

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen mit etwa 70.550 Neuerkrankungen jährlich. Zwei Drittel dieser Fälle sind ER-positiv/HER2-negativ und können mit endokrinen Therapien behandelt werden. Etwa 40% der Patientinnen entwickeln eine Resistenz gegen diese Therapien, oft aufgrund von Mutationen im ESR1-Gen (30-40%). Neuere Therapien können das Tumorwachstum bei Vorliegen solcher Mutationen verlangsamen. 2023 wurde das Medikament ORSERDU® (Elacestrant) in Deutschland für die Behandlung von ER-positivem, HER2-negativem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs zugelassen, wenn eine endokrine Therapie nicht mehr wirksam ist und eine ESR1-Mutation vorliegt. Die molekulargenetische Diagnostik auf ESR1-aktivierende Mutationen mittels Liquid Biopsy kann dabei helfen wichtige Therapieentscheidungen zu treffen und das progressionsfreie Überleben von Brustkrebspatientinnen zu verlängern.

[1] Bidard et al., Elacestrant (oral selective estrogen receptor degrader) versus standard endocrine therapy for estrogen receptor positive, human epidermal growth factor receptor 2 negative advanced breast cancer: results from the randomized phase III EMERALD trial., J Clin Oncol. 2022.[2] Bieleo et al., Genomic and clinical landscape of metastatic hormone receptors-positive breast cancers carrying ESR1 alterations., ESMO 2024.[3] Krop et al., Patisiran for oestrogen receptor-positive, aromatase inhibitor-resistant, advanced or metastatic breast cancer (FERGI): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. Lancet Oncol. 2016.[4] O'Leary et al., The genetic landscape and clonal evolution of breast cancer resistance to palbocicb plus fulvestrant in the PALOMA-3 trial. Cancer Discov. 2018.[5] Chandrasekhar et al., Prevalence of ESR1 Mutations in Cell-Free DNA and Outcomes in Metastatic Breast Cancer A Secondary Analysis of the BOLERO-2 Clinical Trial JAMA Oncology 2019.[6] Gennari et al., ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. Annals of Oncology 2019.[7] Dustin et al., ESR1 Mutations in Breast Cancer. Cancer 2019.[8] Bardia et al., Elacestrant in ER+, HER2- Metastatic Breast Cancer with ESR1-Mutated Tumors: Subgroup Analyses from the Phase III EMERALD Trial by Prior Duration of Endocrine Therapy plus CDK4/6 Inhibitor and in Clinical Subgroups, Clin Cancer Res 2024.[9] Patel et al., An emerging generation of endocrine therapies in breast cancer: a clinical perspective, npj 2023.

