

Neue Indikation *PIK3CA*-mutiertes Mammakarzinom: Erste Erfahrungen aus dem molekularpathologischen Routinelabor

S. Strohkamp, S. Schmidt, M. Falk, K. Tiemann, Institut für Hämatopathologie Hamburg, Hamburg.

Bei der Behandlung sowohl des frühen als auch des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Mammakarzinoms (BC) rücken neben der konventionellen Hormon- und Chemotherapie zunehmend zielgerichtete, individualisierte Therapiekonzepte in den Blickpunkt. Letztere orientieren sich neben den immunhistochemischen Eigenschaften (z.B. HER2, PD-L1) insbesondere an der molekulargenetischen Charakterisierung (z.B. *BRCA1/2*, *PIK3CA*) des Tumors [1-3]. Dabei zählt *PIK3CA* mit einem Anteil von 20-35% aller Brustkrebsfälle zu den am häufigsten mutierten Genen (Tab. 1).

***PIK3CA*-Mutation als prädiktiver Marker beim fortgeschrittenen HR+/HER2- BC**

Das *PIK3CA*-Gen kodiert für die α -Isoform p110 der katalytischen Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), welche im PI3K/AKT/PTEN-Signalweg eine wesentliche Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Proliferation sowie Apoptose spielt. Alterationen in *PIK3CA* sind zumeist in den Hotspot-Aminosäurecodons C420, E542, E545, Q546 und H1047 innerhalb funktionell relevanter Domänen lokalisiert und haben durch Hyperaktivierung der katalytischen Untereinheit p110 α die Stimulierung des Tumorstadiums sowie die Resistenzentwicklung gegenüber einer Hormontherapie zur Folge [4, 5]. Bei etwa 40-50% der Hormonrezeptor-positiven (HR+)/HER2-negativen (HER2-) BrustkrebspatientInnen im fortgeschrittenen oder metastasierten Tumorstadium sind *PIK3CA*-Mutationen nachweisbar. Für diese PatientInnengruppe wurde Ende Juli 2020 der orale α -spezifische PI3K-Inhibitor Alpelisib, welcher selektiv an der katalytischen α -Untereinheit des Membranmoleküls ansetzt und dadurch die Phosphorylierung der nachgeschalteten Signalkaskade unterbindet, auf Basis der SOLAR-1-Studienergebnisse zugelassen. Diese wiesen eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (PFS) in der *PIK3CA*-mutierten PatientInnenkohorte bei zusätzlicher Gabe des PI3K-Inhibitors

Alpelisib auf. Der Nachweis eines positiven PI3K-Status durch eine aktivierende *PIK3CA*-Mutation, entweder im Tumorgewebe oder im Blutplasma, ist eine weitere Voraussetzung für den Einsatz des PI3K-Inhibitors [6, 7]. Weitere PI3K-Inhibitoren (z.B. Taselisib sowie GSK2636771, der selektiv an der katalytischen β -Untereinheit ansetzt) befinden sich in der Pipeline.

NGS kann Vorteile gegenüber der *PIK3CA*-Einzelgengestung bieten

Seit der Zulassung von Alpelisib für das fortgeschrittene HR+/HER2-, *PIK3CA*-mutierte Mammakarzinom in 2020 beobachten diagnostische Institutionen einen deutlichen Anstieg der Anfragen nach *PIK3CA*-Analysen. Für viele molekularpathologische Labore kam diese Fragestellung nicht überraschend, denn *PIK3CA* ist per se kein unbekanntes Gen, neu ist lediglich seine Eigenschaft als prädiktiver Biomarker – neben der seit Jahren zum molekulargenetischen Repertoire gehörenden *BRCA1/2*-Testung – im Rahmen einer therapiebegleitenden Diagnostik (Companion Diagnostics, CDx) für Brustkrebskrankungen. Aufgrund der – wenn auch vielfach noch nicht abschließend geklärten – prognostischen bzw. prädiktiven Rolle von *PIK3CA*-Mutationen beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) [11, 12] und Kolorektalkarzinom [13] ist *PIK3CA* bereits seit einigen Jahren fester

Bestandteil vieler Next Generation Sequencing (NGS)-Panels und wurde, trotz teils unklarer klinischer Signifikanz, bei diesen Entitäten vielfach in den Routine-Testablauf integriert, auch in Erwartung zukünftigen Erkenntnisgewinns zur klinischen Implikation [7].

