

GBG

GERMAN  
BREAST  
GROUP



Heilung durch Innovation, Kompetenz und Partnerschaft

# Liquid biopsy markers – Alle Welt redet davon – Wo stehen wir, was macht die GBG?

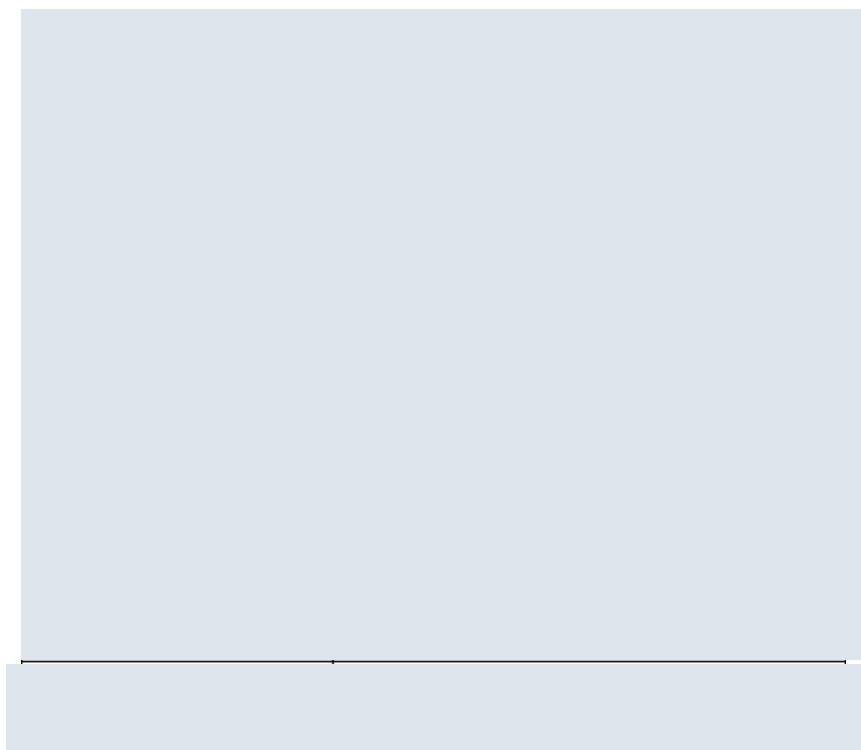


UNIVERSITÄTSKLINIKUM  
Schleswig-Holstein

PD Dr. Marion van Mackelenbergh  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Campus Kiel



# Was sind liquid biopsy marker?





## Wofür liquid biopsy markers?

- Therapieauswahl
- zur Vermeidung von ineffektiven Therapien und unnötigen Nebenwirkungen
- Evaluation neuer Therapeutika
- Therapie Monitoring - erfolgt meist über die Bildgebung – Strahlenbelastung – Belastung für die Patientin
- Schnellere/frühere Reaktion auf Veränderungen

**Neue zuverlässige Biomarker mit verbesserter Sensitivität und hoher Spezifität sind von großem klinischen Interesse**

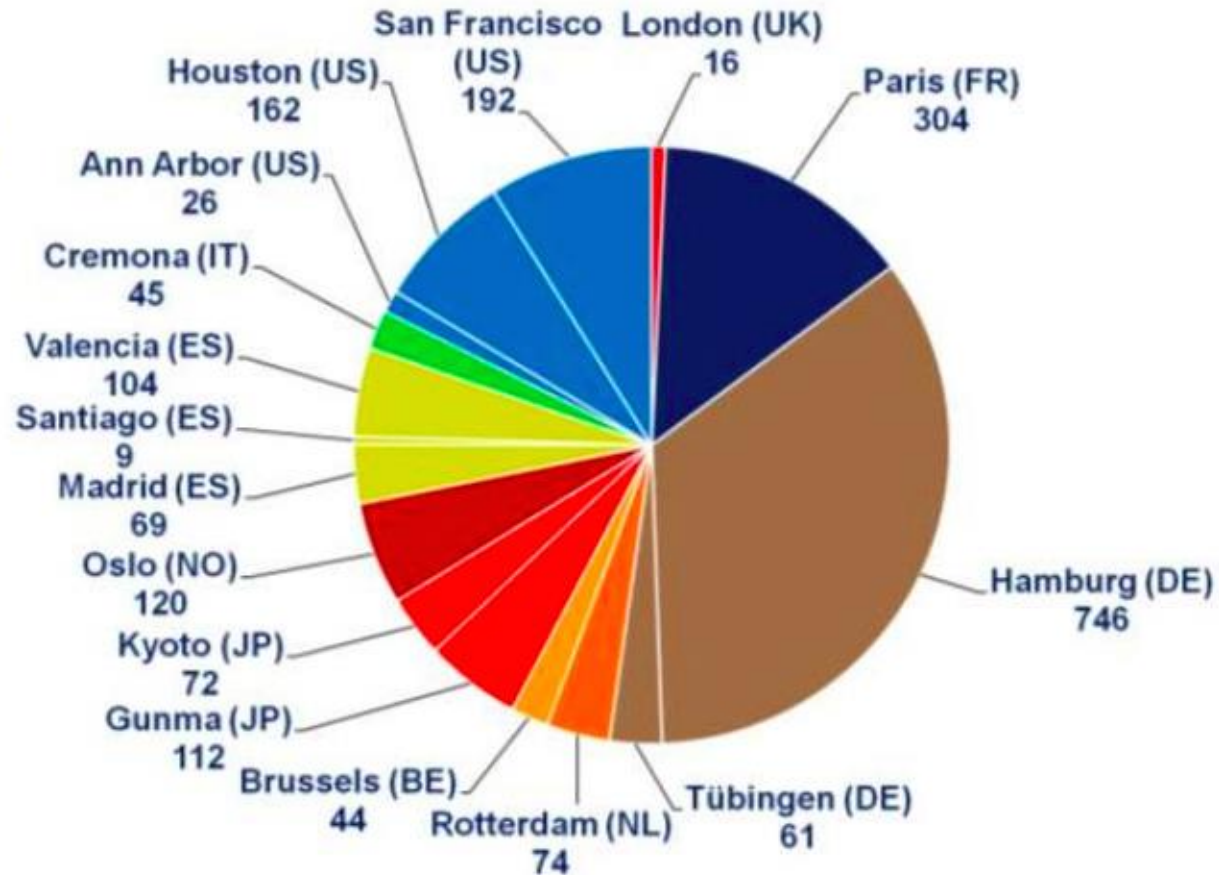
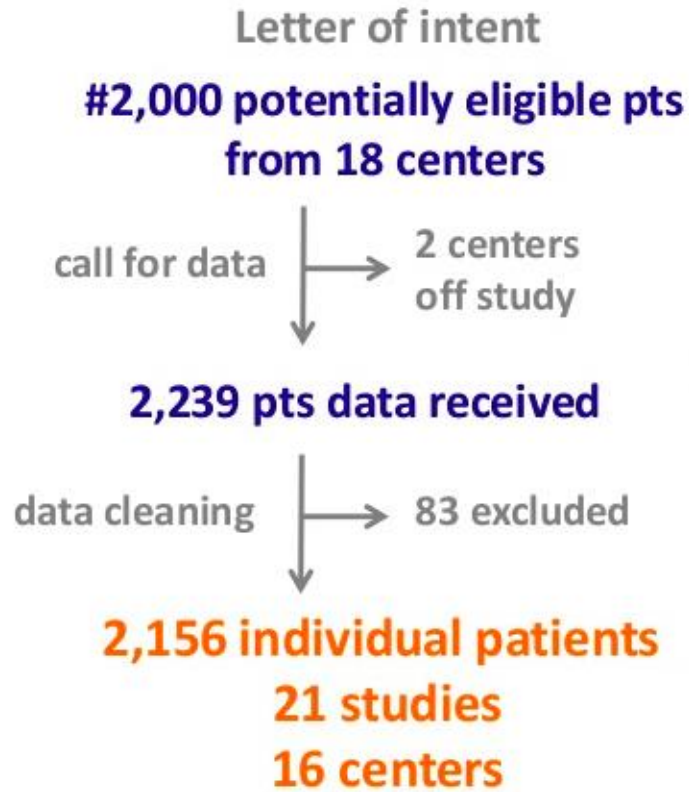


## Wanted:

# Biomarker mit hoher Spezifität und Sensibilität

- **Cancer Antigen CA 15-3 hat eine Sensitivität von 60-70%**
  - Große Schwankungen im Messwert (u.a. metabolische Einflüsse)
- **Messung von zirkulierenden Tumorzellen**
  - CellSearch System (FDA approved) – Sensitivität von 65%
  - 1 Zelle in 7,5 ml Blut
  - >5 Zellen/7,5ml Blut – Verschlechterung der Prognose
  - Einzelzellanalyse von zirkulierenden Tumorzellen möglich
- **Analyse zirkulierender Tumor DNA (ctDNA)**
  - Je nach Plattform unterschiedliche Sensitivität
  - Mutationsanalysen sowie Analyse von epigenetischen Veränderungen (Methylierungen)

# IMENEO – International MEta-analysis of circulating tumor cell detection in early breast cancer patients treated by NEOadjuvant chemotherapy



# Results IMENEO – CTC Detektion und pCR

- pCR definiert als ypT0/isN0 bei 92,5% der Patientinnen (N=1916/2072)
- pCR **beobachtet** bei 24,3% der Patientinnen (N=503/2072)

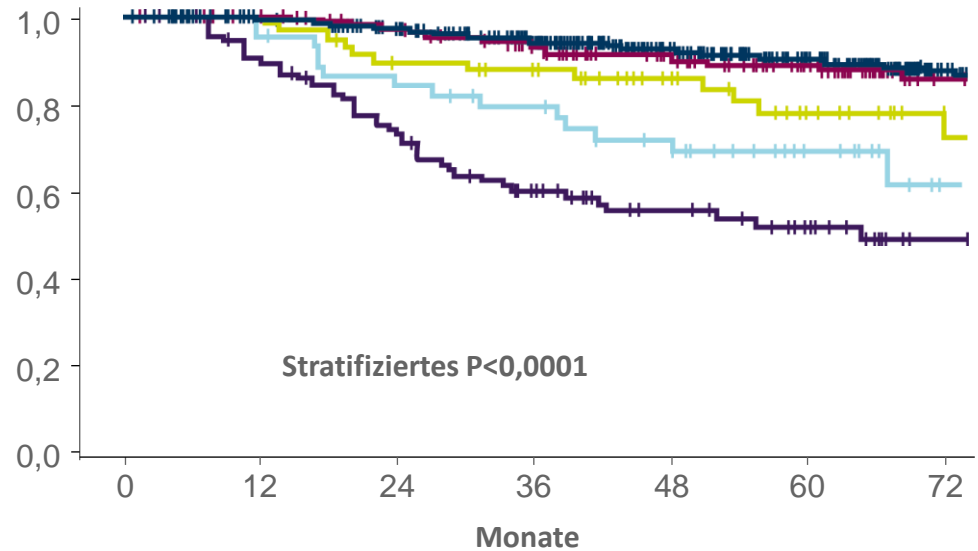
	N	≥1 CTC	≥2 CTC	≥5 CTC	kontinuierlich
<b>CTC vor NCT</b>		p=0,76	p=0,65	p=0,90	p=0,10
pCR	374 (24,0%)	21,7%	12,0%	6,1%	
Keine pCR	1183 (76,0%)	26,3%	13,0%	5,9%	
<b>CTC vor OP</b>		p=0,45	p=0,13	p=0,53	p=0,52
pCR	300 (26,3%)	13,7%	7,0%	1,3%	
Keine pCR	841 (73,7%)	15,7%	4,6%	1,0%	



