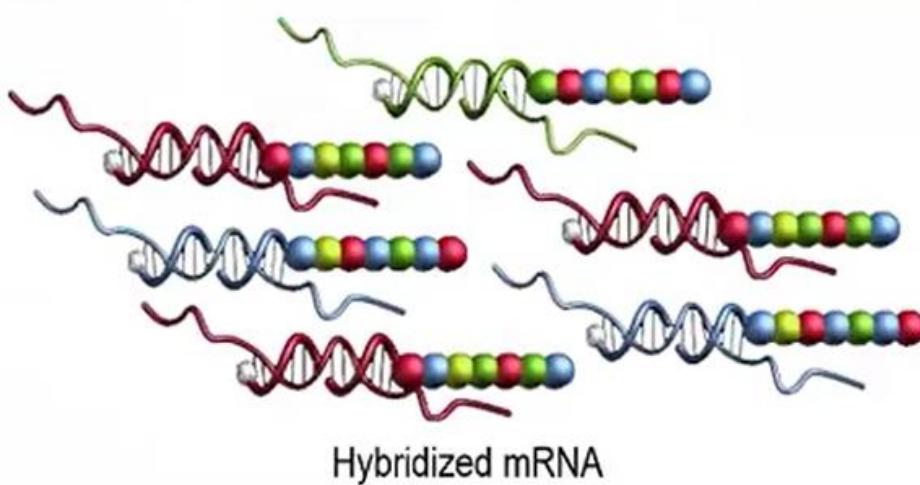
Digital counting of single molecules

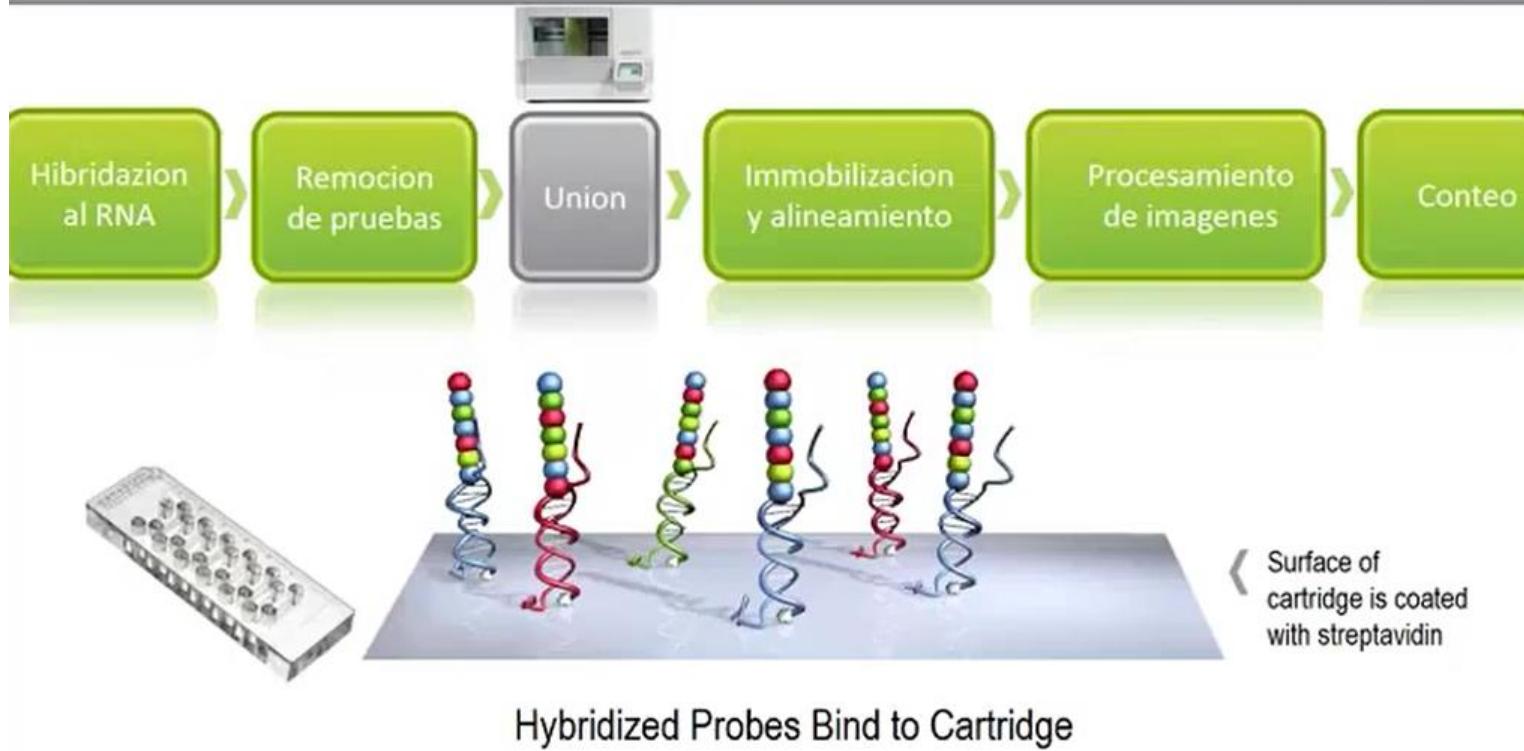
- Probes up to 800 genes simultaneously
- **Digital gene expression** applied to biological pathways



**Single molecule fluorescent barcodes**  
each attached to an individual nucleic acid molecule

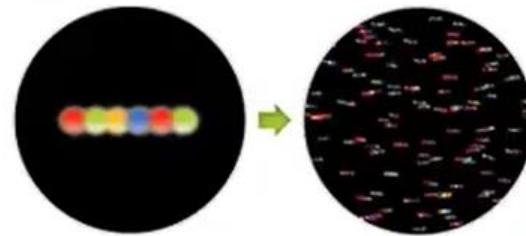


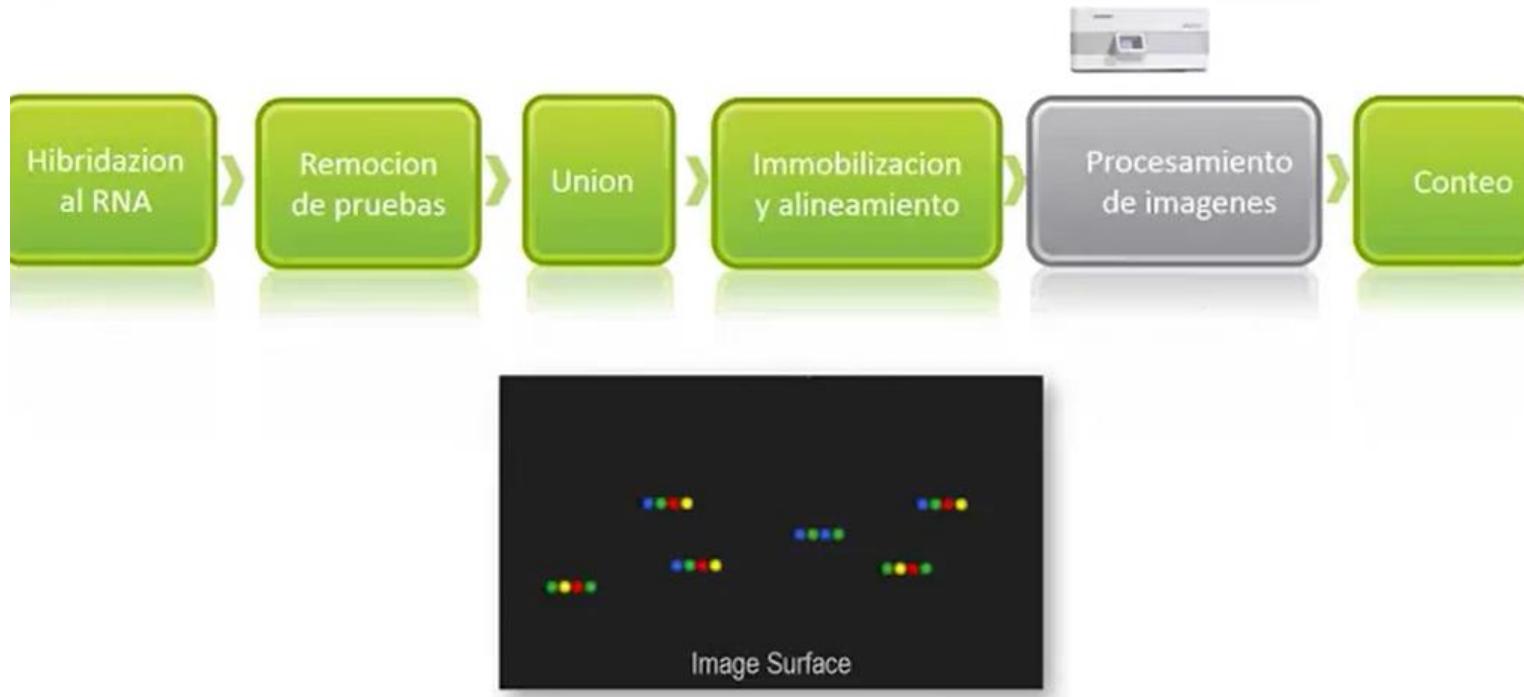






Immobilize and align reporter for image collecting and barcode counting

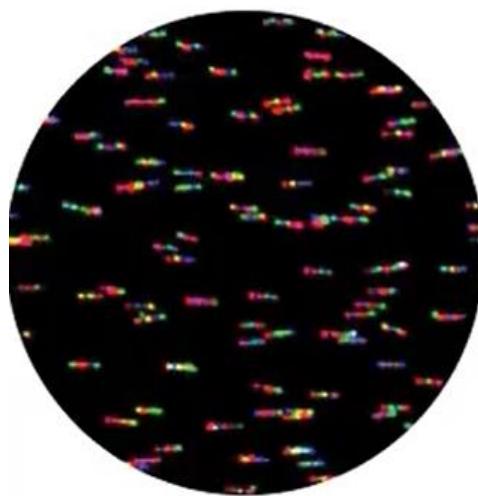






Codigo	Gen	Conteo
●●● ●●● ●●●	x	3
●●●	y	1
●●● ●●●	z	2

Conteo y tabulacion de codigos

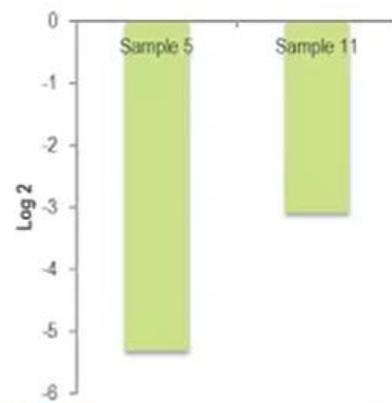


Codigo	Gen	Conteo
█████	x	3
███	y	1
███	z	2

Analisis de 800 objetivos moleculares por reaccion

Gene	Muestra 1	Muestra 5	Muestra 11
	Tratamiento Grupo A	Tratamiento Grupo B	Control Grupo C
SPP1	8,002	201	948
GAPDH	7,452	1,621	1,370
PLA2G2A	6,884	449	948
HSP90AB1	2,751	915	632
TGFBI	2,096	816	1,054
TIMP1	2,034	473	948
PGK1	1,427	1,420	632
MCL1	1,320	1,374	421
FAT1	1,303	208	948
STAT3	1,270	1,554	1,054
PLG	1,129	7,935	527
XRCC5	1,113	1,854	1,791
COL1A1	1,080	272	1,054
ERBB2	1,028	106	421

