UKD Universitätsklinikum Düsseldorf

HEINRICH HEINE UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

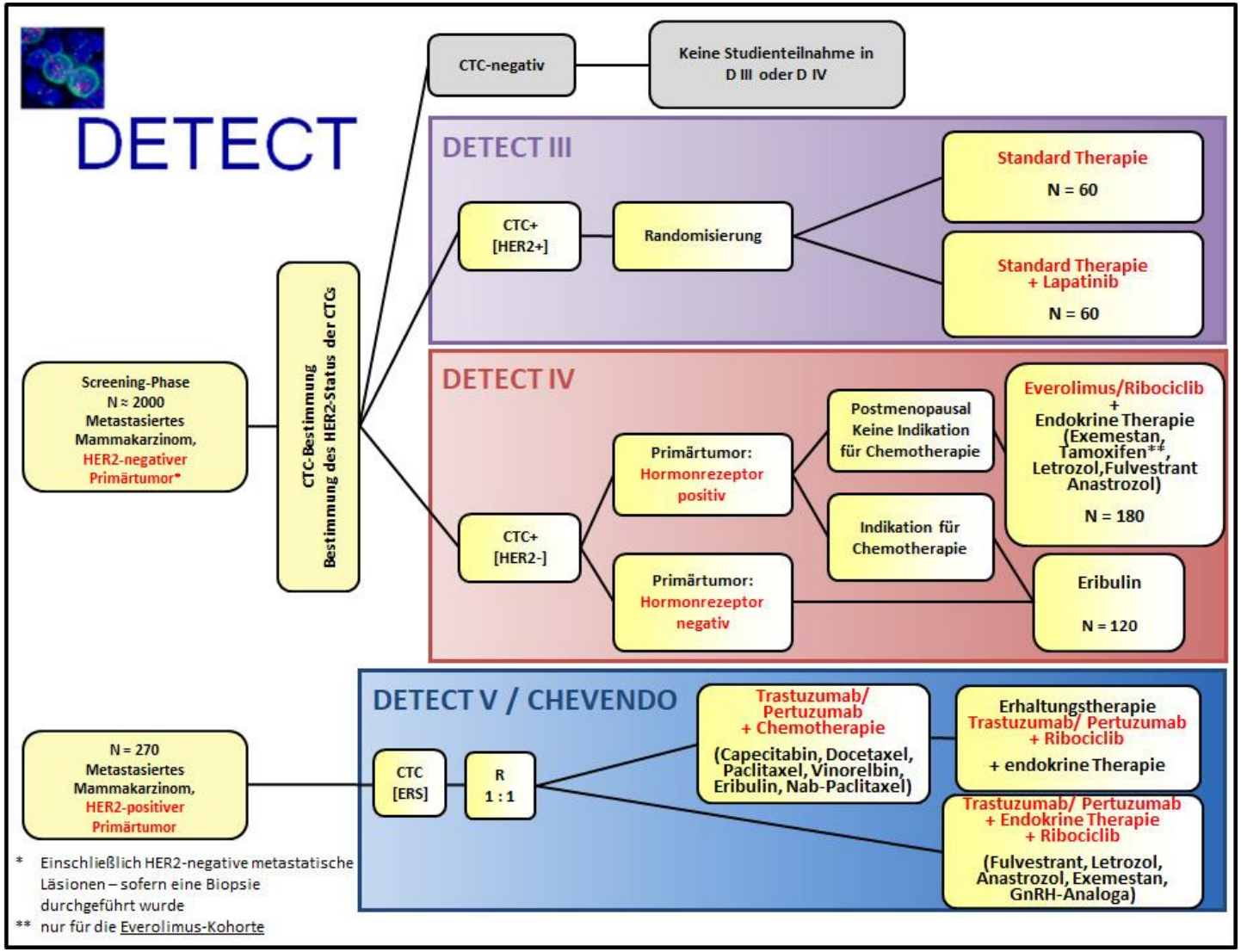
DETECT

Aktueller Stand der translationalen Forschung – Update aus den DETECT Studien

Prof. Dr. Tanja Fehm

III. DETECT Investigator Meeting
Flughafen Frankfurt
08.05.2019

Das Studiendesign der aktuellen DETECT Studien



DETECT

CTC-Bestimmung in DETECT

Screening-Bogen
Ergebnismitteilung
Begleitschein

BE: Blutentnahme
*BE einmalig in Woche 3 bis 4 und einmalig in Woche 9 bis 12

Screening Besuch
nur DIII und DIV:
→ Patienteneinverständnis 1
→ Screening Kit

Rando/ Einschlussbesuch
→ Für DIII/DIV:
- Patienteneinverständnis 2
- Analyse Kit nur mit Pateinverständnis 3

→ Für DV:
- Patienteneinverständnis 1
- Analyse Kit („Baseline“) nur mit Patienteneinverständnis 2

Kontrollbesuche
→ DIII, DIV und DV
→ Analyse Kit (Zeitpunkte BE s. Angaben)

Abschlussbesuch
→ Analyse Kit
→ DIII, DIV und DV

DETECT III: Alle 8 – 12 Wochen
DIV a: Woche 4
Woche 12
alle 12 Wochen
DIV b: Woche 3 - 4*
Woche 9 - 12*
DV: Woche 6

Ende**
Ende**
Ende**
Ende**

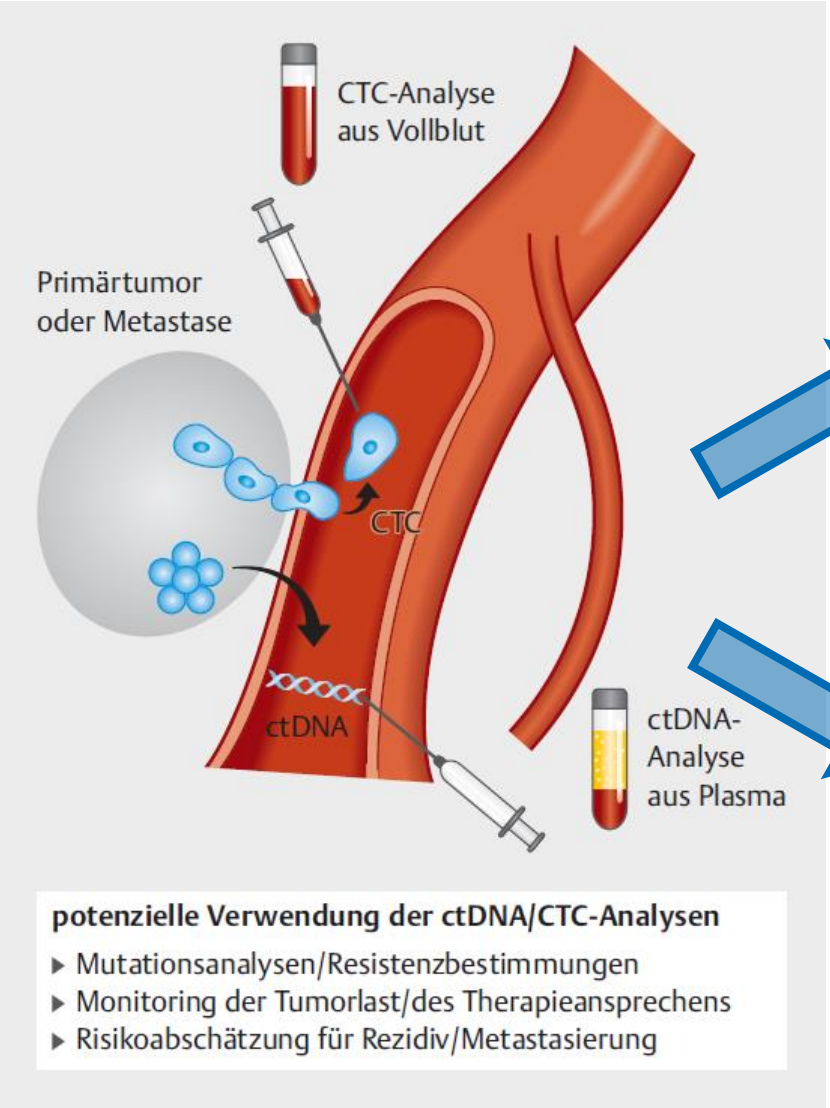
BE
BE
BE
BE
BE
BE

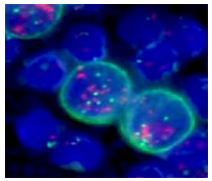
Analyse-Kit

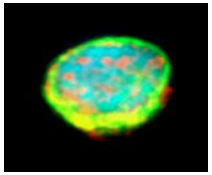
Max. 3 Wochen
0
Behandlungsbeginn
max. 1 Jahr
Behandlungsende**

**reguläres Studienende bzw. End of Treatment bei Progress

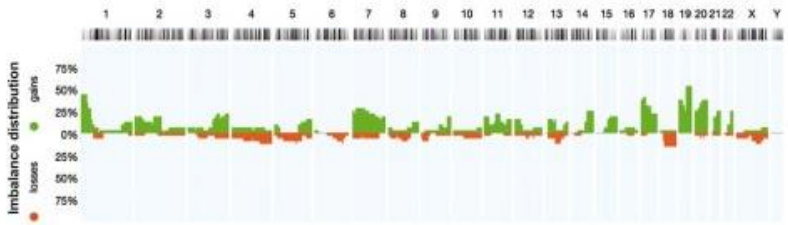
CTCs und ctDNA und ihre potenzielle Verwendung



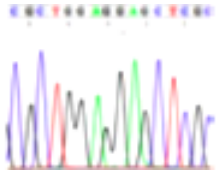


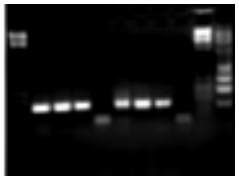


Expressionsanalysen



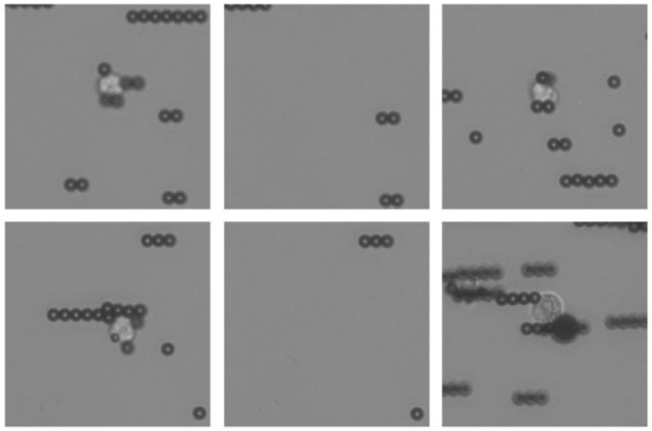
Mutationsanalysen



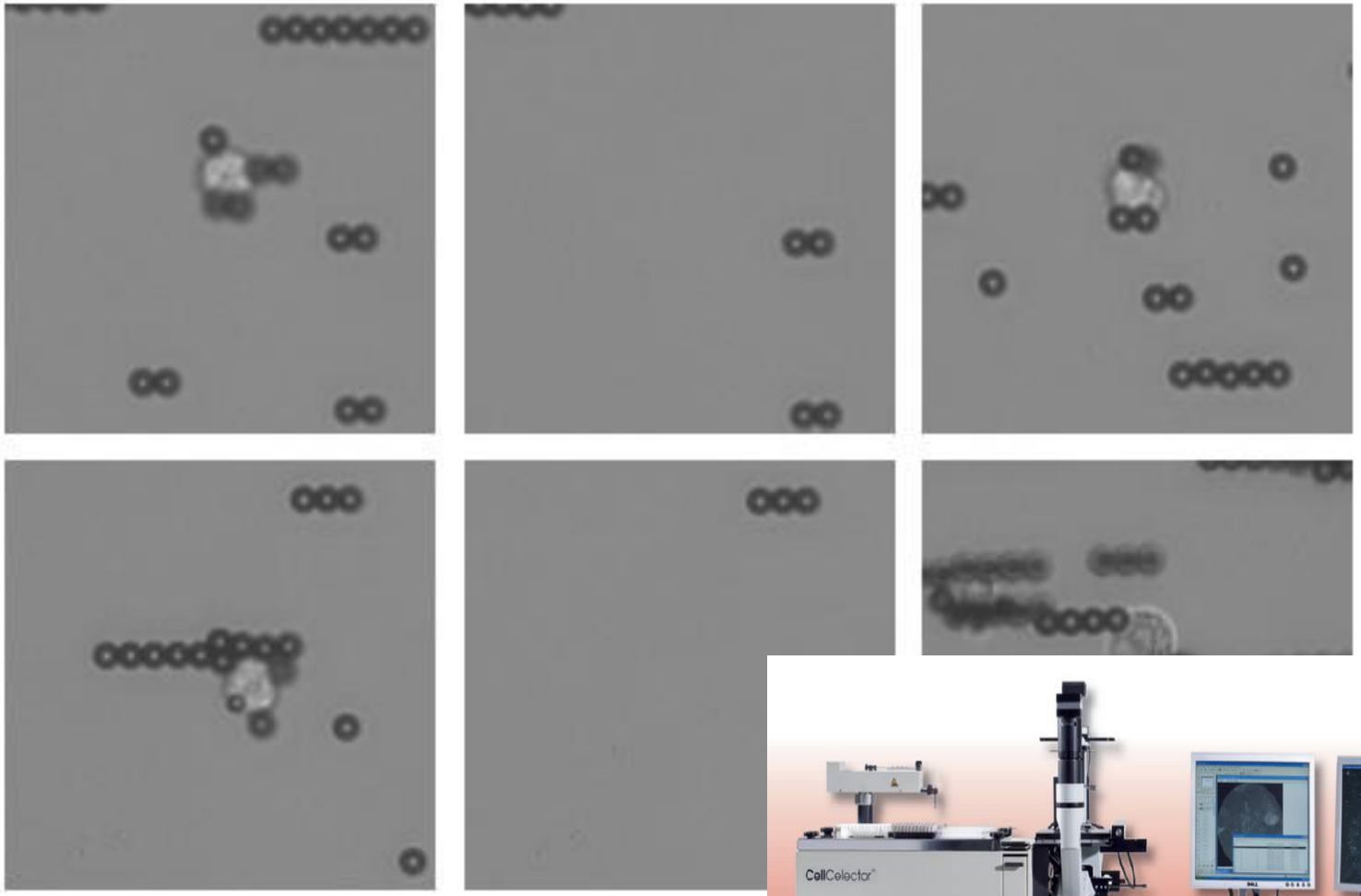


modifiziert nach: Polasik *et al.*, Geburtshilfe Frauenheilkd. 2017 Dec;77(12):1291-1298.

CTC- Isolierung und CTC Banking
- Wie geht das?-

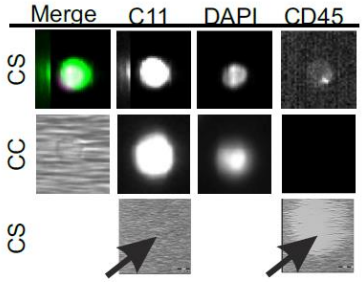


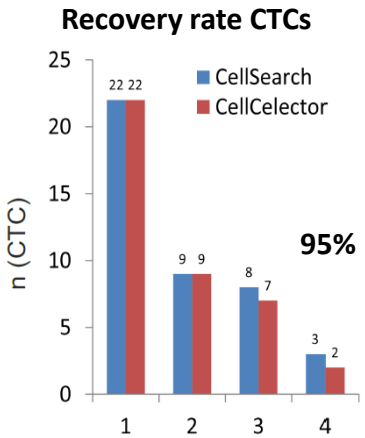
CTC- Isolierung und CTC Banking



DETECT

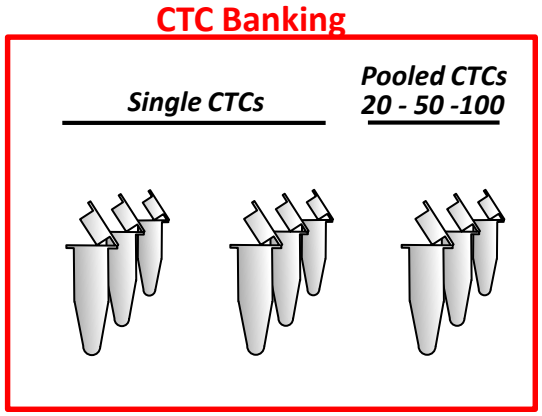
CTC-Isolierung, -Banking und molekulargenetische Charakterisierung