# Results IMENEO – CTC vor NCT und Gesamtüberleben

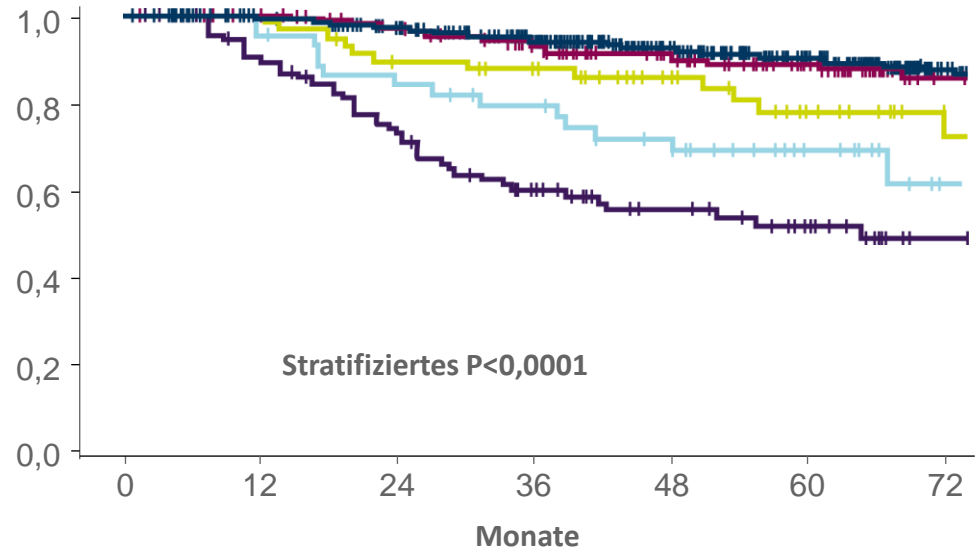
	N	% Ereignisse	HR
0 CTC	1175	9,8 %	1
1 CTC	199	10,6%	1,09 (0,65-1,69)
2 CTC	59	23,7%	2,63 (1,42-4,54)
3-4 CTC	47	29,8%	3,84 (1,08-6,66)
≥ 5 CTC	93	46,2%	6,25 (4,34-9,09)

- Gleiche HR ohne T4d Tumore
- Keine Interaktion mit Tumor-Subtypen



	N	% Ereignisse	HR
0 CTC	1175	9,8 %	1
1 CTC	199	10,6%	1,09 (0,65-1,69)
2 CTC	59	23,7%	2,63 (1,42-4,54)
3-4 CTC	47	29,8%	3,84 (1,08-6,66)
≥ 5 CTC	93	46,2%	6,25 (4,34-9,09)

- Gleiche HR ohne T4d Tumore
- Keine Interaktion mit Tumor-Subtypen



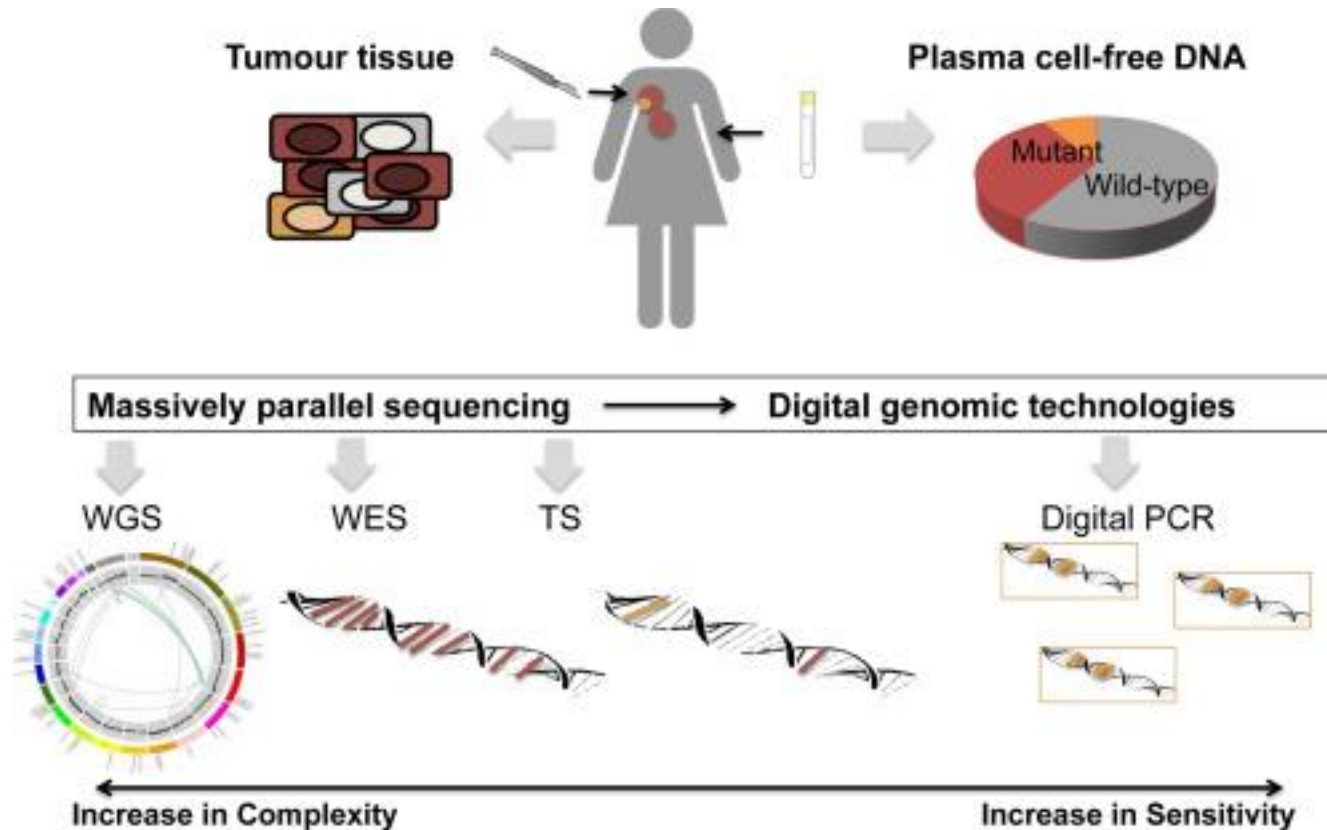
- Post-neoadjuvantes Überleben hängt nicht ausschließlich von Charakteristika des Mammakarzinoms und der pCR ab
- Die Zahl der CTC hat einen Einfluss auf OS und DDFS (signifikant ab  $\geq 2$  CTC/7,5ml)
- CTC kann als Ergänzung der üblichen prognostischen Faktoren gewertet werden, ohne sie zu ersetzen



## Zirkulierende DNA-Fragmente - ctDNA

- Werden in der zellfreien Blutfraktion gefunden (Plasma)
- Repräsentieren nur einen kleinen Teil der zirkulierenden DNA
- Moderne Sequenzierung ermöglicht eine schnelle Identifikation von somatischen, genomischen Veränderungen
- Diese Veränderungen machen personalisierte Assays für das Monitoring möglich
- Initialstudien haben mit verschiedenen soliden Tumoren ein „*proof of concept*“ vorgelegt

# ctDNA - Analysen



Note that for digital PCR it is essential to know a priori the genomic alteration to be targeted. WGS, whole genome sequencing, WES, whole exome sequencing, TS, targeted sequencing



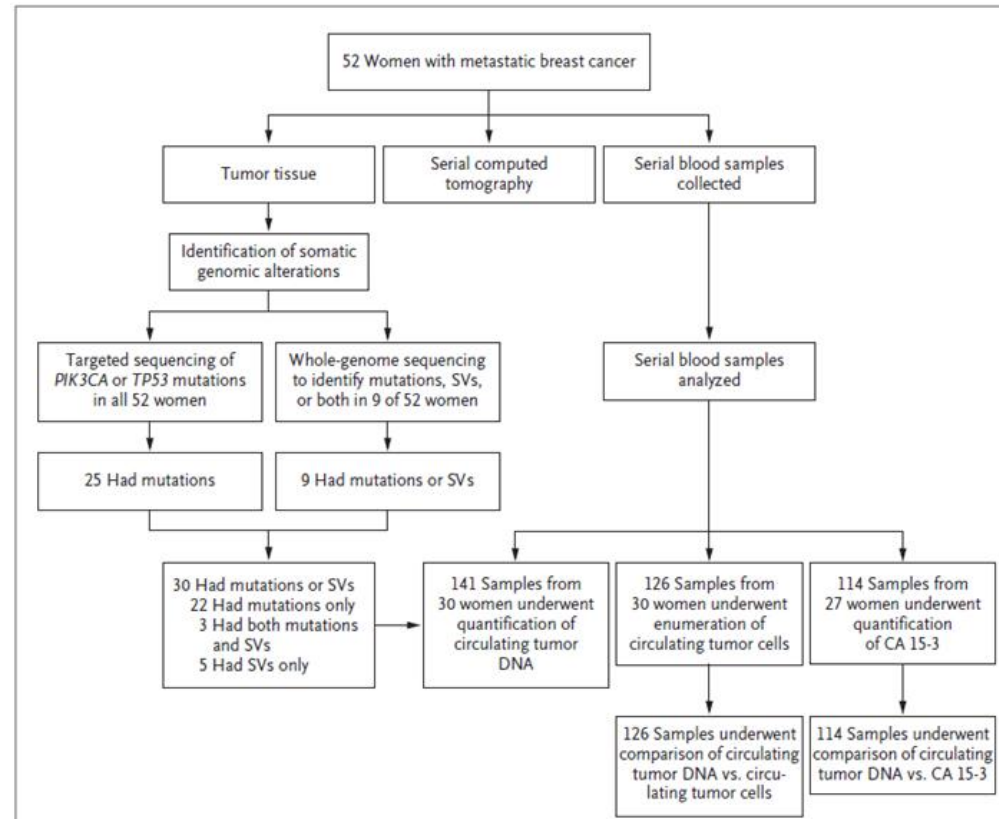
*The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE*

ORIGINAL ARTICLE

## Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer

Sarah-Jane Dawson, F.R.A.C.P., Ph.D., Dana W.Y. Tsui, Ph.D.,  
Muhammed Murtaza, M.B., B.S., Heather Biggs, M.A.,  
Oscar M. Rueda, Ph.D., Suet-Feung Chin, Ph.D., Mark J. Dunning, Ph.D.,  
Davina Gale, B.Sc., Tim Forshew, Ph.D., Betania Mahler-Araujo, M.D.,  
Sabrina Rajan, M.D., Sean Humphray, B.Sc., Jennifer Becq, Ph.D.,  
David Halsall, M.R.C.Path., Ph.D., Matthew Wallis, M.B., Ch.B.,  
David Bentley, D.Phil., Carlos Caldas, M.D., F.Med.Sci.,  
and Nitzan Rosenfeld, Ph.D.

