

**Liquid Biopsy-Diagnostik von zellfreier DNA
und zirkulierenden Tumorzellen:
"Hip or Hype"**

3. Nationales Biobankensymposium 2014

Berlin, 04.12.2014

Prof. Dr. rer. nat Edgar Dahl

RWTH zentralisierte Biomaterialbank (RWTH cBMB)
Institut für Pathologie, Uniklinik RWTH Aachen

Agenda

1. Krebs-DNA Analyse aus dem Blut: Analyte und ihre Herkunft

2. Wegweisende Arbeiten zur cfDNA und CTC-Analyse

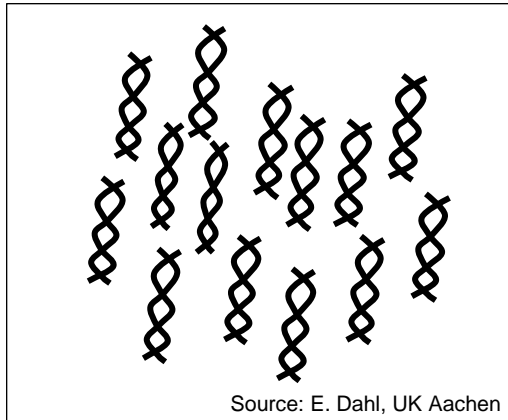
3. cfDNA-Analytik im Rahmen von klinischen Studien

4. Die Rolle von Pharma-/Biotech / Technologische Neuentwicklungen

5. Zusammenfassung und Ausblick

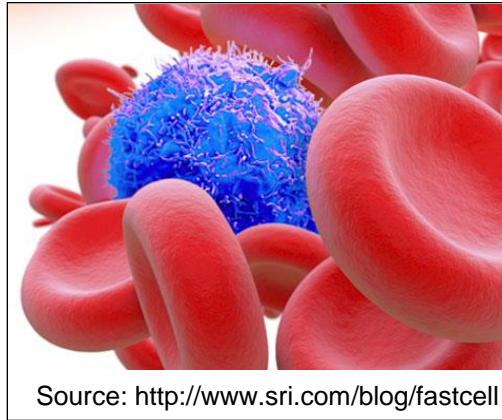
cfDNA (ctDNA), CTCs, Exosomen

cfDNA



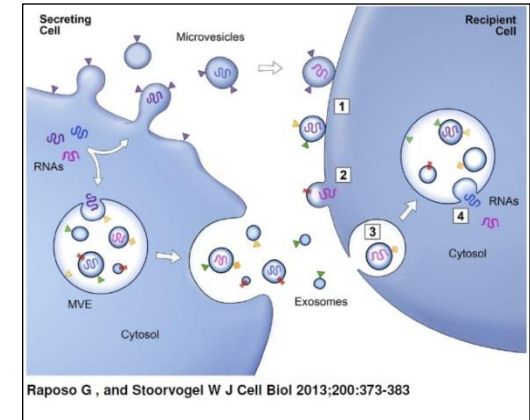
1-100 ng freie DNA
pro ml Blut

CTCs



0 – einige 10 CTCs
pro 10 ml Blut

Exosomen



ca. 10^8 Exosomen
(100 nm) pro ml Blut

→ Die Mengen der diagnostisch relevanten Analyte zur Gewinnung der DNA sind extrem gering

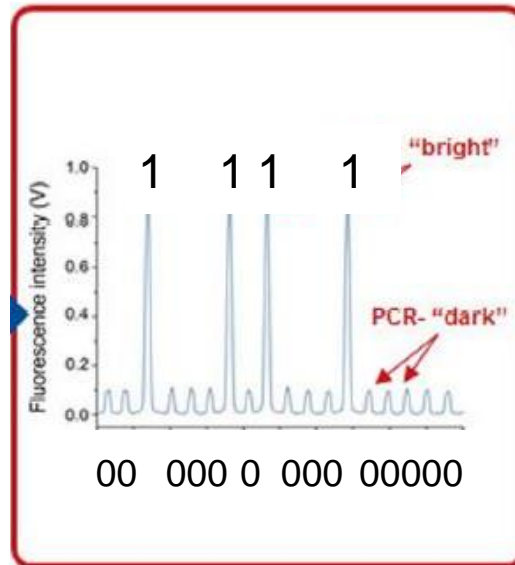
Technologischer Quantensprung: Absolute Quantifizierung von Genkopien ist möglich