In der Alpelisib-Zulassungsstudie SOLAR-1 erfolgte die molekulare therapeutische Stratifizierung sowohl am Tumorgewebe als auch an Liquid Biopsies des Blutplasmas mithilfe eines Realtime-PCR-basierten Assays (Fa. QIAGEN, the-rascreen® *PIK3CA* RGQ PCR Kit) [14, 15]. Dieses Testverfahren bildet die 11 häufigsten *PIK3CA*-Mutationen mit jeweils spezifischen Nachweisgrenzen zwischen 1,82-7,07% ab [16].

Für die Integration und Etablierung einer geeigneten *PIK3CA*-Testung in die Routinediagnostik muss das breite Spektrum der zur Verfügung stehenden Methoden überdacht und abgewogen werden. Hierbei sind – nicht zuletzt im Rahmen der **Qualitätssicherung** – Kriterien wie Sensitivität, Spezifität und Detektionslimit ausschlaggebend. So ist das NGS im Vergleich zum Realtime-PCR-basierten Assay zwar kostenintensiver und auch zeitaufwendiger, ermöglicht jedoch bei hoher Sensitivität (5% für Gewebe; idealerweise 0,1% für freie zirkulierende DNA (cfDNA) im Plasma) den **gesamten Genbereich von *PIK3CA*** abzudecken. Jedoch ist die **singuläre Analyse des *PIK3CA*-Status** (ohne zusätzliche



Nachlese

Liquid Biopsy bei gastrointestinalen Tumorerkrankungen
www.med4u.org/19367

aNSCLC: Blut-basiertes genomisches Profiling aus der BFAST-Studie mit Real-World-Daten vergleichbar
www.med4u.org/19368

Interview: Zielgerichtete Therapie für Brustkrebs-Patientinnen
www.med4u.org/19369

CUP-Tumoren: Präzisionsonkologie mit molekularer Testung
www.med4u.org/19370

BRCA1/2-Anforderung) mittels NGS insgesamt nicht kostendeckend darstellbar und es stellt sich zudem die dringende Frage nach dem Umgang mit „Nicht-SOLAR-1-Mutationen“, die zusätzlich detektiert werden. So wiesen in einer ersten Kohorte von 104 Mammakarzinom-PatientInnen, die in der Hämatopathologie Hamburg (HpH) routinediagnostisch mittels NGS untersucht wurden, 24% eine Nicht-SOLAR-1-Mutation auf (Abb. 1C). Unter diesen war der Aminosäureaustausch p.N345K innerhalb der funktionell relevanten C2-Domäne des PIK3CA-Gens bei 6 von 45 PatientInnen (13%) am häufigsten nachweisbar. Diese Mutation ist durch den qPCR-basierten therascreen® Assay nicht abgedeckt, sodass sie im Rahmen der zulassungsrelevanten SOLAR-1-Studie hinsichtlich einer Sensitivität gegenüber Alpelisib unberücksichtigt blieb. Aufgrund ihres Mutationslokus führt die PIK3CA-Variante p.N345K jedoch sehr wahrscheinlich zu einer aberranten Interaktion mit der regulatorischen PI3K-Untereinheit p85-α und damit möglicherweise zu einer Verstärkung des PI3K-AKT-mTOR Signalweges [17]. Um die klinische Relevanz dieser und anderer seltener Nicht-SOLAR-1-Mutationen besser abschätzen zu können, sind wir auf weitere Daten angewiesen. Sequenzierungen des gesamten PIK3CA-Gens liefern hierfür die Basis und werden

höchstwahrscheinlich noch weitere aktivierende Alterationen im PIK3CA-Gen zu Tage fördern.