Cambio relativo a la muestra 1 (Log2)



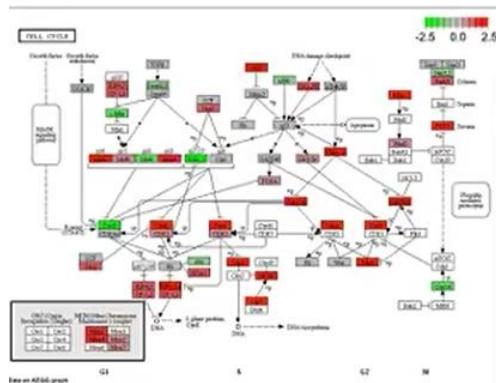
**Datos digitales y Visualizacion de Resultados:** via nSolver



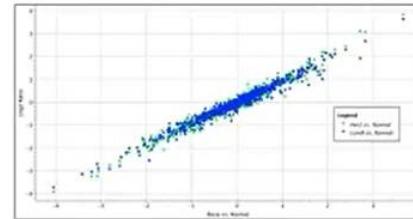
## Analisis Estadistico



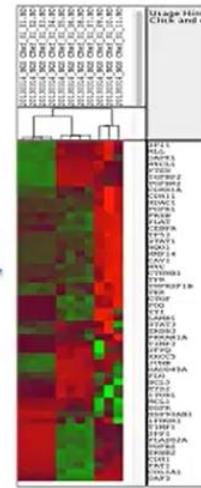
## Analysis de Expression



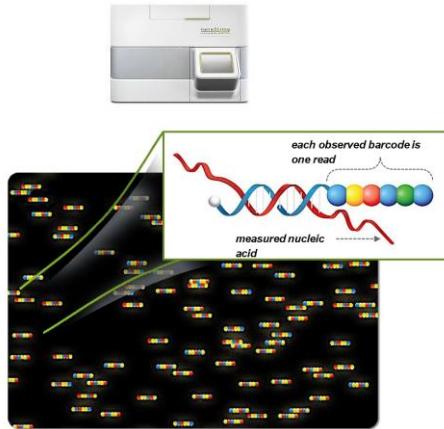
© 2015 NanoString Technologies, Inc. All rights reserved.



## Aglomeracion y “Heat Map” Analysis



# Características más relevantes del test



The surface is imaged and reporter probes are decoded

Identity	Color code	Counts
Gene 1		3
Gene 2		2
...		
Gene $n$		1

- Análisis y detección digital.
    - Single molecule fluorescent barcodes, each attached to an individual nucleic acid.
    - Digital counting: 1 read = 1 molecule
  - Cuantificación directamente de las moléculas (DNA, mRNA, etc.) sin necesidad de amplificación de ácidos nucleicos ni proteínas.
  - Flexibilidad en el tipo de muestra:

RNA o DNA a partir de FFPE, plasma, suero y otros biofluidos, muestras originadas a partir de sistemas de microdissección por captura de laser y célula única, lisado de células y de tejidos, etc.
  - Diseñado para objetivos de secuencia corta.
  - Múltiplex:

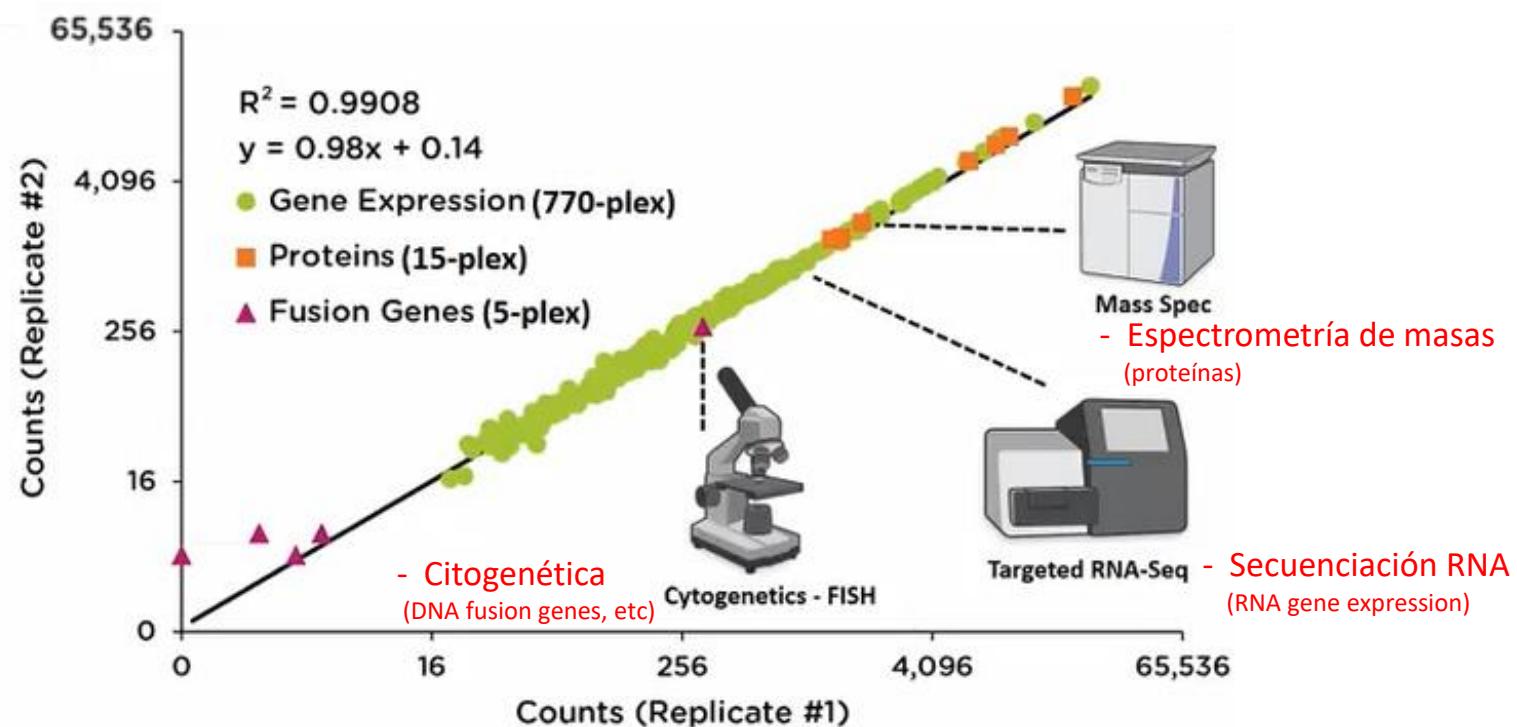
Permite analizar simultáneamente los niveles de expresión de hasta 800 genes diferentes simultáneamente con una precisión superior a la PCR en Tiempo Real.
  - Alta sensibilidad y reproducibilidad (límite de detección entre 0.1 fM y 0.5 fM).
  - Easy data analysis – nSolver analysis suite

# NanoString: ¿en qué consiste y qué nos ofrece?

- Tecnología Nanostring
- Sistema de Análisis nCounter
- **Biología en 3D**
- Aplicaciones de Nanostring