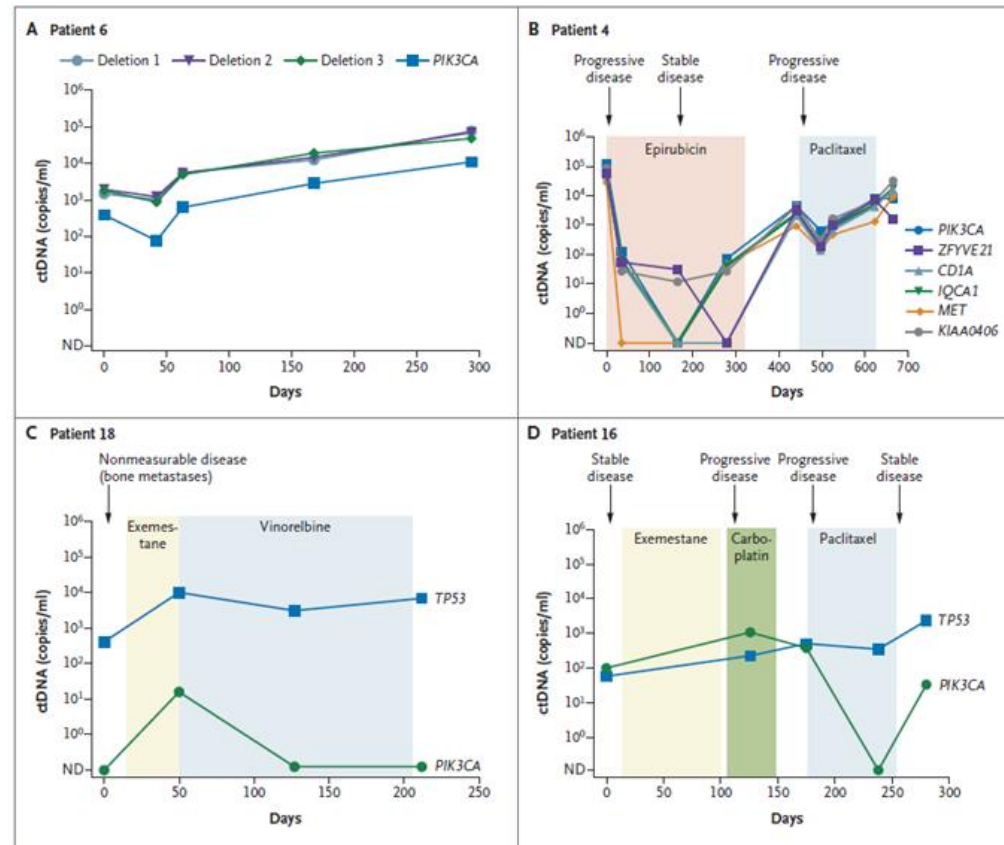
- Direkter Vergleich von **CA15-3** und **zirkulierenden Tumorzellen**, **Bildgebung (CT)** mit **ctDNA**
- In 97% (29 von 30 Pat.) Konnte ctDNA nachgewiesen werden
- CA 15-3 in 78% (21 von 27)
- cTC in 87% (26 von 30)
- Die ctDNA zeigt eine größere Variationsbreite und eine bessere Korrelation mit der Tumorlast
- Die ctDNA liefert die frühesten Veränderungen bei Therapieansprechen
- **Mediane DNA-Menge: 150 Kopien/ml Plasma**



**Figure 1. Enrollment of Patients and Collection of Clinical Samples.**

In the 30 women who were found to have somatic mutations, structural variants (SVs), or both, the genomic alterations were determined through targeted deep sequencing or whole-genome paired-end sequencing of tumor-tissue specimens and matched normal-tissue specimens. CA 15-3 denotes cancer antigen 15-3.

- Die Methode ist quantitativ (A)
- Verschiedene Mutationen zeigen einen vergleichbaren Verlauf (B)
- Es gibt aber klonale Heterogenität mit dominierenden Mutationen (C)
- Veränderungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorevolution verhalten sich unterschiedlich (D)

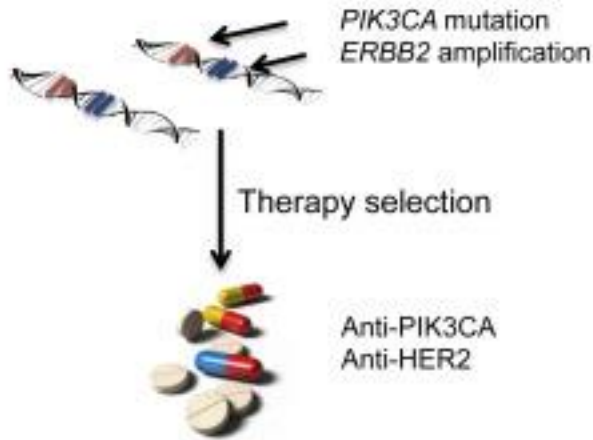


**Figure 2. Monitoring Multiple Point Mutations and Structural Variants in Circulating DNA.**

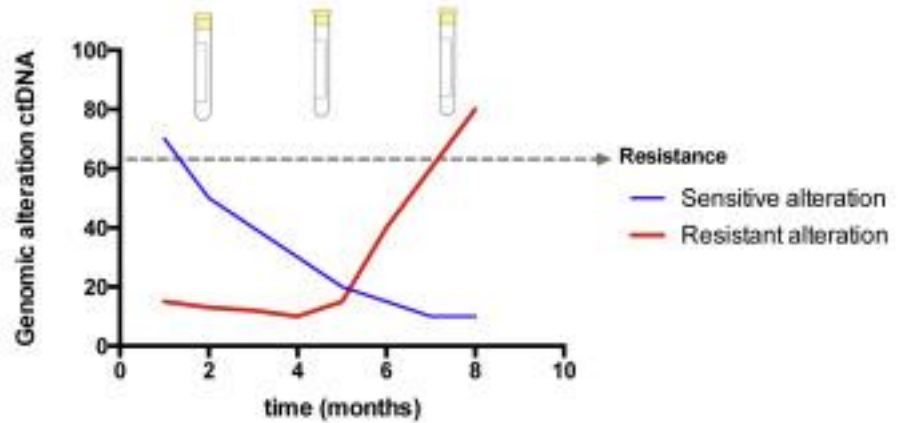
Panels A, B, and C show plasma levels of circulating tumor DNA (ctDNA) for three patients (one per panel), quantified in parallel by means of a digital polymerase-chain-reaction (PCR) assay across multiple time points. In Panels B, C, and D, the use of endocrine or cytotoxic therapy is indicated by colored shading, and disease status at various times (as ascertained on computed tomography) is shown. Panel A shows three structural variants (deletions) and a point mutation in *PIK3CA*. The three deletions occurred in the setting of a complex rearrangement associated with amplification. Panel B shows six point mutations, all of which showed similar dynamic patterns. Panel C shows point mutations in *PIK3CA* and *TP53*; the *TP53* mutation was dominant in the circulation as compared with the *PIK3CA* mutation. Panel D shows plasma levels of ctDNA for a fourth patient, with point mutations in *PIK3CA* and *TP53* quantified by means of tagged-amplicon deep sequencing. The *TP53* mutation was identified in plasma only, and levels remained elevated after paclitaxel chemotherapy despite a fall in the *PIK3CA* mutation level in the presence of stable disease. ND denotes not detected.

# ctDNA – Einsatzmöglichkeiten

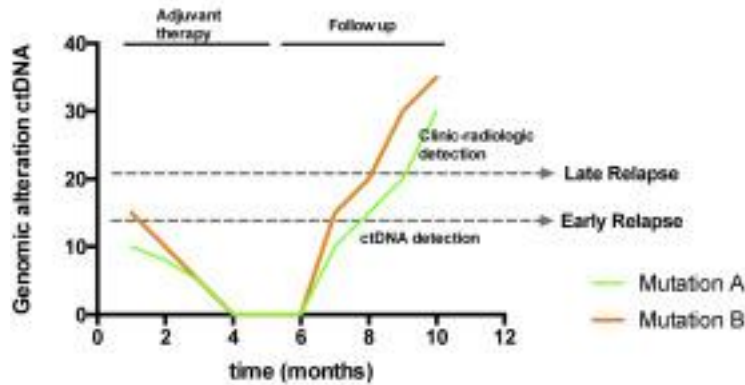
## A. Stratification



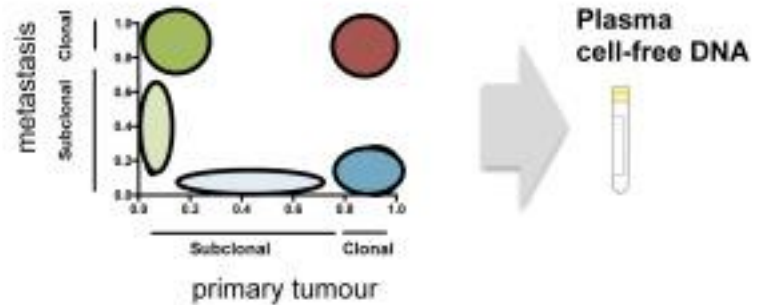
## B. Longitudinal Monitoring



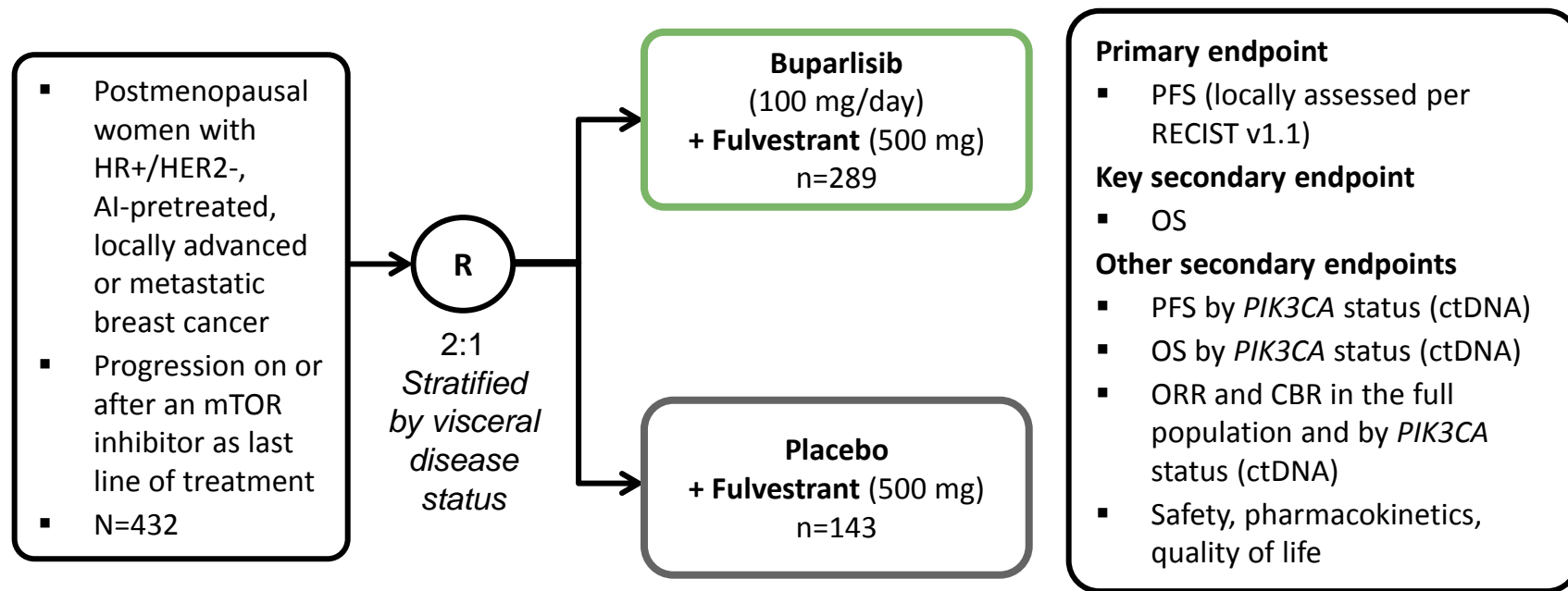
## C. Early detection



## D. Intra- and inter-tumour heterogeneity



- **BELLE-3: A Phase III Study of Buparlisib and Fulvestrant in Postmenopausal Women With HR+, HER2-, AI-treated, Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer, Who Progressed On or After mTOR Inhibitor-based Treatment**