Weiterhin lehren uns die Erfahrungen aus der Lungenkarzinom-Diagnostik, dass therapierelevante Mutationen speziell in der Liquid Biopsy zum Teil mit sehr geringen Allelfrequenzen (0,1-1%) detektierbar sind. Daher rückt die digitale PCR bzw. digital droplet (dd)PCR als modifiziertes, quantitatives Testverfahren speziell für diesen Anwendungsbereich immer stärker in den Fokus. Im Vergleich zur herkömmlichen PCR ist die digitale PCR mit sehr hohen Lesetiefen das derzeit sensitivste Verfahren, bedarf allerdings einer entsprechenden Geräteausrüstung. Außerdem werden methodenbedingt auch hier ausschließlich definierte Mutationsbereiche, wie die eingangs bereits erwähnten Hotspot-Aminosäurecodons, in Einzelgentestungen abgedeckt. Grundsätzlich muss bei der Testung von cfDNA beachtet werden, dass ein Wildtyp-PIK3CA-Ergebnis bzw. ein negativer PIK3CA-Status nicht zwangsläufig eine PIK3CA-Mutation im Tumor ausschließt. Da nicht jedes Karzinom ausreichende Mengen zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) in das periphere Blut abgibt, besteht immer die Option eines falsch-negativen Liquid Biopsy-Ergebnisses. So lange es keine standardisierte Möglichkeit

zur Quantifizierung des Verhältnisses von ctDNA zur Gesamtheit der cfDNA gibt, muss die Einschränkung einer potenziell falsch-negativen Messung und die damit fälschlicherweise einhergehende fehlende Therapieoption im pathologischen Befund Erwähnung finden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt gilt der Probengewinnung. Hier muss unbedingt über einen geeigneten

Intrinsischer Subtyp (rel. Anteil an allen Mammakarzinomen)	HR (ER und/ oder PR)	HER2/ neu	Ki-67 Index	Therapie	relativer Anteil von PIK3CA-Mutationen
Luminal A (50-70%)	+++	-	niedrig	endokrin	HR-positiv/HER2-negativ 40-50%
Luminal B – HER2-negativ (10-20%)	+	-	hoch	endokrin +/- Chemotherapie	
Luminal B – HER2-positiv (5-10%)	+	+	jedes	endokrin +/- Chemotherapie + Anti-HER2-Therapie	HER2-positiv 25-40%
HER2-positiv (5-10%)	-	+	jedes	Chemotherapie + Anti-HER2-Therapie	
Triple-negativ (TNBC) (10-15%)	-	-	jedes	Chemotherapie	7-15%
über die Gesamtheit aller Subtypen des Mammakarzinoms					20-35%

Tab. 1: Intrinsische Subtypen des Mammakarzinoms. Das Mammakarzinom wird in 5 molekulare Subtypen eingeteilt, die eine klinische Relevanz im Hinblick auf Therapieempfehlung und Krankheitsverlauf besitzen. Die zielgerichtete Therapie mit dem oralen α-spezifischen PI3K-Inhibitor Alpelisib ist derzeit beim fortgeschrittenen oder metastasierten, HR-positiven/HER2-negativen Mammakarzinom mit einer PIK3CA-Mutation indiziert (mod. nach [2, 8-10]). ER=Östrogenrezeptor, HR=Hormonrezeptor, PR=Progesteronrezeptor