1

Mechanismus der Digitalisierung einer PCR

Multiplex PCR Ansatz

Digitalisierung durch Verdünnung

Amplifikation in Nanowells

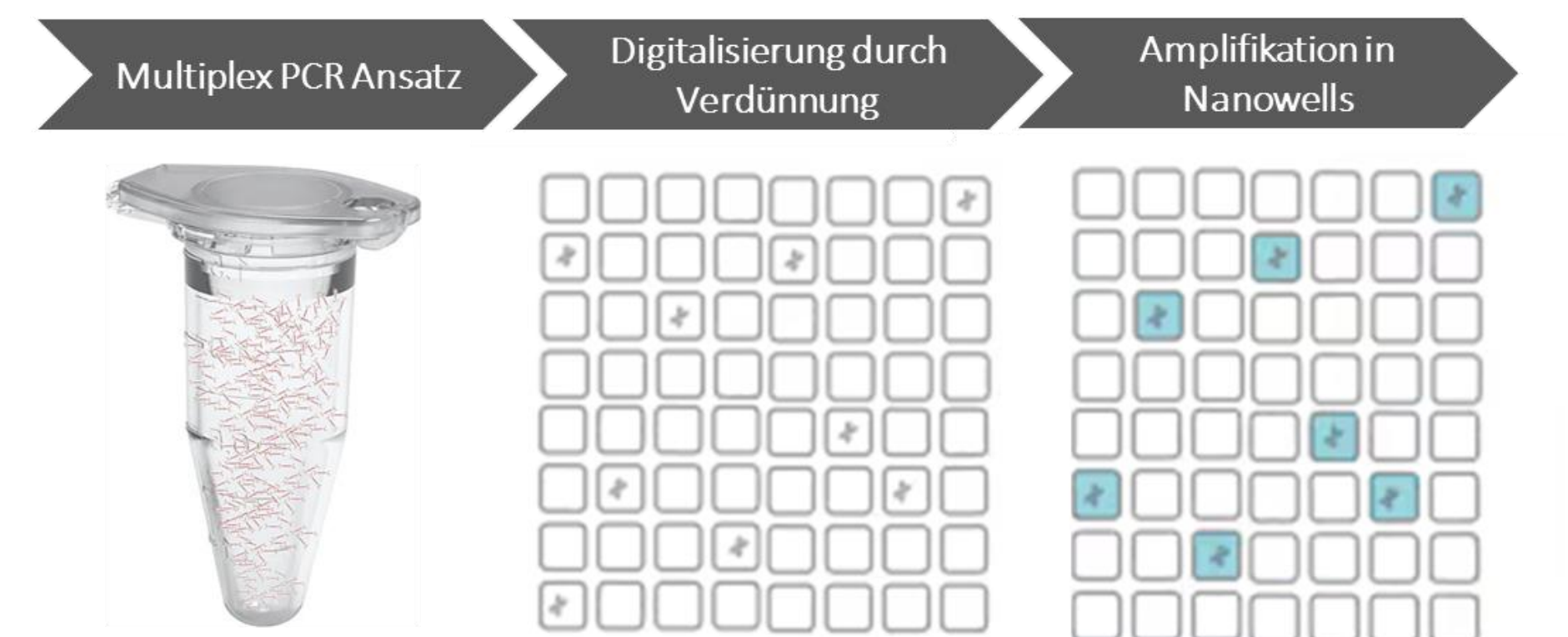


Abb.1 : Digitalisierung einer PCR [Erstellt nach Vorlage von : <https://www.thermofisher.com>]

Die Digitalisierung erfolgt durch die Verteilung der Einzeltemplates eines PCR-Ansatzes in mehrere tausend Micro Wells

Hardwarekomponenten



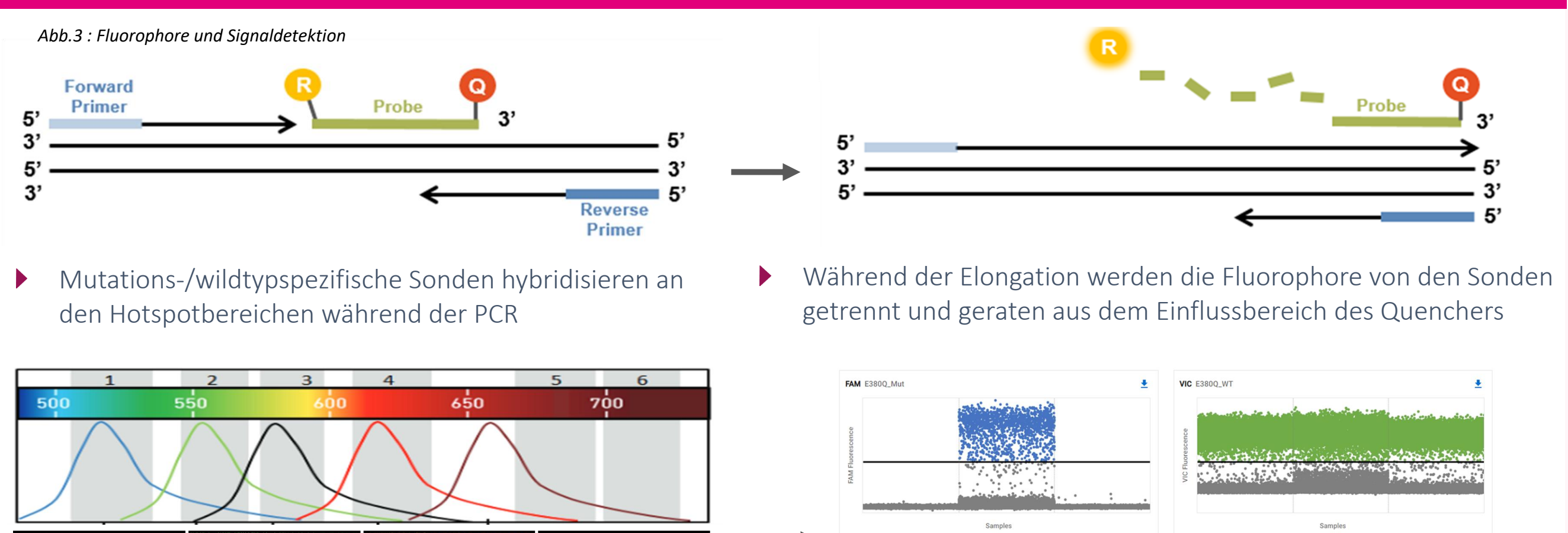
Abb.2: Hardwarekomponenten [Erstellt nach Vorlage von : <https://www.thermofisher.com>]