→ Grundlage ist die Digitalisierung des Meßsignals

Droplet digital PCR (ddPCR)



Source: bio-rad.com

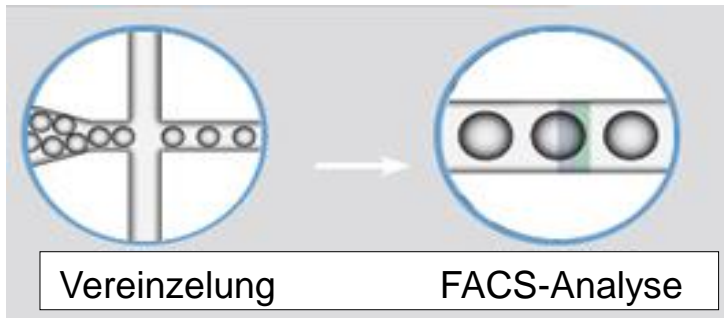


Source: <http://www.idtdna.com>

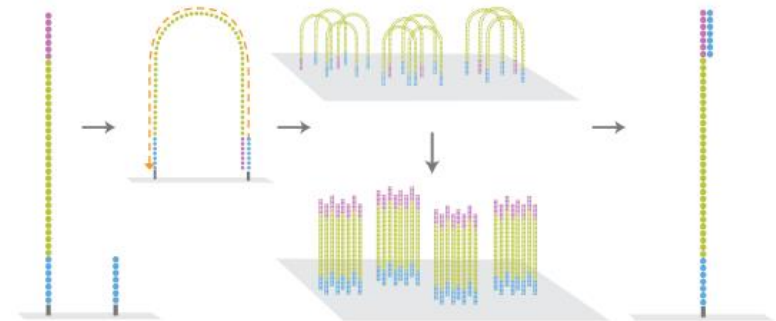
NGS



Source: Illumina



Source: Chen et al. Molecular Therapy Nucleic Acids (2013)



Source: Illumina.com

Potentielle Anwendungsgebiete Liquid Biopsy-Diagnostik in der Onkologie

- Früherkennung von Tumoren und Diagnose
→ ergänzendes Potential
- Verlaufskontrolle
→ Tumorlast des Patienten nicht-invasiv verfolgen
- Therapie-Stratifizierung
→ Entstehende Resistenz-Mutationen gegen
zielgerichtete Therapien frühzeitig erkennen