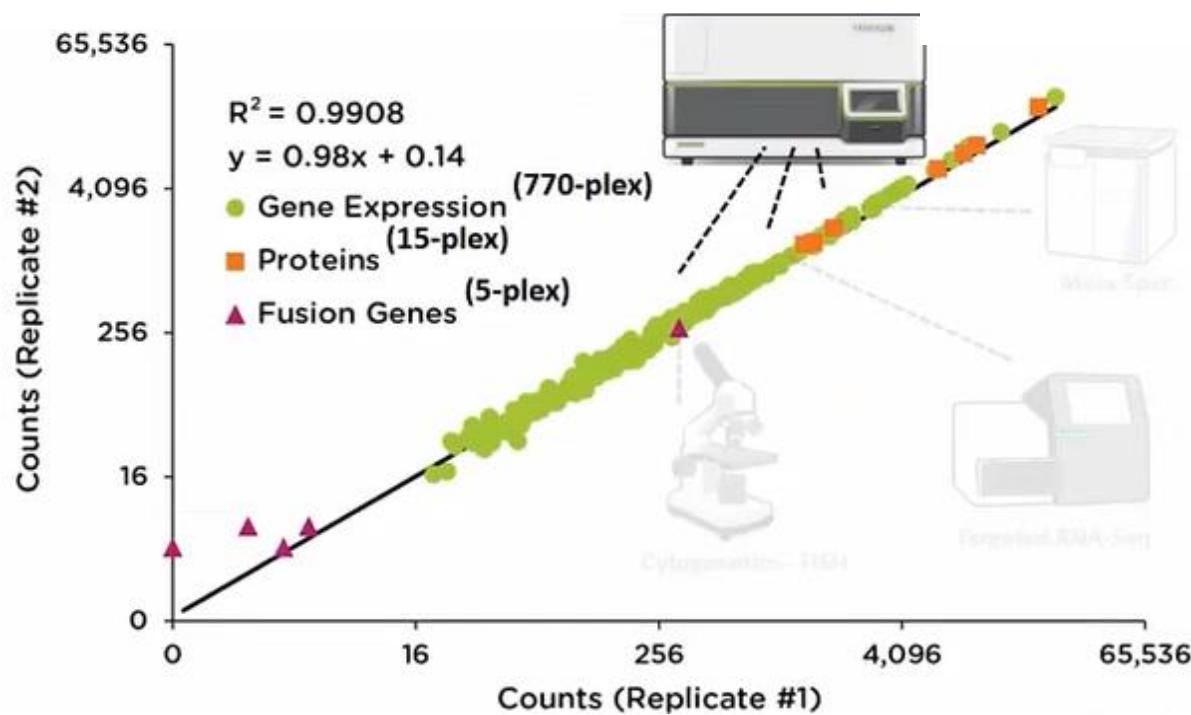
## Biología en 3D

### Analyze DNA, RNA and Protein Simultaneously

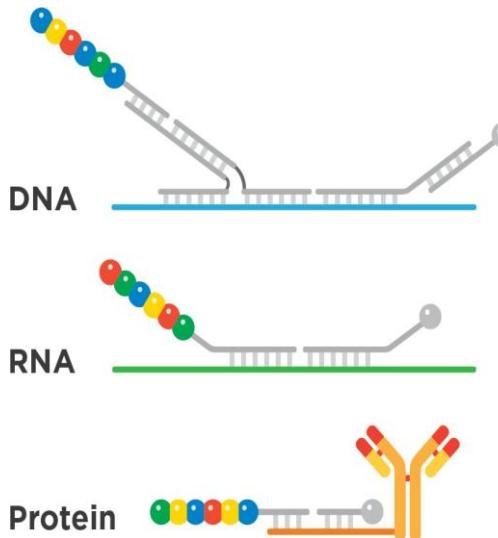
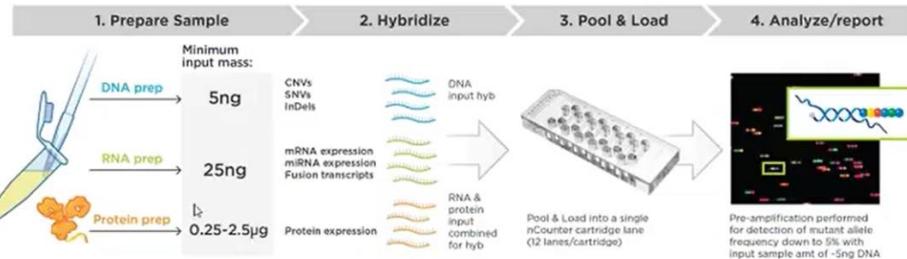


## Biología en 3D

### Analyze DNA, RNA and Protein Simultaneously

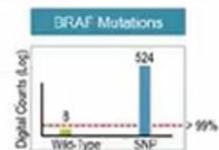
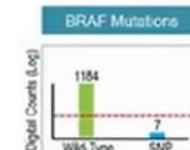
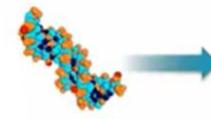


# Análisis simultáneo de DNA, RNA y Proteínas



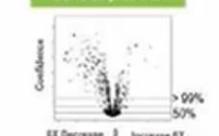
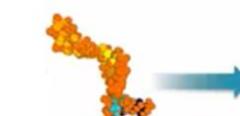
## DNA based

- mutations (SNV)
- insertions/deletions
- rearrangements/fusions
- copy number



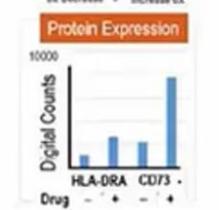
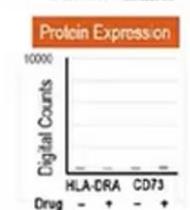
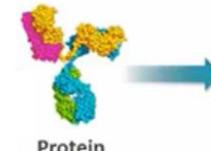
## RNA based

- gene expression (insertions, rearrangements, etc)
- miRNA



## Protein based

- protein expression



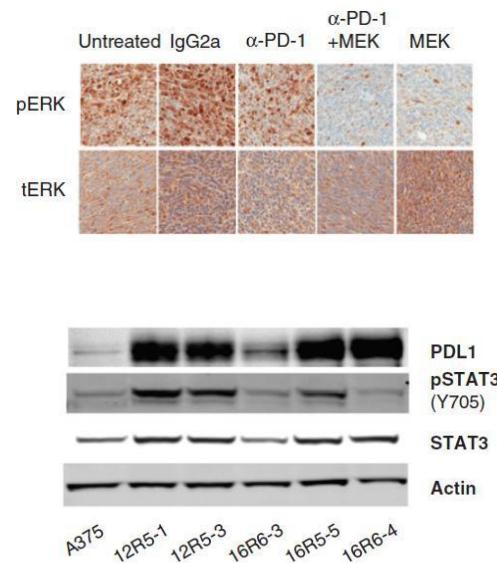
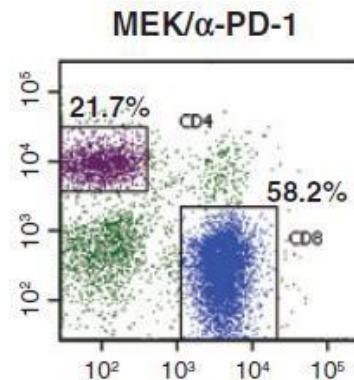
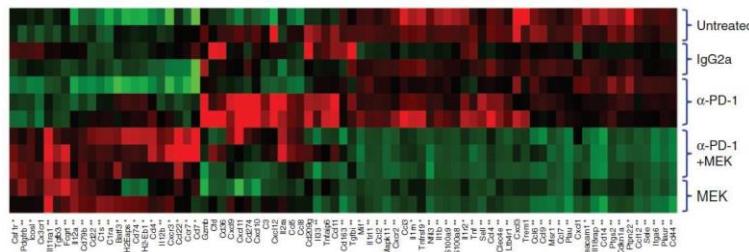
# Multi-analyte analysis to reveal molecular mechanisms in combination therapies



## The BRAF and MEK Inhibitors Dabrafenib and Trametinib: Effects on Immune Function and in Combination with Immunomodulatory Antibodies Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4

Li Liu<sup>1</sup>, Patrick A. Mayes<sup>1</sup>, Stephen Eastman<sup>1</sup>, Hong Shi<sup>1</sup>, Sapna Yadavill<sup>1</sup>, Tianqian Zhang<sup>1</sup>, Jingsong Yang<sup>1</sup>, Laura Seestalter-Wehr<sup>1</sup>, Shu-Yun Zhang<sup>1</sup>, Chris Hopson<sup>1</sup>, Lyuben Tsvetkov<sup>1</sup>, Junping Jing<sup>2</sup>, Shu Zhang<sup>3</sup>, James Smothers<sup>1</sup>, and Axel Hoos<sup>1</sup>

## Gene Expression by NanoString



# NanoString: ¿en qué consiste y qué nos ofrece?

- Tecnología Nanostring
- Sistema de Análisis nCounter
- Biología en 3D
- **Aplicaciones de Nanostring**

## Aplicaciones de Nanostring

Variación en  
numero de  
copias (ADN)



SNV (ADN)



DNA:

- Determinación en la variación del número de copias de genes
- Determinación de mutaciones a nivel de un solo nucleótido (Single Nucleotide Variation).
- Determinación de inserciones, delecciones, reordenamientos y fusiones

## Aplicaciones de Nanostring



RNA:

- Determinación de RNA
- Determinación de micro RNA
- Determinación de expresión de reordenamientos y fusiones genéticas

\* Se puede hacer con un límite de detección de una sola célula

### **Single Cell Expression Assay**

Ensayo en un solo tubo, para varias muestras que permite analizar de 20 a 800 genes simultáneamente en una única célula con alta sensibilidad minimizando la amplificación.

## Aplicaciones de Nanostring

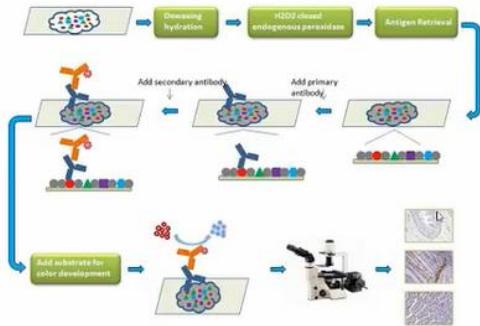
Proteínas



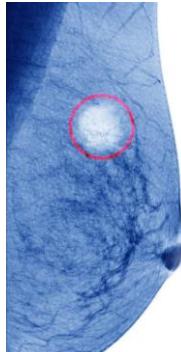
Proteínas:

- Se utilizan anticuerpos que reconocen las proteínas con una secuencia de DNA pegada. A esa secuencia de DNA se le asocia una sonda RNA nanostring con código de barras de color.