Reaktionsplatten mit 20.000 Micro Wells pro Ansatz

QuantStudio Absolute Q Digital-PCR-System

Signaldetektion

Abb.3 : Fluorophore und Signaldetektion



Mutations-/wildtypspezifische Sonden hybridisieren an den Hotspotbereichen während der PCR

Während der Elongation werden die Fluorophore von den Sonden getrennt und geraten aus dem Einflussbereich des Quenchers



Nach Abschluss der PCR werden die abgespaltenen Fluorophore bei spezifischen Wellenlängen zur Emission angeregt

Die Emissionssignale werden von einem Kamerasystem detektiert und von der Software quantifiziert

2

Der Östrogenrezeptor und seine Rolle bei Brustkrebs

Therapieentscheidung bei POD

Patienten mit ER+/HER2 MBC

Erstlinientherapie CDK4/6 Inhibitoren + ET

Progression of Disease (POD)

Therapieentscheidung

ESR1m+ (Elacestrant)

PIK3CAm+ (Alpelisib+Fulvestrant)

BRCA1/2m+/PALB2m+ (PARP-Inhibitor)

Others (u.a. Fulvestrant Monotherapie)

Abb.4 :ESMO Guidelines [Gennari et al., Annals of Oncology 2019]

ESR1-Mutationen entwickeln sich bei metastasierendem Brustkrebs oft nach längerer Exposition gegenüber endokrinen Therapien.

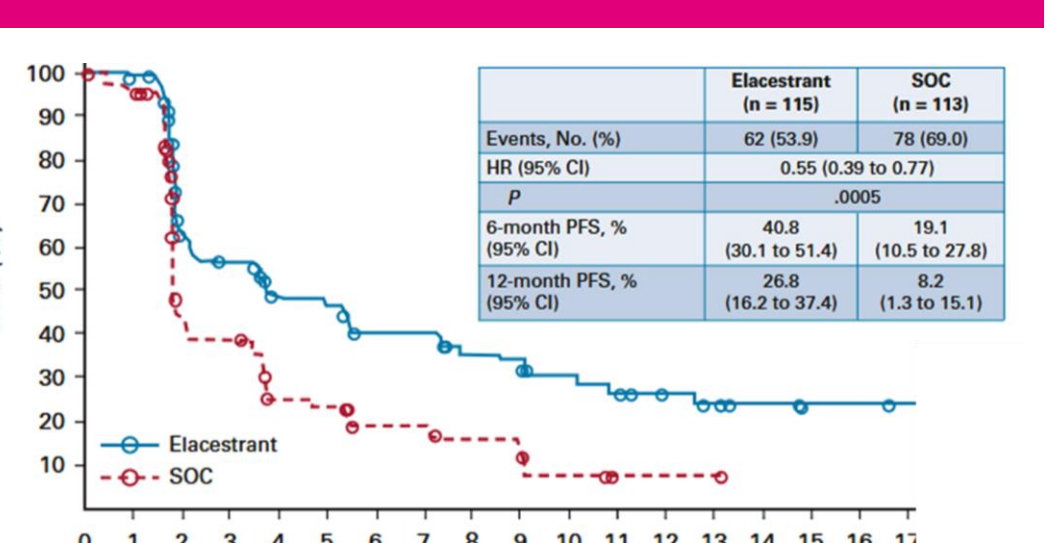
Sie können dafür verantwortlich sein, dass Patienten zunächst gut auf die Behandlung ansprechen, dann jedoch einen Rückfall erleiden.