Agenda

1. Krebs-DNA Analyse aus dem Blut: Analyte und ihre Herkunft

2. Wegweisende Arbeiten zur cfDNA und CTC-Analyse

3. cfDNA-Analytik im Rahmen von klinischen Studien

4. Die Rolle von Pharma-/Biotech / Technologische Neuentwicklungen

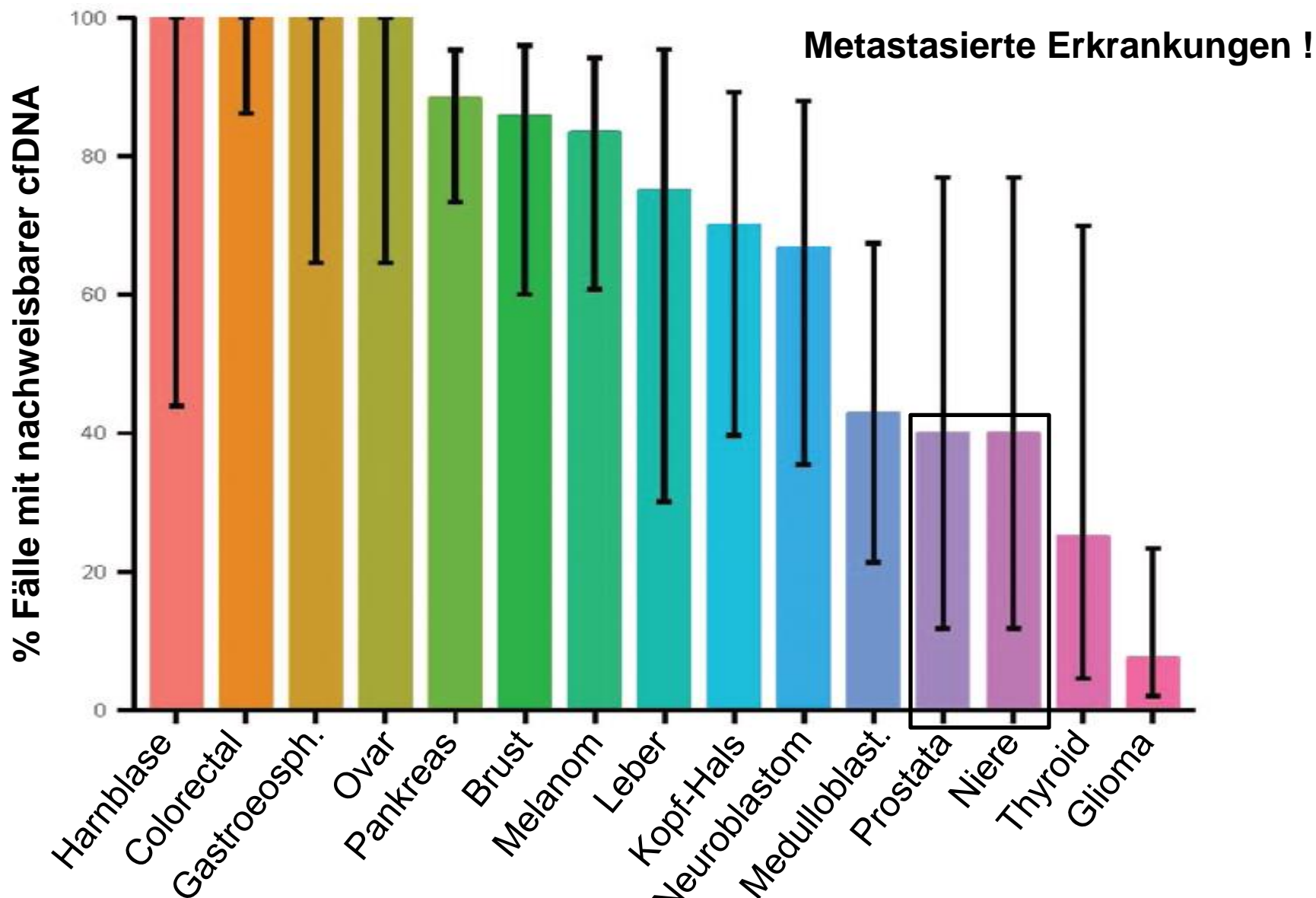
5. Zusammenfassung und Ausblick

Wegweisende Arbeiten zur cfDNA-Analyse

(1) Bettegowda et al. (Feb. 2014, STM)