# IHQ automatizada



Smaller Biopsies



Smaller Tumors



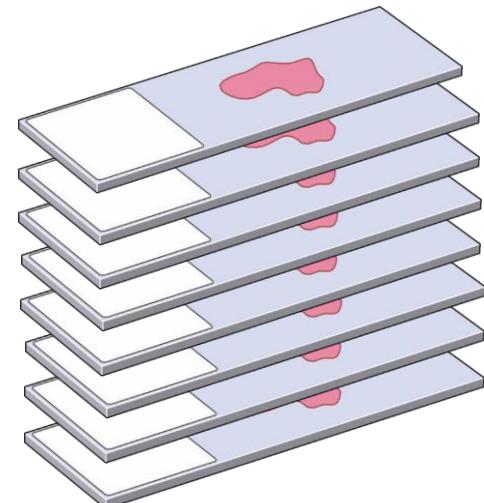
MORE Biology

Proteins

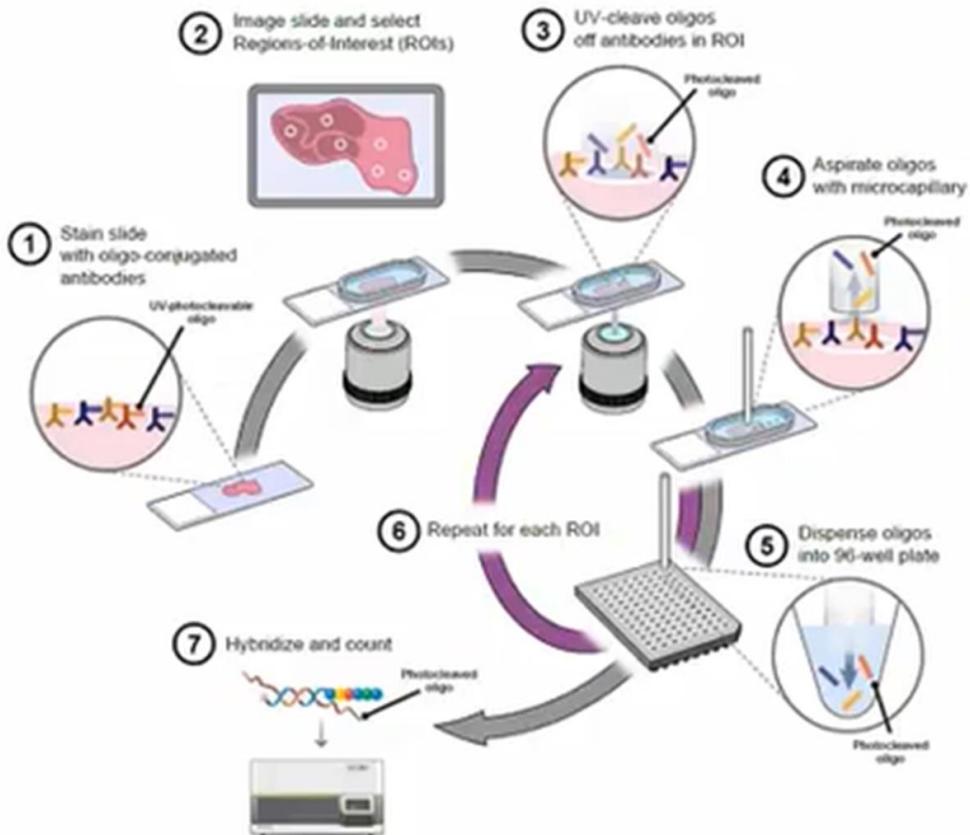
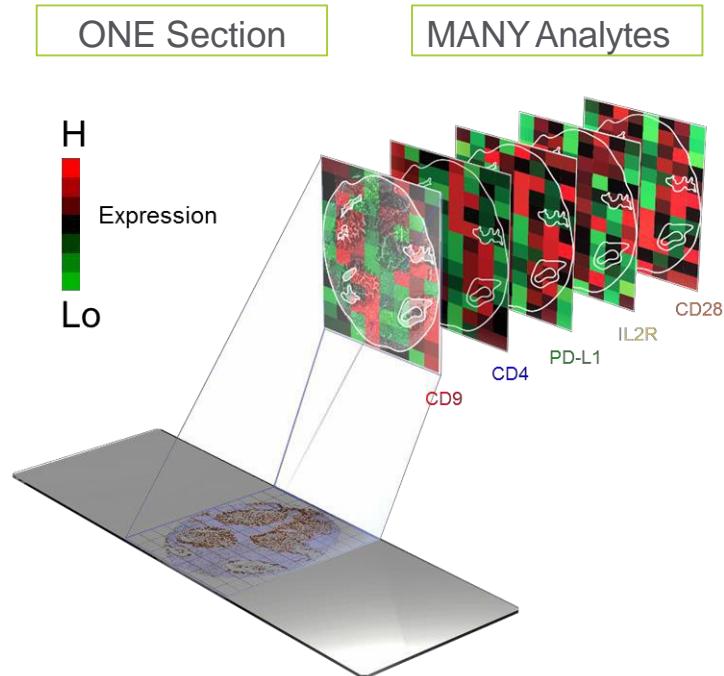
- ER
- PR
- ACTR3B
- ANLN
- BAG1
- BCL2
- BIRC5
- BLVRA
- CCNB1
- CCNE1
- CDC20
- CDC6
- CDCA1
- CDH3
- CENPF
- CEP55
- CXGC5
- EGRF
- EXO1
- FGFR4
- FOXA1
- FOXC1
- GPR160
- GRB7
- KIF2C
- HER2
- KI-67
- KNTC2
- KRT14
- KRT17
- KRT5
- MAPT
- MDM2
- MELK
- MIA
- MLPH
- MMP11
- MYBL2
- MYC
- NAT1
- ORC6L
- PHGDH
- PTTG1
- RRM2
- SFRP1
- SLC39A6
- TMEM45B
- TYMS
- UBE2C
- UBE2T

Genes

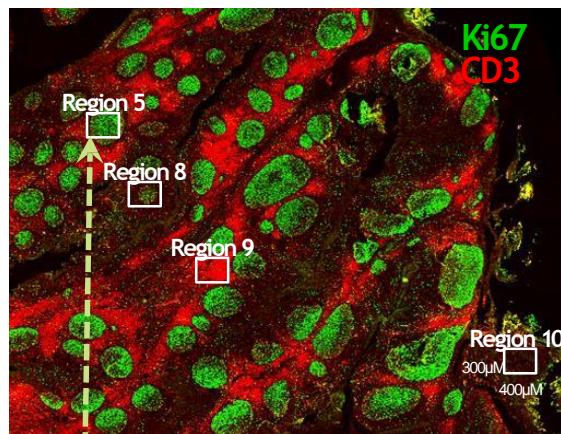
MANY Sections



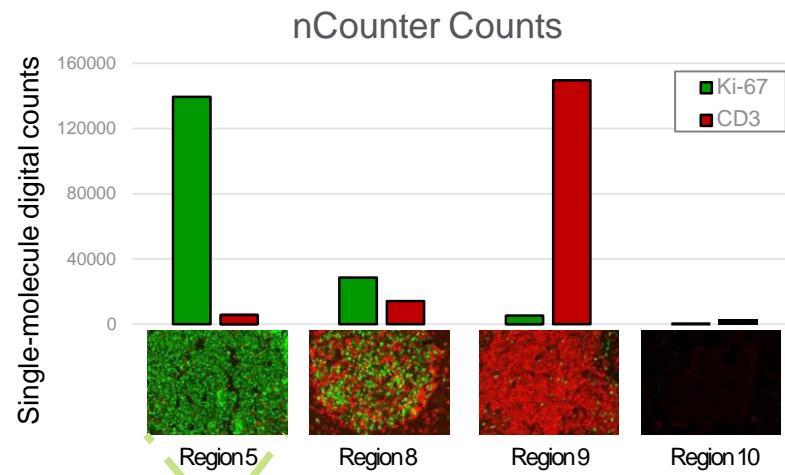
# IHQ automatizada



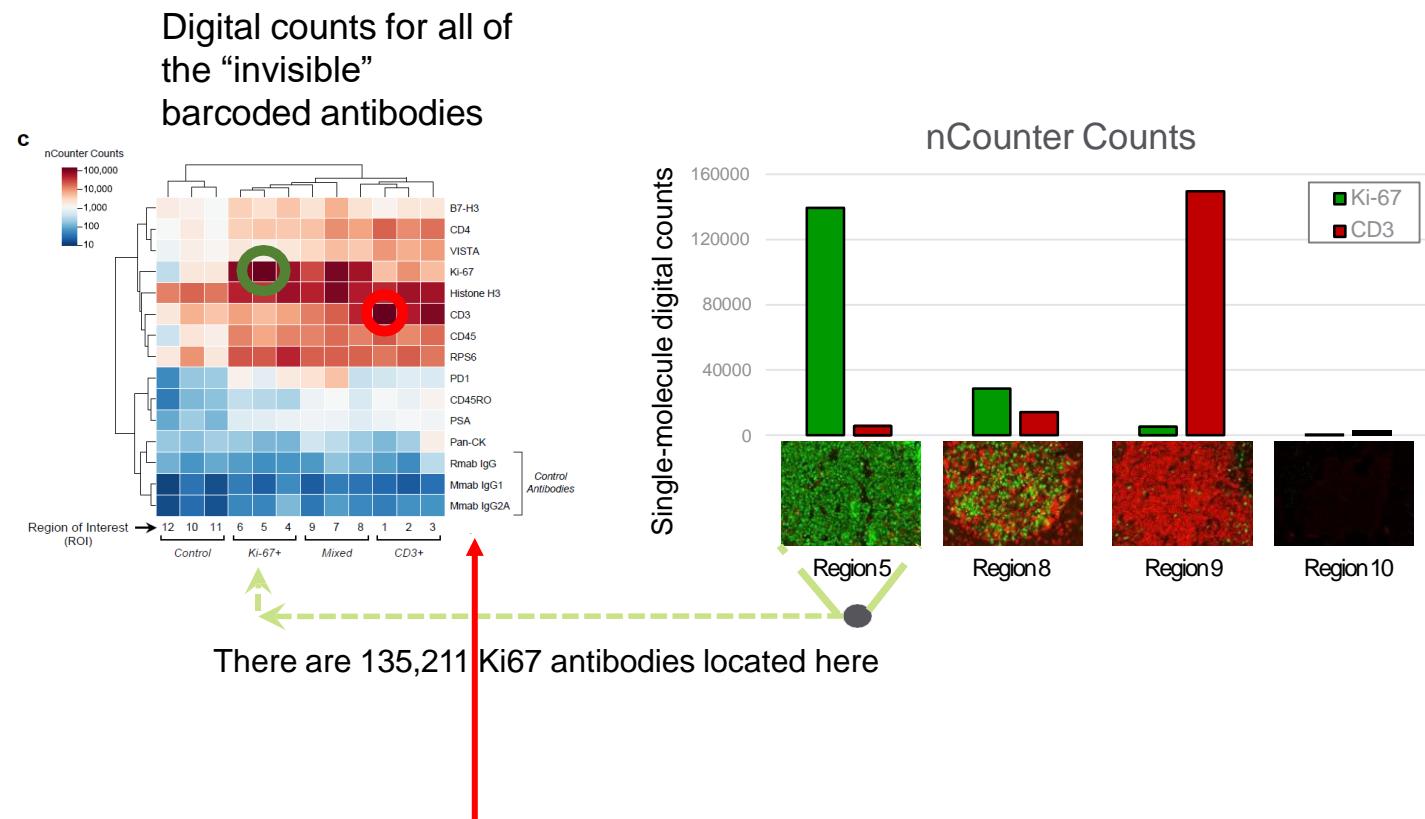
# Single-molecule counting of photocleaved oligos



