

Empfehlungen zur Biomarkeranalyse beim metastasierten Mammakarzinom

AutorInnen:

Zsusanna Bago-Horvath ¹, Angelika Reiner ²

1 Medizinische Universität Wien & AKH-Wien, Klinisches Institut für Pathologie

2 em. Primaria, Pathologisch-bakteriologisches Institut, Klinikum Donaustadt, Wien

I. Einleitung

Trotz vieler Fortschritte in diagnostischen und Therapiemöglichkeiten konnte in den letzten Jahren kaum eine Verbesserung des Überlebens beim metastasierten Mammakarzinom erzielt werden.¹ Epidemiologische Studien zeigen, dass etwa 20-30% aller BrustkrebspatientInnen entwickeln Fernmetastasen.² Darüber hinaus werden 5-10% aller PatientInnen im primär metastasierten Stadium der Erkrankung diagnostiziert.³

Die Herausforderungen in der Diagnostik und Therapie des metastasierten Mammakarzinoms unterscheiden sich vom frühen Mammakarzinom. Ziel der folgenden Zusammenfassung ist, eine Empfehlung in Bezug auf therapierelevante pathologische und molekularpathologische Untersuchungen bereitzustellen, die eine optimale Therapiewahl für die individuelle PatientIn gewährleisten.

II. Histologische Abklärung

Beim Verdacht auf *de novo* Fernmetastasierung ist eine histologische Abklärung anzustreben, wenn eine Biopsie der verdächtigen fernmetastatischen Läsionen einfach durchführbar ist.⁴ Wegen der möglichen Heterogenität der metastatischen Klone, der Plastizität des Tumorgewebes (insbesondere eine mögliche Veränderung der Tumorbiologie im weiteren Therapieverlauf) sowie der individuellen klinischen Situation erscheint eine case-by-case Entscheidung bei der Therapiewahl, ob nach Biologie der Metastase oder des Primärtumors, sinnvoll.

III. Voraussetzungen für die Biomarkeranalyse

Zur Testung aller angeführten Biomarker wird für alle Untersuchungsmethoden generell formalinfixiertes, paraffineingebettetes Tumorgewebe (FFPE) benötigt. Proben des Primärtumors oder der Metastasen sind gleichermaßen für die Analyse geeignet. Im Rahmen der Gewebsentnahme ist darauf zu achten, dass die Ischämiezeit möglichst kurz gehalten wird und ausschließlich phosphatgepuffertes Formalin verwendet wird.

Im Idealfall sollte die Analyse sowohl vom Primärtumor als auch von der Metastase durchgeführt werden. Proben des Primärtumors oder der viszeralen und Weichteilmetastasen sind gleichermaßen für die Analyse geeignet. Knochenmetastasen können aufgrund der zur Entkalkung notwendigen chemischen Vorbehandlung für die Analyse nicht verwendet werden.

Derzeit gibt es keine ausreichende Evidenz darüber, ob bei diskrepanter Tumorbilogie die Eigenschaften des Primärtumors oder der metastatischen Läsion die Therapiewahl bestimmen sollten. Generell gilt, bei positivem Befund eine entsprechende zielgerichtete Therapie einzuleiten.⁴

IV. Immunhistochemie

Therapierelevante prognostische und prädiktive Faktoren, in erster Linie Östrogen- und Progesteronrezeptor (ER, PR), sowie HER2 sind – wie bei allen invasiven Mammakarzinomen und Rezidiven – auch bei metastatischen Läsionen zu bestimmen. Hierbei gilt es, die derzeit gültigen ASCO/USCAP Richtlinien der Bestimmung und Bewertung zu beachten.^{5,6}

Eine allgemein anerkannte Untersuchungsmethode ist die Immunhistochemie (IHC). Um das bekannte Problem möglicher falsch negativer Testbefunde zu minimieren, ist die IHC auf automatisierten Färbepattformen durchzuführen. Darüber hinaus sind interne und externe Validierung erforderlich. Dementsprechend ist die regelmäßige Teilnahme an externen Qualitätssicherungsprogrammen (Ringversuchen) erforderlich.

IV.1. Östrogen- und Progesteronrezeptor

Bei ER- und PR-Bestimmung sind der Prozentsatz positiv gefärbter Tumorzellkerne und die Intensität der Färbung anzugeben. Ein positiver Befund ist durch $\geq 1\%$ immunreaktiver Tumorzellkerne definiert. Über die biologische Wertigkeit eines Testergebnisses mit 1 - 9% positiver Tumorzellkerne besteht derzeit noch keine endgültige Klarheit. In der S3-Leitlinie wird daher die Bewertung des Ergebnisses in drei Kategorien empfohlen: $\geq 10\%$ ER/PR positiv, 1-9% ER/PR gering positiv, $< 1\%$ ER/PR negativ. In allen Fällen ist das Ergebnis der IHC mit dem histologischen Typ zu korrelieren und auf Plausibilität zu prüfen.