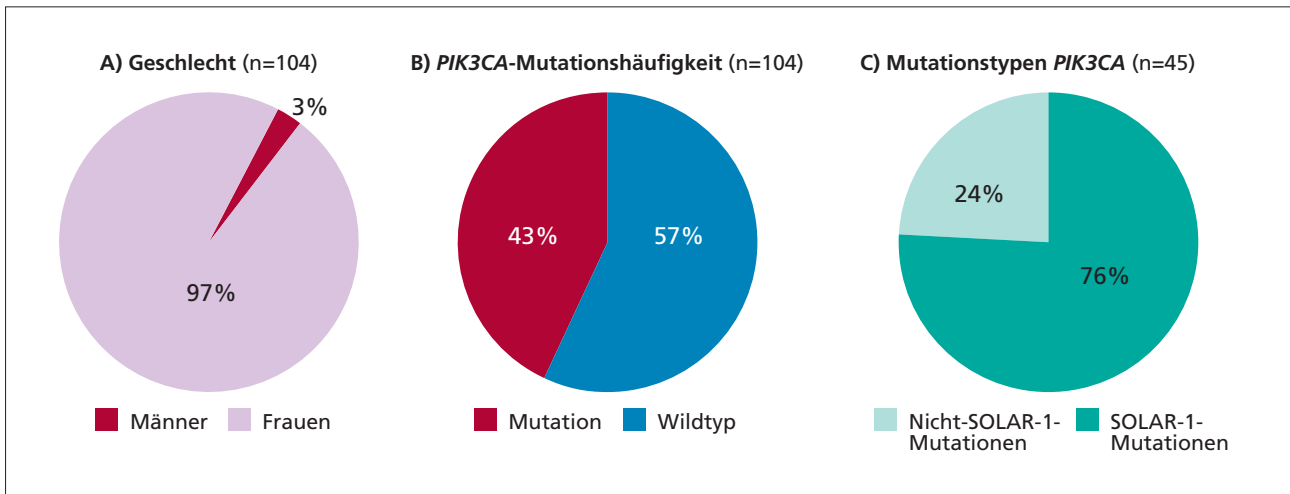


Abb. 1: Auswertung routinediagnostischer Daten einer Gruppe von 104 Mammakarzinom-PatientInnen. Das FFPE-Material wurde im Jahr 2020 in der HpH anforderungsgemäß auf Mutationen im *PIK3CA*-Gen (Exons 1-20) untersucht. Dabei kam ein laboreigenes NGS-Panel zur Anwendung. A) Geschlechtsverteilung, B) *PIK3CA*-Mutationshäufigkeit und C) prozentualer Anteil der *PIK3CA*-Mutationen, SOLAR-1- vs. Nicht-SOLAR-1-Mutationen.

Adapter die Blutprobe in ein speziell für diese Analyse vorgesehenes Blutabnahmeröhrchen (z.B. Fa. STRECK, Roche oder QIAGEN) entsprechend der Herstellerangaben aufgenommen werden. Diese speziellen Röhrchen enthalten ein Fixativ, welches die Zellen des peripheren Venenbluts bis zu 1 Woche bei Raumtemperatur stabilisiert, und somit eine Vermischung der zu untersuchenden cfDNA des Blutplasmas mit artifiziell freigesetzter DNA aus lysierten Blutzellen verhindert. Peripheres Venenblut, das in herkömmlichen Monovetten entnommen wurde, ist für die Analyse der ctDNA in dem hier genannten Sinne einer Liquid Biopsy nicht verwendbar.

Erste Ergebnisse zur *PIK3CA*-Mutationsanalyse an solidem Tumorgewebe mittels NGS

Derzeit sammeln diagnostische Institutionen erste Erfahrungen zur *PIK3CA*-Mutationsanalyse beim HR+/HER2-BC. Wir haben in der HpH die ersten 104 routinediagnostischen Mammakarzinom-Fälle, bei denen es sich ausschließlich um solide Tumorgewebe aus FFPE-Gewebe handelte, retrospektiv ausgewertet. Dieses Probenkollektiv stammte zu 97% (101/104) von weiblichen und zu 3% (3/104) männlichen Patienten (Abb. 1A). Insgesamt wiesen 43% (45/104) der Tumorgewebe mind.

eine *PIK3CA*-Mutation auf (Abb. 1B). In 6 dieser Tumorgewebe waren insgesamt 2 oder 3 *PIK3CA*-Mutationen parallel nachweisbar, in der Mehrzahl (39/45, 87%) lag aber nur eine Mutation im *PIK3CA*-Gen vor. Unter den detektierten Mutationen im *PIK3CA*-Gen waren die **SOLAR-1-Mutationen** (C420R, E542K, E545A, E545D, E545G, E545K, Q546E, Q546R, H1047L, H1047Y, H1047R) erwartungsgemäß mit **76% (34/45) am häufigsten vertreten** (Abb. 1C). Seltenerere Nicht-SOLAR-1-Mutationen

machten aber immerhin einen Anteil von 24% aus (11/45).

Bei dem Großteil der uns zugesandten Proben handelte es sich um Biopsate/Resektate des Primärtumors (63%, 66 von 104) und seltener um Metastasenmaterial (37%, 38/104) (Abb. 2A). Die Metastasen stammten in 47% (18/38) aus der Leber, gefolgt von Knochen bzw. Knochenmark (26%, 10/38), aus Lymphknoten (16%, 6/38), aus zytologischem Material (5%, 2/38) sowie zu jeweils 3%