There are 135,211 Ki67 antibodies located here

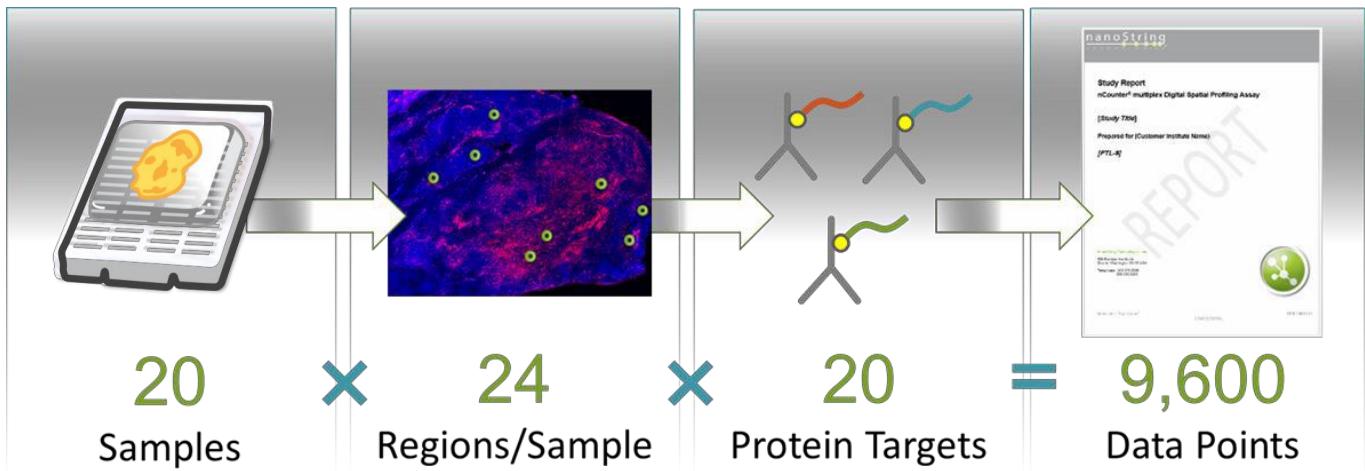


# Single-molecule counting of photocleaved oligos

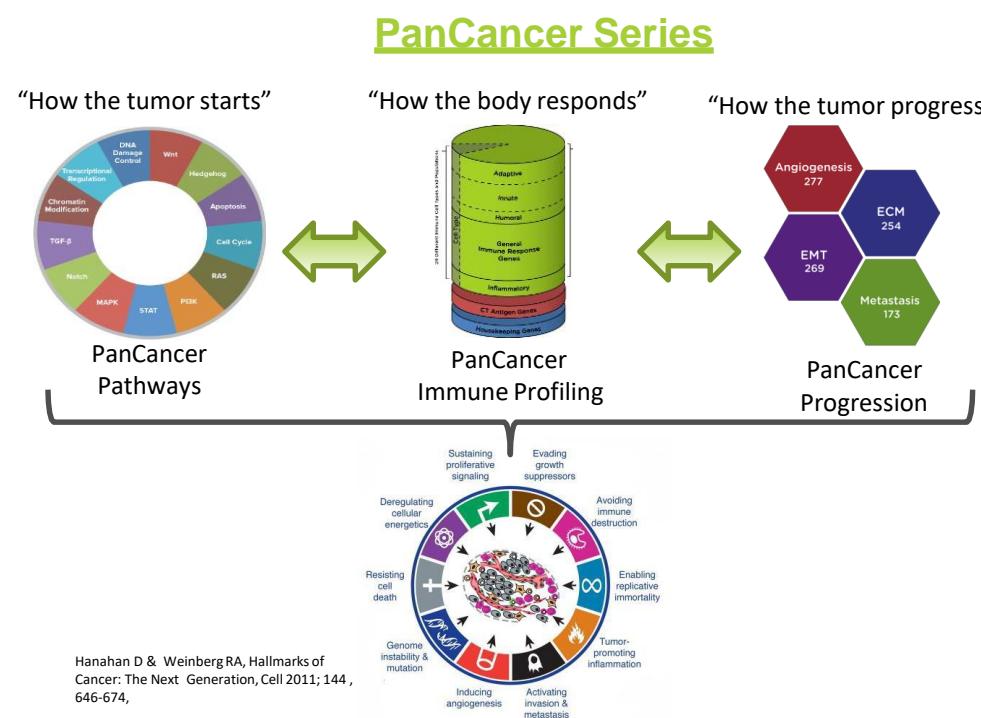


# Technology Access Program:

Multiplex many analytes on one tissue slice in a single pass



# NanoString predesigned gene expression panels



Allow rapid, tissue-sparing sample profiling and signature developments

## Biology-focused Panels

### Immune

- Immunology (broad)
- Inflammation
- Myeloid biology

### Cancer Biology

- Breast cancer biology
- Gene Fusions

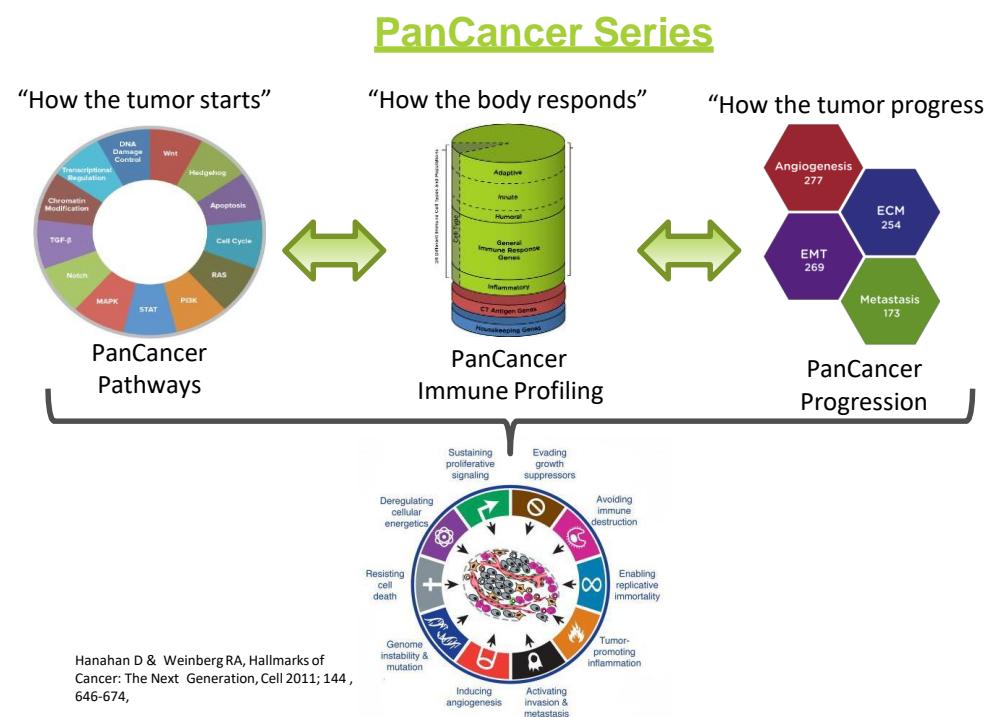
### Neurology

- Neuropathology

## Custom Content

- Up to 800 genes custom panels
- All predesigned panels can be supplemented with up to 30 custom genes

# NanoString predesigned gene expression panels



Allow rapid, tissue-sparing sample profiling and signature developments

## Biology-focused Panels

### Immune

- Immunology (broad)
- Inflammation
- Myeloid biology

### Cancer Biology

- **Breast cancer biology**
- Gene Fusions

### Neurology

- Neuropathology

## Custom Content

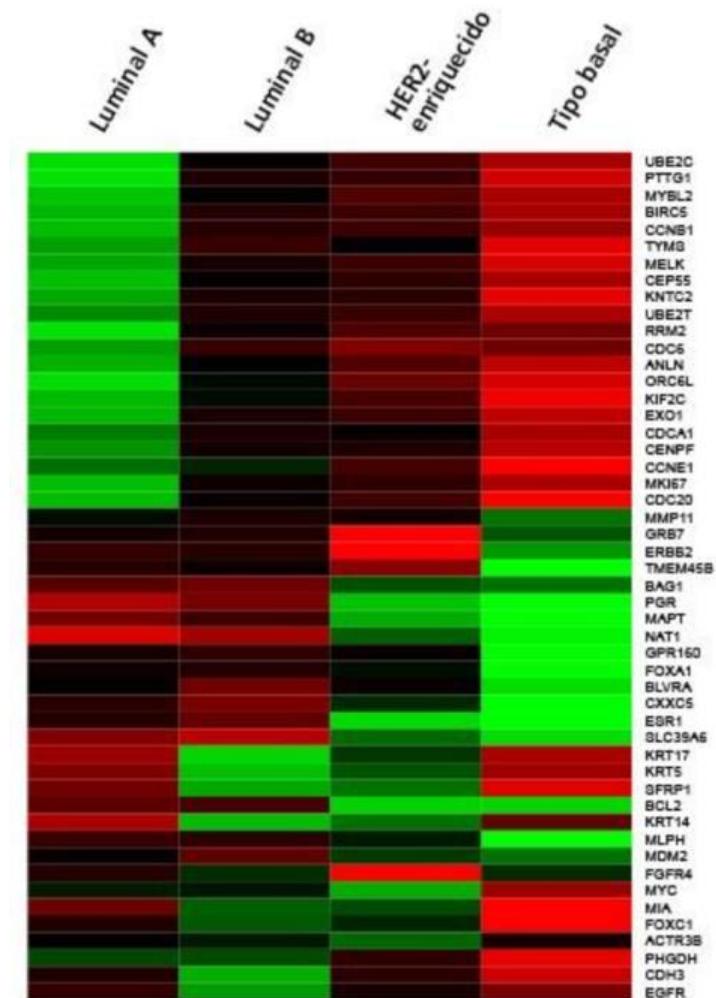
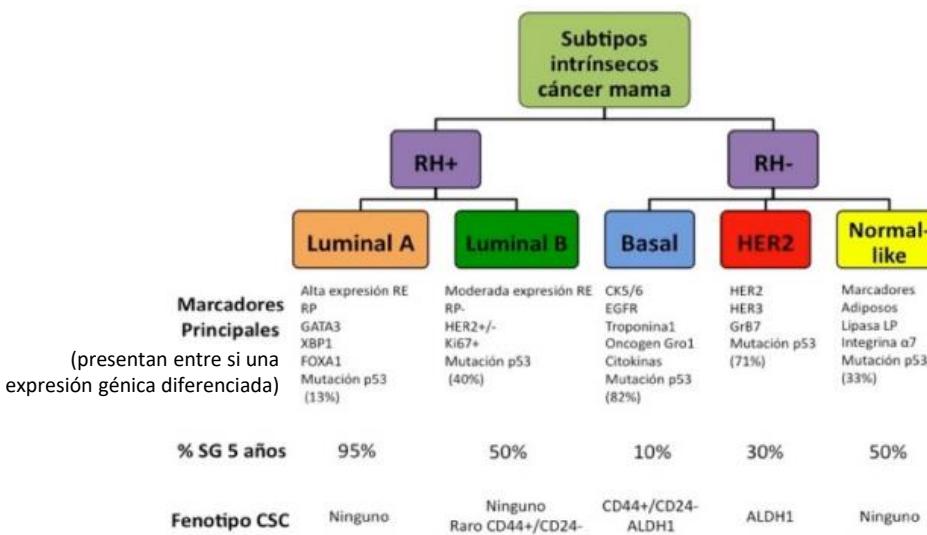
- Up to 800 genes custom panels
- All predesigned panels can be supplemented with up to 30 custom genes