Ursächlich ist eine Resistenz gegen die endokrine Therapie mit z.B. Aromatase-Hemmern (AI) oder Tamoxifen (SERM) .

Es kommt zu einem Fortschreiten der Erkrankung (POD).

Die molekulargenetische Diagnostik auf das Vorliegen aktivierender Mutationen wird von der ESMO bei ER+ und HER-metastasierendem oder lokal fortgeschrittenem Mammakarzinom bei Progression, nach mindestens einer endokrinen Erstlinientherapie empfohlen und ist seit Juli 2024 eine Leistung der gesetzlichen Krankenkassen.

Abb.5 : Kaplan-Meier-Plot Elacestrant vs. SOC [Bidard et al., J Clin Oncol. 2022]

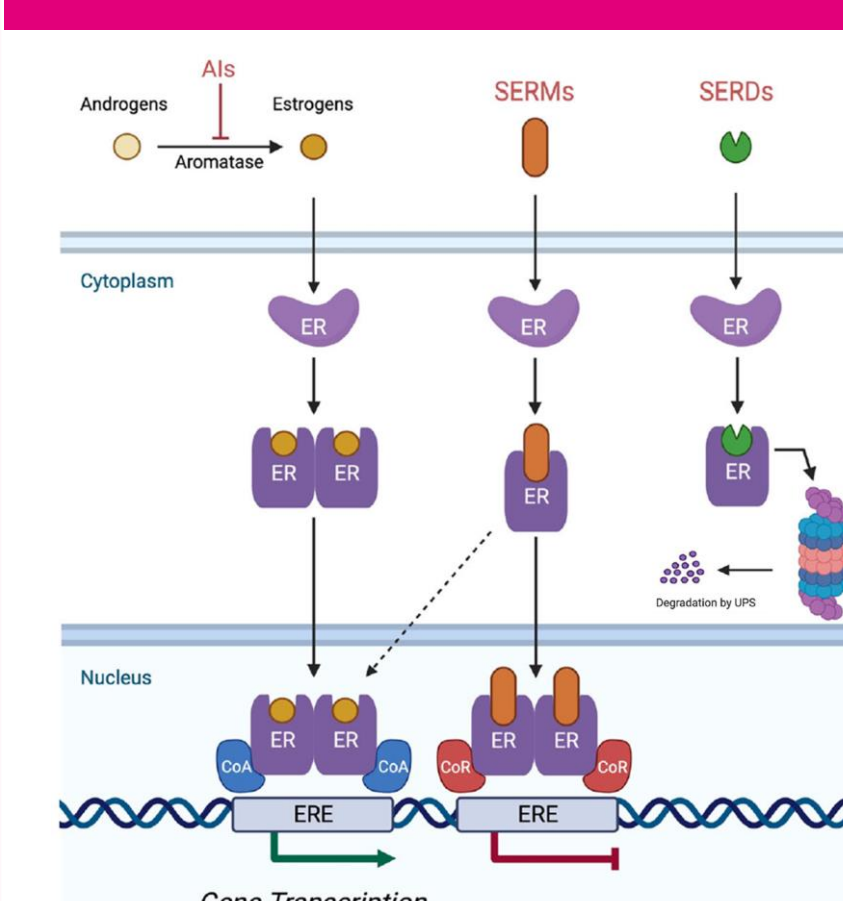


Die EMERALD-Studie untersuchte die Wirksamkeit und Sicherheit von Elacestrant, bei Patientinnen mit ER+, HER2- metastasiertem Brustkrebs, die zuvor mit endokriner Therapie behandelt wurden.