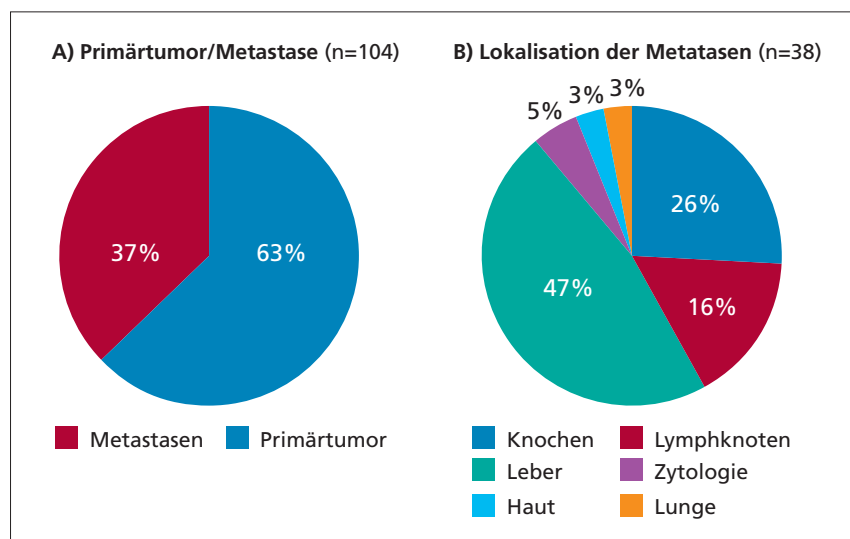


Abb. 2: Häufigkeit des diagnostischen Materials (A) und Lokalisation der Metastasen (B) an insgesamt 104 getesteten Patientenproben.

aus der Haut bzw. der Lunge (je 1/38) (Abb. 2B).

Im Rahmen der SOLAR-1-Studie gab es in Bezug auf die Lokalisation des Untersuchungsmaterials (Primärtumor vs. Metastase) keine Einschränkungen. Die Zulassung von Alpelisib beinhaltet die Liquid Biopsy als Möglichkeit der *PIK3CA*-Mutationsanalyse. Verglichen mit solidem Tumorgewebe gilt der Nachweis einer *PIK3CA*-Mutation im Blutplasma als ein besserer Prädiktor für das PFS [18]. In unserem Institut wurden bislang nur solide Tumorseiten auf *PIK3CA*-Mutationen untersucht. Der Mutationsnachweis an der Liquid Biopsy bleibt möglicherweise auch in Zukunft eine Ausnahme. Zwar wird der Einheitliche Bewertungsmaßstab (EBM) mit Wirkung zum 01. April 2021 um Ziffern für den Mutationsnachweis am Blutplasma erweitert, jedoch setzt die Verwendung dieser Ziffern voraus, dass nicht genügend Tumormaterial für eine Analyse gewonnen werden kann. Zudem schließen die Ziffern die Verwendung der *PIK3CA*-Analyse an einer Liquid Biopsy zu Zwecken des Therapie-Monitorings explizit aus (KBV-Mitteilung: https://www.kbv.de/html/1150_50726.php). Und auch aus klinischer Sicht sollte die Untersuchung des Tumorgewebes nach Möglichkeit einer Liquid Biopsy vorgezogen werden, da sich durch die mikroskopische Quantifizierung des prozentualen Anteils der Tumorzellen im Gewebe ein falsch-negatives Ergebnis, wie es als bereits erwähntes Restrisiko bei der Liquid Biopsy besteht, nahezu ausschließen lässt. Insofern ist die Situation analog zur Primärdiagnose des NSCLC, als dass die Gewebeprobe der Goldstandard bleibt und die Liquid

Biopsy als minimalinvasive Alternative für den Fall unzureichenden Tumormaterials gilt.

Fazit und Ausblick

Mit der Zulassung des *PIK3CA*-Inhibitors Alpelisib eröffnet sich die erste molekular stratifizierte Therapieoption für das fortgeschrittene HR+/HER2- BC. Voraussetzung für das Ansprechen der Therapie ist der Nachweis bestimmter aktivierender Mutationen im *PIK3CA*-Gen, die mit adäquaten Methoden

molekularpathologisch getestet werden müssen. Wie bei allen zielgerichteten Therapieansätzen wird es auch hier auf das Management der Rezidivsituation ankommen. Es gibt bereits erste Daten zum *loss-of-PTEN* als einen möglichen Resistenz-vermittelnden Mechanismus gegenüber der *PIK3CA*-Inhibition [19].