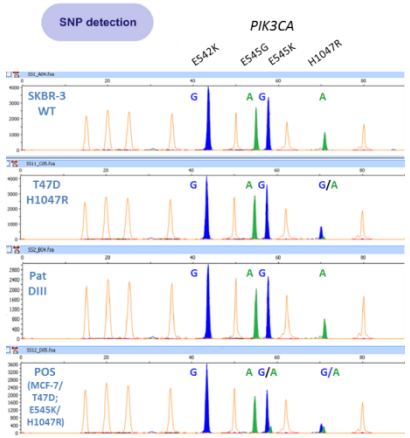


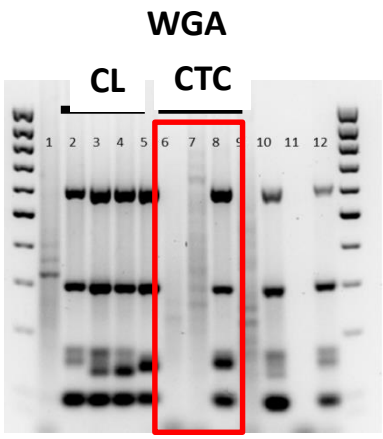
Micromanipulation

CTC Einzelzellisolation und Banking



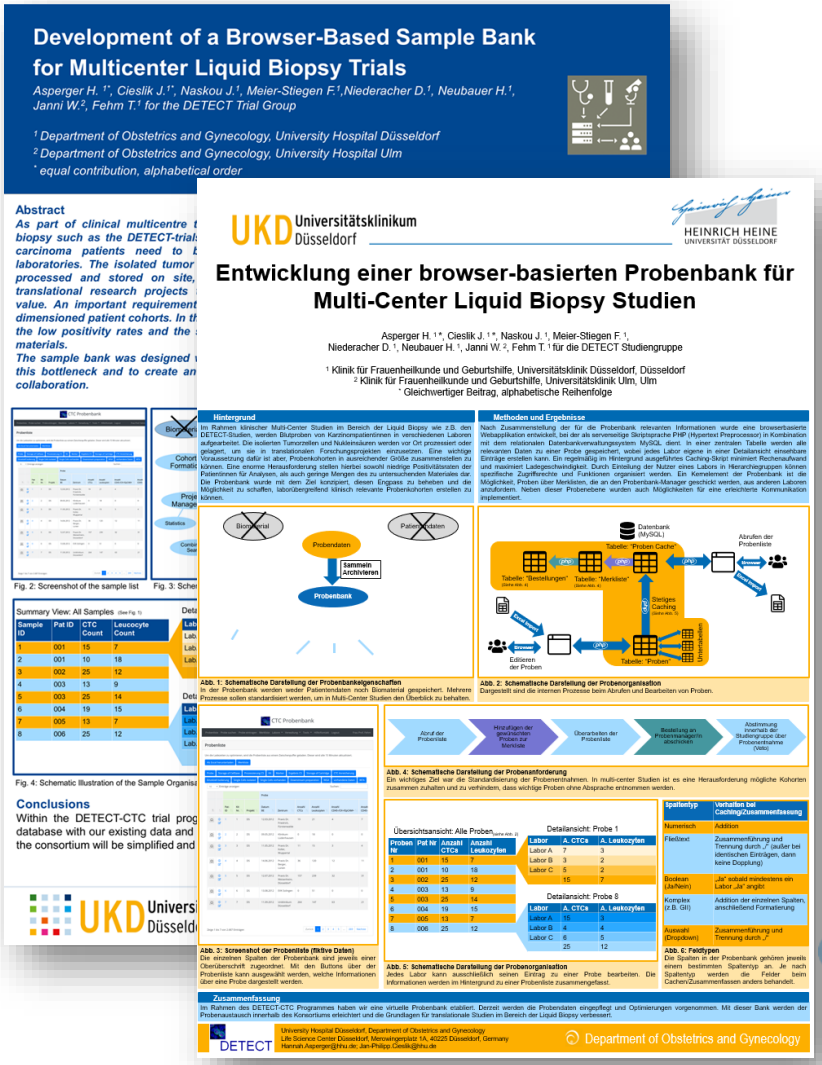
- Mutationsanalyse (z. B. *PIK3CA*, *ESR-1*)
- *single cell genome profiling*



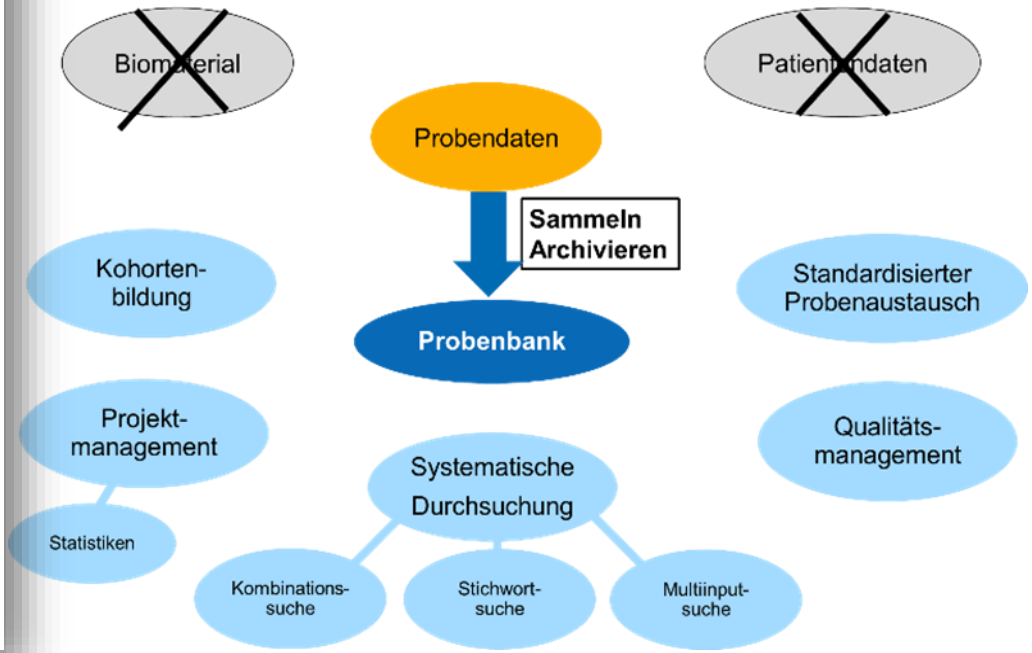


Schneck H,.., Neubauer H. Mol Oncol. 2013

Etablierung einer CTC-Probenbank zur Ermöglichung translationaler Projekte



Aktuell Probendaten von ca. 2700 Proben gespeichert



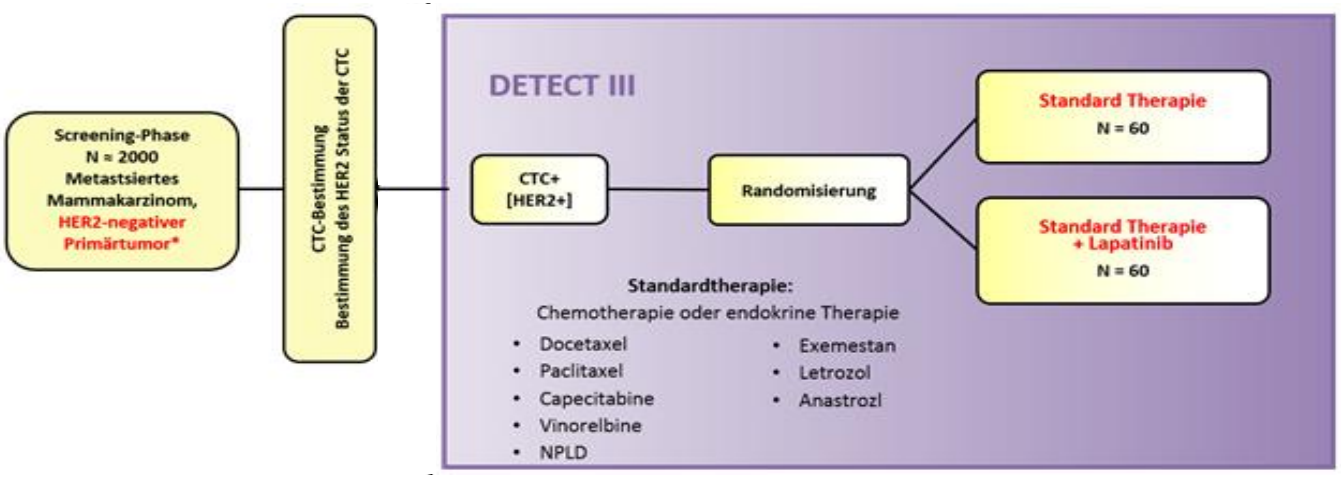
Asperger H et al. DKTK-Meeting 2018

Translationale Studien

Update zu den CTC-Studien

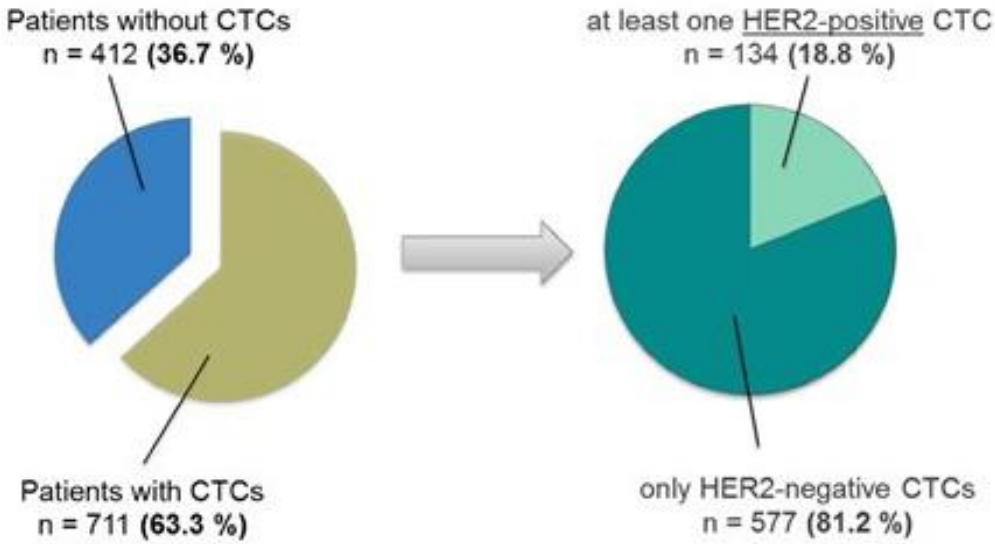
DETECT III

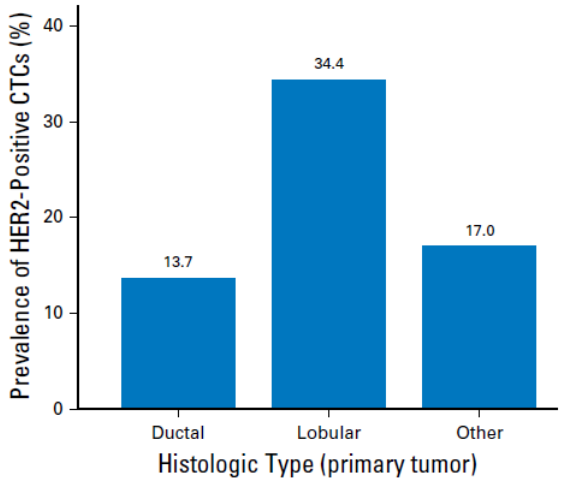
Multizentrische, prospektiv randomisierte Phase III Studie zum Vergleich einer antineoplastischen Therapie allein versus einer antineoplastischen Therapie plus **Lapatinib** bei Patientinnen mit initial HER2-negativem metastasiertem Brustkrebs und **HER2-positiven zirkulierenden Tumorzellen**

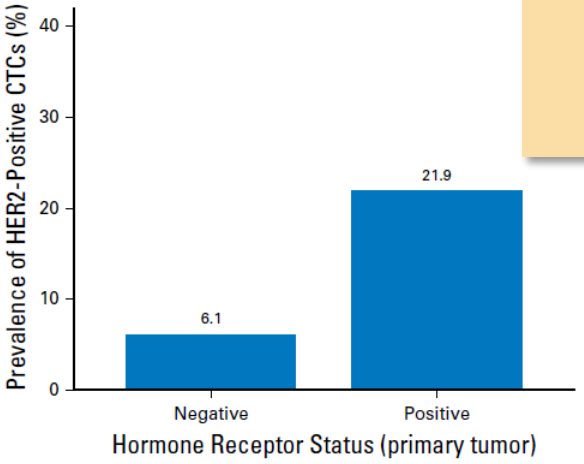


Primärer Endpunkt: CTC-Clearence

Diskordanz zwischen Primärtumor und CTCs bezüglich HER2 -Status







- → Diskordanz des HER2 Status in 18,8% der Patientinnen
- → Assoziation zum HR-Status und zur Histologie des Primärtumors
- → Der klinische Nutzen einer HER2 gerichteten Therapie steht noch aus

Poster presentation at 38th Annual SABCS, 2015, available at https://www.sabcs.org/ De Gregorio *et al.*, *JCO Precision Oncology* 2017 DOI: 10.1200/PO.17.00023

Trafo-Kongress 2018

UKD Universitätsklinikum Düsseldorf

HEINRICH HEINE UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

CTC-Analyse am Beispiel einer Index Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom – eine Falldarstellung.

André Franken[1], Bianca Behrens[2], Florian Reinhardt[1], Liwen Yang[1], Ellen Honisch[1], Nikolas Stoecklein[2], Dieter Niederacher[1], Tanja Fehm[1], Hans Neubauer[1]

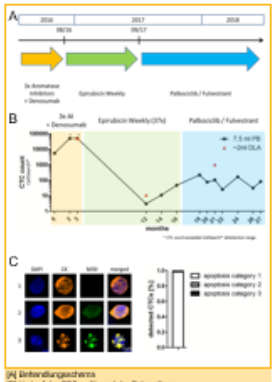
[1] Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Düsseldorf
[2] Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Einleitung

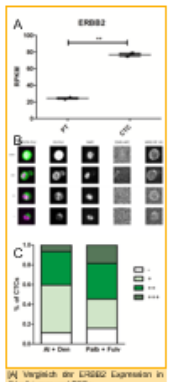
Die molekulare Charakterisierung und der klinische Nutzen zirkulierender Tumorzellen (CTCs) wird durch ihre geringe Anzahl im Blut erschwert. Vereinzelt finden wir jedoch Patienten mit vielen CTCs im Blut, sodass speziell in solchen Fällen genauere und wiederholbare Untersuchungen CTC-spezifischer, molekularer und funktionaler Eigenschaften möglich sind. Wir erhoffen uns, dass wir anhand solcher Fälle Informationen zur heterogenen Bildung von CTCs erhalten können um damit Konsequenzen über den klinischen Nutzen zu ziehen.

Methodik

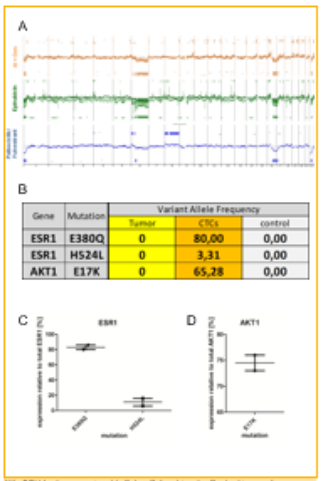
Die Patientin leidet derzeit an einem metastasierten Mammakarzinom. Der Primärtu - 2007 operativ entfernt - war vom luminal-luminalen Subtyp, der im weiteren klinischen Verlauf multiple cerebrale, eine ossäre und hepatische Metastase sowie eine Knochenmarksekundärinvasion nimmt. Die Therapieschemata wurde im fortgeschrittenen Stadium wie folgt: drei verschiedene Aromatasehemmer (AI) und Denosumab nach cerebraler und ossärer Metastasierung, bei hepatischer Metastasierung und oligärer Progrese erfolgte die Gabe von Epirubicin im weekly Schema. Seit Anfang 2018 erhält die Patientin Palbociclib und Fulvestrant. Während der Behandlungszeitraums wurden in regelmäßigen Abständen Blutproben entnommen. Zusätzlich wurden CTCs mit Hilfe der in unserer Klinik etablierten diagnostischen Leukapherese (DLA) aus mehreren Litern Blut angereichert. Die Anzahl der CTCs wurde mittels CellSearch® Analyse aus peripheren Blut- und DLA-Proben bestimmt. Neben der CTC-Anzahl wurde die Expression von Östrogenrezeptor und Her2/Neu auf CTCs untersucht. CTCs sowie die Gewebe des Primärtus und einer hepatischen Metastase wurden auf chromosomale Aberrationen und Mutationen mit Hilfe einer Array-basierten vergleichenden genomischen Hybridisierung bzw. der Sequenzierung des Cancer-Loms untersucht. Zudem wurde das Genexpressionsprofil von CTCs und Primärtumor durch RNA Sequenzierung verglichen.



(A) Behandlungsschema
(B) Verlauf der CTCs während der Behandlung
(C) Die Patientin weist außergewöhnlich viele nicht apoptotische CTCs auf, die für eine weitere Charakterisierung besonders gut geeignet sind.