## Plataformas multigénicas en cáncer de mama

	Oncotype DX®	MammaPrint®	PAM 50®	EndoPredict®	MapQuant Dx™	Breast Cancer Index™
Material	Muestras parafinadas	Muestras en fresco o parafinadas	Muestras parafinadas	Muestras parafinadas	Muestras en fresco	Muestras parafinadas
Plataforma	qRT-PCR	Microarray qRT-PCR	qRT-PCR	qRT-PCR	Microarray	qRT-PCR
Número de genes	16 genes + 5 genes de referencia	70 genes	50 genes	8 genes + 3 genes de referencia	97 genes	7 genes (2 genes + 5 genes)
Indicación	Tumores ER+, ganglios (-)	Tumores estadios I-II, < 5 cm, ER+/-, ganglios (-)	Tumores todos los subtipos, ganglios (-)	Tumores ER+ HER2-	Tumores ER+, grado II	Tumores ER+, estadios I-IIA ganglios (-)
Valor pronóstico	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Valor predictivo	Sí (predice beneficio de la quimioterapia)	Indirecto*	Sí	Indirecto	Sí (predicción de respuesta a tamoxifeno)	Sí (predicción de respuesta a tamoxifeno)

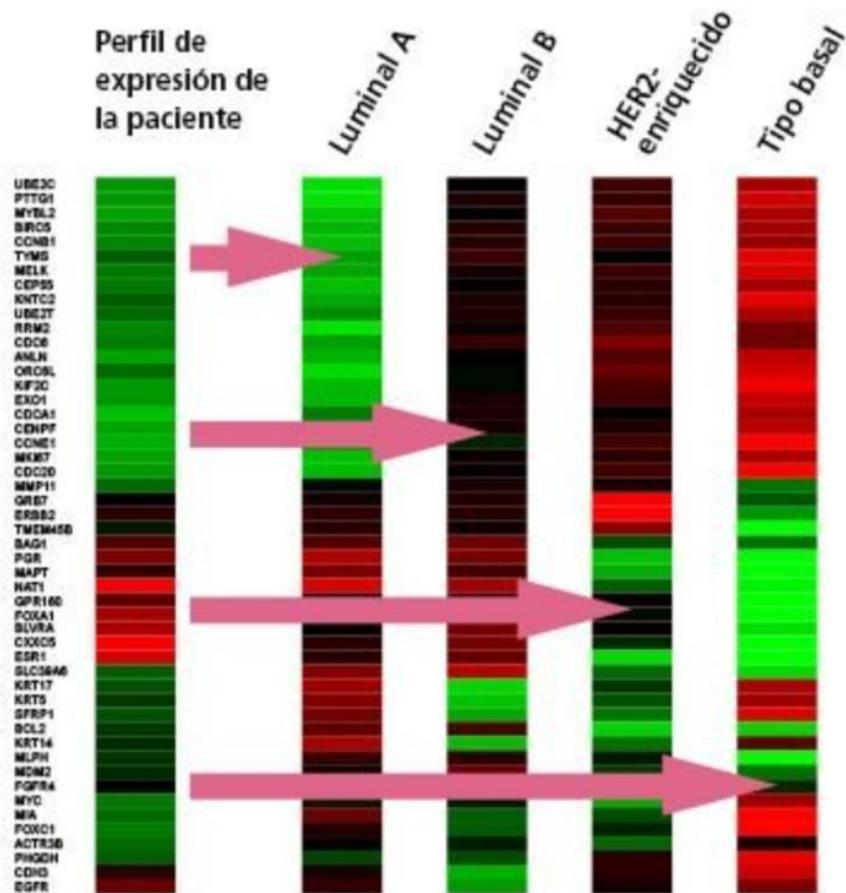
# PAM50/Prosigna

- Cuantifica la expresión de mRNA de 50 genes mas 5 genes control.
- Subdivide y reconoce los 4 subtipos intrínsecos  
(PAM50 aprobado como instrumento para clasificar el cáncer de mama según su subtipo intrínseco)



# PAM50/Prosigna

- Cuantifica la expresión de mRNA de 50 genes mas 5 genes control.
- Subdivide y reconoce los 4 subtipos intrínsecos (presentan entre si una expresión génica diferenciada).
- Compara el perfil de expresión génica del tumor de una paciente con cada una de las firmas genéticas de los subtipos intrínsecos definidos para determinar el grado de similitud.



Nielsen T et al, 2013, y de Gnant M et al, 2012.

# PAM50/Prosigna

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

## Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes

Joel S. Parker, Michael Mullins, Maggie C.U. Cheang, Samuel Leung, David Voduc, Tammi Vickery, Sherri Davies, Christiane Fauron, Xiaping He, Zhiyuan Hu, John F. Quackenbush, Inge J. Stijleman, Juan Palazzo, J.S. Marron, Andrew B. Nobel, Elaine Mardis, Torsten O. Nielsen, Matthew J. Ellis, Charles M. Perou, and Philip S. Bernard

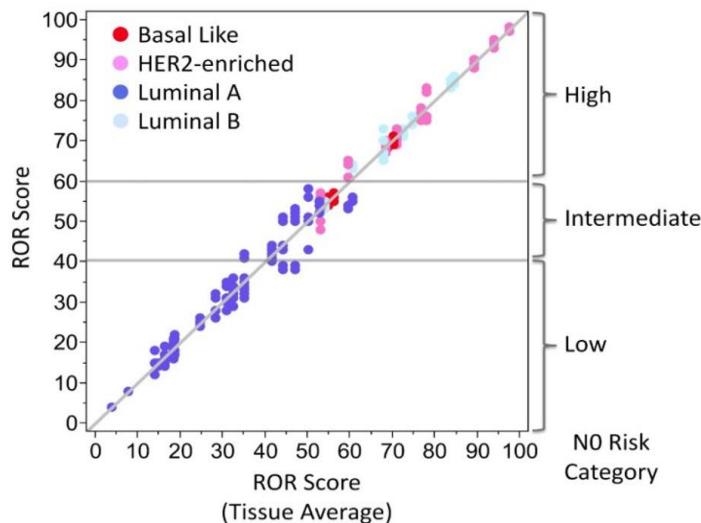
## Riesgo de Recurrencia (escala de 0 a 100)

Calculado a partir de:

- Subtipo intrínseco
- Tamaño del tumor
- Estatus ganglionar
- Índice de proliferación

Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens

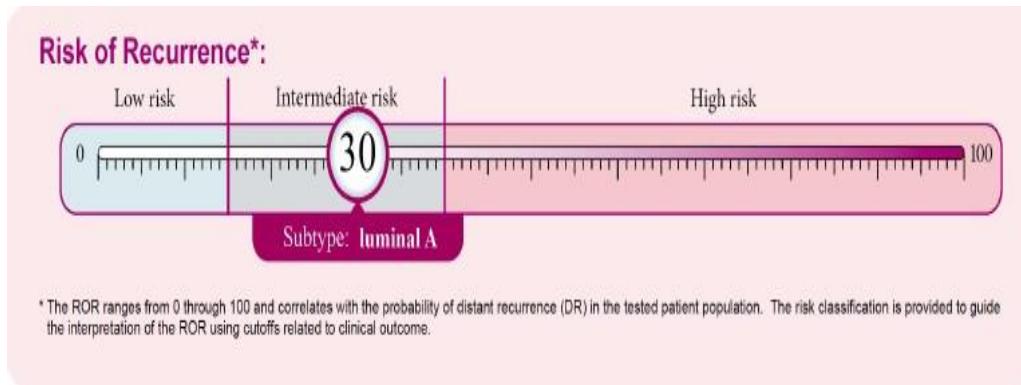
Torsten Nielsen<sup>1,A\*</sup>, Brett Wallden<sup>2</sup>, Carl Schaper<sup>3</sup>, Sean Ferree<sup>2</sup>, Shuzhen Liu<sup>1</sup>, Dongxia Gao<sup>1</sup>, Garrett Barry<sup>1</sup>, Naeem Dowidar<sup>2</sup>, Malini Maysuria<sup>2</sup> and James Storhoff<sup>2</sup>



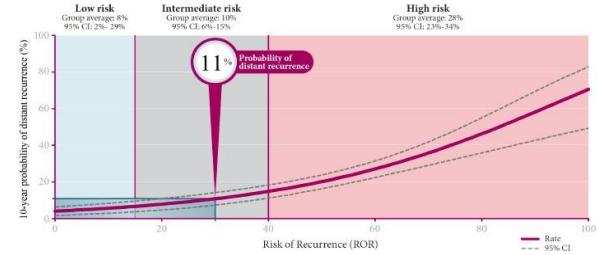
Concordancia media entre centros > 90% SD = 2,9

# PAM50/Prosigna

Análisis de datos por Algoritmo Nanostring & Informe del Test Prosigna™



## Probabilidad de recurrencia a los 10 años



- Calcula el Riesgo de Recaída a partir de un algoritmo basado en el subtipo intrínseco, el tamaño del tumor, la afectación ganglionar y el índice de proliferación.
- Estima la probabilidad de supervivencia libre de recidiva a 10 años en estadios I y II (afectación de 1 a 3 ganglios), en pacientes postmenopáusicas RE positivo tratadas con hormonoterapia adyuvante.