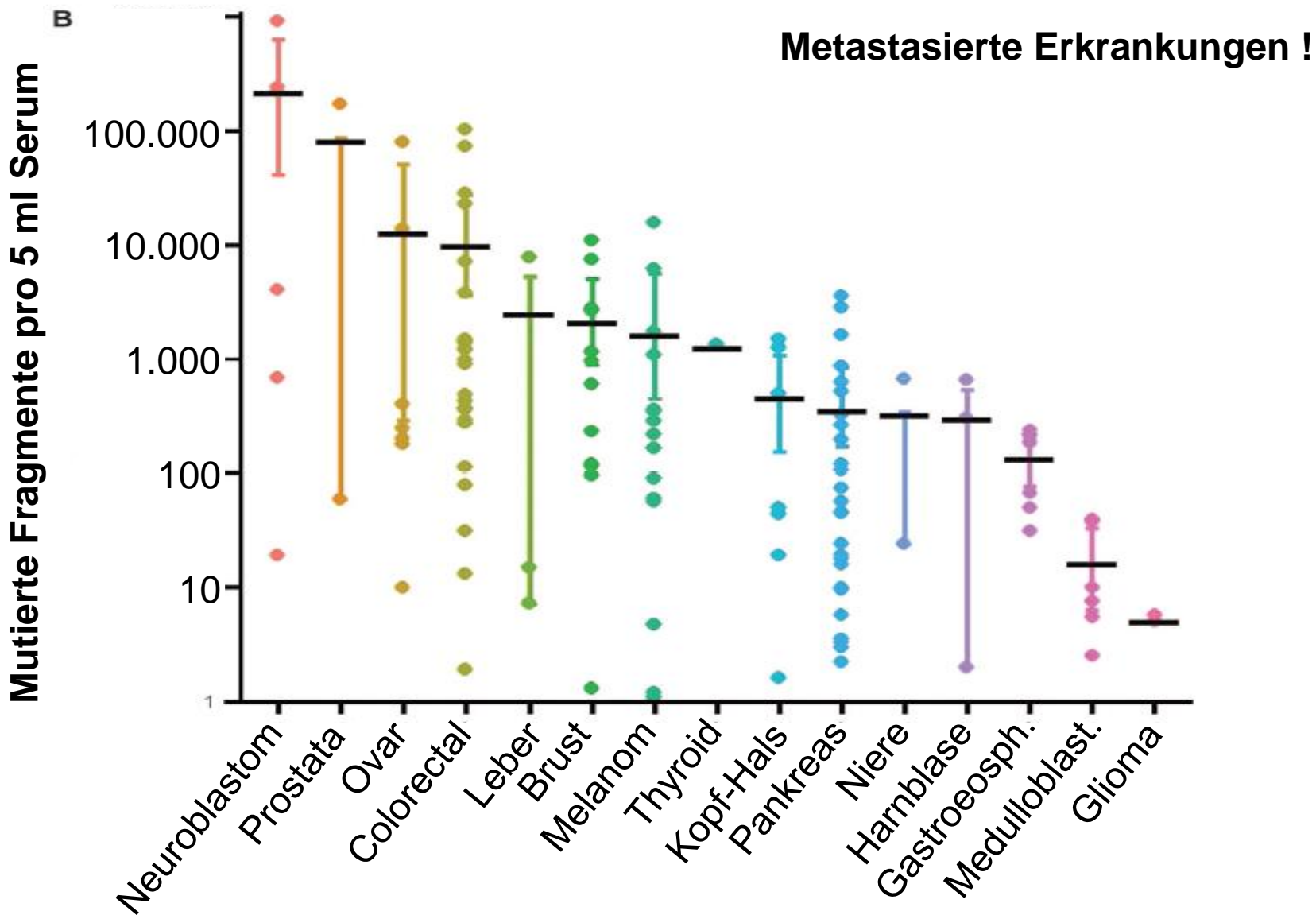
- Mutationen in der cfDNA bei 640 Patienten mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen mittels digitaler PCR analysiert
- cfDNA war detektierbar in 75% der Patienten mit Metastasen
- in primären Tumoren war die Detektionsrate unter 50%
- KRAS Codon 12/13-Mutationsanalyse beim CRC in cfDNA im Vergleich zum Primärtumor (Gold-Standard): Konkordanz: 95% (Sensitivität: 87.2%, Spezifität: 99.2%)
- Falsch-negative cfDNA-Ergebnisse waren signifikant mit muzinöser Histologie verknüpft

Nachweisbarkeit von cfDNA hängt stark von der Tumorentität ab



Source: Bettegowda et al. Sci Transl Med (2014)

Anzahl der gemessenen mutierten Fragmente schwankt innerhalb einer Tumorentität um den Faktor 100 bis 10.000



