

25. Juni 2018

---

## Umfassendes Tumorprofiling ermöglicht zielgerichtete Therapiewahl

*State of the Art der molekulargenetischen Diagnostik*

**Das Verständnis der molekularen Grundlagen von Krebs hat sich in den vergangenen Jahren deutlich verbessert. Die molekulargenetische Diagnostik ermöglicht es heute zunehmend, Krebspatienten individuell und zielgerichtet zu behandeln. Die Analyse der molekularen Eigenschaften des Tumors durch ein umfassendes Tumorprofiling bildet hierfür die Grundlage. Der molekulare Informationsservice FoundationOne® erfasst die häufigsten aktuell bekannten krebsassoziierten genetischen Veränderungen und kann auf diese Weise entscheidende Informationen für die Therapiewahl geben.**

Brauchte es zu Zeiten des Humangenom-Projektes noch mehrere Jahre, um ein einzelnes menschliches Genom zu entschlüsseln und war mit immensen Kosten verbunden, so kann die Sequenzierung heute zu einem Preis von nur etwa 1.000 US-Dollar vorgenommen werden. Der exponentielle Fortschritt, der in den letzten 3 Jahrzehnten im Bereich der DNA-Sequenzierung erzielt wurde, hat maßgeblich zum vertieften Verständnis und der differenzierteren Kategorisierung und Behandlung von Krebs beigetragen.

In der Molekulardiagnostik geht es heute verstärkt darum, nach verschiedenen genetischen Alterationen zu suchen, um daraus ein Therapiekonzept abzuleiten, das die molekularen Veränderungen des jeweiligen Patienten individuell berücksichtigt. Dafür müssen unter Einsatz von Assays mit hoher Sensitivität und Zuverlässigkeit breite umfassende molekulare Analysen vorgenommen werden. Der Zeitaufwand für diese Analysen ist kurz bemessen, da insbesondere bei aggressiv verlaufenden Krebserkrankungen meist zeitnah mit der zielgerichteten Therapie begonnen werden sollte. In ersten Studien konnte gezeigt werden, dass bei einer CGP (Comprehensive Genomic Profiling)-orientierten Therapiewahl bessere Therapieergebnisse zu erwarten sind (1, 2).

So können moderne Verfahren, wie das Hybrid-Capture-basierte Next Generation Sequencing (NGS) das gesamte Spektrum klinisch relevanter genetischer Veränderungen nachweisen (3). Mithilfe dieser Methode können auch genetische Veränderungen bei geringer Allelfrequenz detektiert und bislang unbekannte Genfusionen nachgewiesen werden (4).

### **Warum Hybrid-Capture NGS?**

Um genetische Veränderungen im Tumorgewebe eines Patienten zu erfassen, stehen verschiedene Optionen zur Verfügung. Standard-Verfahren wie Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung

(FISH) und Immunhistochemie (engl. ImmunoHistoChemistry, IHC) sowie Hotspot-Panels erkennen in der Regel nur eine oder zwei Arten klinisch relevanter Alterationen (3, 5). Bei diesen Verfahren kann die Analyse mehrerer genetischer Veränderungen meist nur separat durchgeführt werden, da aufgrund der technischen Bedingungen und biologischen Gegebenheiten eine gleichzeitige Analyse von z.B. Amplifikation und Basenaustausch nicht durchführbar ist (3, 5). Bei Hotspot-Tests werden in ausgewählten Genen vordefinierte bekannte Mutationen bzw. genetische Veränderungen analysiert. Weitere, potenziell wichtige genetische Veränderungen für Krebserkrankungen, die nicht vorab definiert wurden, können mit Hotspot-Tests nicht analysiert werden (6).

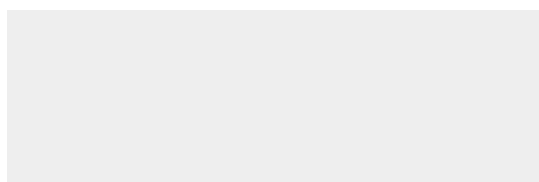
Das CGP bietet im Vergleich dazu eine Genanalyse unter Berücksichtigung auch solcher Alterationen, die nur selten untersucht werden. Zudem ist es mittels des CGP-basierten Ansatzes möglich, sämtliche Klassen von genetischen Veränderungen (Punktmutationen, Deletionen/Insertionen, Kopienzahlvariationen und Genrekombinationen) nachzuweisen (3). Der CGP-basierte Service FoundationOne analysiert ein 315-Gen-Panel für die individuelle Tumoranalyse und bestimmt zudem die Mikrosatelliteninstabilität sowie die Tumormutationslast (7, 8). Die Ergebnisse der Analysen sowie verfügbare Informationen zu Therapien und klinischen Studien werden in einem Report zusammengefasst und an den behandelnden Arzt übermittelt.