IV.2. HER-2

Voraussetzung für eine Antikörpertherapie gegen HER-2 ist ein positiver Nachweis von HER-2. Der Cut-off liegt bei 10% positiver Tumorzellen mit starker zirkulärer immunhistochemischer Färbung (Score 3+). Alternativ ist eine durch In-situ-Hybridisierung nachgewiesene Genamplifikation mit einer HER-2/CEP 17- Ratio von $> 2,0$ als positiv zu werten. Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden wird zusätzlich die mittlere Anzahl von HER-2- Signalen pro Zelle berücksichtigt. ≥ 6 Signale pro Zelle gilt als HER-2 positiv, < 4 Signale als negativ. Problematisch ist der Umgang mit der Borderline-Kategorie. Diese ist gegeben, wenn immunhistochemisch ein Score 2+ nachgewiesen wird. Für die In-situ-Hybridisierung ist sie gegeben, wenn $> 4,0$ und $< 6,0$ HER-Signalen pro Zelle nachgewiesen werden. In diesen Fällen muß eine Reflextestung mit einer anderen validierten Methode erfolgen. Ein HER-2 negativer Befund liegt bei immunhistochemischem Score 0 oder 1 und In-situ-Hybridisierung mit einer HER-2/CEP 17- Ratio von $< 2,0$ und mittlerer HER-2-Signalzahl < 4 vor.

IV.3. PD-L1-Testung

Die Behandlungsoptionen beim metastasiertem ER-, PR- und HER2-negativem (tripel-negativem) Mammakarzinom (TNBC) sind aufgrund fehlender zielgerichteter Therapien sehr beschränkt. Ergebnisse der IMpassion130 Studie haben gezeigt, dass eine Kombination der anti-PD-L1 Antikörper Atezolizumab mit nab-Paclitaxel zu einer signifikanten Verlängerung des progressionsfreien und Gesamtüberleben beim erstlinien-metastasierten TNBC geführt hat.⁷ Atezolizumab ist ein Immun-Checkpoint Inhibitor, ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch an den Programmed Cell Death Liganden 1 (PD-L1) an der Oberfläche von Immunzellen und Tumorzellen bindet. Eine nähere Analyse der Studienergebnisse hat gezeigt, dass nur Patientinnen von der Gabe von Atezolizumab profitiert haben, die eine Expression von PD-L1 auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten aufweisen. Die PD-L1 Testung erfolgt immunhistochemisch auf Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem (FFPE) Tumorgewebe. Die PD-L1 Expression sollte bei allen Patientinnen mit primär oder *de novo* metastasiertem TNBC durchgeführt werden. Proben des Primärtumors oder der Weichteilmetastasen sind gleichermassen für die Analyse geeignet. Knochenmetastasen können aufgrund der zur Entkalkung notwendigen chemischen Vorbehandlung für die Analyse nicht verwendet werden. Zur Testung muss ein validierter immunhistochemischer PD-L1 Assay verwendet werden, wobei hier anzumerken ist, dass die Ergebnisse der IMpassion 130 Studie sich ausschliesslich auf dem Ventana SP142 PD-L1 Assay beziehen. Die Bewertung der PD-L1 Expression erfolgt beim TNBC anhand eines Immun-Flächenscores. Hierbei wird der Prozentsatz der Gesamttumorfläche angegeben, die von PD-L1-exprimierenden tumorinfiltrierenden Immunzellen eingenommen wird. Der Cutoff für Positivität liegt bei 1%. Dieser Immun-Flächenscore wurde bis dato bei einer einzelnen klinischen Studie validiert. Um die diagnostische und klinische Validität der PD-L1 Expression zu untermauern wurde eine vergleichende Studie mit anderen immunhistochemischen Assays und anderen scoring Systemen (Tumorscore, Combined Positivity Score, CPS) am PatientInnenkollektiv der IMpassion130 Studie durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass die Konkordanz der unterschiedlichen Assays mässig ausgeprägt war und der SP-142 Assay die höchste prädiktive Wertigkeit im Bezug auf den klinischen Benefit einer zielgerichteten Therapie mit Atezolizumab aufgewiesen hat.⁸

V. Multigenomische Assays

Es fehlen randomisierte Studien zum Einsatz multigenomischer Tests beim metastasiertem Mammakarzinom. Einzelne Pilotstudien mit dem PAM50 multigenomischen Test deuten darauf hin, dass in bis zu 50% der Fälle es zu einer Änderung des biologischen Subtyps kommen kann.^{9, 10} Die therapeutischen Konsequenzen solcher Tumorevolutionsvorgänge können nur durch klinische Studien geklärt werden.

VI. Prädiktive Faktoren für biologische Therapien

VI.1. PI3-Kinase (PIK3CA) - Mutationsanalyse beim luminalen metastasierten Mammakarzinom

Mutationen des *PIK3CA*-Gens konnten in etwa 40% aller ER-positiven, HER2-negativen Mammakarzinomen nachgewiesen werden.¹¹ Ergebnisse der SOLAR-1 Studie zeigten, dass der PIK3CA-Inhibitor Alpelisib in Kombination mit dem Aromatase-Inhibitor Fulvestrant in Patientinnen mit solchen Tumoren bei nachgewiesener PIK3CA-Mutation das progressionsfreie Überleben signifikant verlängern konnte.¹² Daraus ergibt sich die Indikation für eine molekularpathologische Mutationsanalyse des *PIK3CA*-Gens beim erstlinien-metastasierten ER-positivem, HER2-negativem Mammakarzinom, wenn eine Kombinationstherapie mit Alpelisib und Fulvestrant geplant ist.