Anwendung: Resistenz-Monitoring nach TKI-Blockade

Sample ID	Pretreatment								Posttreatment								
	KRAS 12	KRAS 13	KRAS 61	NRAS 12	NRAS 61	BRAF 600	PIK3CA 538 – 549	PIK3CA 1039 – 1050	EGFR 714	EGFR 794	KRAS 12	KRAS 61	NRAS 12	NRAS 61	BRAF 600	EGFR 714	EGFR 794
Patient #5											■						
Patient #16											■	■					■
Patient #17																	
Patient #18										■		■					
Patient #19													■	■			
Patient #21										■			■	■			
Patient #22										■					■		
Patient #24													■				
Patient #26										■							
Patient #27										■							
Patient #1										■	■		■				
Patient #2										■							
Patient #4										■	■						
Patient #7										■			■	■			
Patient #9										■							
Patient #10										■	■						
Patient #12										■	■						
BARD 101										■			■				
BARD 102										■							
BARD 103										■							
CRC 188										■							
CRC 189										■	■						
CRC 190										■			■	■			
CRC 191										■	■						
Total # of cases	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	16	1	15	1	1	1

ctDNA: Erworbene Resistenz gegenüber Panitumomab / Cetuximab

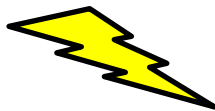
- ➔ Polyklonale Resistenz
- ➔ Bedeutung von KRAS/ NRAS Codon 61 Mutationen

Source: Bettgowda et al. Sci Transl Med 2014

Wegweisende Arbeiten zur cfDNA-Analyse

(2) Thierry et al. (Feb. 2014, Nature Medicine)

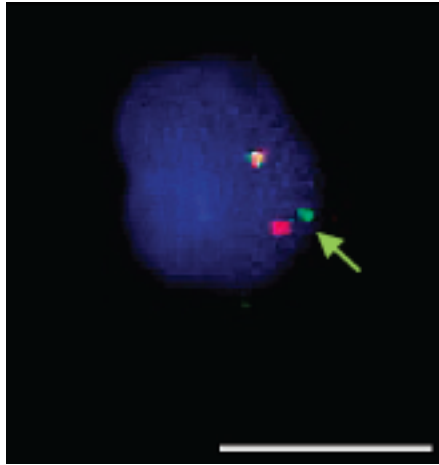
- erste verblindete prospektive Studie zum Vergleich von KRAS und BRAF-Mutationsstatus beim metastasierten CRC zwischen Tumorgewebe (Gold-Standard) und cfDNA aus Blutplasma (n=95)
- Verwendete Technologie: IntPlex PCR
→ Allel-spezifische qPCR mit PCR-Fragmenten von ca. 60 bp
- BRAF V600E Mutation: 100% Konkordanz (100% Sens., 100% Spez.)
- KRAS Codon 12,13: 96% Konkordanz (92% Sensitivität, 98% Spezifität)
- Schwankung der Frequenz der mutierten Allele in der cfDNA in dieser Studie „nur“ um den Faktor 100



Diese Studie zeigt, dass Liquid Biopsy durch cfDNA die Tumorschnitt-basierte Analyse ersetzen kann ...

Wegweisende Arbeit zur CTC-Analyse Pailler et al. (2013, JCO)