## Otras Aplicaciones Diagnósticas

- Linfoma de celula B difusa
- Hodgkin Linfoma
- Subtipos de meduloblastoma
- Cancer de Prostata
- Cancer de ovario

# nCounter PanCancer - Pathways Panel

- Gene Expression Panels
- Custom CodeSets Panels



Identifica la expresión génica de hasta 700 genes que capturan la actividad de 13 vías canónicas del cáncer y los genes drivers asociados:

- Notch
- Wnt
- Hedgehog
- TGFB
- MAPK
- STAT
- P13K
- RAS
- Chromatin modification
- Transcriptional Regulation
- DNA Damage Control
- Cell Cycle
- Apoptosis.

Generación de paneles personalizados

# nCounter PanCancer - Pathways Panel

- Gene Expression Panels
- Custom CodeSets Panels



Identifica la expresión génica de hasta 700 genes que capturan la actividad de 13 vías canónicas del cáncer y los genes drivers asociados:

- Notch
- Wnt
- Hedgehog
- TGFB
- MAPK
- STAT
- P13K
- RAS
- Chromatin modification
- Transcriptional Regulation
- DNA Damage Control
- Cell Cycle
- Apoptosis.

**Generación de paneles personalizados**

---

# Identification of *ALK*, *ROS1* and *RET* Fusions by a Multiplexed mRNA-Based Assay in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Samples from Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients

Noemí Reguart,<sup>1,2\*†</sup> Cristina Teixidó,<sup>3†</sup> Ana Giménez-Capitán,<sup>3†</sup> Laia Paré,<sup>2</sup> Patricia Galván,<sup>2–4</sup> Santiago Viteri,<sup>5</sup> Sonia Rodríguez,<sup>3</sup> Vicente Peg,<sup>3</sup> Erika Aldeguer,<sup>3</sup> Nuria Viñolas,<sup>1</sup> Jordi Remon,<sup>6</sup> Niki Karachaliou,<sup>3,5,7</sup> Esther Conde,<sup>8</sup> Fernando Lopez-Rios,<sup>8</sup> Ernest Nadal,<sup>9</sup> Sabine Merkelbach-Bruse,<sup>10</sup> Reinhard Büttner,<sup>10</sup> Rafael Rosell,<sup>3,5,11</sup> Miguel A. Molina-Vila,<sup>3\*</sup> and Aleix Prat<sup>1,2</sup>

---

	ALK (8 variants)	ROS (11 variants)	RET (8 variants)
<b>Gene Fusion Probes (23 pairs)</b>			
	EML4-ALK_E13:A20	CD74-ROS1_C6:R32	KIF5B-RET_K16:R12
	EML4-ALK_E20:A20	EZR-ROS1_E10:R34	KIF5B-RET_K22:R12
	EML4-ALK_E6:A20	TPM3-ROS1_T8:R35	KIF5B-RET_K23:R12
	EML4-ALK_E2:A20	LRIG3-ROS1_L16:R35	KIF5B-RET_K24:R8*
	EML4-ALK_E18:A20	GOPC-ROS1_G4:R36	KIF5B-RET_K24:R11*
	TFG-ALK_T5:A20	GOPC-ROS1_G7:R35	KIF5B-RET_K15:R11*
	KIF5B-ALK_K17:A20	SLC34A2-ROS1_S13del2046:R32	KIF5B-RET_K15:R12*
	KIF5B-ALK_K24:A20*	SLC34A2-ROS_S4:R32*	CCDC6-RET_C1:R12
		SLC34A2-ROS_S4:R34*	
		SDC4-ROS1_S4:R34	
		SDC4-ROS1_S2:R32	
<b>Imbalance Probes (24 pairs)</b>	8 probes	8 probes	8 probes
<b>Housekeeping genes</b>		GAPDH , GUSB , OAZ1 , POLR2A	

**Table 1.** Summary of results of gene fusion analyses in patients evaluable by nCounter ( $n = 98$ ).

Technique	$n = 98$	ALK	ROS1	RET	Total positive
nCounter	Positive samples	32	21	2	55
	Only 3'/5'	6 (19%)	4 (19%)	0 (0%)	
	Only specific probes <sup>a</sup>	0 (0%)	4 (19%)	0 (0%)	
	3'/5' and specific probes	26 (81%)	13 (62%)	2 (100%)	
FISH	Negative samples	66	77	96	
	Positive samples	22	27	2	51
	Negative samples	66	51	23	
IHC	No result	10	20	73	
	Positive samples	29	18		47
	Negative samples	36	60		
	No result	33	20	98	

<sup>a</sup> Samples positive for ALK specific probes but negative for ALK 3'/5' imbalance were considered as not evaluable.

**Table 3.** Concordance of nCounter (nC) with IHC, FISH for ALK and ROS1.

Gene	ALK			ROS1	
	nC <sup>a</sup> vs FISH	nC vs IHC	nC vs RT-PCR	nC vs FISH	nC vs IHC
Variable					
No. concordant samples	77	64	54	68	67
No. discordant samples	11	1	9	10	11
Diagnostic sensitivity	95.5% (CI = 78.2-99.2)	100% (CI = 88.3-100)	85.7% (CI = 68.5-94.3)	70.4% (CI = 51.5-84.2)	77.8% (CI = 54.8-91.0)
Diagnostic specificity	84.9% (CI = 74.3-91.6)	97.2% (CI = 85.8-99.5)	85.7% (CI = 70.6-93.7)	96.1% (CI = 86.8-98.9)	88.3% (CI = 77.8-94.2)
Concordance	87.5% (CI = 79.0-92.9)	98.5% (CI = 91.8-99.7)	85.7% (CI = 75.0-92.3)	87.2% (CI = 78.0-92.9)	85.9% (CI = 76.5-91.9)
Cohen's $\kappa$	0.707 (CI = 0.5-0.91)	0.969 (CI = 0.73-1.21)	0.712 (CI = 0.46-0.96)	0.701 (CI = 0.48-0.92)	0.625 (CI = 0.40-0.85)

## Lung Panel Gene Fusions

---

The Vantage 3D Lung Fusion Panel includes 63 probes: 35 for specific fusion detection, 24 for positional gene expression imbalance detection, and 4 internal reference genes.

Specific Lung Gene Fusion Probes detect the following gene fusion families:

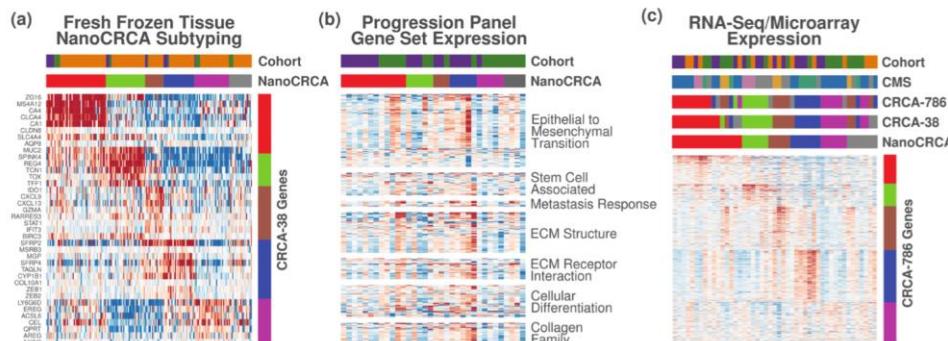
ALK	RET	ROS	NTRK1
EML4-ALK	CCDC6-RET	CD74-ROS1	CD74-NTRK1
HIP1-ALK	KIF5B-RET	EZR-ROS1	MPRIP-NTRK1
KIF5B-ALK		GOPC-ROS1	
TFG-ALK		LRIG3-ROS1	
TPR-ALK		SDC4-ROS1	
		SLC34A2-ROS1	
		TPM3-ROS1	

Lung Imbalance probes detect gene expression imbalance in the following genes:

ALK	RET	ROS
8 probes	8 probes	8 probes

# Analytical Validation of Multiplex Biomarker Assay to Stratify Colorectal Cancer into Molecular Subtypes

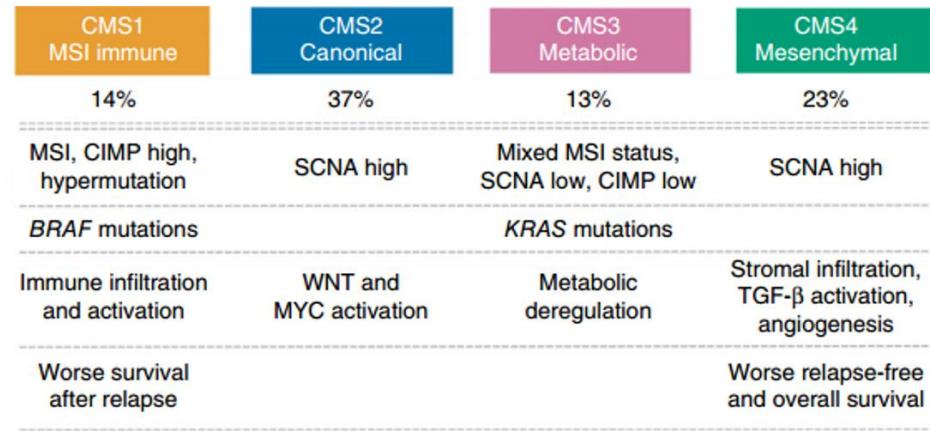
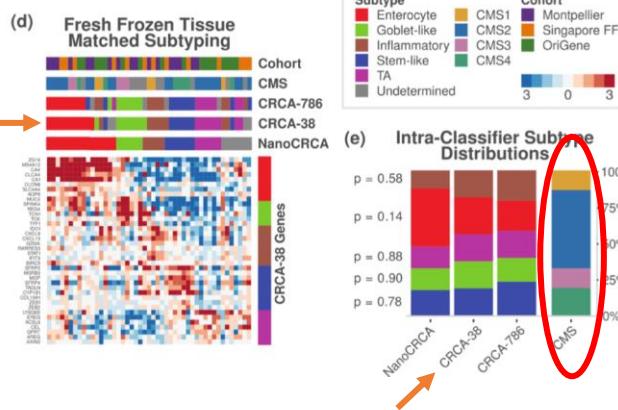
Chanthirika Ragulan<sup>1,2</sup>, Katherine Eason<sup>1</sup>, Elisa Fontana<sup>1,2</sup>, Gift Nyamundanda<sup>1,2</sup>, Noelia Tarazona<sup>3</sup>, Yatish Patil<sup>1,2</sup>, Pawan Poudel<sup>1</sup>, Rita T. Lawlor<sup>4,5</sup>, Maguy Del Rio<sup>6</sup>, Si-Lin Koo<sup>7</sup>, Wah-Siew Tan<sup>8</sup>, Francesco Sclafani<sup>9</sup>, Ruwaida Begum<sup>9</sup>, Larissa S. Teixeira Mendes<sup>2</sup>, Pierre Martineau<sup>6</sup>, Aldo Scarpa<sup>1,2</sup>, Andrés Cervantes<sup>10</sup>, Iain Beehuat Tan<sup>11</sup>, David Cunningham<sup>2,9</sup> & Anguraj Sadanandam<sup>1,2</sup>



## Custom NanoString nCounter platform-based biomarker assay (NanoCRCA) to stratify CRCs into subtypes.

38-gene panel selected using an in-house machine-learning pipeline.