Die Studie zeigte, dass Elacestrant im Vergleich zu einer Standardtherapie signifikante Vorteile in Bezug auf das progressionsfreie Überleben bot.

Zudem wurde festgestellt, dass Elacestrant gut verträglich war und ein akzeptables Sicherheitsprofil aufwies.

Resistenzbildung bei Hormontherapie

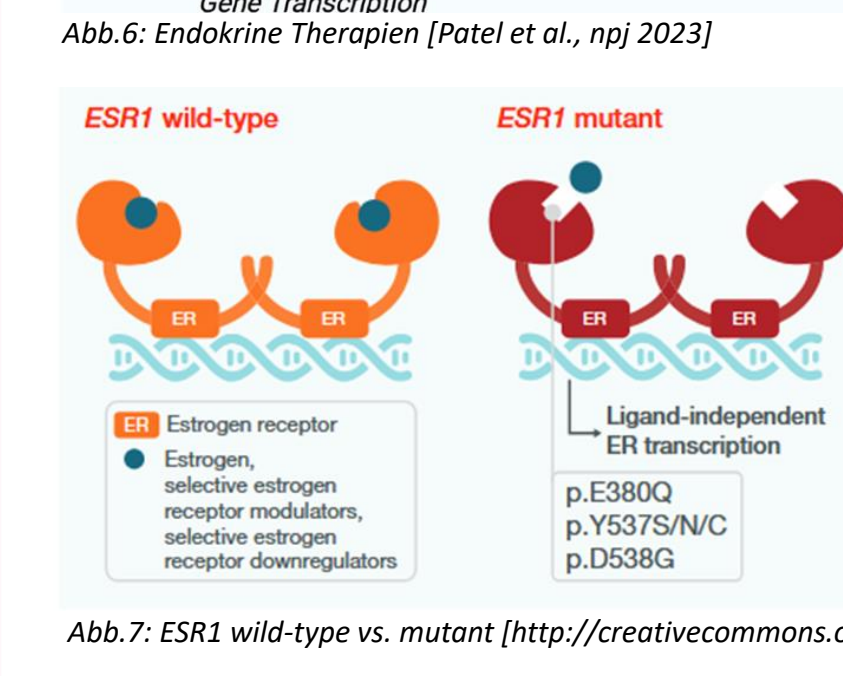


Der Östrogenrezeptor ist ein nukl. Rezeptor, der durch Östrogen aktiviert wird und die Expression von Genen reguliert, die an der Zellproliferation beteiligt sind.

Bei ER+ Brustkrebs sind die Krebszellen beim Wachstum auf Östrogen angewiesen.

Therapien mit Aromatasehemmern (AIs) oder selektive Östrogenrezeptor-modulatoren (SERMs) blockieren diesen Weg und verlangsamen das Tumorwachstum.

Abb.6: Endokrine Therapien [Patel et al., npj 2023]