Es besteht kein Interessenkonflikt.

Die Literatur finden Sie unter: www.link.de/...

ABSTRACT

S. Strohkamp, S. Schmidt, M. Falk, K. Tiemann.¹

Recently, the *PIK3CA* inhibitor alpelisib was approved in combination with fulvestrant for therapy of locally advanced and metastatic HR positive, HER2 negative breast cancer. The SOLAR-1 trial showed superior outcome for patients whose tumors harbored activating point mutations within exons 7, 9 and 20 of *PIK3CA*, tested either on tissue or liquid biopsy samples. With the companion diagnostic approval of alpelisib, diagnostic institutions have been facing the need to integrate *PIK3CA* testing into the routine workflow. We discuss pros and cons of different methodological approaches as well as data on a cohort of the first 104 patients routinely tested at our institution.

¹ Institut für Hämatopathologie Hamburg, Hamburg

Keywords: *PIK3CA*, alpelisib, breast cancer, liquid biopsy

AUTORIN

Dr. rer. nat. Sarah Strohkamp

Institut für Hämatopathologie
Hamburg
Fangdieckstr. 75A
22547 Hamburg

E-Mail: Strohkamp@hp-hamburg.de



AUTORIN

Hon. Prof. Dr. med. Katharina Tiemann

Institut für Hämatopathologie
Hamburg
Fangdieckstr. 75A
22547 Hamburg

E-Mail: ktiemann@pathologie-hh.de

Literatur

1. Rosenbaum JN, Weisman P. The evolving role of companion diagnostics for breast cancer in an era of next-generation omics. *Am J Pathol* 2017;187(10):2185-2198.
2. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S et al. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Ann Oncol* 2019;30(10):1541-1557.
3. Schmidt M. Zielgerichtete Therapie beim metastasierten Mammakarzinom – welche molekularen Tests sind notwendig? *J Gynäkol Endokrinol AT* 2020;30:64-66.
4. Alqahtani A, Ayes HSK, Halawani H. PIK3CA gene mutations in solid malignancies: association with clinicopathological parameters and prognosis. *Cancers (Basel)* 2019;12(1):93.
5. Vollbrecht C. What's New Liquid Biopsy – PIK3CA-Testung beim Mammakarzinom. *Pathologie* 2020;41(Suppl 2):138-142.
6. Arnheim K. Neue zielgerichtete Option beim HR-positiven Mammakarzinom. *gynäkologie + geburtshilfe* 2020;25:71.
7. 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;380(20):1929-1940.
8. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* 2008;68(15):6084-91.
9. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012;490(7418):61-70.
10. Lebeau A. Molekularpathologie des Mammakarzinoms. *Gynäkologie* 2020;53:284-291.
11. Wang Y, Wang Y, Li J et al. Clinical significance of PIK3CA gene in non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Biomed Res Int* 2020;2020:3608241.
12. Scheffler M, Bos M, Gardizi M et al. PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies. *Oncotarget* 2015;6(2):1315-26.
13. Jin J, Shi Y, Zhang S et al. PIK3CA mutation and clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and Meta-Analysis. *Acta Oncol* 2020;59(1):66-74.
14. Rugo HS, Mayer M, Conte P et al. Abstract CT142: Prevalence of PIK3CA mutations in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor-2-negative advanced breast cancer from the SOLAR-1 trial. *Cancer Res* 2019;79(13 Supplement).
15. Juric D. Abstract GS3-08: Alpelisib + fulvestrant for advanced breast cancer: subgroup analyses from the phase III SOLAR-1 trial. *Cancer Res* 2019;79(4 Supplement).
16. QIAGEN. theascreen® PIK3CA RGQ PCR Kit Instructions for Use (Handbook).
17. Dogruluk T, Tsang YH, Espitia M et al. Identification of variant-specific functions of PIK3CA by rapid phenotyping of rare mutations. *Cancer Res* 2015;75(24):5341-54.
18. Liquid Biopsies Predict Alpelisib Benefit in Breast Cancer. *Oncology Times* 2019;41(1):25.
19. Razavi P, Dickler MN, Shah PD et al. Alterations in PTEN and ESR1 promote clinical resistance to alpelisib plus aromatase inhibitors. *Nat Cancer* 2020;1(4):382-393.