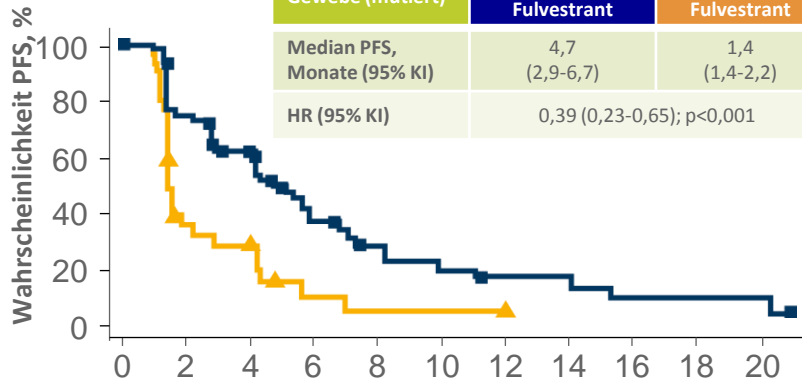




# BELLE-3 – PFS je nach PIK3CA-Status

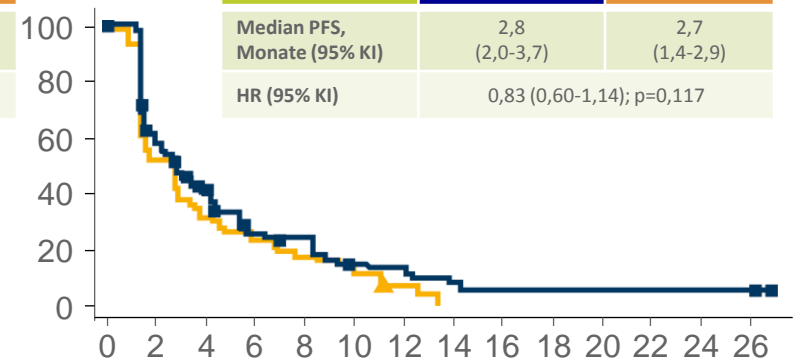
## Mutiert

Gewebe (mutiert)	Buparlisib+ Fulvestrant	Placebo + Fulvestrant
Median PFS, Monate (95% KI)	4,7 (2,9-6,7)	1,4 (1,4-2,2)
HR (95% KI)	0,39 (0,23-0,65); p<0,001	



## Wildtyp

Gewebe (WT)	Buparlisib+ Fulvestrant	Placebo + Fulvestrant
Median PFS, Monate (95% KI)	2,8 (2,0-3,7)	2,7 (1,4-2,9)
HR (95% KI)	0,83 (0,60-1,14); p=0,117	



Primäres  
Tumor-  
gewebe

(PCR)  
N = 321

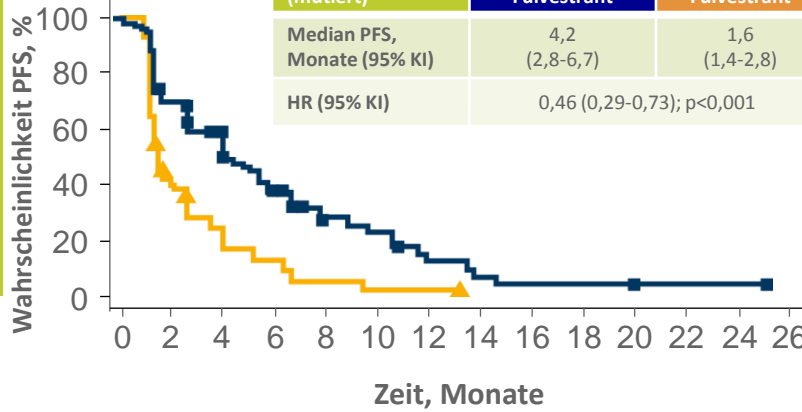
PIK3CA mutiert:  
**34%**

ctDNA Proben  
bei Studien-  
beginn

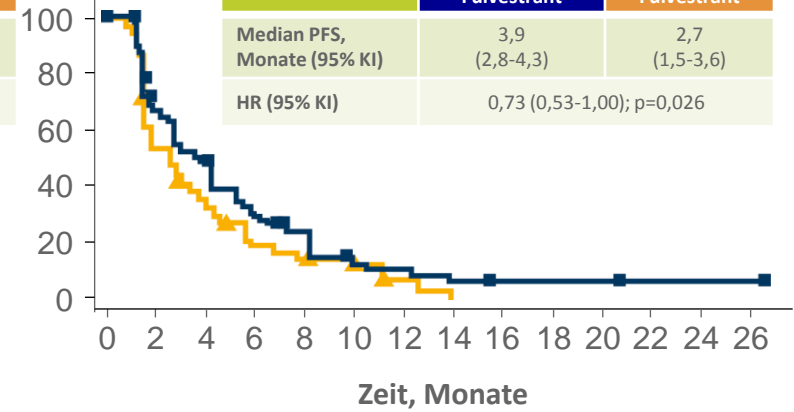
(BEAMing)  
N = 348

PIK3CA mutiert:  
**39%**

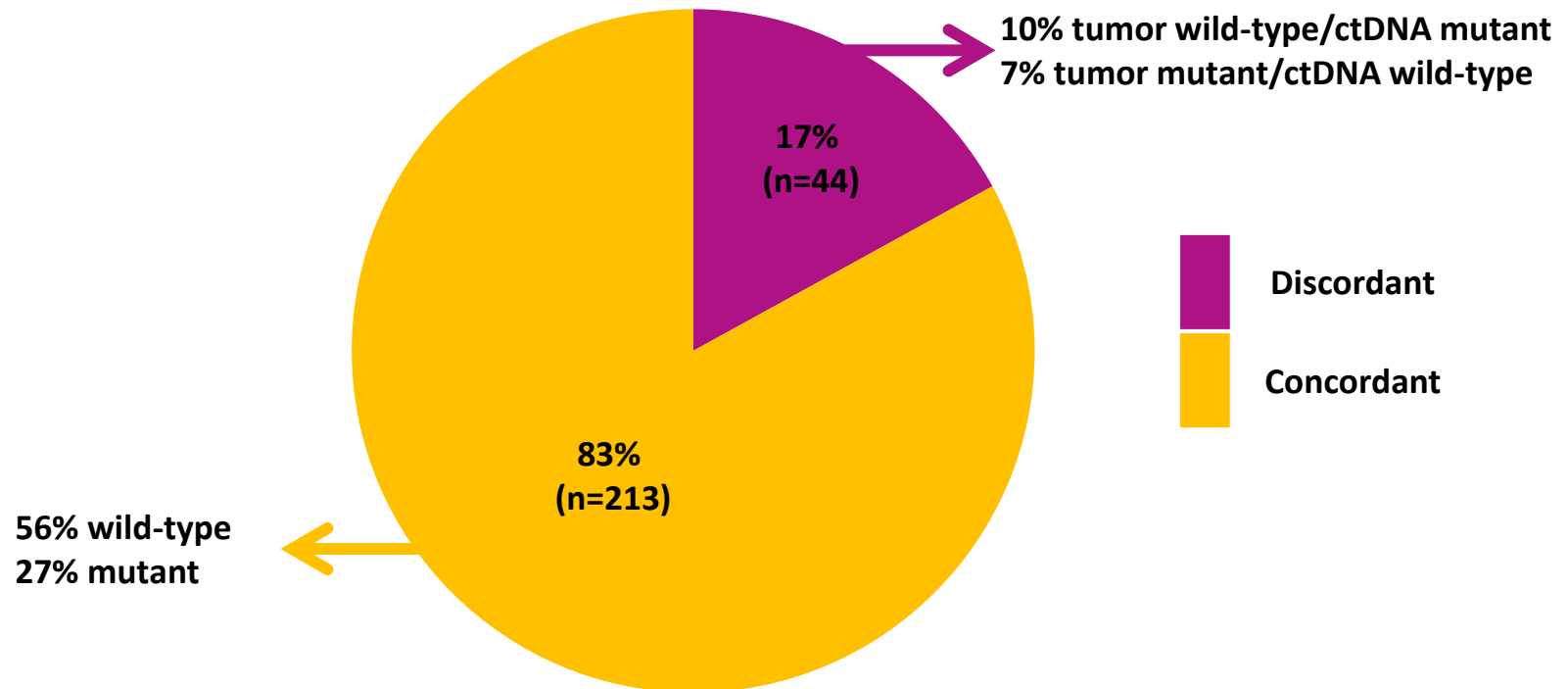
cTDNA (mutiert)	Buparlisib+ Fulvestrant	Placebo + Fulvestrant
Median PFS, Monate (95% KI)	4,2 (2,8-6,7)	1,6 (1,4-2,8)
HR (95% KI)	0,46 (0,29-0,73); p<0,001	