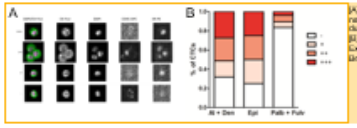


(A) Vergleich der ERBB2 Expression in Primärtumor und CTCs
(B) Einteilung der CTCs nach HER2 Expression durch Immunfluorescenz
(C) Verlauf der Her2 Expression während des Beobachtungszeitraums



Gene	Mutation	Variant Allele Frequency		
		Tumor	CTCs	control
ESR1	E380Q	0	80,00	0,00
ESR1	H524L	0	3,31	0,00
AKT1	E17K	0	65,28	0,00

(A) aCGH Analyse zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Beobachtungszeitraums
(B) Vergleich von Mutationen zwischen Primärtumor und CTCs zum Zeitpunkt der ersten DLA
(C) Primärtumorinvasiver ESR1 Transkripte in den CTCs
(D) Primärtumorinvasiver AKT1 Transkripte in den CTCs



(A) Einteilung der CTCs nach HER2 Expression durch Immunfluorescenz
(B) Verlauf der Her2 Expression während des Beobachtungszeitraums

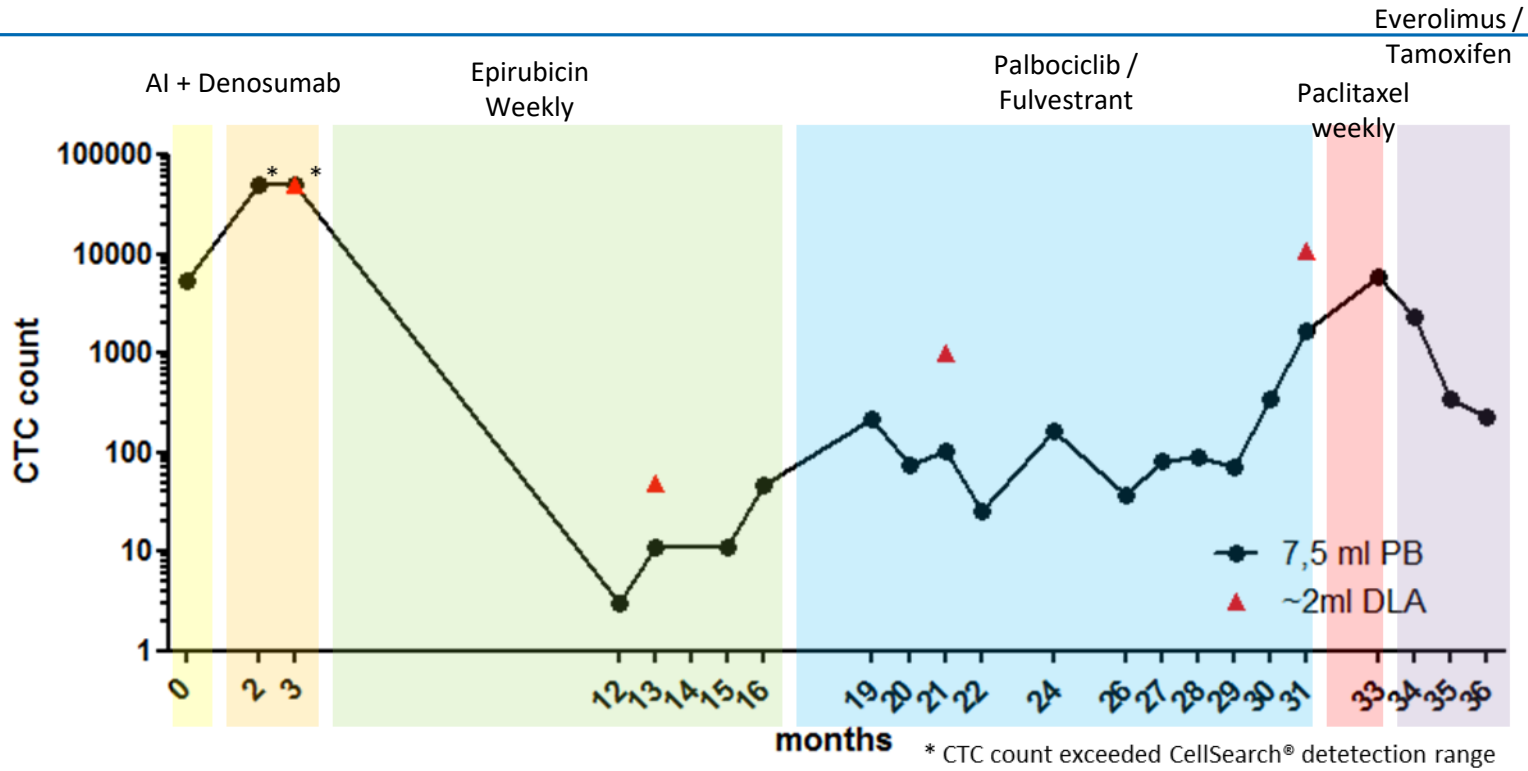
Schlussfolgerung

Indes Patientinnen ermöglichen es, die ganze Breite an zur Verfügung stehender Methoden anzuwenden um den speziellen Fall detailliert analysieren zu können. Dies kann dazu beitragen, die klinischen Fakten von CTCs zu ergründen.

University Hospital Düsseldorf, Department of Obstetrics and Gynecology
Life Science Center Düsseldorf, Merowingerplatz 1A, 40225 Düsseldorf, Germany

Department of Obstetrics and Gynecology

CTC-Analyse am Beispiel einer Index Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom – eine Falldarstellung

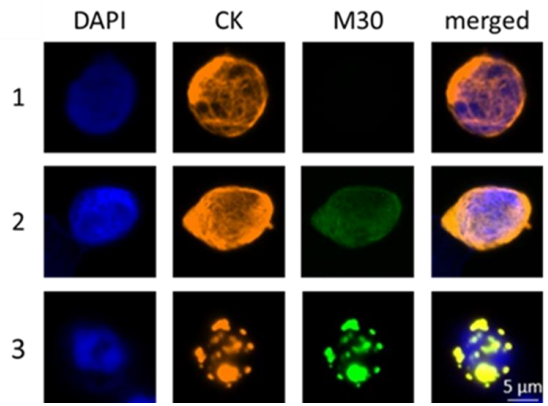


→ Index Patientinnen ermöglichen es, die ganze Breite an zur Verfügung stehender Methoden anzuwenden um den speziellen Fall detailliert analysieren zu können. Dies kann dazu beitragen, den klinischen Nutzen von CTCs zu ergründen.

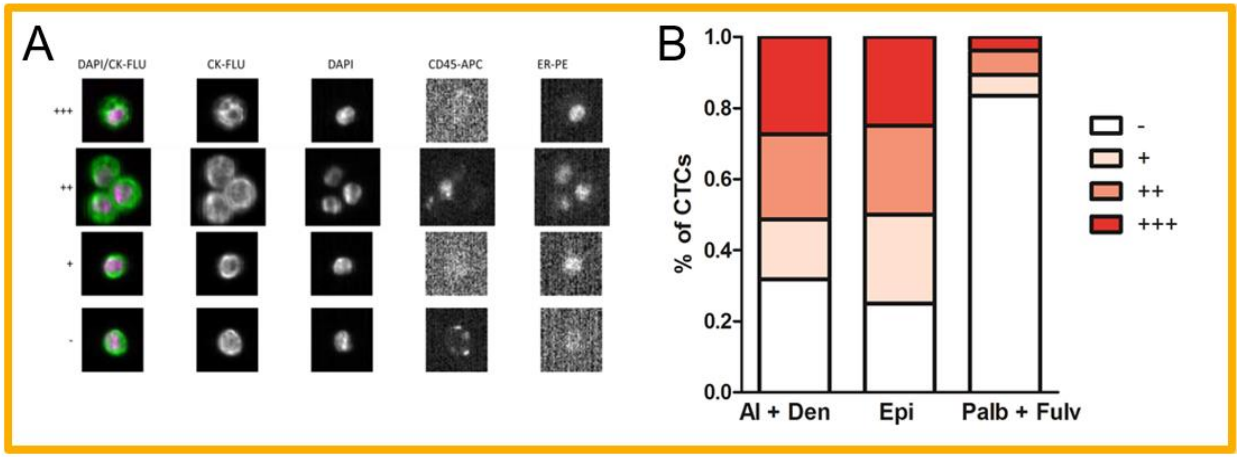
Unpublished data

CTC-Analyse am Beispiel einer Index Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom – weitergehende Charakterisierung der CTCs

Nachweis von Apoptose



Bestimmung des HER2-Status



→ Index Patientinnen ermöglichen es, die ganze Breite an zur Verfügung stehender Methoden anzuwenden um den speziellen Fall detailliert analysieren zu können. Dies kann dazu beitragen, den klinischen Nutzen von CTCs zu ergründen.

DETECT IV

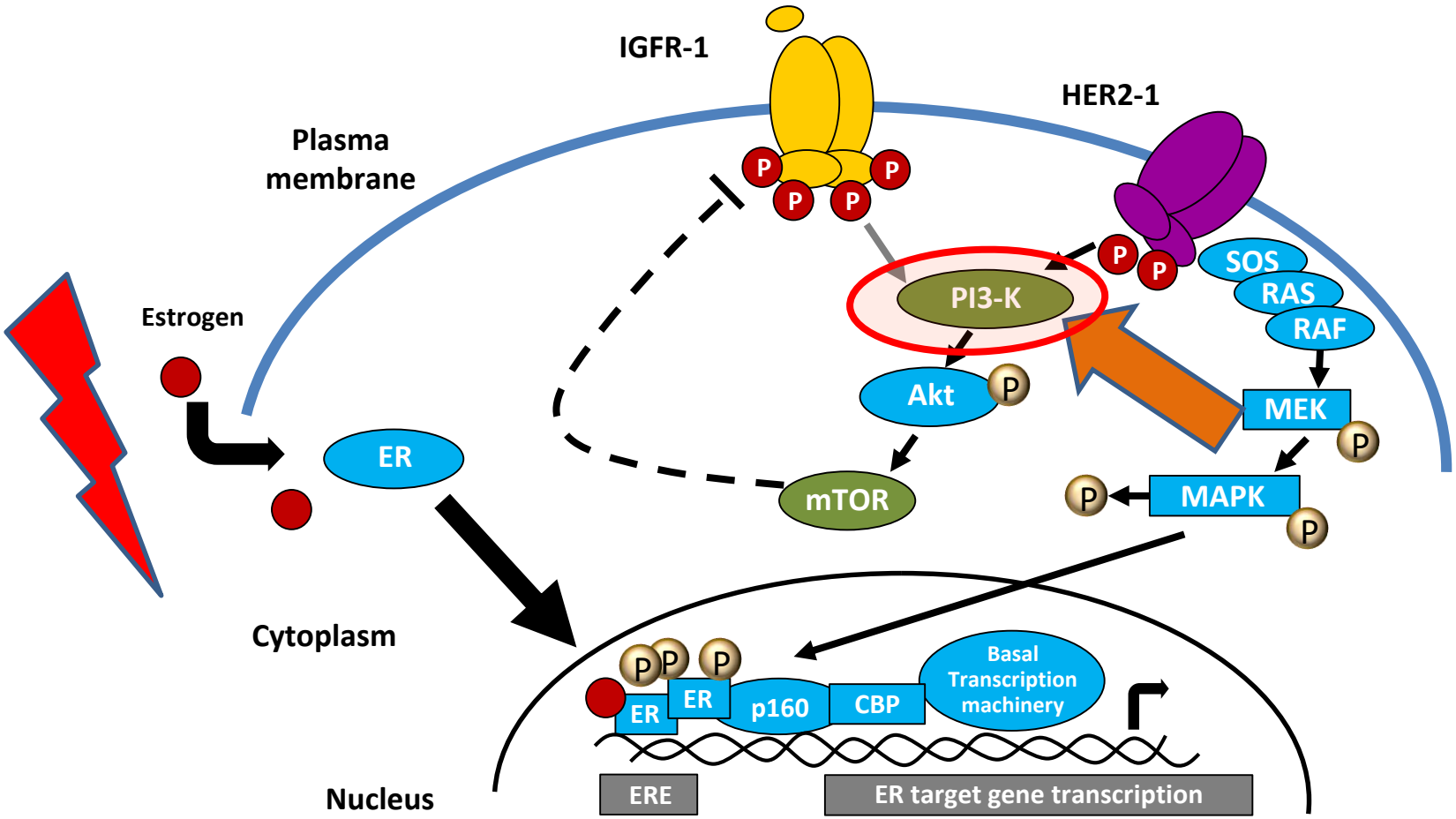
Für Patientinnen mit HER2 – negativem metastasiertem Mammakarzinom und **HER2 – negativen zirkulierenden Tumorzellen**

DETECT IVa: Patientinnen mit ***hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom*** erhalten ***Everolimus bzw. Ribociclib*** plus eine ***endokrine Therapie***

DETECT IVb: Patientinnen mit ***triple-negativem oder mit hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom*** und Indikation zur Chemotherapie werden mit Eribulin behandelt

Rationale: Analyse des prädiktiven Werts von CTCs für verschiedene Therapieinterventionen mit dem Ziel einer weiter personalisierten Tumortherapie

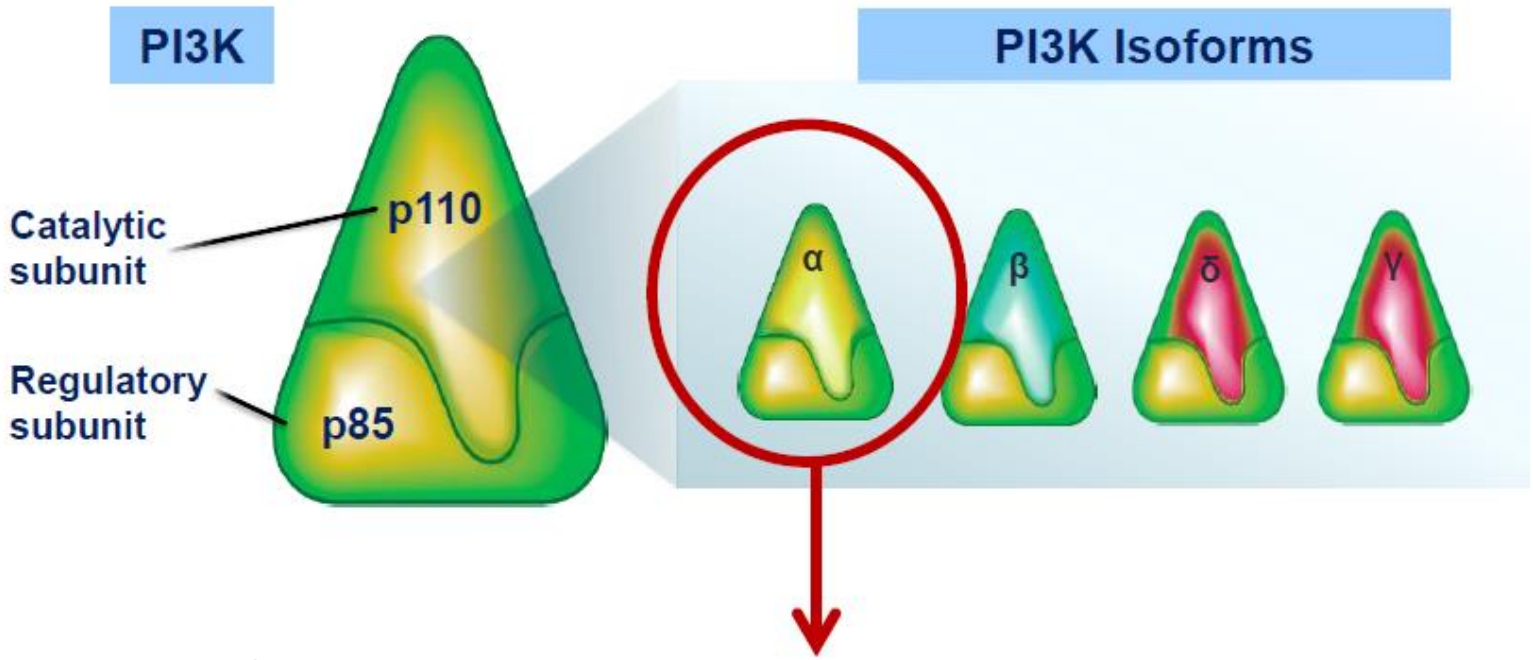
Mechanismen endokrinen Resistenz



CBP = CREB binding protein, ER = estrogen receptor, ERE = estrogen-responsive element, HER2 = human epidermal growth factor receptor 2, MAPK = mitogen-activated protein kinase, MEK = mitogen-activated protein kinase/extracellular signal–related kinase kinase, mTOR = mammalian target of rapamycin, PI3K = phosphoinositide-3 kinase, SOS = son of sevenless

Baselga J. *Oncologist* 2011;16:12-19.