### **Was ist FoundationOne?**

Der Hybrid-Capture-basierte NGS-Informationsservice FoundationOne (3) liefert ein umfassendes Tumorprofil, das mit hoher Genauigkeit alle 4 Klassen genetischer Veränderungen – d.h. Basensubstitutionen, Insertionen/Deletionen, Kopienzahlvariationen und Genrekombinationen – auf ausgewählten und mit Krebs assoziierten Genen analysieren kann. Zudem können Aussagen hinsichtlich der Tumormutationslast und der Mikrosatelliteninstabilität getroffen werden (7, 8). Der Service sequenziert simultan die kodierende Region von 315 krebsrelevanten Genen sowie Introns aus 28 bei Krebs häufig veränderten Genen bei einer durchschnittlichen Coverage von über 500x (3).

Jeder Read deckt ein einzigartiges DNA-Fragment ab, um auch solche genetischen Veränderungen nachweisen zu können, die aufgrund von Tumorerheterogenität, hoher Durchsetzung des Tumormaterials mit Nicht-Tumorzellen und geringer Größe von Gewebeproben schwer nachweisbar sind. In einer einzigen diagnostischen FFPE-(formalinfixierte Paraffin-Einbettung) Routine-Biopsie (inklusive Stanzbiopsie oder Feinnadelbiopsien) werden Mutationsarten wie Basensubstitutionen, Insertionen und Deletionen, Kopienzahlvariationen und Genrekombination erkannt (Tab. 1).

Der Service benötigt nur eine geringe Menge an Gewebe, einschließlich Routine-Biopsate und Feinnadelaspirate, und funktioniert auch bei Proben mit hohem Anteil an Nicht-Tumorzellen (3).



Tab. 1: Technische Spezifikation des FoundationOne-Assays (mod. nach [3]).  
*MAF=Minor Allel Frequency, CN=Copy Number, FFPE=Formalin Fixated Paraffin Embedded, PPV=Positive Predictive Value*

Technische Informationen	Basensubstitution	Insertionen/ Deletionen	Kopienzahl/ -variationen	Genre- kombination
Sensitivität	> 99% MAF $\geq$ 5%	> 97% MAF $\geq$ 10%	> 95% CN $\geq$ 8 oder 10 $\geq$ 30% Tumorzellkerne	$\geq$ 90% > 99% bei ALK-Fusion $\geq$ 20% Tumorzellkerne
Spezifität (PPV)	> 99%	> 99%	> 99%	> 99%
Typische mittlere Coverage (Jeder Read deckt ein einzigartiges DNA-Fragment ab, um selten auftretende Veränderungen detektieren zu können)	500			
Probenanforderung	$\geq$ 40 $\mu$ m Gewebe zu mind. 20% malignen Ursprungs auf 8 bis 10 ungefärbten Objektträgern oder in einem FFPE-Block, Punktionsbiopsie ebenfalls geeignet			
Turnaround-Time	Durchschnittlich 14 Tage (Gemessen ab dem Datum, an dem eine den Anforderungen entsprechende Probe im Foundation-Medicine-Labor eingeht)			

### Liquid Biopsy: Molekulare Diagnostik im Blut

Zur Charakterisierung eines Tumors wird in der Regel eine histopathologische Gewebediagnostik mit anschließender molekularpathologischer Untersuchung der aufgearbeiteten Tumorzell-DNA durchgeführt. Mittlerweile gibt es mit der Liquid Biopsy ein weiteres, Blut-basiertes Verfahren, mit dem unter anderem zellfreie Tumor-DNA hinsichtlich Genveränderungen analysiert werden kann.

Mit FoundationACT™ (9) wird Roche in Kooperation mit dem US-amerikanischen Unternehmen Foundation Medicine demnächst einen solchen Blutbasierten molekularen Analyse-Service anbieten. Mit dem Assay kann die Tumor-DNA von 62 krebsassoziierten Genen analysiert werden. Für die Auswertung wird lediglich eine Probenmenge von 2x 10 Milliliter peripheres Blut benötigt.