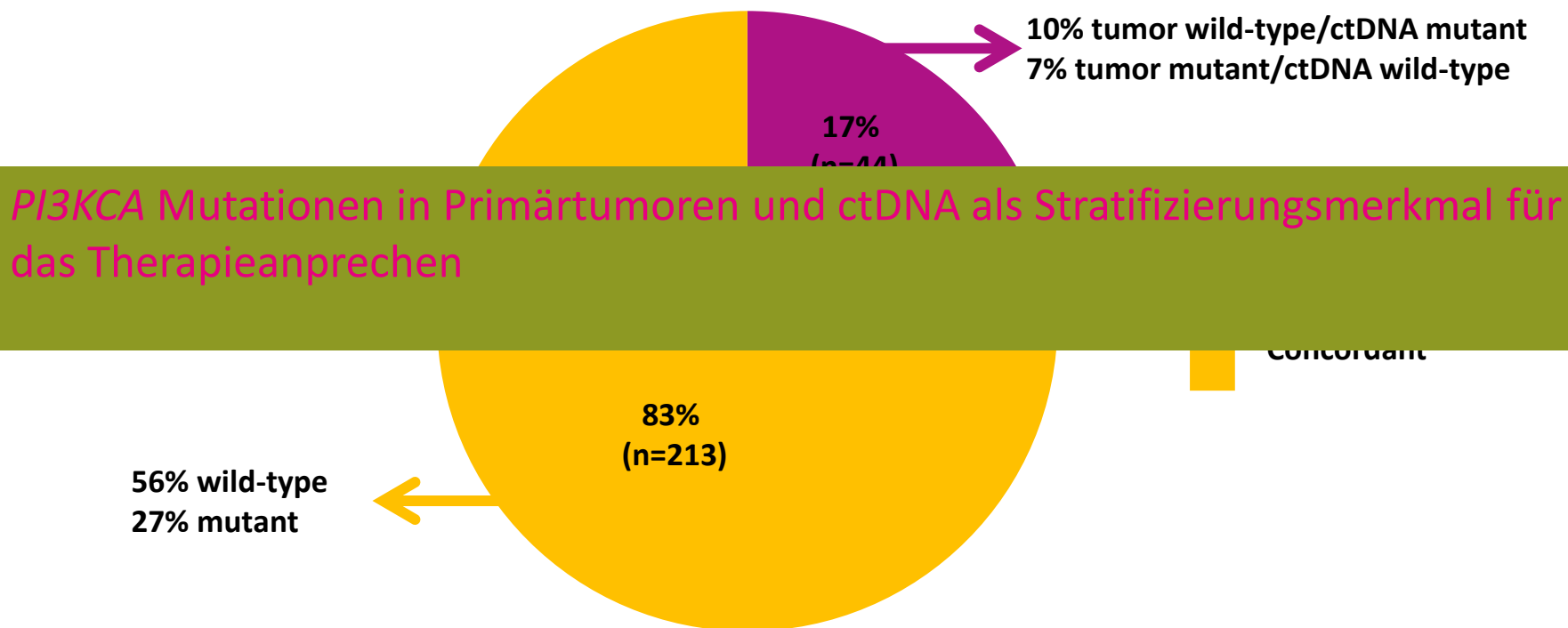
cTDNA (WT)	Buparlisib+ Fulvestrant	Placebo + Fulvestrant
Median PFS, Monate (95% KI)	3,9 (2,8-4,3)	2,7 (1,5-3,6)
HR (95% KI)	0,73 (0,53-1,00); p=0,026	



- *PIK3CA* Status wurde in Primärtumoren und gepaarten ctDNA Proben von 257 (59%) Patientinnen untersucht



- *PIK3CA* Status wurde in Primärtumoren und gepaarten ctDNA Proben von 257 (59%) Patientinnen untersucht



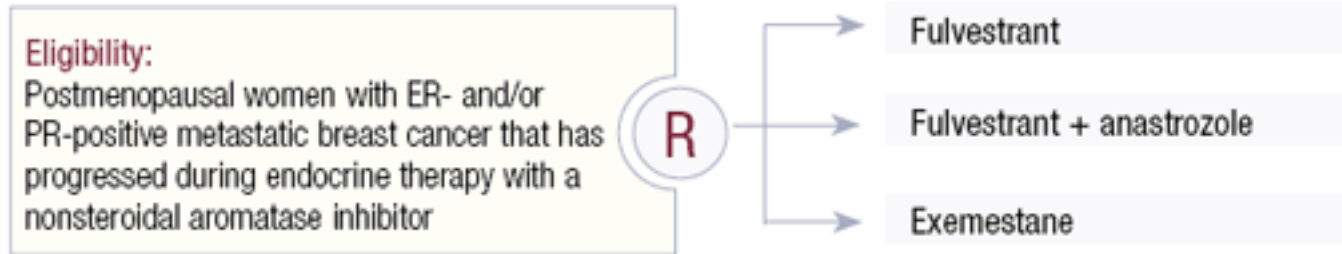


## Plasma *ESR1* Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor–Positive Advanced Breast Cancer

*Charlotte Fribbens, Ben O'Leary, Lucy Kilburn, Sarah Hrebien, Isaac Garcia-Murillas, Matthew Beaney, Massimo Cristofanilli, Fabrice Andre, Sherene Loi, Sibylle Loibl, John Jiang, Cynthia Huang Bartlett, Maria Koehler, Mitch Dowsett, Judith M. Bliss, Stephen R.D. Johnston, and Nicholas C. Turner*

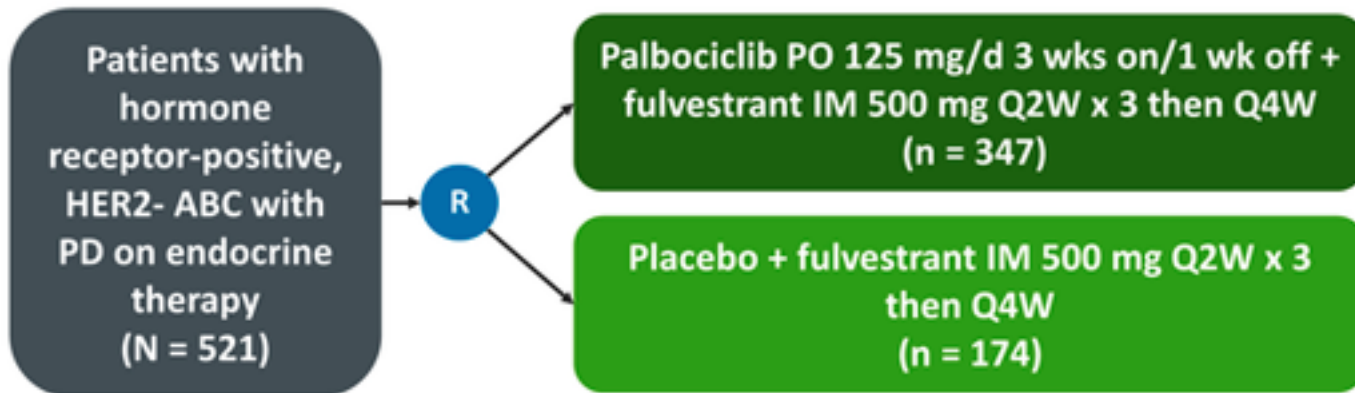
Charlotte Fribbens, Ben O'Leary, Sarah Hrebien, Isaac Garcia-Murillas, Matthew Beaney, Mitch Dowsett, and Nicholas C. Turner, Institute of Cancer Research; Charlotte Fribbens, Ben O'Leary, Stephen R.D. Johnston, and Nicholas C. Turner,

**SoFEA:**



162 Baseline Plasma Proben, *ESR1* Mutationsanalyse in 99,4% erfolgreich

**PALOMA-3:**



360 Baseline Plasma Proben, *ESR1* Mutationsanalyse in 100% erfolgreich

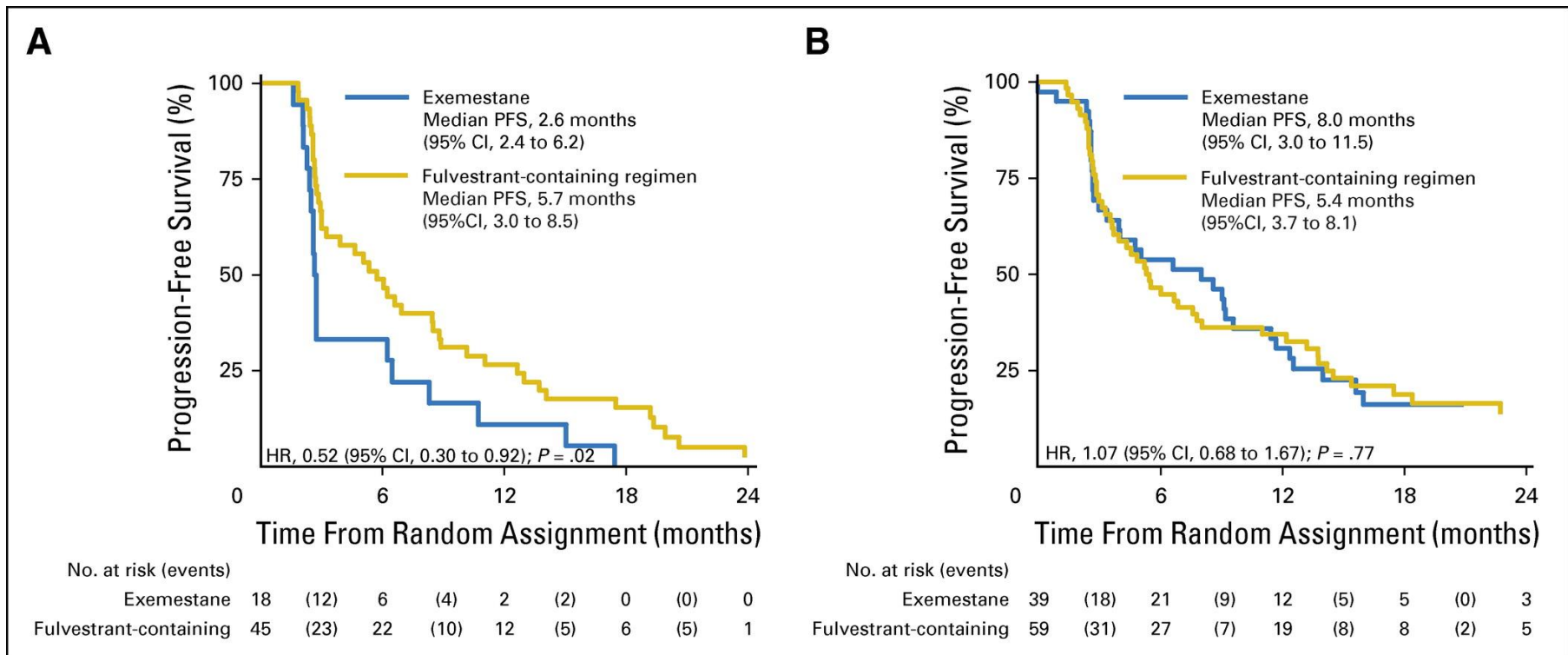
# SoFEA – PFS je nach Mutationsstatus

*ESR1* Mutationen wurden in 39.1% der ctDNA Proben detektiert

häufigste Mutationen D538G, Y537N, Y537S, and E380Q

*ESR1* Mutation

*ESR1* wild-type



Patientinnen mit *ESR1* Mutationen haben ein kürzeres PFS Intervall unter Exemestan