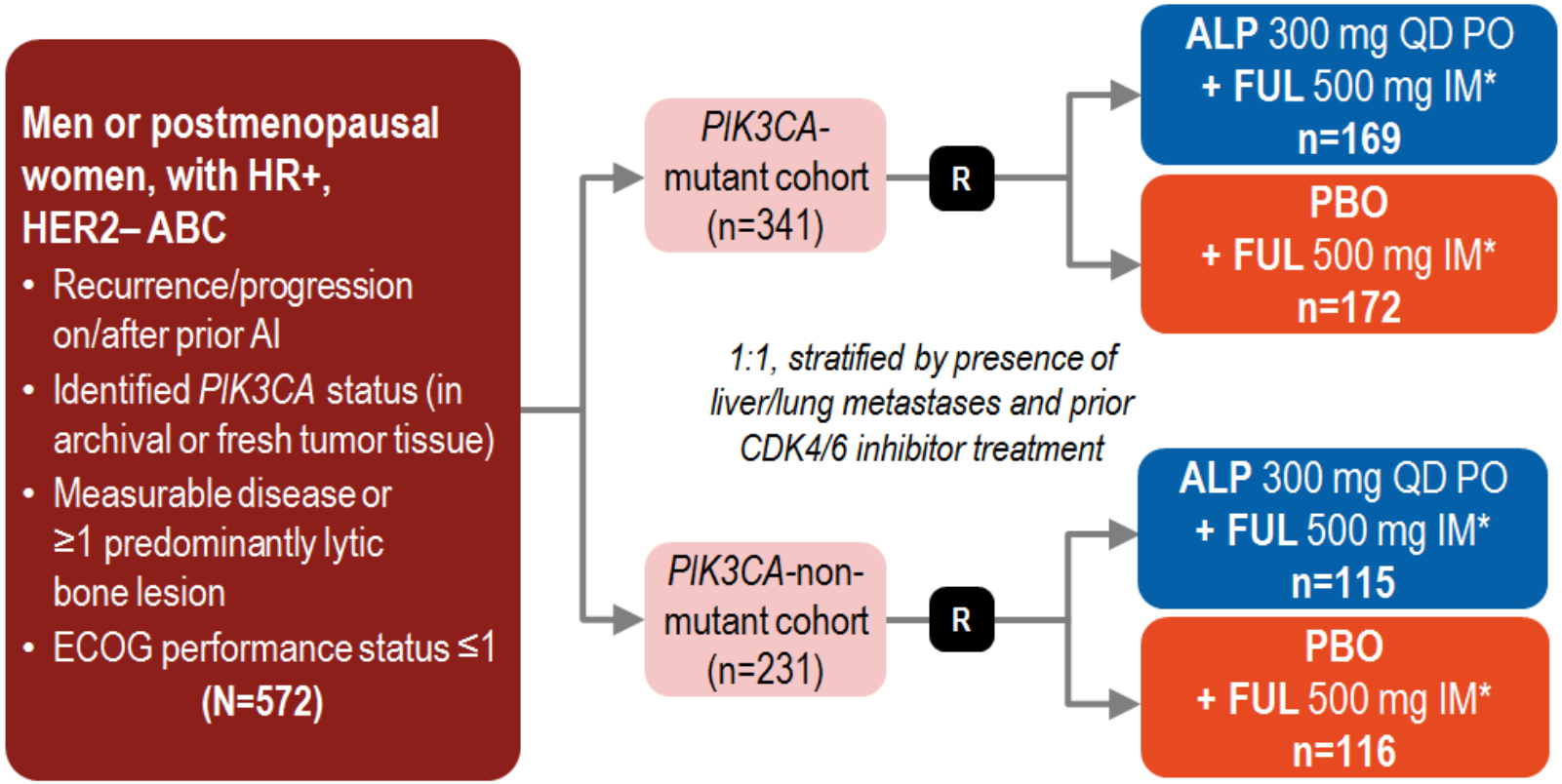
PI3K: Vier unterschiedliche Klasse-1-Isoformen



- Die alpha Isoform ist die dominante PI3K im Mammakarzinom.
- PIK3CA-Mutationen sind in 25-40% aller Mammakarzinome nachweisbar;
  - insbesondere HR+ und/ oder Her2+.

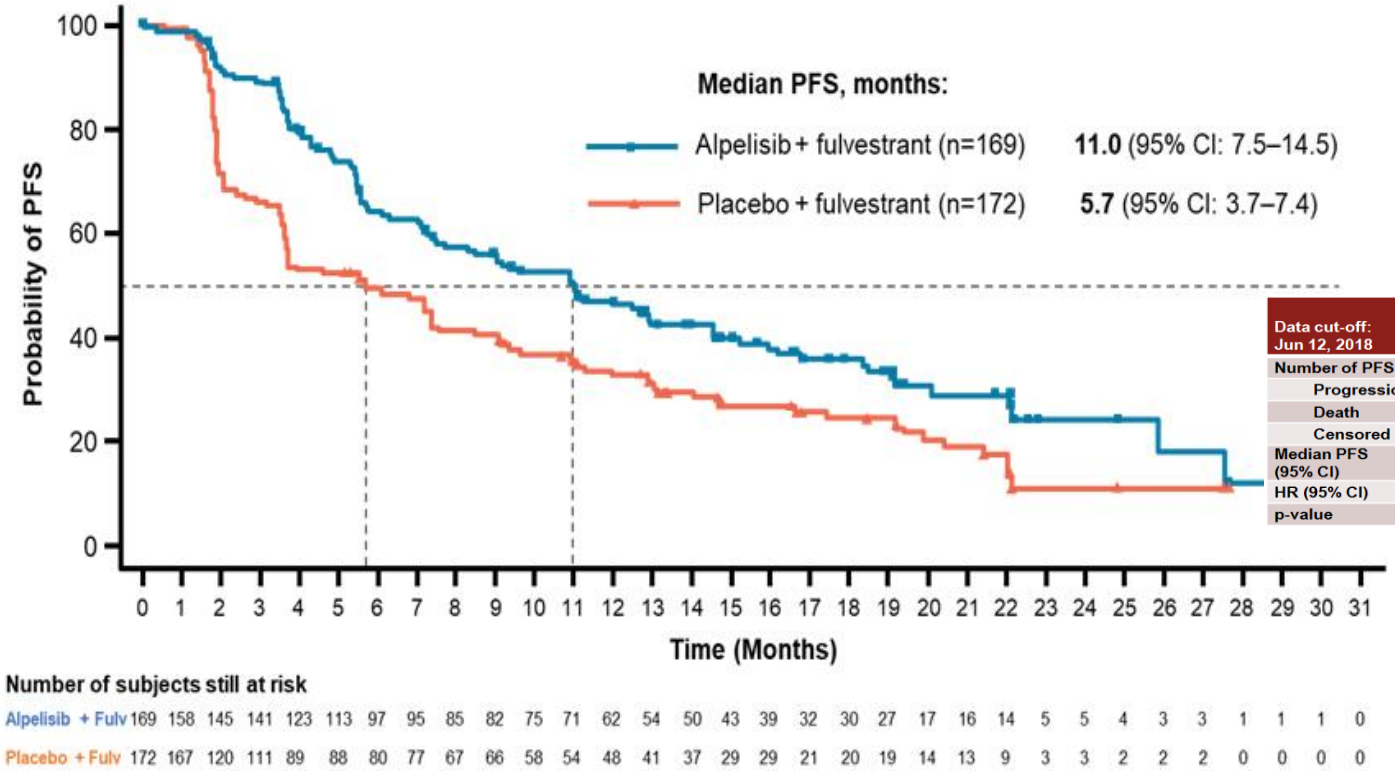
Andre F, Global Breast Cancer Summit, 2015

SOLAR-1: randomisierte Phase-III-Studie



André F et al., ESMO, 2018

Primärer Endpunkt: lokales Assessment von PFS in der PIK3CA-mutierten Kohorte

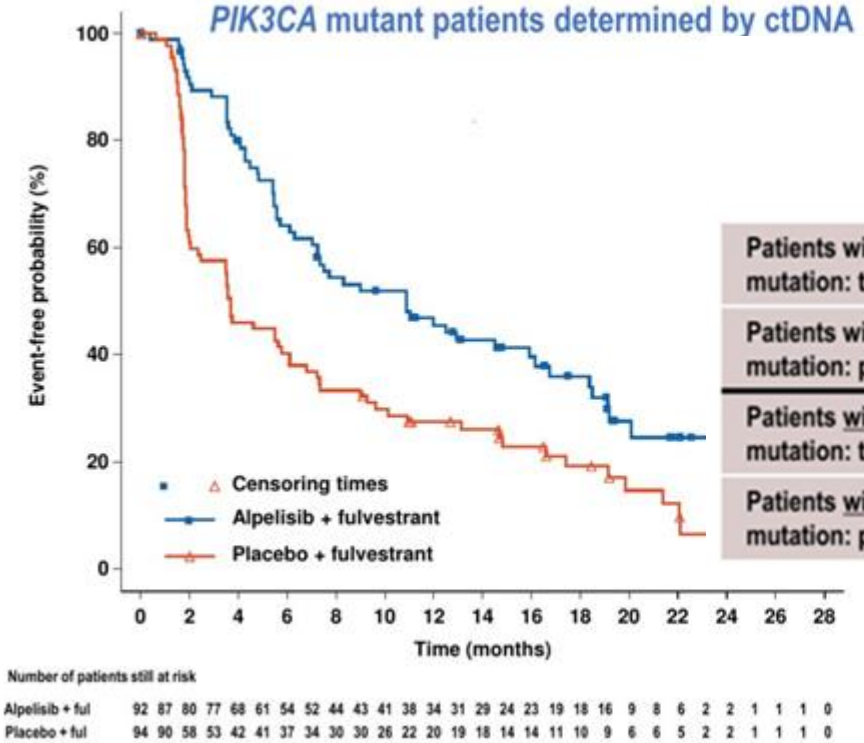


Data cut-off: Jun 12, 2018	Alpelisib + fulvestrant (N=169)	Placebo + fulvestrant (N=172)
Number of PFS events, n (%)	103 (60.9)	129 (75.0)
Progression	99 (58.6)	120 (69.8)
Death	4 (2.4)	9 (5.2)
Censored	66 (39.1)	43 (25.0)
Median PFS (95% CI)	11.0 (7.5–14.5)	5.7 (3.7–7.4)
HR (95% CI)	0.65 (0.50–0.85)	
p-value	0.00065	

Verlängerung des Progressionsfreien Intervalls bei PIKCA-Mutation von 5,7 auf 11 Monate (HR 0,65)

André F et al., ESMO, 2018

Lokal erhobenes PFS nach Mutationsstatus in Tumor & Plasma

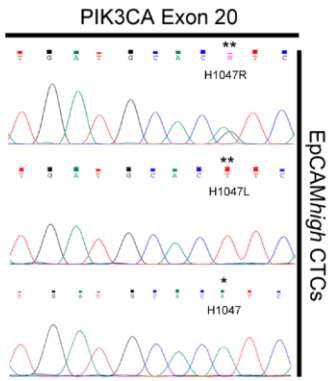


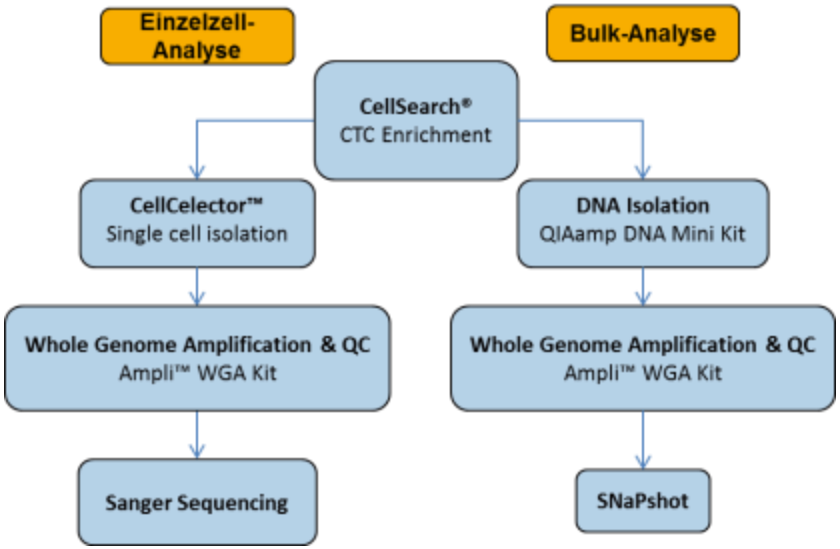
	ALP + FUL		PBO + FUL		
	Event n/N (%)	Median PFS	Event n/N (%)	Median PFS	HR
Patients with *PIK3CA* mutation: tissue	103/169 (60.9)	11.0	129/172 (75.0)	5.7	0.65
Patients with *PIK3CA* mutation: plasma	57/92 (62.0)	10.9	75/94 (79.8)	3.7	0.55
Patients without *PIK3CA* mutation: tissue	49/115 (42.6)	7.4	57/116 (49.1)	5.6	0.85
Patients without *PIK3CA* mutation: plasma	92/181 (50.8)	8.8	103/182 (56.6)	7.3	0.80

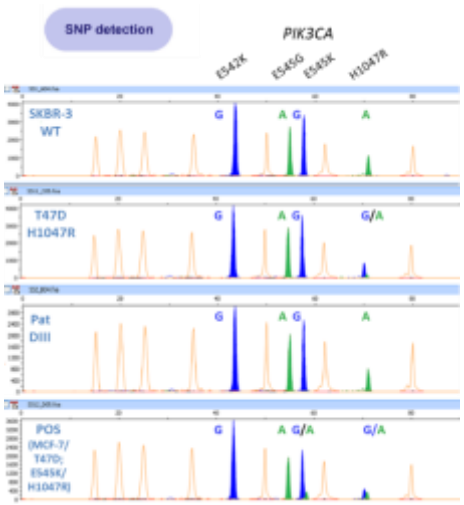
Bestimmung der Mutation im Plasma (ctDNA) sagt Wirksamkeit voraus: „Liquid Biopsy“ scheint möglich

Juric D et al. SABCS 2018 GS3_8

Molekulargenetische Charakterisierung von CTCs – *PIK3CA* Mutationsstatus







	Sanger Sequencing	SNaPshot
Number of patients analysed	**19**	**65**
Number of samples analysed	**93**	**81**
Number of mutations	**14**	**19**
Number of patients with *PIK3CA* mutations	**5 (26,3%)**	**13 (20%)**
Number of samples with *PIK3CA* mutations	**14 (15,1%)**	**15 (18,5%)**
Number of Exon 9 E545K	**9**	**11**
Number of Exon 20 H1047R and H1047L	**5**	**8**

Lampignano *et al.*, Int J Mol Sci. 2017 Aug 31;18(9). pii: E1885 and Schömer, unpublished data.

Therapierelevante genomische Faktoren beim Mammakarzinom („actionable“)

© AGO e. V.
in der DGGG e.V.
sowie
in der DKG e.V.

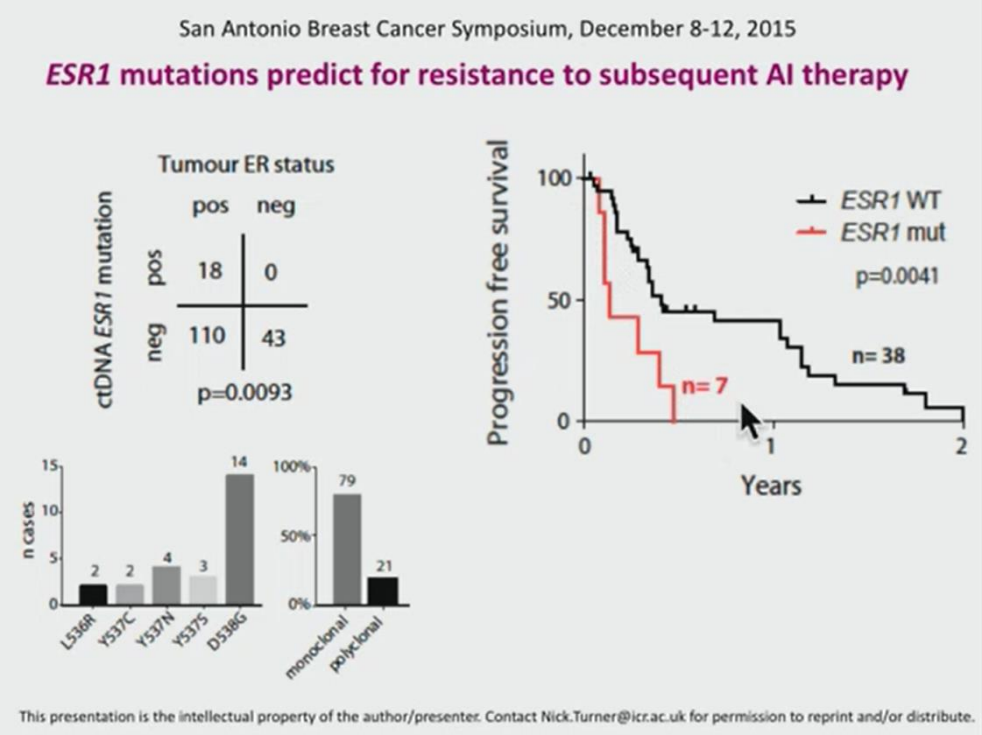
Guidelines Breast
Version 2012.1D

Faktor*	Outcome	LoE_{2009}	CTS	AGO
Aus Studien beim Mammakarzinom				
▪ sPI3K Mutation	Anti-HER-Therapie-Effektivität	I	B	-**
▪ sESR1 Mutation	Antihormon-Effektivität	II	B	+/-**
▪ sHER2 Mutation	Anti-HER2-Therapie-Effektivität	II	B	+/-**
▪ sBRCA1/2 oder gBRCA1/2	Platin-Effektivität	II	B	+/-**
▪ sBRCA1/2 oder gBRCA1/2	Chemotherapie-Effektivität	II	B	+/-**
▪ sBRCA1/2 oder gBRCA1/2	PARP-Inhibitor-Effektivität	I	A	+**
Aus Studien bei anderen Karzinomen				
▪ Companion Diagnostics Mutations bei Therapien für andere Karzinome (z.B. BRAF, FGFR1, …)	Effektivität verschiedener Medikamente	IV	D	+/-**
▪ Large Panel Gene Analysis (e.g. FoundationOne, GPS Cancer, NeoSelect, Molecular Health Guide, Lokale „hand selected„ Panels)	Effektivität verschiedener Medikamente, Prognose	III	C	+/-**

* Bestimmungmethode somatischer Veränderungen nicht bewertet. Prinzipiell möglich aus Tumorfrischmaterial, Paraffin-Gewebe, zirkulierenden Nukleinsäuren