NanoCRCA applied to 413 samples from 355 CRC pts.



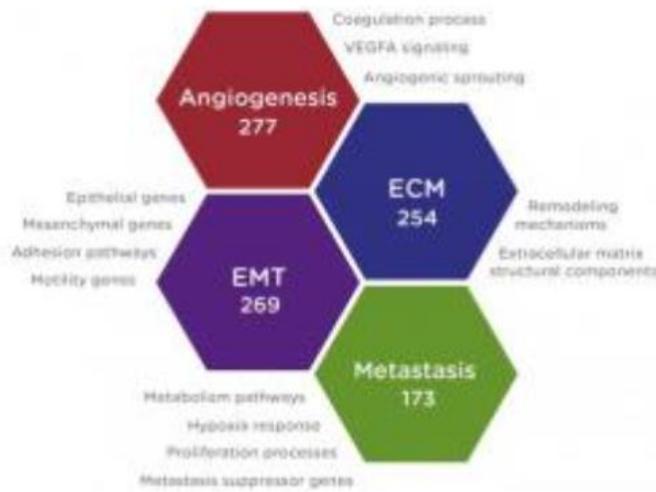
Colorectal cancers (CRCs) classified into five CRCAssigner (CRCA) subtypes with different prognoses and potential treatment responses, later consolidated into four consensus molecular subtypes (CMS). We compared the assay results with the CMS classifier, different platforms (microarrays/RNAseq) and gene-set classifiers (**38 and the original 786 genes**).

NanoCRCA classified fresh frozen and FFPE samples into all five CRCA subtypes with consistent classification of selected matched fresh frozen/FFPE samples.

We demonstrate high and significant subtype concordance across protocols (100%), gene sets (95%), platforms (87%) and with CMS subtypes (75%) when evaluated across multiple datasets. Overall, NanoCRCA assay with further validation may facilitate prospective validation of CRC subtypes in clinical trials and beyond.

# nCounter PanCancer - Progression Panel

- Gene Expression Panels
- Custom CodeSets Panels



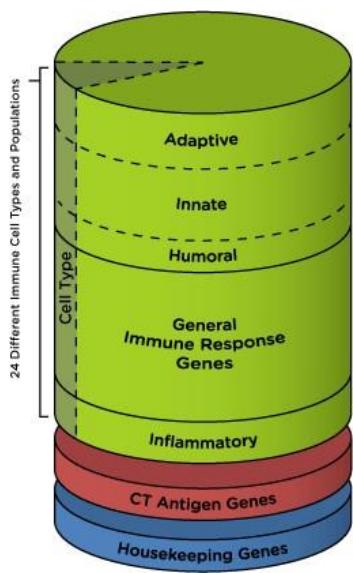
Identifica la expresión de los genes implicados en la progresión de un tumor.

Incluye los genes representativos de:

- **angiogénesis**
- **transición epitelio mesenquimal (EMT)**
- **remodelación de la matriz extracelular (ECM)**
- **metástasis.**

# nCounter PanCancer – Immune Profiling Panel

- Gene Expression Panels
- Custom CodeSets Panels



Cell profiling panel  
(30 proteins)

Cell signaling panel  
(26 proteins)

Panel de expresión génica multiplex que cuantifica 770 genes que corresponden a los perfiles de la respuesta inmune.

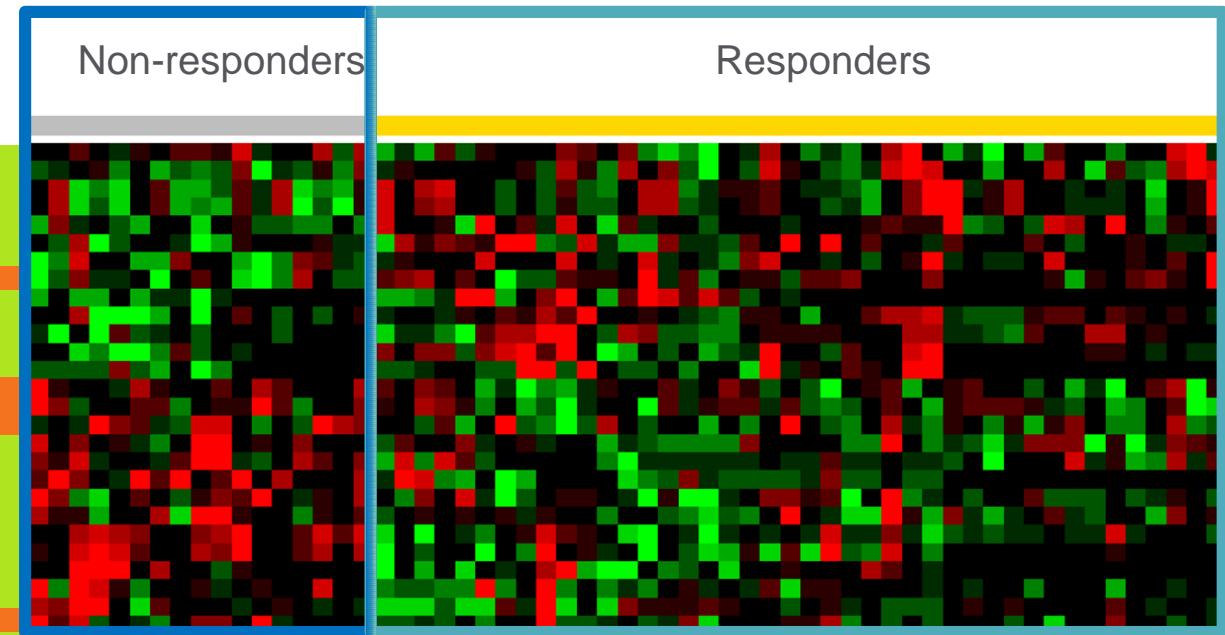
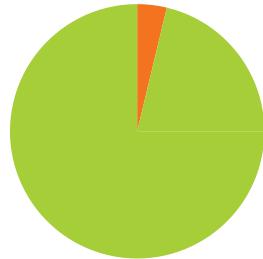
Incluye genes que representan todas las categorías de la respuesta inmune y los genes inhibidores de "checkpoint".

Immune Cell Profiling Protein	
Stage of Cancer Immunity Cycle	Associated Proteins
Antigen presentation	CD4, CD40, CD40L
Priming and activation	PD-1, PD-L1, PD-L2, IL2R, NCAM, GITR, OX40, CD27, CD28, CD127, CD137
Trafficking and infiltration	CD9
Recognition of and killing cancer cells	PD-1, PD-L1, PD-L2, BTLA, HLA-DRA
Immune modulation	PD1, ICOS, KIR3DL1, NKp46, CTLA-4, CD3E, CD8A, CD14, CD19, CD33, CD68, CD163, CD45RO, NT5E
Immune Cell Signaling Protein	
Immunologic Role	Associated Proteins
Chemokines	CCL5, CXCL5, CXCL8
Cytokines	IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TGF $\beta$ , IL-13
Transcription Factors	Aiolos, BaF, FoxP3, GATA3, Helios, Ikaros, STAT1, STAT3, T-bet, Th-Pok, IRF4, Bcl-6
Additional Immune Functions	GM-CSF, IFN $\gamma$ , Perforin, IL-15RA, PTEN, ARG1

Identifying potential biomarkers for responders vs non-responders and create potentially predictive signatures for immunotherapies.

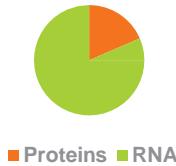
Assay:

Vantage 3D RNA:Protein Immune  
Cell Profiling  
30 protein/770 RNA (3.8% protein)



Results:

5 protein/22 RNA (18.5% protein)



# V SIMPOSIO GETHI

## NanoString: ¿en qué consiste y qué nos ofrece?

### Conclusiones:

- Cada molécula diana viene identificada por un “código de barras” molecular formado por la combinación secuencial de seis unidades de fluorocromos de cuatro colores distintos.
  - Estos códigos de barras hibridan directamente con las moléculas de interés.
  - Pueden ser cuantificadas individualmente sin ser necesaria la amplificación de las muestras.
- Permite analizar cientos de mRNAs, miRNAs, SNV, CNV o proteínas directamente mediante detección molecular digital directa, en una sola reacción en ausencia de enzimas (sin retrotranscripción ni amplificación) con una alta sensibilidad, reproducibilidad con gran capacidad de multiplexado (hasta 800 genes en la misma reacción).
- Aplicaciones potenciales:
  - Expresión génica: Paneles pre-diseñados o customizados con los targets de interés (hasta 800 dianas) con finalidad diagnóstica, pronóstica o terapéutica.
    - Paneles relacionados con el estudio del cáncer, con la expresión de genes implicados en rutas inmunológicas, inflamatorias, etc.
    - miRNAs o lncRNA: Pueden combinarse con mRNA para análisis simultáneo o para estudiar interacciones lncRNA-proteínas (Inmunoprecipitación).
  - Paneles de expresión génica prediseñados o customizados para la identificación de biomarcadores predictivos de la respuesta immune.
  - DNA: Variación de Número de Copias (CNV), mutaciones puntuales (SNV) o reordenamientos.
  - Proteómica.
  - Inmunohistoquímica automatizada.
  - Estudios de la interacción entre tumor, microambiente y respuesta immune.