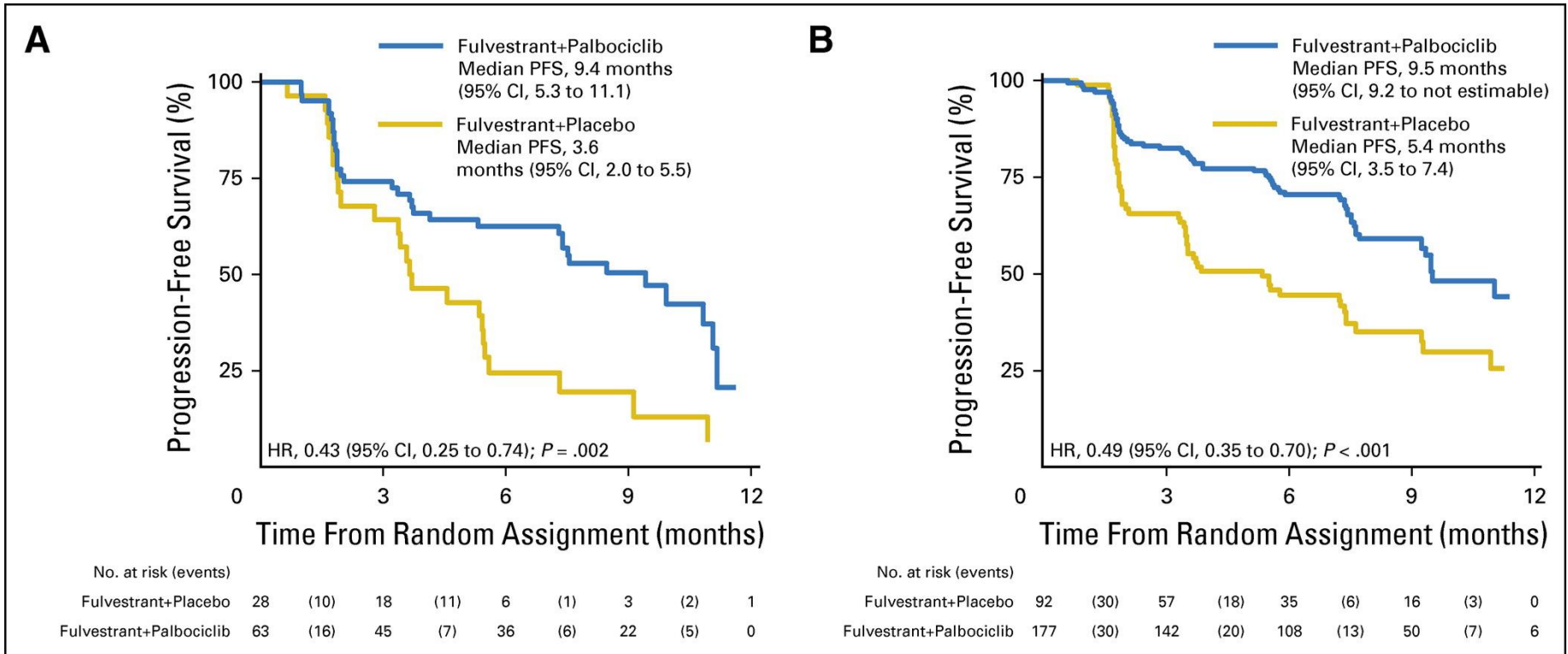
# PALOMA-3 – PFS je nach Mutationsstatus

*ESR1* Mutationen wurden in 25.3% der ctDNA Proben detektiert

Niedriger durch Tamoxifen Vortherapie und intrinsische Resistenz

*ESR1* Mutation

*ESR1* wild-type



Der Benefit von Palbociclib ist unabhängig vom Mutationsstatus



- Archivierte EDTA Plasma Proben können auch nach längerer Zeit für die ctDNA Analyse mit digitaler PCR verwendet werden
- Robuste und kostengünstige Methode der gezielten Mutationsanalyse
- Erste Evidenz für die *ESR1* ctDNA Mutationsanalyse als Hilfsmittel zur Therapieentscheidung der endokrinen Therapie

# ctDNA – Als Marker für Relapse?

Research Article



EMBO  
Molecular Medicine

## Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease

Eleonor Olsson<sup>1,2,†</sup>, Christof Winter<sup>1,2,†</sup>, Anthony George<sup>1,2</sup>, Yilun Chen<sup>1,2</sup>, Jillian Howlin<sup>1,2</sup>,  
Man-Hung Eric Tang<sup>1,2</sup>, Malin Dahlgren<sup>1,2</sup>, Ralph Schulz<sup>1,2,3</sup>, Dorthe Grabau<sup>4</sup>, Danielle van Westen<sup>5</sup>,  
Mårten Fernö<sup>1,2</sup>, Christian Ingvar<sup>6</sup>, Carsten Rose<sup>2,7,8</sup>, Pär-Ola Bendahl<sup>1,2</sup>, Lisa Rydén<sup>2,6</sup>, Åke Borg<sup>1,2,3,8</sup>,  
Sofia K Gruvberger-Saal<sup>1,2</sup>, Helena Jernström<sup>1,2</sup> & Lao H Saal<sup>1,2,8,\*</sup>

# ctDNA – Als Marker für Relapse?

Research Article

Serial monitoring of  
patients

RESEARCH ARTICLE | CANCER

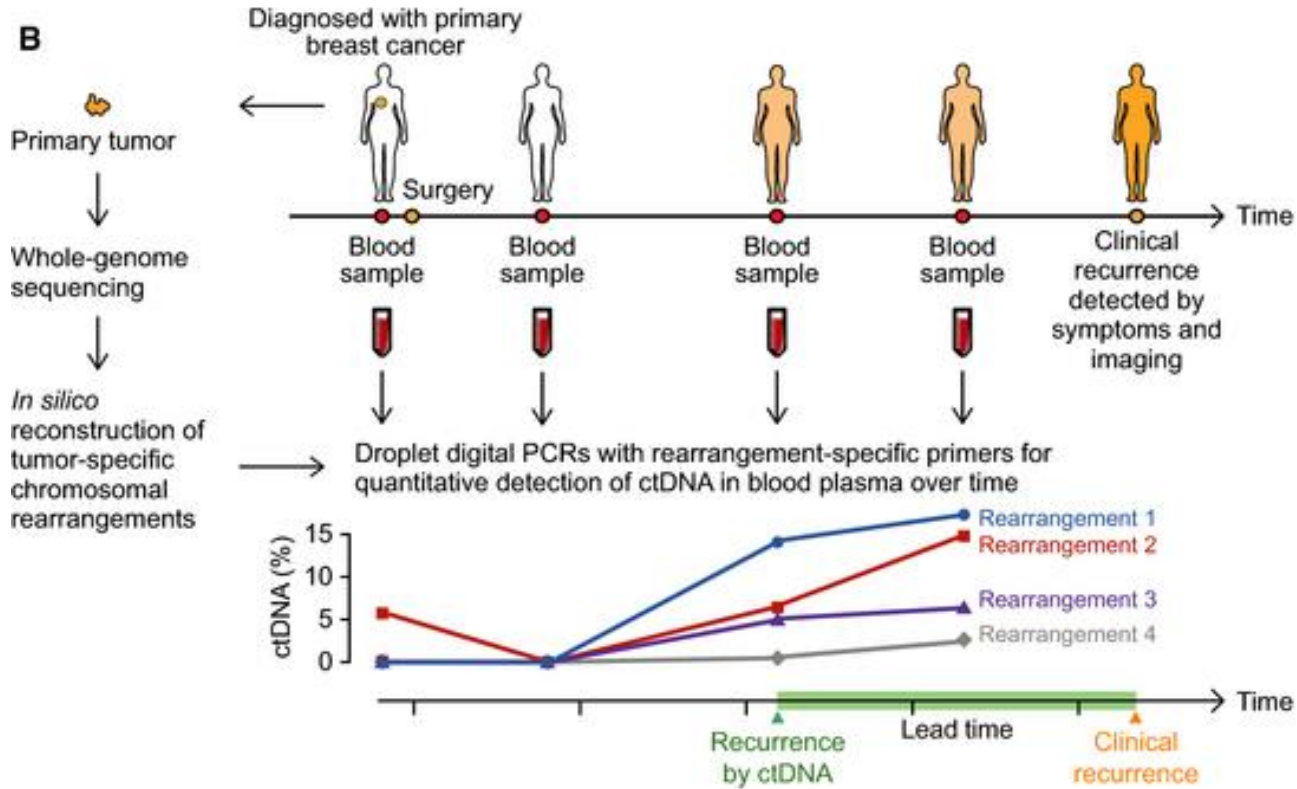
Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer

Isaac Garcia-Murillas<sup>1,\*</sup>, Gaia Schiavon<sup>1,2,\*</sup>, Britta Weigelt<sup>3</sup>, Charlotte Ng<sup>3</sup>, Sarah Hrebien<sup>1</sup>,  
Rosalind J. Cutts<sup>1</sup>, Maggie Cheang<sup>4</sup>, Peter Osin<sup>2</sup>, Ashutosh Nerurkar<sup>2</sup>, Iwanka Kozarewa<sup>1</sup>, Javier  
Armisen Garrido<sup>1</sup>, Mitch Dowsett<sup>1,2</sup>, Jorge S. Reis-Filho<sup>3</sup>, Ian E. Smith<sup>2</sup> and Nicholas C. Turner<sup>1,2,†</sup>  
George<sup>1,2</sup>, Yilun Chen<sup>1,2</sup>, Jillian Howlin<sup>1,2</sup>,  
Ralph Schulz<sup>1,2,3</sup>, Dorthe Grabau<sup>4</sup>, Danielle van Westen<sup>5</sup>,  
Carsten Rose<sup>2,7,8</sup>, Pär-Ola Bendahl<sup>1,2</sup>, Lisa Rydén<sup>2,6</sup>, Åke Borg<sup>1,2,3,8</sup>,  
Helena Jernström<sup>1,2</sup> & Lao H Saal<sup>1,2,8,\*</sup>