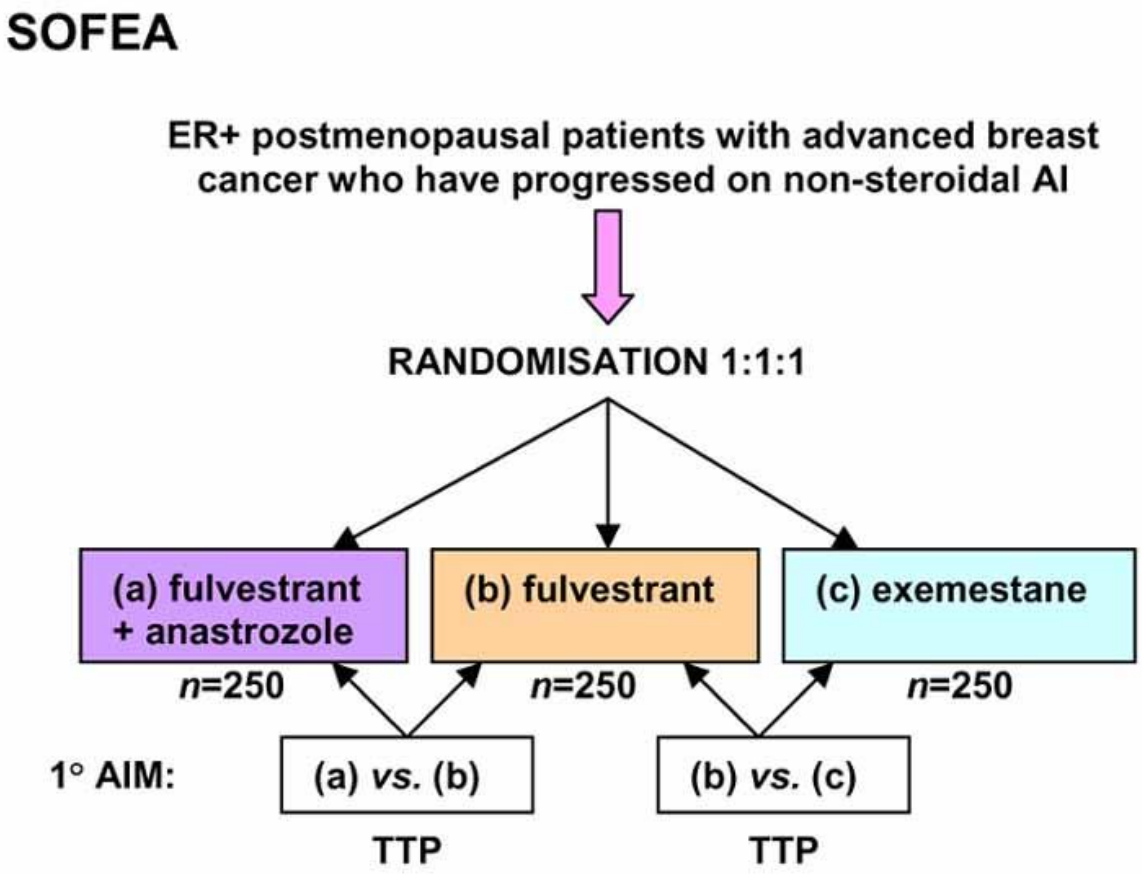
** Teilnahme an Studien oder strukturierten Programmen empfohlen / s=somatisch / g = Keimbahn

ESR-1 Mutationen als Hinweis für endokrine Resistenz



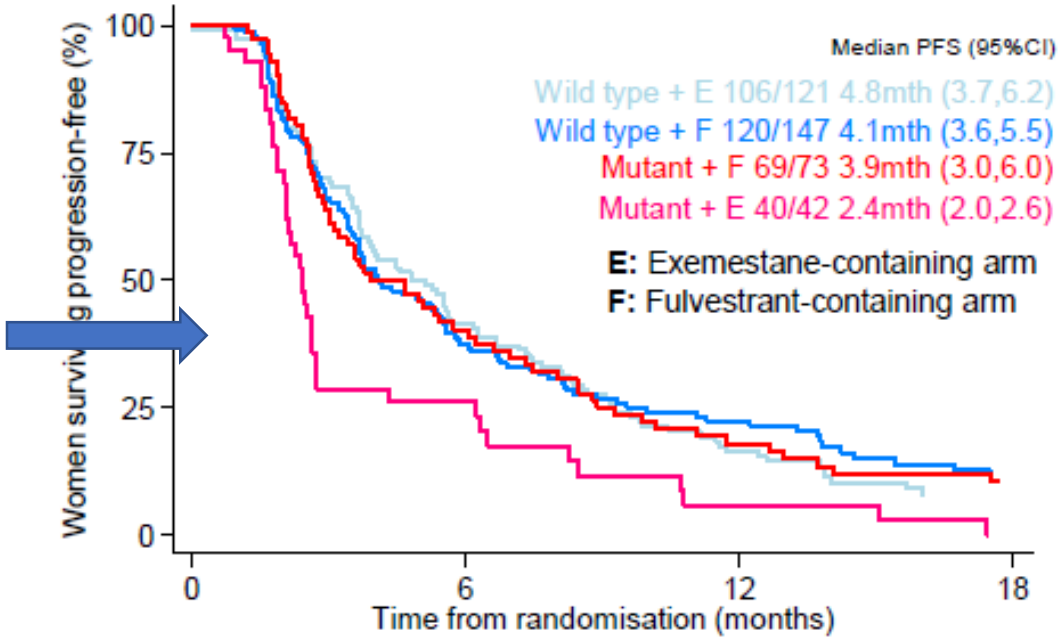
→ Aktivierende ESR1-Mutationen scheinen eine essentielle Rolle bei der Entstehung endokriner Resistenz zu haben (Robinson *et al.,* Nat Genet. 2013 Dec;45(12):1446-51.)

Metaanalyse SoFEA und EFECT



Turner N et al., SABCS 2018, PD 2-04

SoFEA and EFECT meta-analysis for baseline detection of *ESR1* mutations



N at risk (events)

Wild type + E	121	(70)	49	(28)	17	(8)	7
Wild type + F	147	(87)	50	(19)	25	(10)	8
Mutant + E	42	(31)	9	(7)	2	(2)	0
Mutant + F	73	(43)	29	(16)	12	(5)	6

Turner N et al., SABCS 2018, PD 2-04

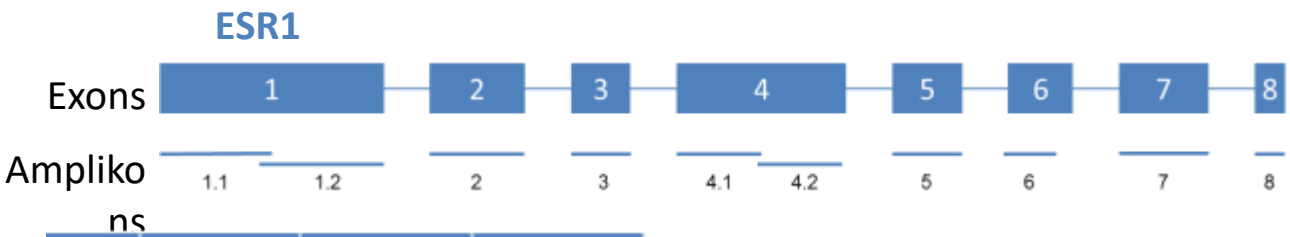
DETECT

Amplikon-basierte *ESR1* Sequenzierung im Rahmen von DETECT IVa

CTC Anreicherung mit CellSearch

CTC Isolation mit CellCelector

anschließend *Whole Genome Amplification*



#	WT	D538G	L507F
1	2		
2	1		
3	1		
4	5	4	
5	2		
6	3		
7			1
8	4		

	QC quality	mutation	
#1	3	-	
#2	4	+	homozygous
#3	3	+	homozygous
#4	4	+	heterozygous
#5	1	+	homozygous
#6	1	-	
#7	3	-	
#8	3	-	
#9	2	-	

Identifikation von Punktmutationen, bislang CTCs von 46 Patientinnen analysiert

DETECT

ESR1 Sequencing of CTCs

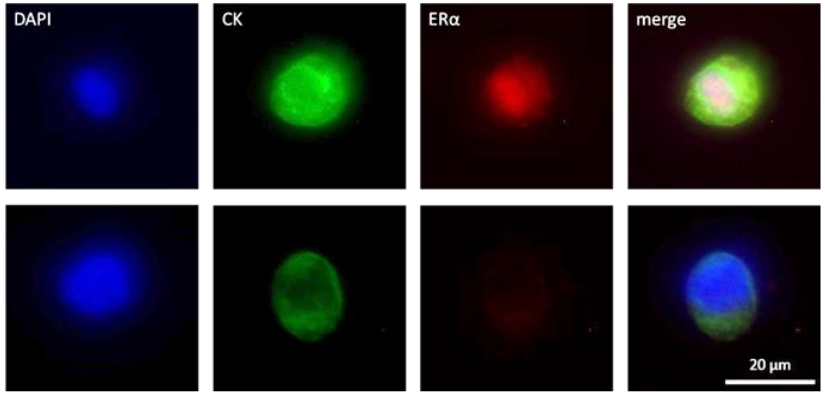
- 46 met Luminal BC Patients
- 1 - 8 CTCs per patient
- Exclusion of germline variants
- 13 von 46 Pat. haben CTCs mit ESR1-Mutationen 28%

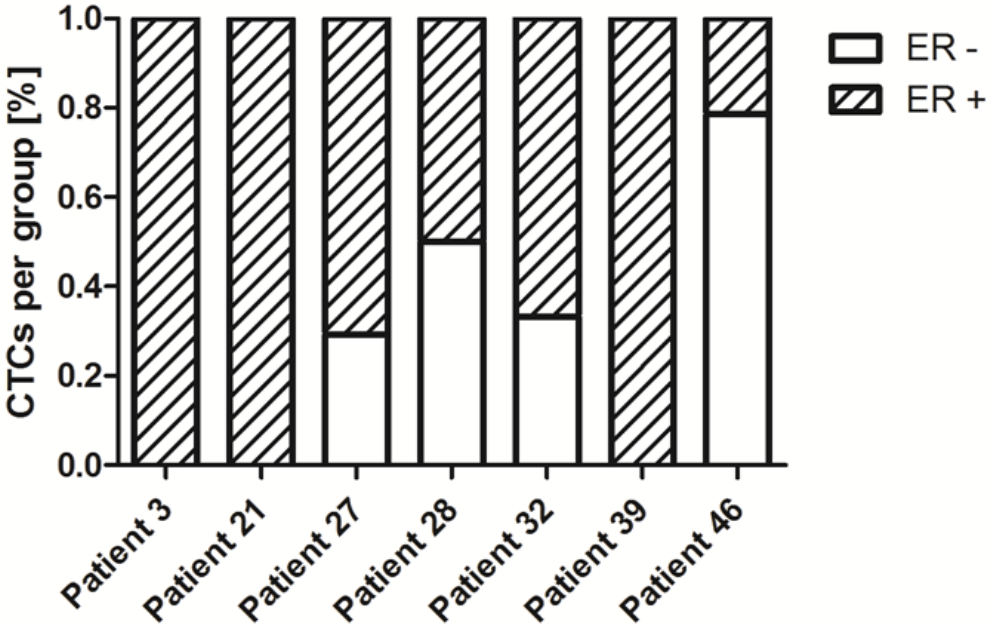
	WT	G160C	K252R	N348S	E380Q	D426E	L507F	Y537C	Y537N	D538G	D541Q
Patient 1								1*			
Patient 2								1			
Patient 3	1									7	
Patient 4	1										
Patient 5	5										
Patient 6	2										
Patient 7	2										
Patient 8	1										
Patient 9	3										
Patient 10	4										
Patient 11	3									5	
Patient 12	3										
Patient 13	4										
Patient 14	3										
Patient 15	2										
Patient 16	3										
Patient 17	1										
Patient 18	4										
Patient 19	2										
Patient 20	6										
Patient 21	4		1								
Patient 22	1										
Patient 23	2										
Patient 24	1										
Patient 25							1				
Patient 26	1										
Patient 27	2				5						
Patient 28	3					1					
Patient 29	1										
Patient 30	1										
Patient 31	3										
Patient 32	1			1							
Patient 33	4										
Patient 34	3										
Patient 35	1										
Patient 36	3										
Patient 37					1						
Patient 38	3										
Patient 39	3								1		
Patient 40	2										
Patient 41	3										
Patient 42	2										
Patient 43	3										
Patient 44	1	2									
Patient 45	5										
Patient 46	1										1

Franken et al. in preparation

DETECT

ERα Expression on Mutated CTCs



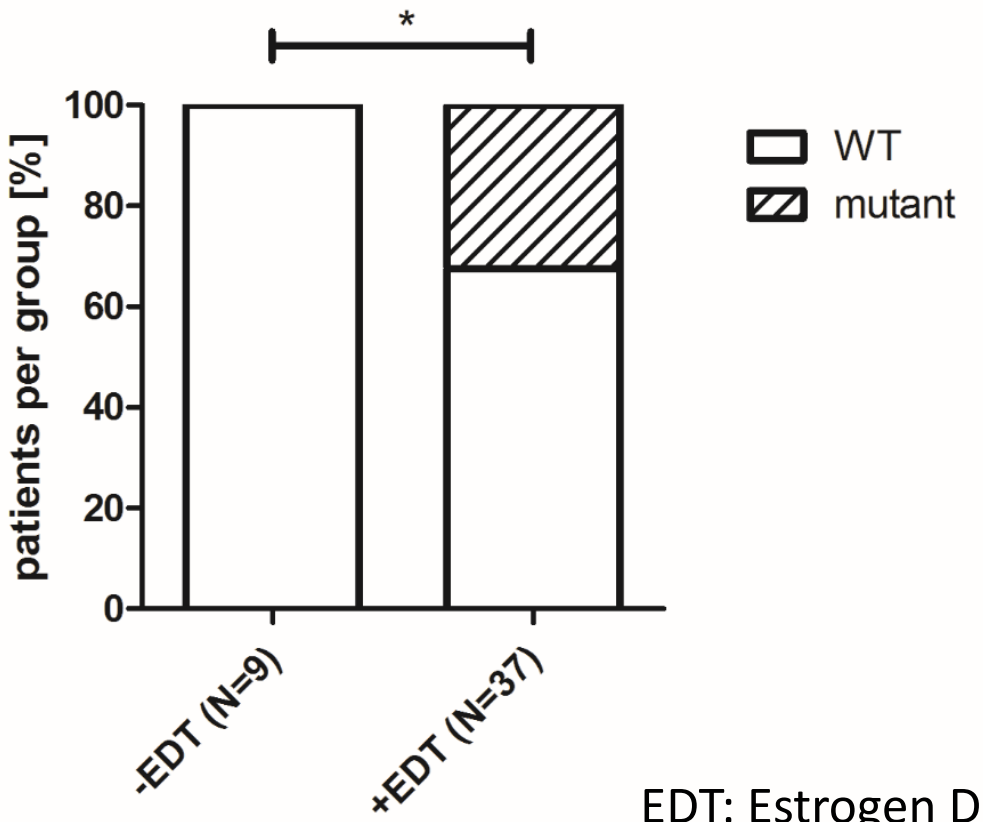


- 21.4 to 100 % of CTCs show nucleated ERα staining

Franken et al. in preparation

Presence of *ESR1* Mutations Correlates with Therapy

DETECT



EDT: Estrogen Deprivation Therapy

- ESR1 mutations only detected in patients, who received estrogen deprivation therapy (p-value: 0.0476)

Franken et al. in preparation

DETECT

Analysis of Tumor Tissue

	PT	2. PT	Rec	Met (before AI)	CTCs	Met (after AI)
Patient 1	WT				L408S/Y537C	
Patient 2	WT		WT		Y537C	
Patient 3	WT				D538G	D538G (42.5%)
Patient 11				WT	D538G	
Patient 21					K252R	
Patient 25	WT				L507F	
Patient 27	WT			WT	E380Q	
Patient 28				WT	D426E	
Patient 32	WT				N348S	
Patient 37	WT	WT			E380Q	
Patient 39	WT				Y537N	Y537N (65.0%)
Patient 46	WT			WT	L541Q	

- No ESR1 mutations detected in biopsies taken before CTC analysis

Franken et al. in preparation

DETECT IV

Für Patientinnen mit HER2 – negativem metastasiertem Mammakarzinom und **HER2 – negativen zirkulierenden Tumorzellen**

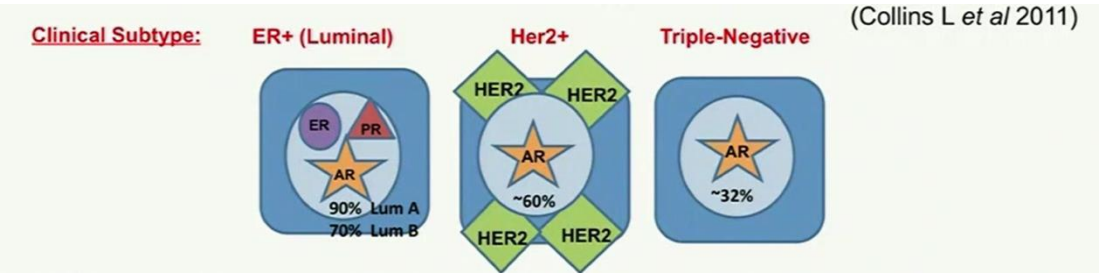
DETECT IVa: Patientinnen mit ***hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom*** erhalten ***Everolimus*** plus eine ***endokrine Therapie***

DETECT IVb: Patientinnen mit ***triple-negativem oder mit hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom*** und Indikation zur Chemotherapie werden mit Eribulin behandelt

Rationale: Analyse des prädiktiven Werts von CTCs für verschiedene Therapieinterventionen mit dem Ziel einer weiter personalisierten Tumortherapie

Androgenrezeptor – ein innovatives Target bei TNP?