### Praxistauglicher Ergebnisbericht

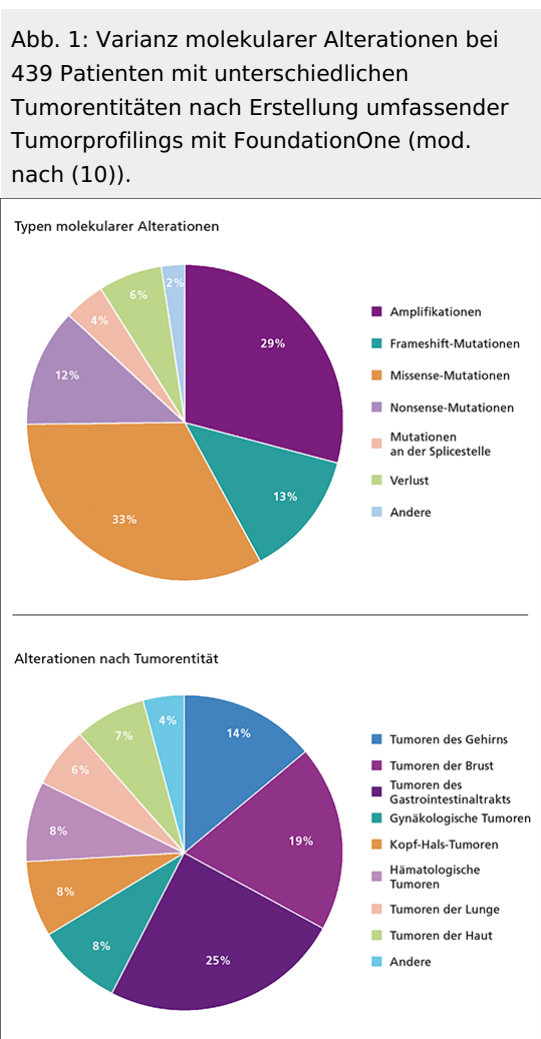
Wird in einer Tumorprobe auf einem Gen der aktuellen FoundationOne-Genliste eine relevante Veränderung gefunden, wird diese im Ergebnisbericht unter konkreter Bezugnahme auf den Tumor dargestellt. Auf der ersten Berichtseite werden die Gene aufgeführt, für die eine oder

mehrere Veränderungen mit klinischer Relevanz nachgewiesen wurden. Für einige Tumorarten sind zusätzlich auch Gene aufgeführt, die in dem untersuchten Tumor nicht auffällig waren und somit zum Ausschluss potenzieller Therapien führen können.

Neben der vollständigen Auflistung aller untersuchten Gene beinhaltet der Report zudem Genvarianten unklarer Signifikanz (VUS), die definitionsgemäß in der wissenschaftlichen Literatur noch nicht adäquat charakterisiert worden sind, aber von künftiger Relevanz sein könnten. Der Bericht wird vervollständigt durch die Auflistung sog. unklarer molekularer Befunde. Bei dieser Einstufung existieren Anzeichen für Amplifikation oder einen homozygoten Verlust eines Gens, die jedoch nicht eindeutig nachweisbar sind.

Der FoudationOne-Service kann bei einem breiten Spektrum maligner Tumoren eingesetzt werden (Abb. 1). Alle ermittelten klinisch relevanten genetischen Veränderungen werden auf Grundlage des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstands und veröffentlichter klinischer Daten mit zielgerichteten Therapien abgeglichen. Therapieoptionen, die sich daraus für den Patienten ergeben, werden im Report ebenso aufgelistet, wie auch klinische Studien, in denen die gefundene Genveränderung eine Relevanz hat.

Der Bericht liefert Informationen, die den Behandler bei seiner Therapieentscheidung unterstützen können.



## **Für wen eignet sich FoundationOne?**

Der Service kommt vorrangig in Betracht bei Patienten

- mit Erstdiagnose eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms Stadium IV (NSCLC),
- mit Erstdiagnose eines seltenen soliden Tumors Stadium IV, für die es nur eingeschränkte oder keine Empfehlungen für eine systemische Therapie gibt,
- mit Erstdiagnose eines aggressiven soliden Tumors Stadium IV mit schlechter Prognose, sehr geringem Ansprechen auf den Behandlungsstandard und einer hohen Wahrscheinlichkeit für behandelbare molekulare Veränderungen (z.B. Pankreaskarzinom),
- mit Erstdiagnose eines Karzinoms mit unbekannter Primärlokalisation (CUP) oder unbekanntem Primärtumor,
- mit soliden Tumoren Stadium IV, die bereits alle etablierten Leitlinien-basierten systemischen Therapien und entsprechenden molekularen Untersuchungsverfahren durchlaufen haben und deren Allgemeinzustand eine weitere systemische Therapie erlauben,
- für Patienten mit soliden Tumoren, deren Biopsat für eine erforderliche molekulare Analyse nicht ausreicht.