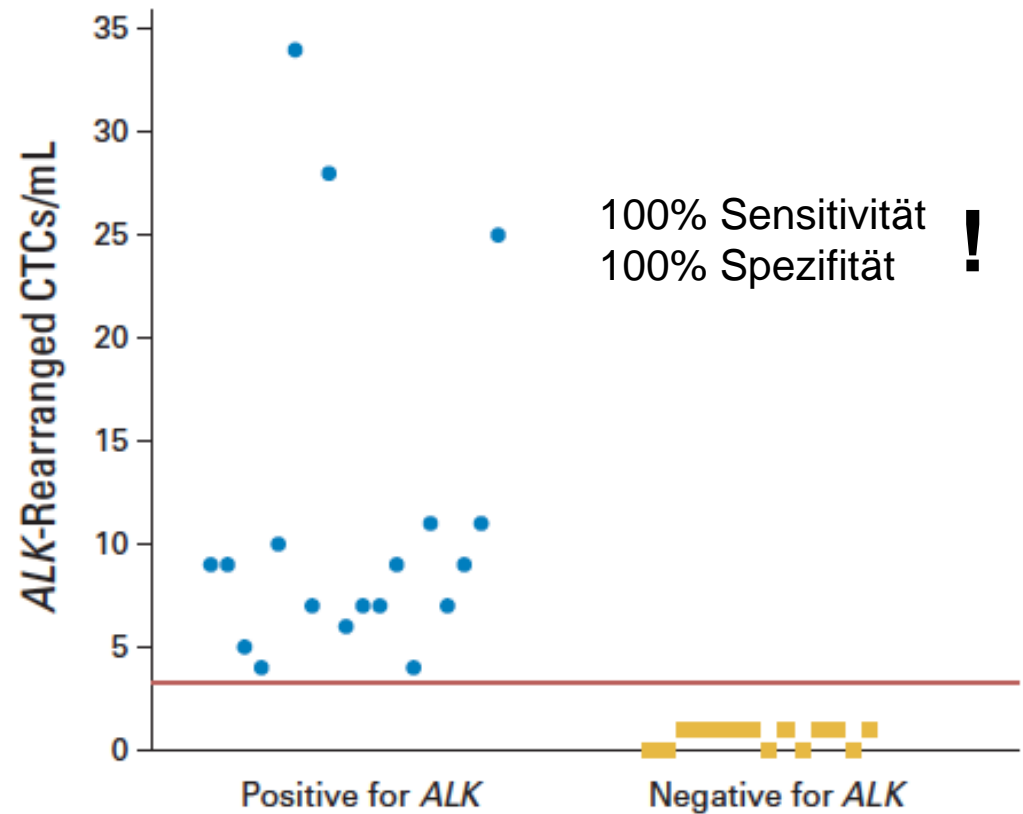
CTC: ALK+ NSCLC



CellSearch



FISH



ALK-Rearranged CTCs	ALK Status in Tumor Samples		Total	
	Patients <u>Positive for ALK</u>	Patients <u>Negative for ALK</u>		
< 4	0	14	14	NPV = 100%
≥ 4	18	0	18	PPV = 100%
Total	18	14	32	
Sensitivity = 100%		Specificity = 100%		

Source: Pailler E et al. J Clin. Oncol. 2013

Agenda

1. Krebs-DNA Analyse aus dem Blut: Analyte und ihre Herkunft

2. Wegweisende Arbeiten zur cfDNA und CTC-Analyse

3. cfDNA-Analytik im Rahmen von klinischen Studien

4. Die Rolle von Pharma-/Biotech / Technologische Neuentwicklungen

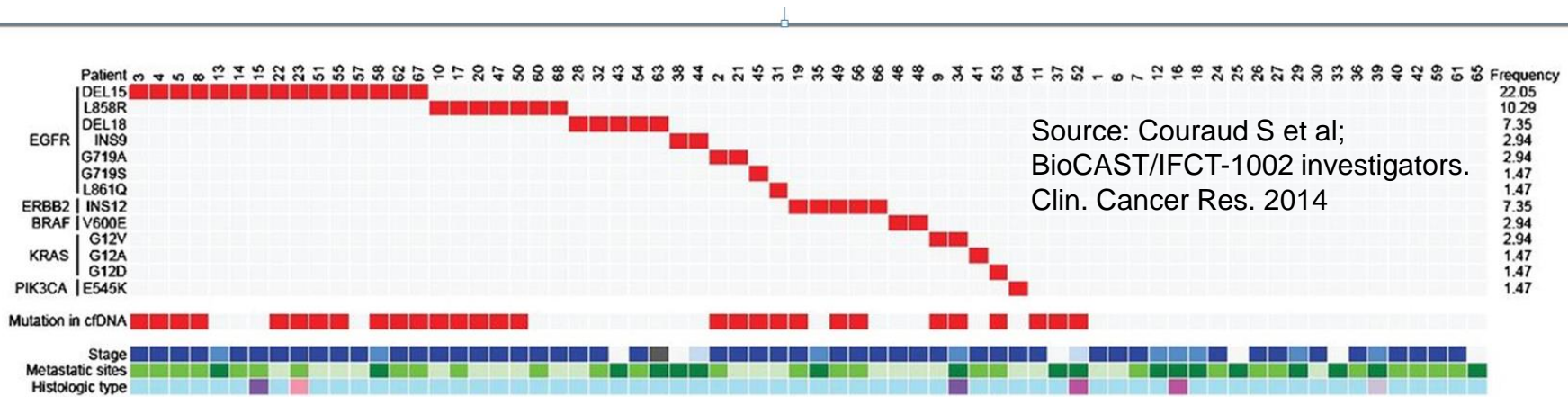
5. Zusammenfassung und Ausblick

cfDNA-Analytik im Rahmen von BioCAST/IFCT-1002

Couraud et al. (Jul. 2014, CCR)