- 77% der Mammakarzinome exprimieren Androgenrezeptor[1]



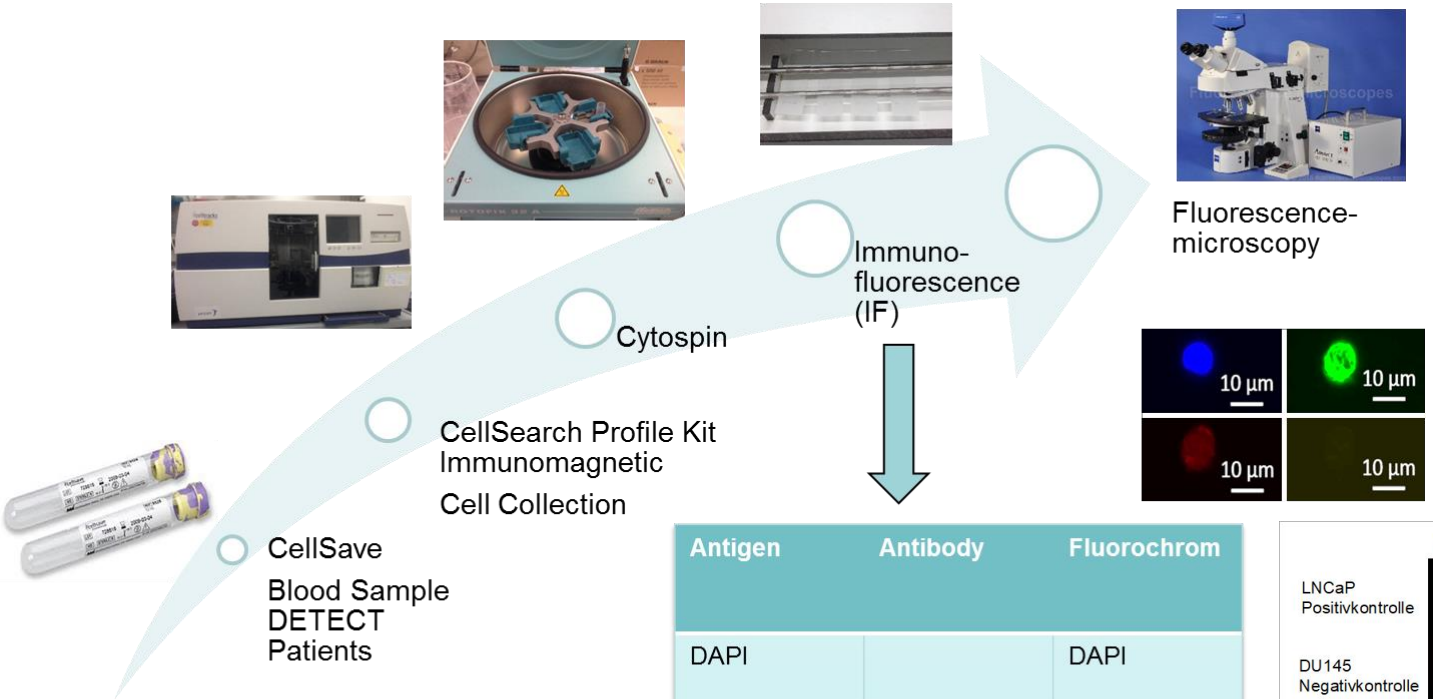
- ~16% der triple-negativen Mammakarzinome sind AR^{+}
  - Subklassifikation: Androgenrezeptorpositive Signatur[2]
  - AR+ TNBC positive Korrelation mit DFS[3]

Androgen receptor inhibitors		
UCBG 12-1: single arm, open-label, multicentre phase 2 trial[77] (NCT01842321)	Patients with metastatic or locally advanced TNBC and androgen receptor-positive breast cancer; abiraterone acetate (1000 mg) once a day plus prednisone (5 mg) twice a day; n=30	Clinical benefit rate 20·0% (95%CI 7·70%–38·6%); overall response rate 6·7% (0·80%–22·1%) median progression-free survival 2·8 months (1·7%-5·4%); 14·7% had grade 3 adverse events
MDV3100-11: phase 2 study[78] (NCT01889238)	Evaluating single agent enzalutamide in advanced androgen receptor-positive TNBC; evaluation of androgen receptor signature as possible biomarker; n=118 treated, n=75 evaluated for response	Clinical benefit rate (16 weeks): 35% (all patients), 39% (androgen-receptor signature positive); 5% had adverse events ≥grade 3
TBCRC 011: phase 2 study[79] (NCT00468715)	Patients with androgen receptor positive, oestrogen or progesterone receptor-negative metastatic breast cancer; bicalutamide (150 mg orally); n=28 treated, n=26 for response evaluation	6 month clinical benefit rate, 19%; median progression-free survival, 12 weeks; 14% had grade 3 adverse events

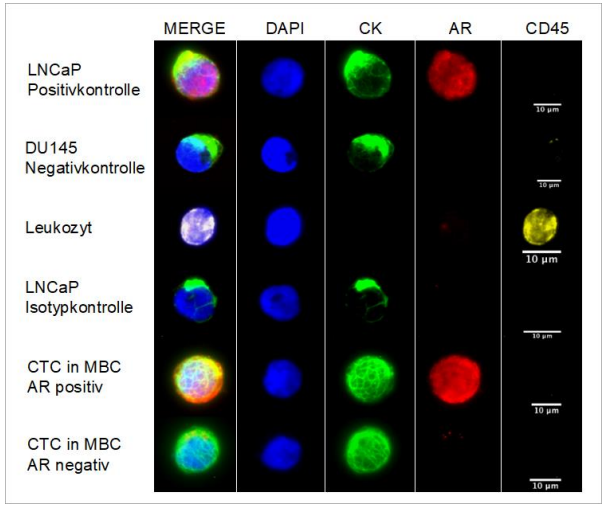
[1]Collins et al., 2011; [2]**Wang** et al., Oncotarget. 2016;7(29):46482-46491; [3] **Agoff**, AmJClinPathol. 2003;120(5):725-31.

Workflow to detect AR expression in CTCs

DETECT

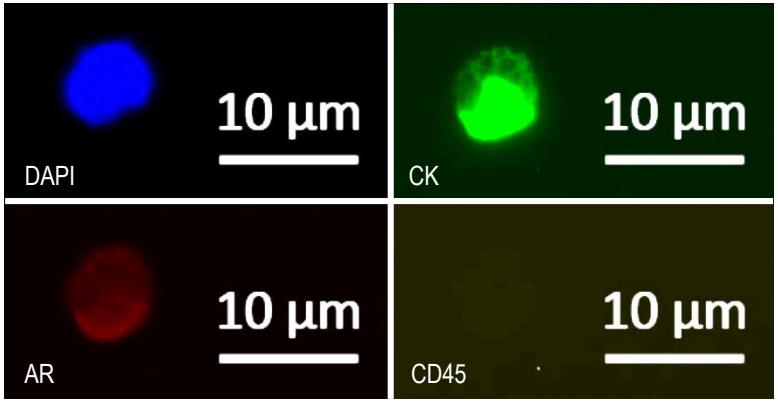


Antigen	Antibody	Fluorochrom
DAPI		DAPI
Androgen-receptor	D6F11	AF 594
Cytokeratin	C11	FITC
CD45	35-Z6	AF 647

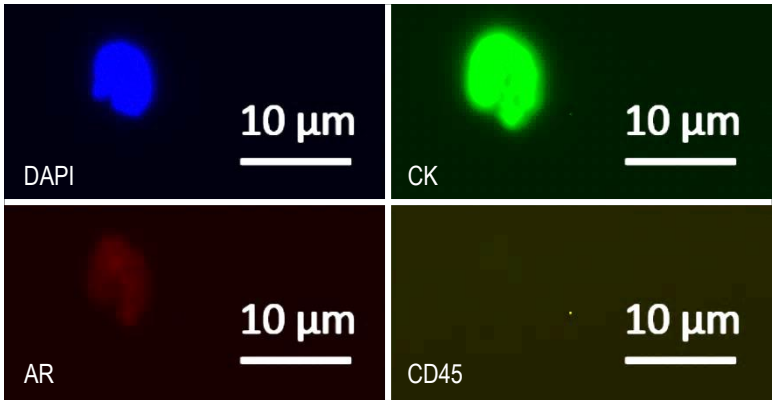


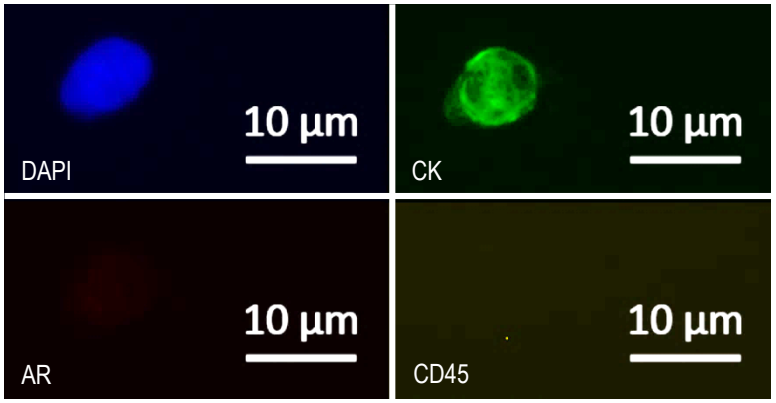
Heterogeneity of AR expression in different CTCs of one sample

DETECT



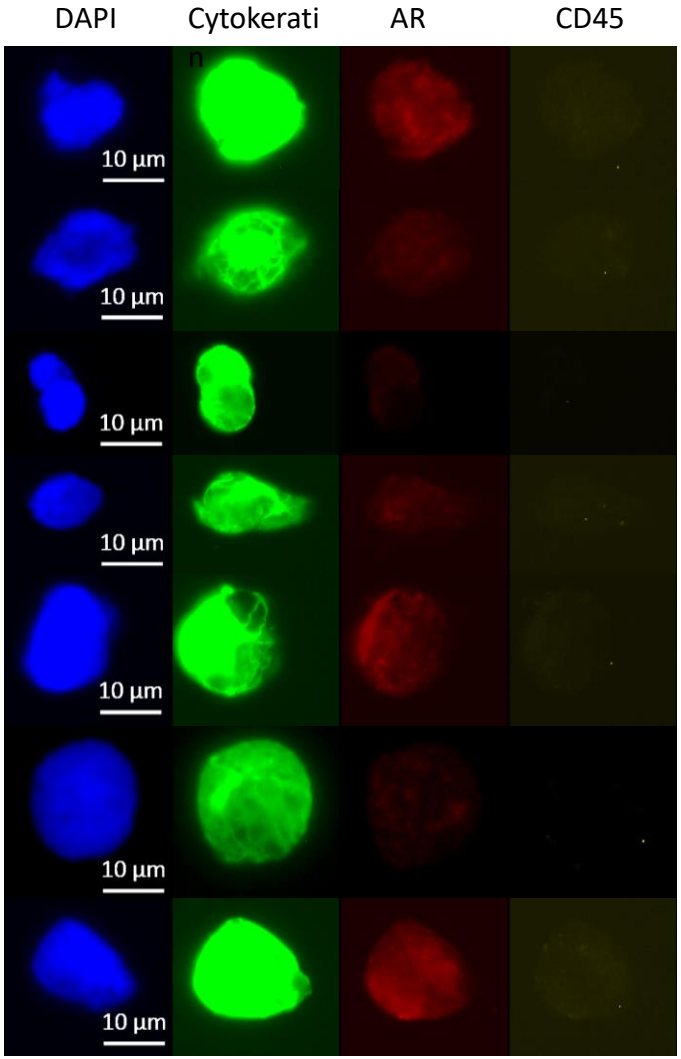
Unterschiedliche Androgenrezeptorexpression bei einer Patientin



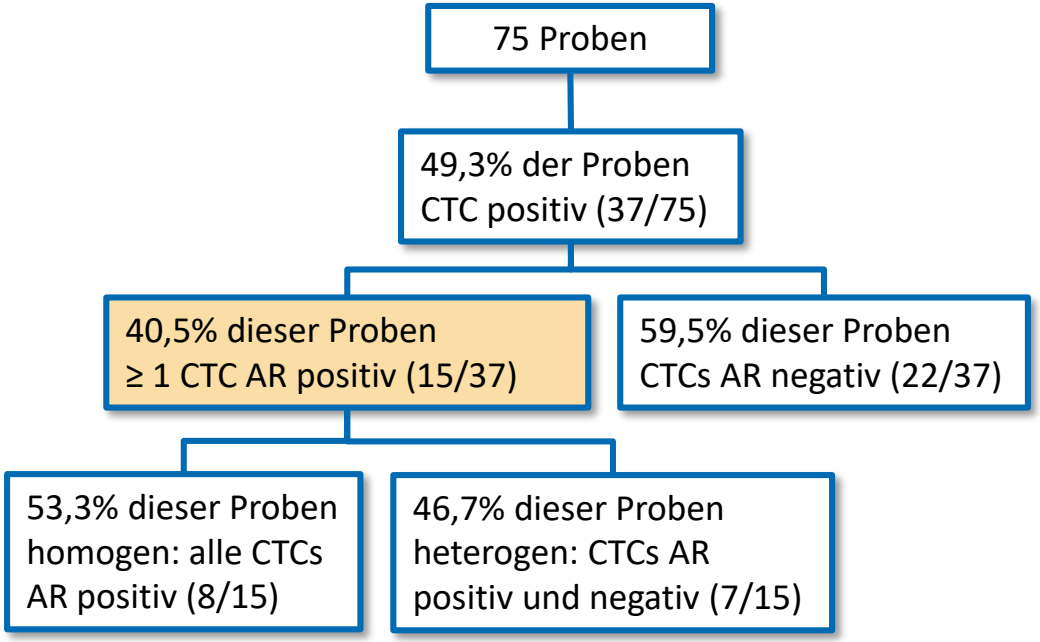


Magnification: 40x

AR Expression in CTCs



Magnification: 63x



- Expression des AR in CTCs konnte erfolgreich nachgewiesen werden
- Pilotstudie mit Androgenrezeptorblockade

Melissa Neubacher, Labor Düsseldorf, unpublished data

DGGG 2018

UKD Universitätsklinikum Düsseldorf

HEINRICH HEINE UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen durch Expressionsnachweis des Androgenrezeptors bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom

Neubacher M.[1], Meier-Stiegen F.[1], Krawczyk N.[1], Neubauer H.[1], Janni W.[2], Fehm T.[1], für die DETECT Studiengruppe

[1]Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinik Düsseldorf
[2]Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinik Ulm

Zielsetzung: Die prognostische Relevanz zirkulierender Tumorzellen (CTCs) bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom (MBC) wurde in zahlreichen klinischen Studien gezeigt. Die potentielle prädiktive Relevanz der CTCs wird derzeit untersucht. Das DETECT Studienkonzept (Abb. 1) untersucht die Bedeutung der Phänotypisierung von CTCs auf Therapieentscheidungen bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. Mit dem Studienkonzept assoziiert sind translationale Forschungsprojekte zur Identifizierung potentieller prädiktiver Marker. Der Androgenrezeptor (AR) als potentieller Angriffspunkt endokriner oder zielgerichteter Therapie kann in bis zu 45% der triple-negativen und bis über 70% der Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinome nachgewiesen werden. Ziel des Projekts war die Etablierung des Nachweises von AR in CTCs mittels Immunfluoreszenz.