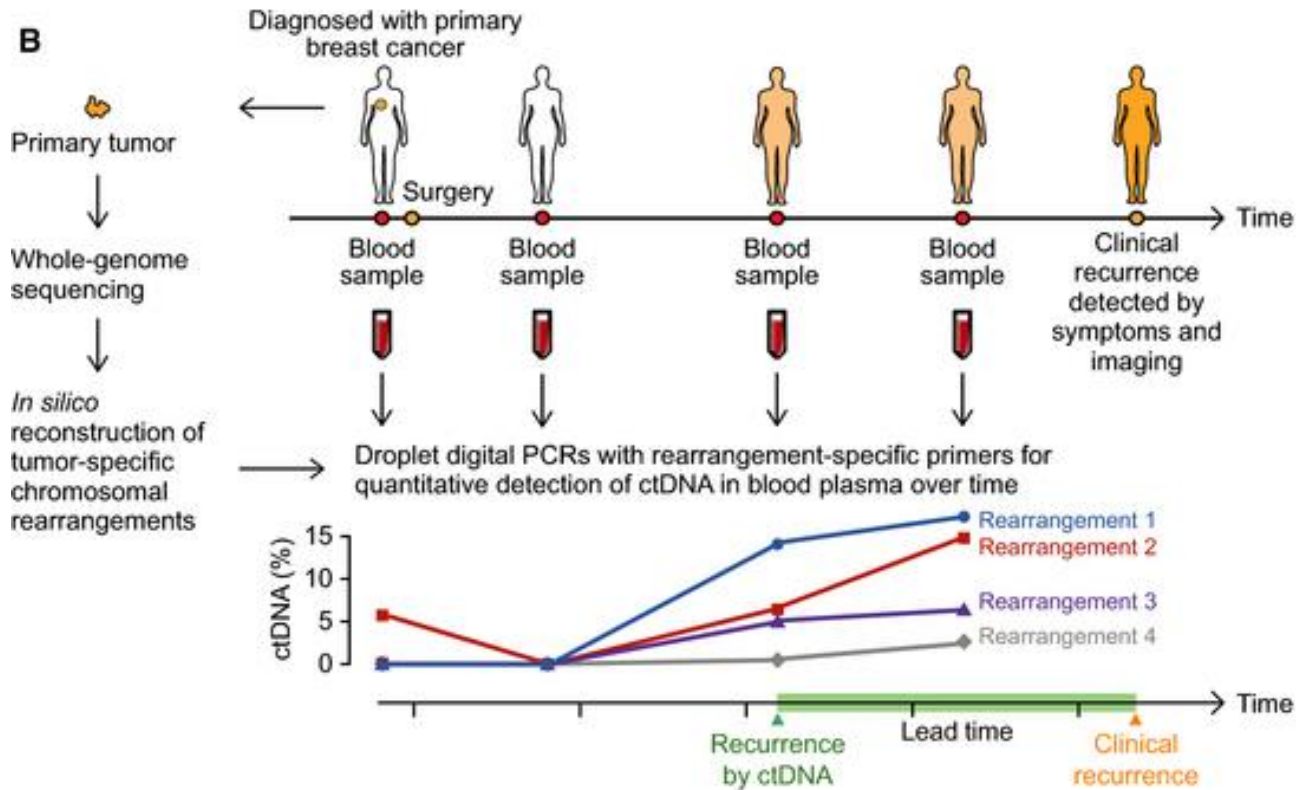


ctDNA in  
cancer for detection

# ctDNA – Als Marker für Relapse?

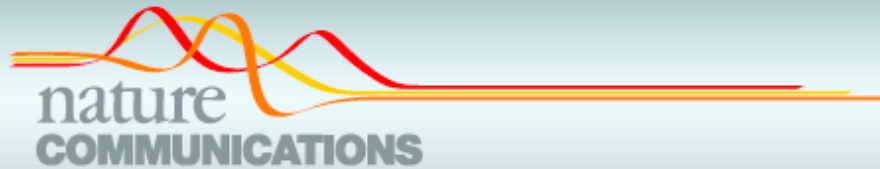


# ctDNA – Als Marker für Relapse?



ctDNA Detektion von okkulten Metastasen 8-11 Monate vor klinischer Diagnose

ctDNA Detektion post OP war prädiktiv für Early Relapse



## ARTICLE

Received 11 Aug 2015 | Accepted 28 Sep 2015 | Published 4 Nov 2015

DOI: [10.1038/ncomms9760](https://doi.org/10.1038/ncomms9760)

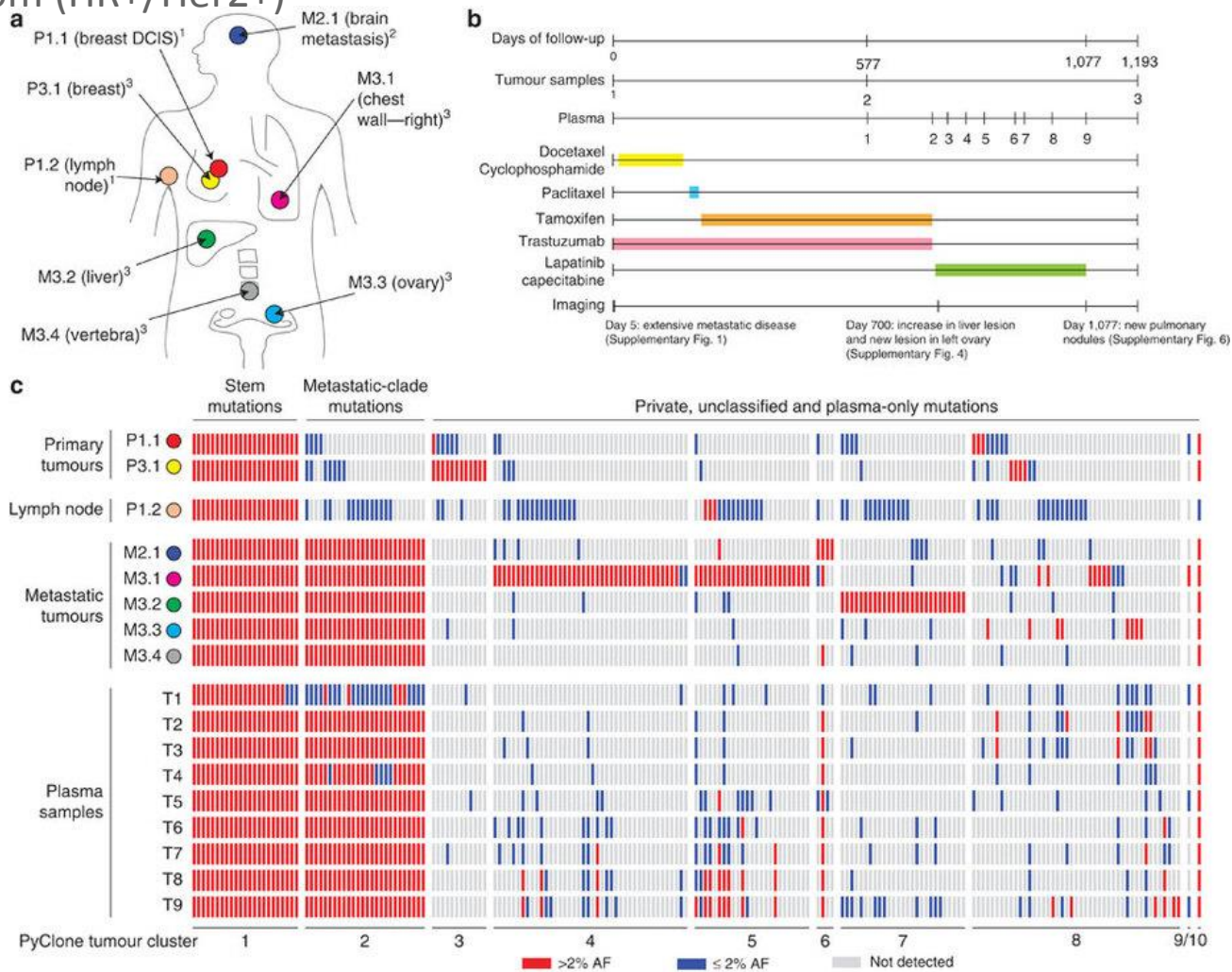
[OPEN](#)

# Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer

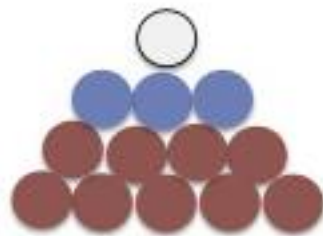
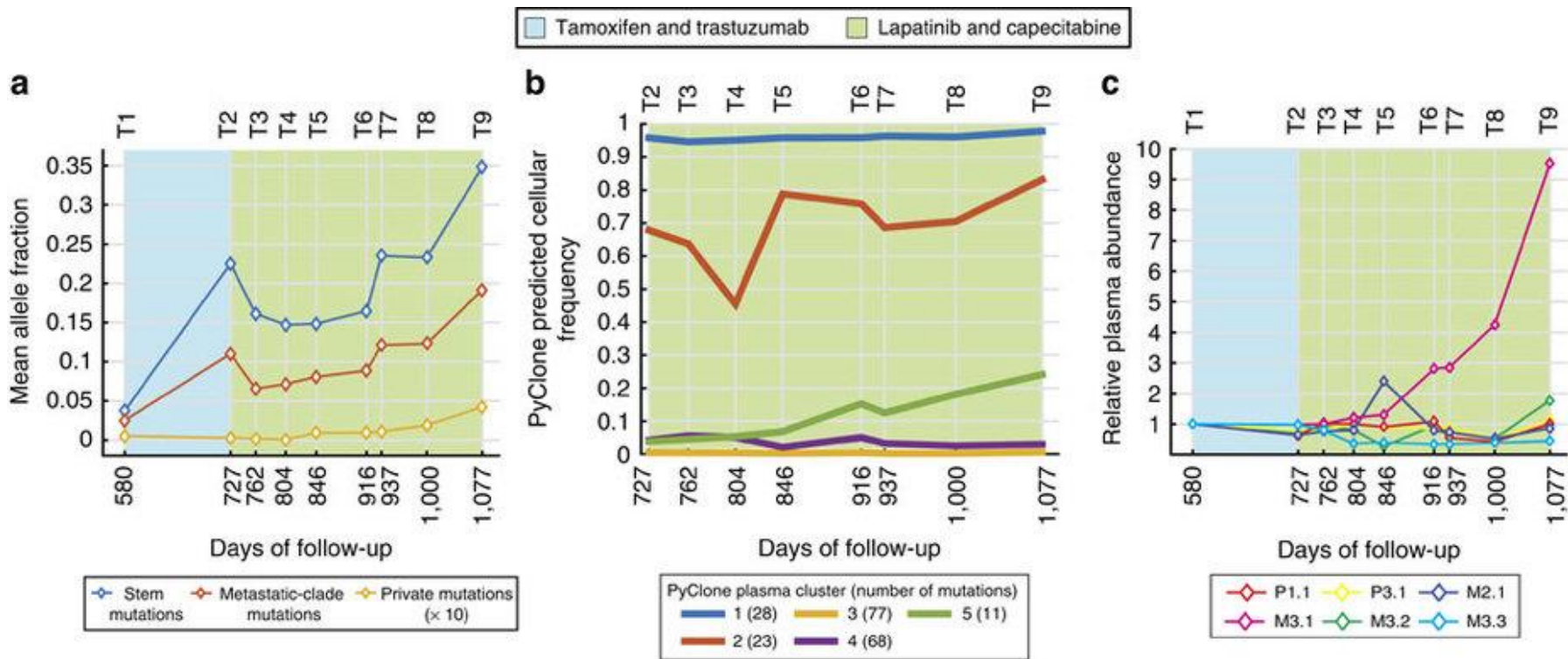
Muhammed Murtaza<sup>1,2,3,4,\*</sup>, Sarah-Jane Dawson<sup>1,5,6,\*</sup>, Katherine Pogrebniak<sup>1,2</sup>, Oscar M. Rueda<sup>1,2</sup>, Elena Provenzano<sup>5,7</sup>, John Grant<sup>7</sup>, Suet-Feung Chin<sup>1,2</sup>, Dana W.Y. Tsui<sup>1</sup>, Francesco Marass<sup>1,2</sup>, Davina Gale<sup>1</sup>, H. Raza Ali<sup>1,2,5,7</sup>, Pankti Shah<sup>3</sup>, Tania Contente-Cuomo<sup>3</sup>, Hossein Farahani<sup>8</sup>, Karey Shumansky<sup>8</sup>, Zoya Kingsbury<sup>9</sup>, Sean Humphray<sup>9</sup>, David Bentley<sup>9</sup>, Sohrab P. Shah<sup>8</sup>, Matthew Wallis<sup>5,10</sup>, Nitzan Rosenfeld<sup>1,2,\*\*</sup> & Carlos Caldas<sup>1,2,5,\*\*</sup>