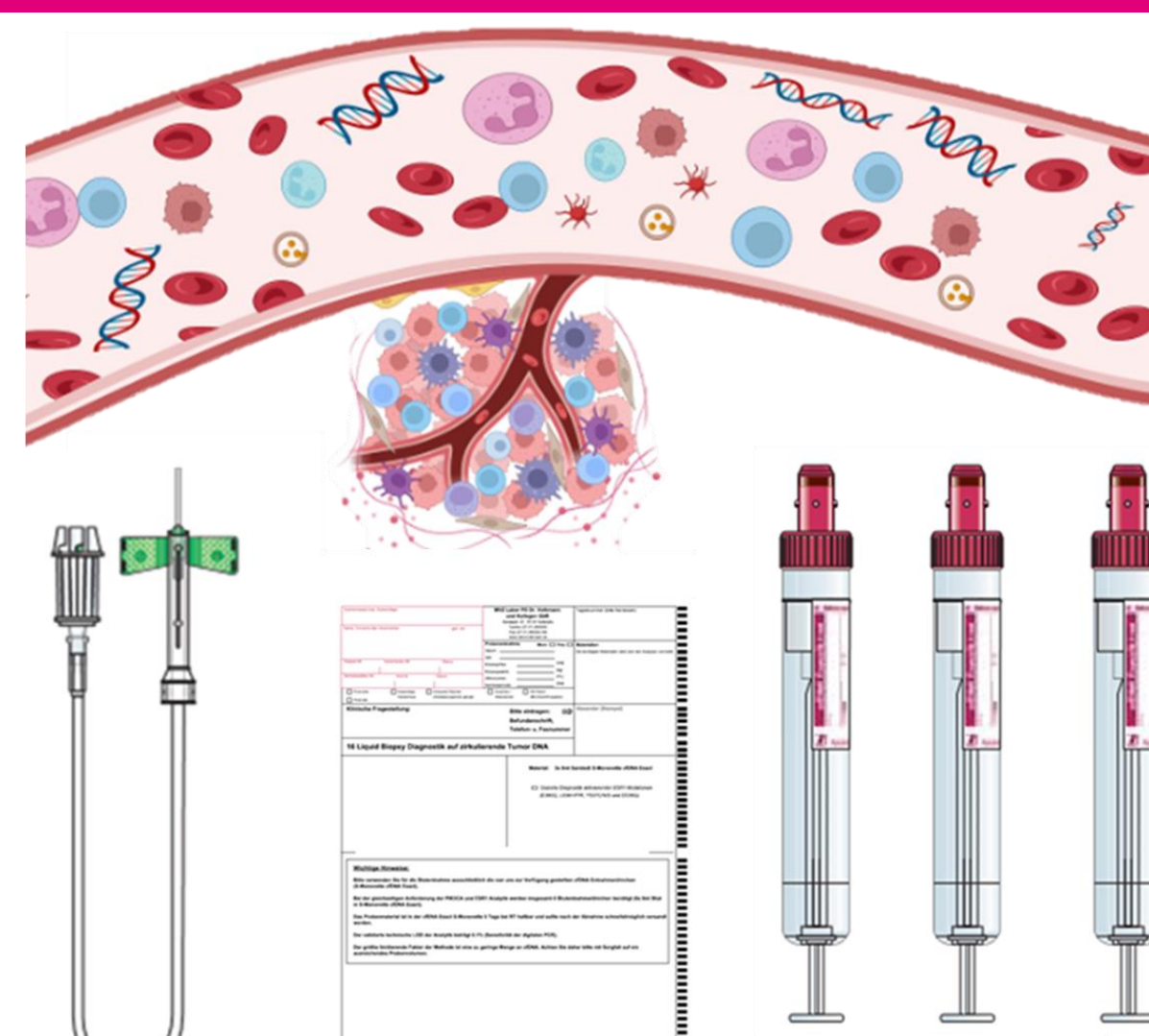
Aktivierungsmutationen im ESR1-Gen sind Veränderungen, die die Struktur des Rezeptors so verändern, dass er konstitutiv aktiviert wird, selbst in Abwesenheit von Östrogen. Dies fördert das Wachstum der Krebszellen ohne dass eine Bindung von Östrogen notwendig ist.

Die Mutationen treten häufig im Ligandenbindungsbereich des ESR1-Gens auf im Bereich der Codons 380, 537 und 538.

3

Beispiele aus der Praxis

Präanalytik



3x 9.2 ml cfDNA Exact Röhrchen von Sarstedt.

Proben müssen aufgrund der begrenzten Haltbarkeit des Materials schnellstmöglich ins Labor und dürfen nicht eingefroren werden.

Bei der Blutentnahme nicht ziehen und Kanülen der Größe G20 nutzen.