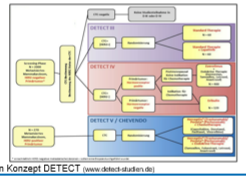


Abb. 1: Studien Konzept DETECT (www.detect-studien.de)

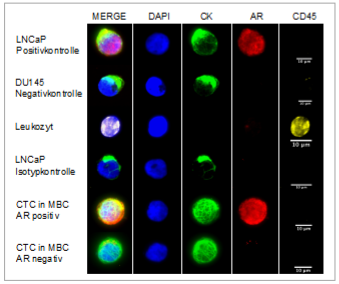


Abb. 2: Immunfluoreszenz

Methoden: Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom und HER2-negativem Primärtumor wurden im Rahmen der DETECT Studien untersucht. CTCs wurden mittels CellSearch® Profile Kit angereichert und auf Objektträger transferiert. (Abb.3) Zur Etablierung der Färbung wurden die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und DU145 als Positiv- bzw. Negativkontrolle verwendet. Der positive Nachweis von Zytokeratin und der Ausschluss des Leukozytenmarkers CD45 dienten zur Identifizierung kernhaltiger Zellen als CTCs. Die Expression des AR konnte mittels spezifischer Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden. (Abb. 2)

Ergebnisse: Die Etablierung der Analyse erfolgte durch Zelllinien mit bekannter AR-Expression. Im Rahmen des translationalen Projekts wurden 76 CTC+-Proben von 66 Patientinnen untersucht. In 50% der Proben wurde mindestens eine CTC detektiert (38/76). In 42,1% dieser Proben konnte in mindestens einer CTC AR-Expression nachgewiesen werden (16/38). Bei 25/38 (65,8%) Proben ließ sich mehr als eine CTC darstellen. Dabei zeigten 14/25 CTCs keine AR Expression, 3/25 ausschließlich AR+ und 8/25 sowohl AR+ als auch AR-. (Abb. 4)

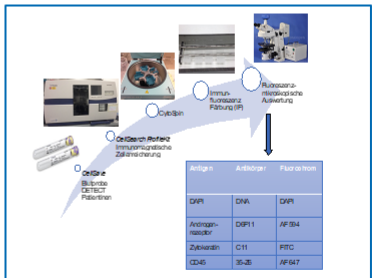


Abb. 3: Arbeitsablauf

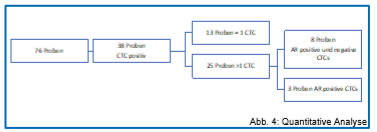


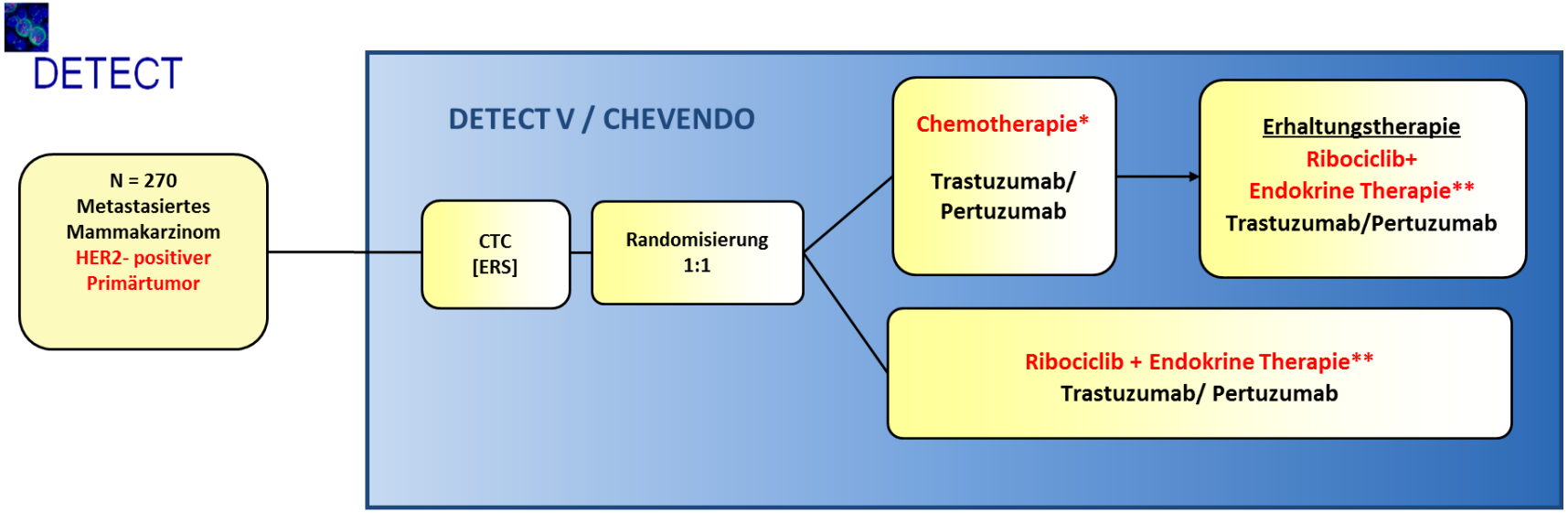
Abb. 4: Quantitative Analyse

Zusammenfassung: Als Grundlage für zukünftige Arbeiten konnte die heterogene Expression von AR in CTCs von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom nachgewiesen werden. Dieser Nachweis könnte zur weiteren Untersuchung des AR als potentieller prädiktiver Faktor dienen.

Melissa.Neubacher@med.uni-duesseldorf.de

DETECT

DETECT V/CHEVENDO: Multizentrische, prospektiv randomisierte Studie zum Vergleich der Kombination einer **dualen HER2-Blockade** (Trastuzumab/Pertuzumab) **plus endokriner Therapie** mit der Kombination einer **dualen HER2-Blockade plus Chemotherapie** bei Patientinnen mit hormonrezeptor-positivem, HER2-positivem metastasiertem Mammakarzinom

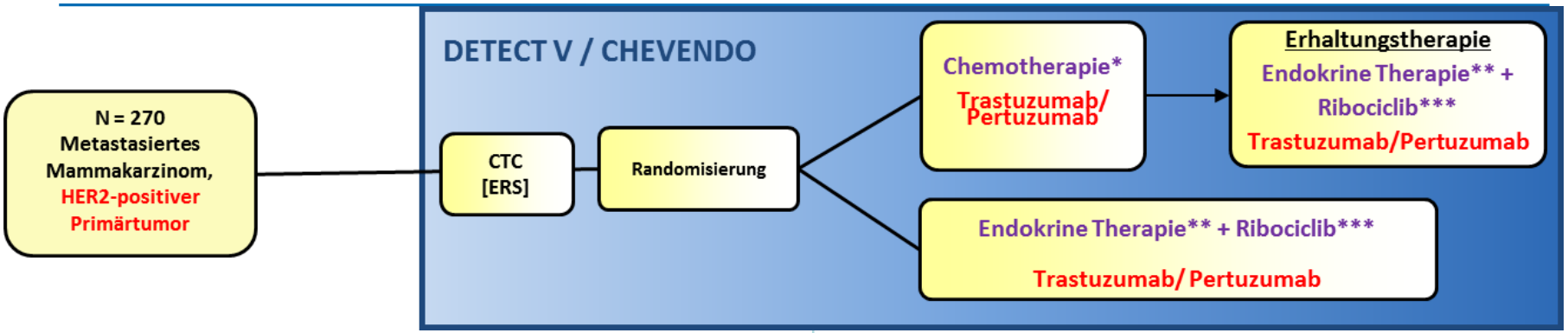


* Capecitabin, Docetaxel, Paclitaxel, Vinorelbin, Eribulin, nab-Paclitaxel
** Fulvestrant, Exemestan, Letrozol, Anastrozol, GnRH-Analoga

Primäres Studienziel:
Evaluation und Vergleich von Sicherheit/Verträglichkeit zwischen den Behandlungsarmen

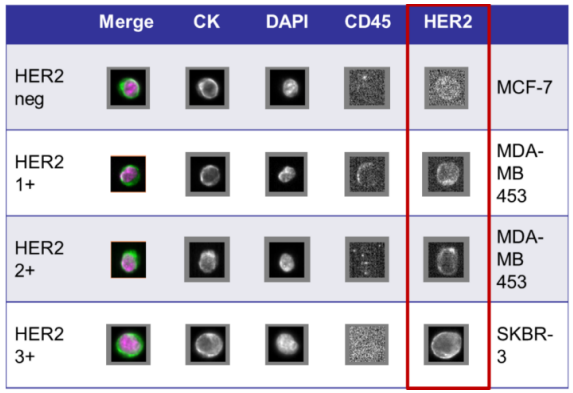
DETECT

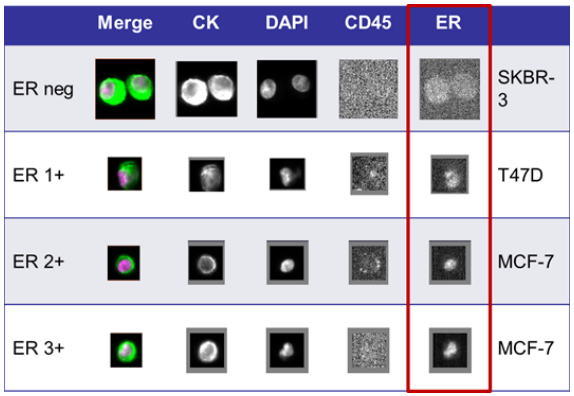
DETECT V/CHEVENDO – Translationales Projekt



Entwicklung eines auf der Expression von bestimmten Markern auf den CTCs basierenden „Endocrine Responsiveness Score“ (ERS)

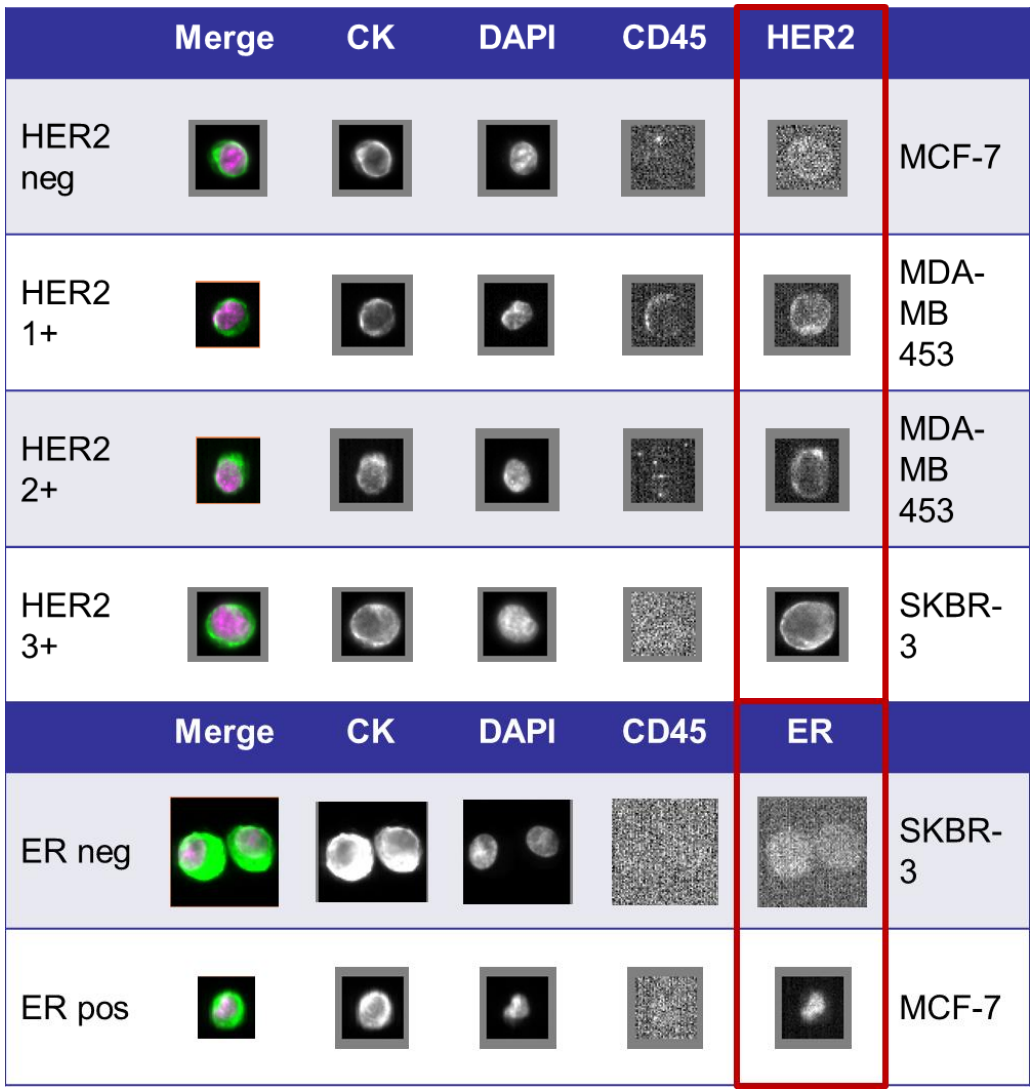
→ Möglicher Indikator für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie





DETECT

Optimierung des Nachweises von HER2 und ER über Immunfluoreszenz



negativ

schwache Färbung

moderate Färbung

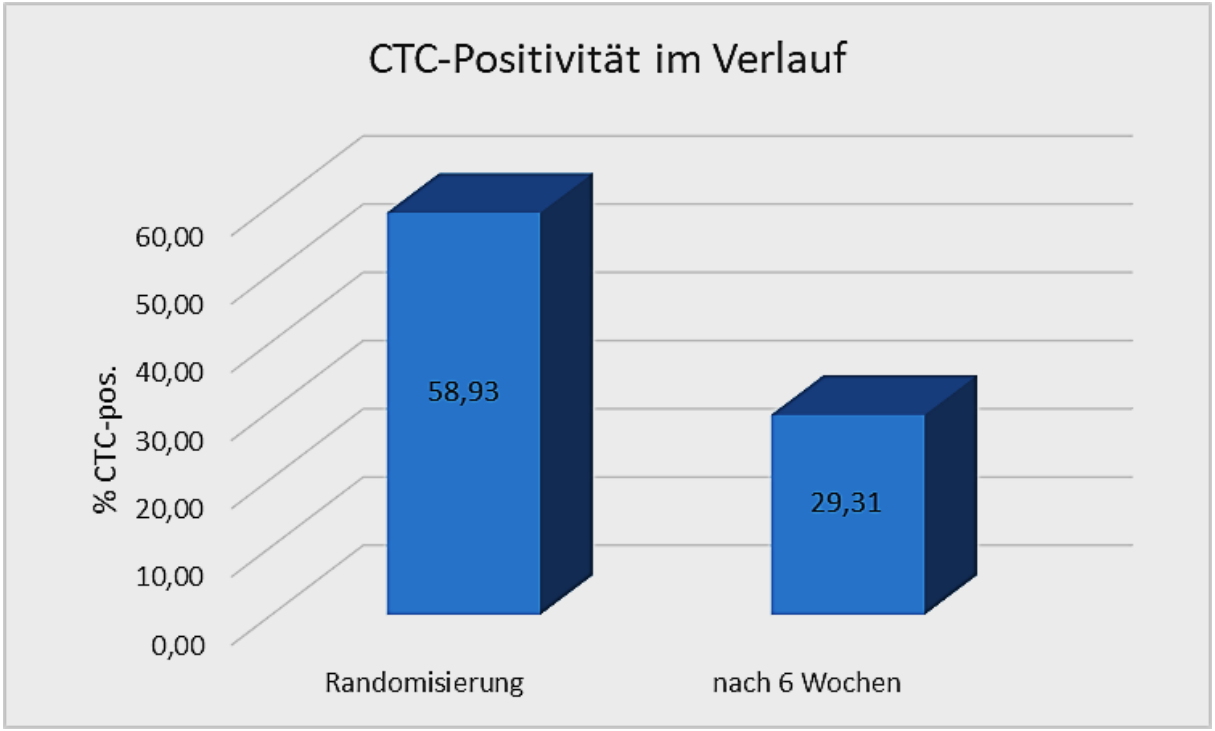
starke Färbung

negativ

positiv

CTC-Positivität und Heterogenität der Expression von HER2 und ER

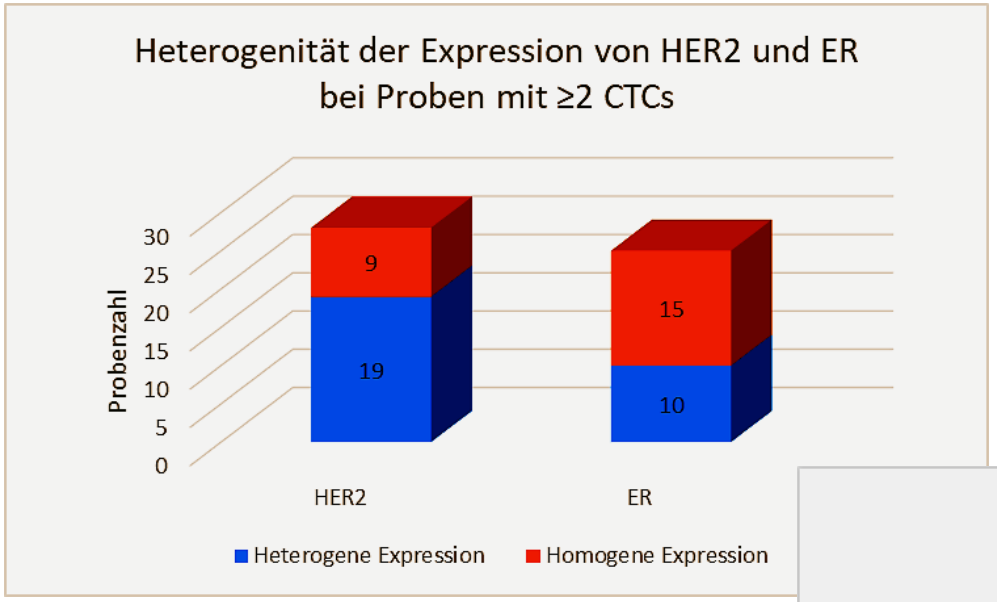
DETECT



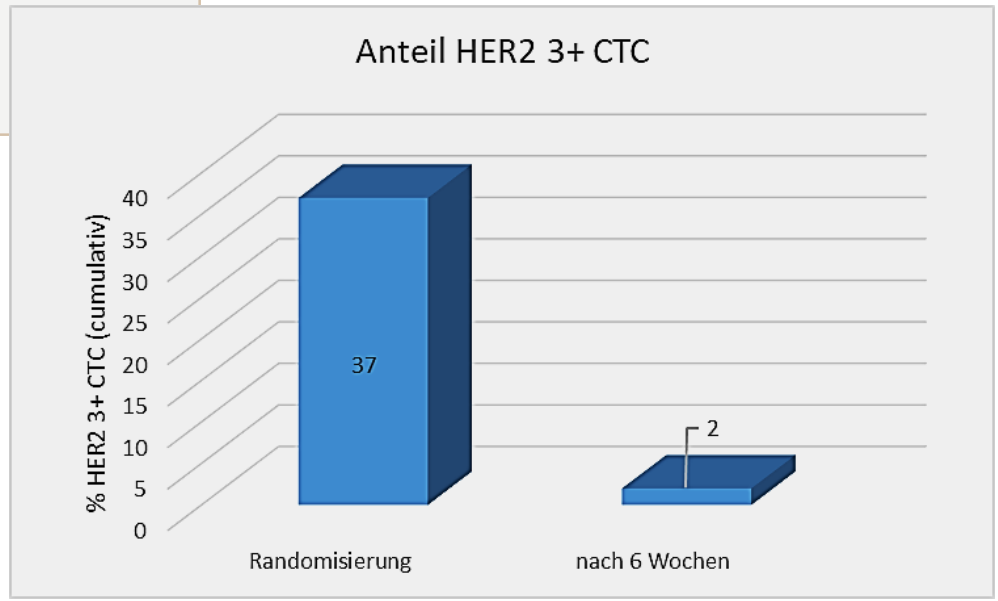
→ 21/31 der initial CTC-pos Patientinnen waren nach sechs Wochen CTC-neg