## **Fazit: Von der Tumorprobe zum umfassenden Tumorprofil mit FoundationOne**

Bei dem validierten umfassenden Tumorprofil von FoundationOne wird die gesamte zu codierende Sequenz von 315 krebsassoziierten Genen plus ausgewählten Introns aus 28 Genen analysiert, die bei soliden Tumoren häufig verändert sind. Zudem können Aussagen hinsichtlich der Tumormutationslast und der Mikrosatelliteninstabilität getroffen werden (7, 8). Weil FoundationOne eine Vielzahl von klinisch relevanten Veränderungen erkennt, können Ärzte durch den Service potenziell zielgerichtete Behandlungsmöglichkeiten auswählen: Zu jedem Patienten werden passend zu den molekularen Veränderungen in seinem Tumor zielgerichtete Therapien und klinische Studienprogramme aufgelistet. Alle vier relevanten Klassen an genetischen Veränderungen werden analysiert. Alle ermittelten klinisch relevanten genetischen Veränderungen werden auf Grundlage des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstands und veröffentlichter klinischer Daten mit zielgerichteten Therapien und klinischen Studienprogrammen abgeglichen. Der Einsender erhält einen ausführlichen Ergebnisbericht.

*Mehr Informationen unter [www.foundationmedicine.de](http://www.foundationmedicine.de)*



## **„FoundationOne ist ein sehr gutes Diagnostik-Tool zur Erstellung umfassender, aber trotzdem fokussierter Tumorprofile“**



Prof. Dr. Arndt Vogel, leitender Oberarzt der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover, nutzt im klinischen Alltag bereits den Service FoundationOne zur molekulargenetischen Diagnostik. Im Interview berichtet er über seine Erfahrungen mit dem innovativen Verfahren.

### **Herr Prof. Vogel, wie schätzen Sie das Potenzial des Hybrid-Capture NGS als Grundlage des Services FoundationOne für den klinischen Alltag ein?**

**VOGEL:** Mit dem NGS können Tumoren sehr genau charakterisiert werden. Insbesondere, wenn ein großes Gen-Panel wie beim FoundationOne-Service verwendet wird. Damit lassen sich nicht nur Mutationen aufdecken, sondern auch Genfusionen. Ich halte diesen Service für das aktuell praktikabelste Diagnostik-Tool, um ein fokussiertes, praxisrelevantes Tumorprofil zu erstellen.

### **Aus welchen Gründen haben Sie sich für das Tumorprofiling mit FoundationOne entschieden?**

**VOGEL:** Dieser Service informiert über klinisch relevante Mutationen auf zahlreichen Genen, zeigt zugleich aber auch seltene Mutationen an und gibt Auskunft über die Mutationslast und über die Mikrosatelliteninstabilität. Diese Informationen erhält man sonst allenfalls in zeitaufwendigen Einzelanalysen. So erhält man viele therapierelevante Informationen in einem einzelnen Schritt.

### **Welche Rückschlüsse ziehen Sie aus den Ergebnisberichten für die Therapiewahl?**

**VOGEL:** Wir verwenden die genetischen Informationen, um die Therapieoptionen für den Patienten unter Berücksichtigung aller verfügbaren klinischen und diagnostischen Merkmale auszuloten.

Dabei führen die genetischen Informationen nicht zwangsläufig zu sofortigen mutationsbasierten Therapien. Das ist vor allem dann der Fall, wenn diese experimentell sind oder erst nach den evidenzbasierten Standardtherapien zum Einsatz kommen sollten. Aber für die Therapieplanung ist es wichtig, das Tumorprofil möglichst umfassend zu kennen – und das so früh wie möglich. FoundationOne erleichtert die Auswertung zahlreicher Informationen, indem bereits eine Gewichtung hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz erfolgt.

Auch auf die therapeutischen Möglichkeiten einschließlich einer möglichen Studienteilnahme wird eingegangen. Das ist ein hoher logistischer Aufwand und hilft bei der Diskussion um die entscheidende Frage, nämlich welche Therapie für welche Mutation infrage kommt.

### **In welchen Behandlungssituationen und bei welchen Patienten setzen Sie FoundationOne ein?**

**VOGEL:** Wir setzen den Test zum Beispiel bei biliären Karzinomen ein, da es bei diesen einige

Mit freundlicher Unterstützung der Roche Pharma AG

Dr. Beate Grübler

### Literatur:

- (1) Wheler JJ et al. *Cancer Res* 2016;76(13):3690-701.
- (2) Schwaederle M et al. *Mol Cancer Ther* 2016;15(4): 743-52.
- (3) Frampton GM et al. *Nat Biotechnol* 2013;31(11):1023-31.
- (4) Ali SM et al. *Oncologist* 2016; 21(6):762-70.
- (5) Naidoo J, Drilon A. *Am J Hematol Oncol* 2014;10(4): 4-11.
- (6) Schrock AB et al. *Clin Cancer Res* 2016; 22(13):3281-5.
- (7) Hall MJ et al. *J Clin Oncol* 2016;34(4, Suppl):528-528.
- (8) Chalmers ZR et al. *Genome Med* 2017; 9(1):34.
- (9) Stephens P et al. *Ann Oncol* 2016; 27(6):401-6.
- (10) Schwaederle M et al. *Mol Cancer Ther* 2015;14(6):1488-94.