# ctDNA – Tumor/Metastasen Heterogenität

Case-Study: 42j. Patientin mit primär ossär pleural und hepatisch metastasiertem Mammakarzinom (HR+/Her2+)



# ctDNA – Tumor/Metastasen Heterogenität



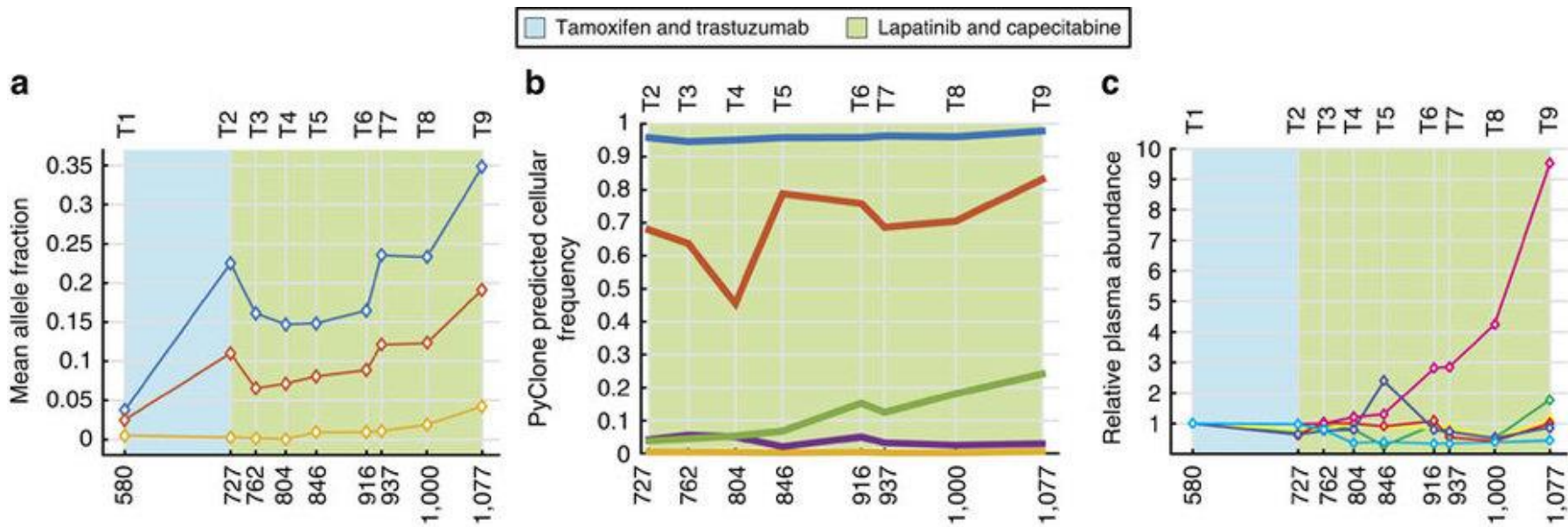
Private mutations

Metastatic clade mutations

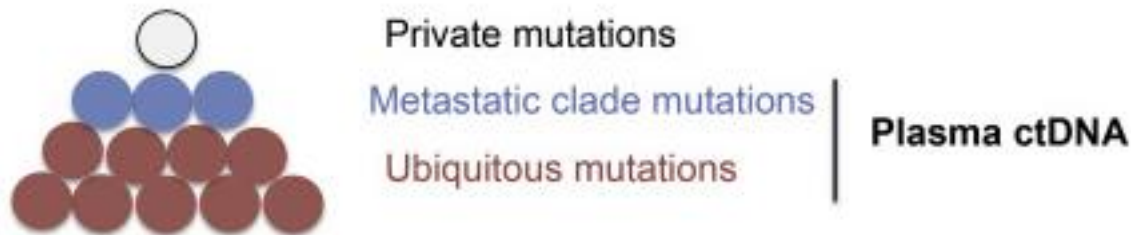
Ubiquitous mutations

Plasma ctDNA

# ctDNA – Tumor/Metastasen Heterogenität



Mit Plasma ctDNA ist es möglich die dynamische clonale und subclonale Tumorheterogenität zu identifizieren





# Was macht die GBG? - Biomaterialsammlung

Studienart	Studie	Serum	Plasma	Vollblut	cfDNA	CTC	OvF(serum)
neoadjuvant	GeparQuinto	x		x		x	
	GeparSixto	x	x	x		x	x
	GeparSepto	x	x	x			x
	GeparOcto	x	x	x			x
	GeparNuevo		x	x			
	GeparOla	x	x	x			
	GeparX	x	x	x			
	NeoPhoebe	x	x	x			
	Genevieve	x	x	x			x
	DAFNE	x	x	x			
	SOFIA	x	x	x			
	Brightness		x	x			
	adjuvant	GAIN-2					
PANTHER		x	x	x			
post-neoadjuvant	Pallas	x	x	x	x		
	Katherine			x			
	Penelope <sup>B</sup>	x	x	x	x		



# Biomaterialsammlung der GBG

Studienart	Studie	Serum	Plasma	Vollblut	cfDNA	CTC	OvF(serum)
palliativ	Evelyn	x	x				
	Aurora	x	x	x			
	Desiree	x	x	x			
	TBP	x					
	MoniCa	x					
	TABEA	x					
	PazoX	x					
	RADAR	x					
	E-VITA	x					
	LEA			x	x		
	Male	x			x		
	operativ	Insema	x				



# ctDNA in PALLAS und PenelopeB

	ctDNA Cycle1Day1	ctDNA Cycle6Day1
PALLAS Rando (Non-US) n = 322	110 (34%)	38 (12%)

	ctDNA Baseline	ctDNA before 7 Cycles CHT	ctDNA EOT
PenelopeB Rando n = 866	488 (56%)	259 (30%)	144 (17%)



- **Ansprechen auf neoadjuvante CTX mit pCR als prädiktiver Marker**
- **Surrogat Marker für die Wirksamkeit neuer Substanzen für bestimmte Subgruppen**
- **Wer profitiert von der CTX auch ohne pCR - wer nicht?**
- **Mancher Patient hat eine Komplettremission aber ein Rezidiv, während andere keine Remission haben, aber nie rezidivieren...**



**Wie weit können diese Tests in die Zukunft schauen?**



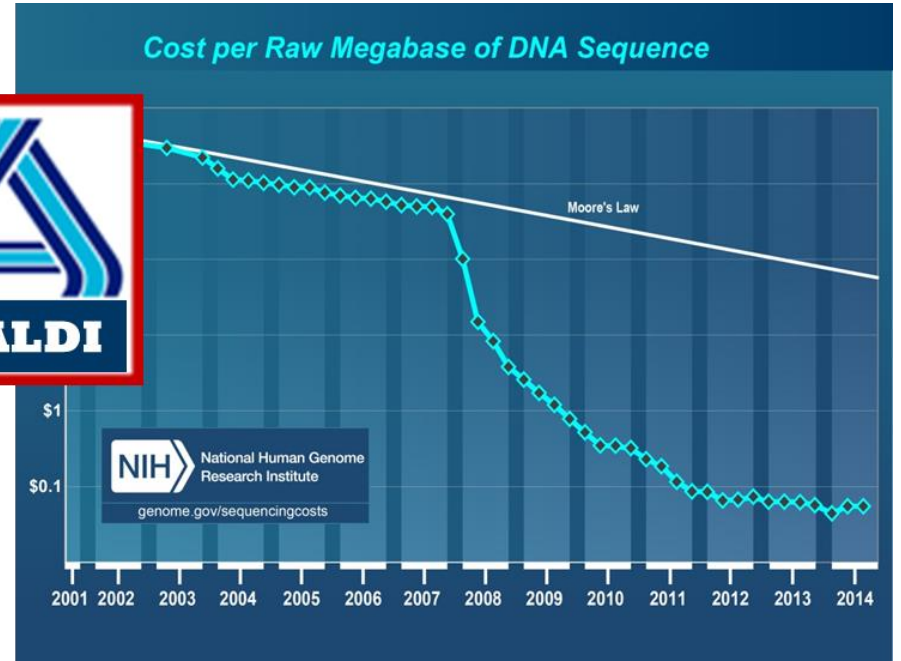
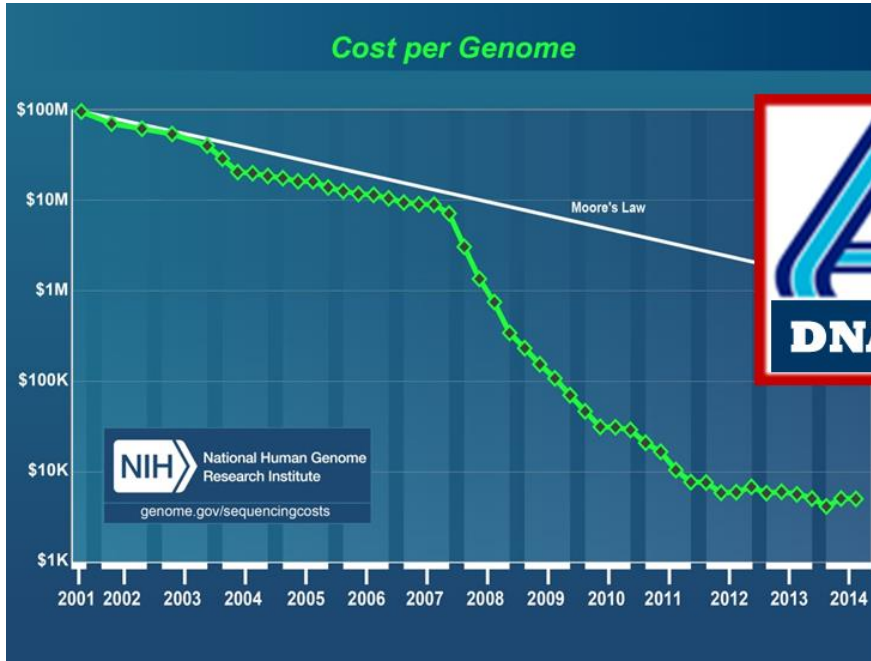
- **Screening bei Rezidiv Gefahr einer asymptomatischen Patientin. Zunächst muss der Nutzen aber im Patienten Outcome bewiesen werden!**
- **Identifikation neuer Mutationen und Informationen über die personalisierte Tumorevolution - mögliche Targets, die aus dem Primärtumor nicht ersichtlich sind.**
- **Eine Verknüpfung der genetischen Informationen mit dem klinischen Phänotyp des Tumors stellt eine Herausforderung dar.**



- **Das Proof of concept für liquid biopsy marker als sensitiver Biomarker ist erbracht!**
- *Das Überleben der Patientinnen kann verbessert werden!*
- **Die technologischen Entwicklungen und die damit verbundenen Preisentwicklungen spielen bei der Etablierung des Markers die entscheidende Rolle**



# Preisentwicklung des Deep-Sequencing



GBG

GERMAN  
BREAST  
GROUP



Vielen Dank



UNIVERSITÄTSKLINIKUM  
Schleswig-Holstein