Unpublished data

CTC-Positivität und Heterogenität der Expression von HER2 und ER

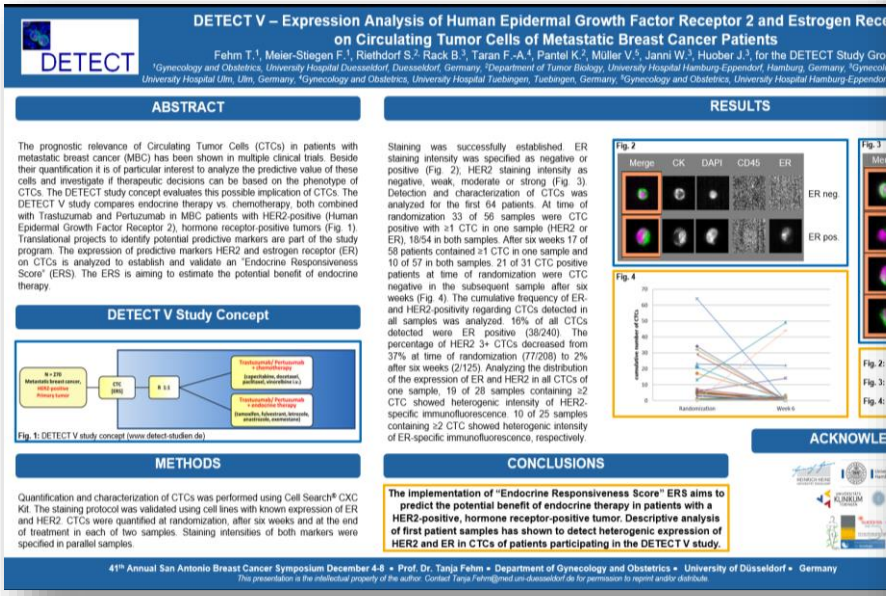


ER-Expression weniger heterogen



HER2-positive CTCs
nahezu komplett verschwunden

SABCS 2018 & DGGG 2018& Update Senologie



DETECT

DETECT V – Expression Analysis of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 and Estrogen Rec on Circulating Tumor Cells of Metastatic Breast Cancer Patients

Fehm T.[1], Meier-Stiegen F.[1], Riethdorf S.[2], Rack B.[3], Taran F.-A.[4], Pantel K.[2], Müller V.[5], Janni W.[3], Huober J.[3], for the DETECT Study Gro
[1]Gynecology and Obstetrics, University Hospital Duesseldorf, Duesseldorf, Germany, [2]Department of Tumor Biology, University Hospital Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, [3]Gynecol
University Hospital Ulm, Ulm, Germany, [4]Gynecology and Obstetrics, University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany, [5]Gynecology and Obstetrics, University Hospital Hamburg-Eppendor

ABSTRACT

The prognostic relevance of Circulating Tumor Cells (CTCs) in patients with metastatic breast cancer (MBC) has been shown in multiple clinical trials. Beside their quantification it is of particular interest to analyze the predictive value of these cells and investigate if therapeutic decisions can be based on the phenotype of CTCs. The DETECT study concept evaluates this possible implication of CTCs. The DETECT V study compares endocrine therapy vs. chemotherapy, both combined with Trastuzumab and Pertuzumab in MBC patients with HER2-positive (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), hormone receptor-positive tumors (Fig. 1). Translational projects to identify potential predictive markers are part of the study program. The expression of predictive markers HER2 and estrogen receptor (ER) on CTCs is analyzed to establish and validate an "Endocrine Responsiveness Score" (ERS). The ERS is aiming to estimate the potential benefit of endocrine therapy.

DETECT V Study Concept

Fig. 1: DETECT V study concept (www.detect-studien.de)

METHODS

Quantification and characterization of CTCs was performed using Cell Search® CXC Kit. The staining protocol was validated using cell lines with known expression of ER and HER2. CTCs were quantified at randomization, after six weeks and at the end of treatment in each of two samples. Staining intensities of both markers were specified in parallel samples.

RESULTS

Staining was successfully established. ER staining intensity was specified as negative or positive (Fig. 2); HER2 staining intensity as negative, weak, moderate or strong (Fig. 3). Detection and characterization of CTCs was analyzed for the first 64 patients. At time of randomization 33 of 56 samples were CTC positive with ≥1 CTC in one sample (HER2 or ER), 18/54 in both samples. After six weeks 17 of 58 patients contained ≥1 CTC in one sample and 10 of 57 in both samples. 21 of 31 CTC positive patients at time of randomization were CTC negative in the subsequent sample after six weeks (Fig. 4). The cumulative frequency of ER- and HER2-positivity regarding CTCs detected in all samples was analyzed. 16% of all CTCs detected were ER positive (38/240). The percentage of HER2 3+ CTCs decreased from 37% at time of randomization (77/208) to 2% after six weeks (2/125). Analyzing the distribution of the expression of ER and HER2 in all CTCs of one sample, 19 of 28 samples containing ≥2 CTC showed heterogenic intensity of HER2-specific immunofluorescence. 10 of 25 samples containing ≥2 CTC showed heterogenic intensity of ER-specific immunofluorescence, respectively.

Fig. 2: Merge, CK, DAPI, CD45, ER; ER neg., ER pos.

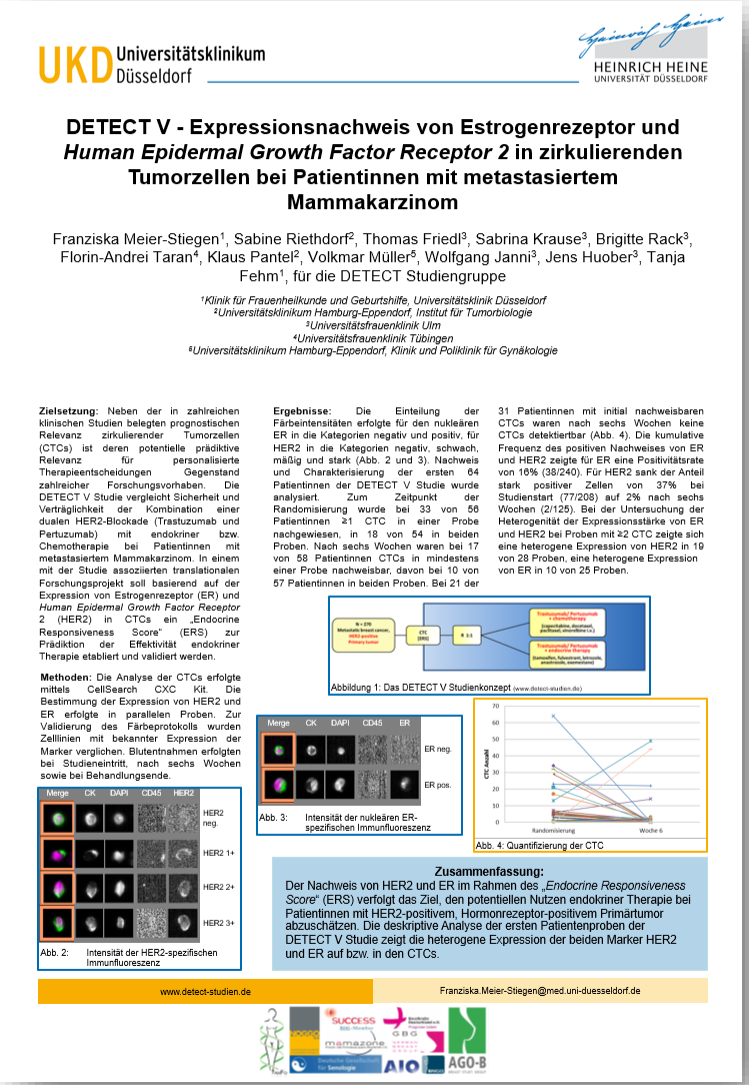
Fig. 4: Randomization, Week 6

CONCLUSIONS

The implementation of "Endocrine Responsiveness Score" ERS aims to predict the potential benefit of endocrine therapy in patients with a HER2-positive, hormone receptor-positive tumor. Descriptive analysis of first patient samples has shown to detect heterogenic expression of HER2 and ER in CTCs of patients participating in the DETECT V study.

ACKNOWLE

41th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium December 4-8 • Prof. Dr. Tanja Fehm • Department of Gynecology and Obstetrics • University of Düsseldorf • Germany
This presentation is the intellectual property of the author. Contact Tanja.Fehm@med.uni-duesseldorf.de for permission to reprint and/or distribute.



UKD Universitätsklinikum Düsseldorf

HEINRICH HEINE UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

DETECT V - Expressionsnachweis von Estrogenrezeptor und *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* in zirkulierenden Tumorzellen bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom

Franziska Meier-Stiegen[1], Sabine Riethdorf[2], Thomas Friedl[3], Sabrina Krause[3], Brigitte Rack[3], Florin-Andrei Taran[4], Klaus Pantel[2], Volkmar Müller[5], Wolfgang Janni[3], Jens Huober[3], Tanja Fehm[1], für die DETECT Studiengruppe

[1]*Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinik Düsseldorf*
[2]*Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Tumorbiologie*
[3]*Universitätsfrauenklinik Ulm*
[4]*Universitätsfrauenklinik Tübingen*
[5]*Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Klinik und Poliklinik für Gynäkologie*

Zielsetzung: Neben der in zahlreichen klinischen Studien belegten prognostischen Relevanz zirkulierender Tumorzellen (CTCs) ist deren potentielle prädiktive Relevanz für personalisierte Therapieentscheidungen Gegenstand zahlreicher Forschungsvorhaben. Die DETECT V Studie vergleicht Sicherheit und Verträglichkeit der Kombination einer dualen HER2-Blockade (Trastuzumab und Pertuzumab) mit endokriner bzw. Chemotherapie bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. In einem mit der Studie assoziierten translationalen Forschungsprojekt soll basierend auf der Expression von Estrogenrezeptor (ER) und *Human Epidermal Growth Factor Receptor* 2 (HER2) in CTCs ein „Endocrine Responsiveness Score" (ERS) zur Prädiktion der Effektivität endokriner Therapie etabliert und validiert werden.

Methoden: Die Analyse der CTCs erfolgte mittels CellSearch CXC Kit. Die Bestimmung der Expression von HER2 und ER erfolgte in parallelen Proben. Zur Validierung des Färbeprotokolls wurden Zelllinien mit bekannter Expression der Marker verglichen. Blutentnahmen erfolgten bei Studieneintritt, nach sechs Wochen sowie bei Behandlungsende.

Merge, CK, DAPI, CD45, HER2; HER2 neg., HER2 1+, HER2 2+, HER2 3+

Abb. 2: Intensität der HER2-spezifischen Immunfluoreszenz

Ergebnisse: Die Einteilung der Färbeintensitäten erfolgte für den nukleären ER in die Kategorien negativ und positiv, für HER2 in die Kategorien negativ, schwach, mäßig und stark (Abb. 2 und 3). Nachweis und Charakterisierung der ersten 64 Patientinnen der DETECT V Studie wurde analysiert. Zum Zeitpunkt der Randomisierung wurde bei 33 von 56 Patientinnen ≥1 CTC in einer Probe nachgewiesen, in 18 von 54 in beiden Proben. Nach sechs Wochen waren bei 17 von 58 Patientinnen CTCs in mindestens einer Probe nachweisbar, davon bei 10 von 57 Patientinnen in beiden Proben. Bei 21 der 31 Patientinnen mit initial nachweisbaren CTCs waren nach sechs Wochen keine CTCs detektierbar (Abb. 4). Die kumulative Frequenz des positiven Nachweises von ER und HER2 zeigte für ER eine Positivitätsrate von 16% (38/240). Für HER2 sank der Anteil stark positiver Zellen von 37% bei Studienstart (77/208) auf 2% nach sechs Wochen (2/125). Bei der Untersuchung der Heterogenität der Expressionsstärke von ER und HER2 bei Proben mit ≥2 CTC zeigte sich eine heterogene Expression von HER2 in 19 von 28 Proben, eine heterogene Expression von ER in 10 von 25 Proben.

Abbildung 1: Das DETECT V Studienkonzept (www.detect-studien.de)

Merge, CK, DAPI, CD45, ER; ER neg., ER pos.

Abb. 3: Intensität der nukleären ER-spezifischen Immunfluoreszenz

CTC Anzahl; Randomisierung, Woche 6

Abb. 4: Quantifizierung der CTC

Zusammenfassung:
Der Nachweis von HER2 und ER im Rahmen des „*Endocrine Responsiveness Score*" (ERS) verfolgt das Ziel, den potentiellen Nutzen endokriner Therapie bei Patientinnen mit HER2-positivem, Hormonrezeptor-positivem Primärtumor abzuschätzen. Die deskriptive Analyse der ersten Patientenproben der DETECT V Studie zeigt die heterogene Expression der beiden Marker HER2 und ER auf bzw. in den CTCs.

www.detect-studien.de
Franziska.Meier-Stiegen@med.uni-duesseldorf.de

Senologie 2019

27.06.2019, 10:00 – 11:30, M4/5
Deutsche Studiengruppen: Was können wir voneinander lernen?

Vorsitz: Prof. Dr. med. Peter A. Fasching, Erlangen, Deutschland
Vorsitz: Prof. Dr. Anton Scharl, Amberg/Weiden, Deutschland

SUCCESS/DETECT
Prof. Dr. med. Tanja Fehm, Düsseldorf, Deutschland ★

27.06.2019, 14:45 – 16:00, A7
Das Luminal-B Mammakarzinom – Herausforderung an Klinik und Forschung

Vorsitz: Prof. Dr. med. Arndt Hartmann, Erlangen, Deutschland
Vorsitz: Prof. Dr. med. Nicolai Maass, Kiel, Deutschland

FV008 - Freier Vortrag: Analysis of ESR1 mutations in single circulating tumor cells from metastatic luminal breast cancer patients upon estrogen deprivation therapy
André Franken, Düsseldorf, Deutschland ★

27.06.2019, 16:15 – 17:15, Industrieausstellung
Postersitzung Versorgungsforschung/Brustzentren/Comprehensive Cancer Centers I

Vorsitz: Prof. Dr. med. Markus Hahn, Tübingen, Deutschland
Vorsitz: Prof. Dr. med. Christine Solbach, Frankfurt am Main, Deutschland

P009 DETECT III und IV - Individualisierte CTC-basierte Therapie des metastasierten Mammakarzinoms
Sabrina Krause, Ulm, Deutschland ★

27.06.2019, 16:15 – 17:15, Industrieausstellung
Postersitzung Varia I

Vorsitz: Prof. Dr. med. Diana Lüftner, Berlin, Deutschland
Vorsitz: Dr. med. Christina Barbara Walter, Tübingen, Deutschland

P024 Development of a browser-based sample bank for multicenter liquid biopsy trials
Jan Cieslik, Düsseldorf, Deutschland ★

28.06.2019, 15:45 – 16:45, Industrieausstellung
Postersitzung Varia II

Vorsitz: Prof. Dr. med. Bernd Gerber, Rostock, Deutschland
Vorsitz: PD Dr. Ines Gruber, Tübingen, Deutschland

P037 Improvement of single circulating tumor cells isolation with CellCelector
Liwen Yang, Düsseldorf, Deutschland ★

28.06.2019, 15:45 – 16:45, Industrieausstellung
Postersitzung Translationale Forschung II

Vorsitz: Prof. Dr. med. Brigitte Rack, Ulm, Deutschland*
Vorsitz: Prof. Dr. med. Ingolf Juhasz-Böss, Homburg (Saar), Deutschland

P110 DETECT V - Expressionsanalyse des human epidermal growth factor receptor 2 und des Estrogenrezeptors auf zirkulierenden Tumorzellen bei Patientinnen mit Metastasiertem Mammakarzinom
Dr. rer. nat Franziska Meier-Stiegen, Düsseldorf, Deutschland ★

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

HEINRICH HEINE UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

LMU KLINIKUM DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

UNIVERSITÄTS KLINIKUM TÜBINGEN

ulm university universität uulm

TRAFO

NOGGO e.V.

SUCCESS BIG-Member

mamazone Frauen und Forschung gegen Brustkrebs e.V.

Brustkrebs Deutschland e.V. Prognose Leben

GBG GERMAN BREAST GROUP

Deutsche Gesellschaft für Senologie

AIO

BNGO

AGO-B BREAST STUDY GROUP