Die Qualität des Materials ist der größte limitierende Faktor der Methode. Falsche Lagerung oder mechanisches Scheren der Blutzellen kann das Material mit zellulärer DNA verunreinigen und die Sensitivität herabsetzen.

Abb.8: Abnahmesystem für die Präanalytik

ctDNA Konzentrationen und Mutationsverteilung

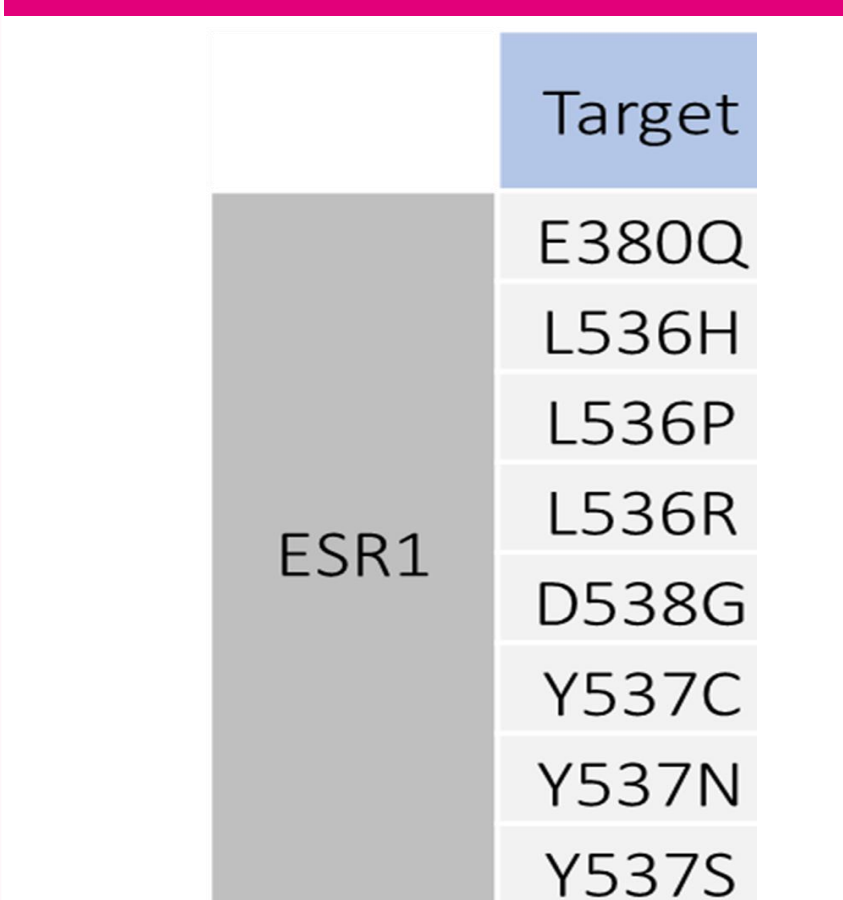


Abb.9: Liste analysierter Varianten und deren Lokalisation auf dem ESR1 Gen [Bieleo et al., ESMO 2024].

Spektrum der nachgewiesenen Mutationen des dPCR Assays und Position im ESR1 Gen.