Die Mutations-hotspots des *PIK3CA*-Gens betreffen die Helix-Domäne (Exon 9; E542 and E545) und die Kinase-Domäne (Exon 20; H1047) der Subeinheit p110 α . Allerdings konnten weitere Mutationen auch in der C2-Domäne (Exon 7) zu einem geringeren Prozentsatz nachgewiesen werden.¹² Diese Mutationen führen zu einer Überaktivierung des PIK3CA-Signalweges, diese führt zu einer gesteigerten Tumorigenese und zu Medikamentenresistenz.¹³

Zum Mutationsnachweis wird Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes (FFPE) Tumormaterial benötigt. Proben des Primärtumors oder der Metastasen sind gleichermassen für die Analyse geeignet. Die Analyse kann mittels Next Generation Sequencing (NGS) oder PCR durchgeführt werden, wobei die NGS-Methoden eine höhere Sensitivität aufweisen.¹⁴ In jedem Fall sollten die Mutationshotspots in den Exons 9 und 20 abgedeckt werden.

VI.2. Genetische Testung beim metastasiertem Mammakarzinom zum Nachweis von BRCA1/2 Keimbahnmutationen bei PatientInnen mit metastasiertem Mammakarzinom

Das therapeutische Konzept der synthetischen Lethalität hat massgeblich zur Entwicklung von PARP-Inhibitoren zur Behandlung vom Mammakarzinom bei PatientInnen mit Keimbahnmutationen der *BRCA 1* und *BRCA 2* Genen beigetragen.¹⁵ Basierend auf die Ergebnisse der OlympiAD und EMBRACA Studien, wurden bis dato 2 Substanzen, Olaparib und Talazoparib durch die FDA für die Behandlung von metastasiertem Mammakarzinom mit BRCA1/2 Keimbahnmutationen zugelassen.^{16, 17} Aus diesem Grund wäre eine diesbezügliche genetische Testung aller PatientInnen mit metastasiertem Mammakarzinom sinnvoll, da Keimbahnmutationen in diesen Genen bei etwa 5% aller MammakarzinompatientInnen beschrieben wurden.

VI.3. Nachweis des ETV6-NTRK3 Fusionsgens beim sekretorischen Mammakarzinom

Das sekretorische Mammakarzinom ist ein seltener spezieller Subtyp des Mammakarzinoms, das durch charakteristische Morphologie und eine fehlende Expression von ER, PR und HER2 gekennzeichnet ist. Der molekularpathologische Nachweis des *ETV6-NTRK3* Fusionsgens ist beweisend für das Vorliegen eines sekretorischen Mammakarzinoms und gilt im metastasierten Stadium als Indikation zur Behandlung mit Larotrectinib, einem innovativen NTRK-Inhibitor.¹⁸

Referenzen

1. Global Status of Advanced/Metastatic Breast Cancer 2005–2015 Decade Report. www.breastcancervision.com and www.abc-lisbon.org
2. Smigal C, Jemal A, Ward E, et al. Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006;56:168–83.
3. Andre F, Slimane K, Bachelot T, et al. Breast cancer with synchronous metastases: trends in survival during a 14-year period. *J Clin Oncol* 2004;22:3302–8.
4. Amir E, Miller N, Geddie W, et al. Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30: 587–592.
5. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Jun 1;28(16):2784-95.
6. Wolff AC, Hammond MEH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2018 Nov;142(11):1364-1382.
7. Schmid P, Rugo HS, Adams S, et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020 Jan;21(1):44-59.
8. Rugo HS et al. ESMO 2019 Abstract 6571.
9. Prat A, Cheang MC, Galván P, et al. Prognostic Value of Intrinsic Subtypes in Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer Treated With Letrozole With or Without Lapatinib. *JAMA Oncol.* 2016 Oct 1;2(10):1287-1294.
10. Cejalvo JM, Martínez de Dueñas E, Galván P, et al. Intrinsic Subtypes and Gene Expression Profiles in Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res.* 2017 May 1;77(9):2213-2221.
11. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012 Oct 4;490(7418):61-70.
12. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, et al. SOLAR-1 Study Group. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2019 May 16;380(20):1929-1940.
13. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014;13:140–156.
14. Rugo, HS et al. AACR 2019, Abstract CT142
15. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science.* 2017 Mar 17;355(6330):1152-1158.
16. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med.* 2018 Aug 23;379(8):753-763.
17. Robson M, Im SA, Senkus E, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med.* 2017 Aug 10;377(6):523-533.
18. Landman Y, Ilouze M, Wein S, et al. Clin Breast Cancer. Rapid Response to Larotrectinib (LOXO-101) in an Adult Chemotherapy-Naive Patients With Advanced Triple-Negative Secretory Breast Cancer Expressing ETV6-NTRK3 Fusion. 2018 Jun;18(3):e267-e270.