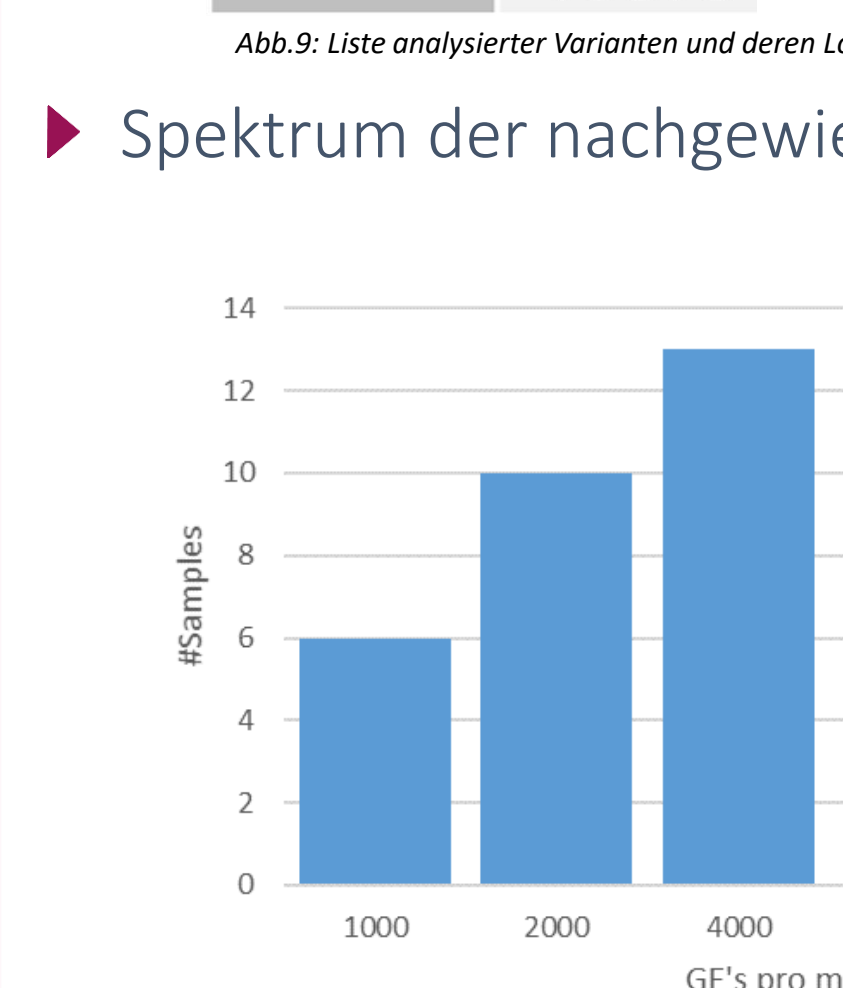


Abb.10: Konzentration an ctDNA in Patientenproben liegt im Mittel bei 4000 Kopien/ml Plasma

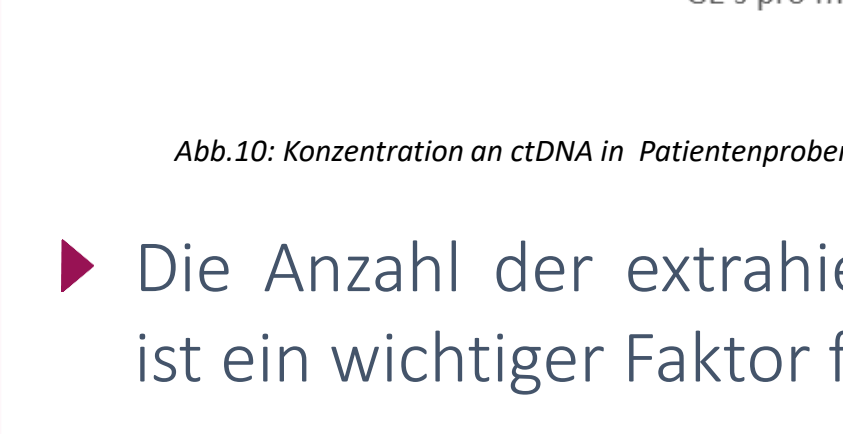


Abb.11: Detektierte Varianten in n=50 Patientenproben

Die Anzahl der extrahierten ctDNA Kopien ist ein wichtiger Faktor für die Sensitivität.

Verteilung der nachgewiesenen Mutationen in Patientenproben.

4

Vorteile der Methode

- Hohe Sensitivität und Spezifität selbst bei Allelfrequenzen von 0.1%.

Einfache, robuste Methode mit extrem schneller TAT von ca. 2 Arbeitstagen nach Probeneingang im Labor.

Absolute Quantifizierung der Wildtyp-Allele erlaubt Rückschlüsse auf die jeweils erreichte Sensitivität im Ansatz.

Nicht invasiv und kosteneffizient; keine Budgetierung.