- BIOCAST/IFCT ist eine französische Lungenkrebsstudie bei Niemals-Rauchern (100 fortlaufende Fälle eingeschlossen → „Real world study“)
- selbstentwickelter NGS multiplex-PCR Assay zur Analyse der Hotspot-Regionen von EGFR, KRAS, BRAF, HER2 und PIK3CA
Plattform: Ion Torrent PGM Sequencer
- Vergleich der Mutationen für 68 Fälle mit gepaarter tDNA und cfDNA
Coverage: 1000x für Tumore, 10.000x für Plasma

„Real-world“ Studie ergibt „Real-world“ Ergebnisse



- **tDNA wies in 50/68 Fällen (ca. 74%) eine Treibermutation auf (davon waren 5 nicht über die Sanger-Sequenzierung gefunden wurden)**
- **in der cfDNA wurden vom IT Variant Caller lediglich 7/50 (14%) der Mutationen gefunden**
- **Eigener Filter: (i) mind. 5 Reads mit der Mutation; (ii) Variant Allel Frequenz >0.2% → damit konnten 28/50 (56%) der Mutationen in der cfDNA wiedergefunden werden**
- **über alle Amplikons betrug die Konkordanz zwischen tDNA und cfDNA in dieser Studie lediglich 68%**

Die Analyse weniger Gene kann bessere Werte für Sensitivität und Konkordanz ergeben

Table 3. IonTorrent NGS test on cfDNA properties for each individual amplicon and overall, using tDNA for reference in all matched samples ($n = 68$)

	<i>n</i>	cfDNA+		cfDNA-		Mutation detection rate (sensitivity)	Concordance rate
		tDNA+	tDNA-	tDNA-	tDNA+		
PI3KCA exon 9	61		1	59	1	—	97%
PI3KCA exon 20	60			60		—	100%
EGFR exon 18	59	3		56		100%	100%
EGFR exon 19	59	11	2	37	9	55%	81%
EGFR exon 20	60			58	2	—	97%
EGFR exon 21	61	6		53	2	75%	97%
BRAF exon 11	60			60		—	100%
BRAF exon 15	61			58	3	—	95%
KRAS exon 2	59	3		55	1	75%	98%
KRAS exon 3	58			58		—	100%
ERBB2 exon 19	59			59		—	100%
ERBB2 exon 20	63	3		58	2	60%	97%
Overall (95%CI; all patients, at least one amplicon)	68	26	3	20	19	58% (43%; 71%)	68% (56%; 78%)
All 12 amplicons together (95% CI)	56	21	3	16	16	57% (41%; 71%)	66% (53%; 77%)

Abbreviations: cfDNA+, mutation in detected in cfDNA; cfDNA-, no mutation detected in cfDNA; tDNA+, mutation detected in tDNA; tDNA-, no mutation detected in tDNA.

Agenda

1. Krebs-DNA Analyse aus dem Blut: Analyte und ihre Herkunft

2. Wegweisende Arbeiten zur cfDNA und CTC-Analyse

3. cfDNA-Analytik im Rahmen von klinischen Studien

4. Die Rolle von Pharma-/Biotech / Technologische Neuentwicklungen

5. Zusammenfassung und Ausblick

Pharma- und Biotech-Firmen positionieren sich im Bereich Liquid-Biopsy Diagnostik

Sept 24, 2013 Source: <http://www.sysmex.co.jp/en/news/press/2013/130924.html>

Sysmex Acquiring Two Germany Based Companies to Expand its Technology Platform Targeting Personalized Medicine and Entering New Fields of Business

Inostics possesses advanced genetic testing technologies, such as ultra-sensitive digital PCR technology for detecting cancer cell DNA directly from blood – a “liquid biopsy” process as opposed to tissue testing. By acquiring those technologies, Sysmex plans to develop on a global basis assay services

June 1, 2014 Source: <http://www.prnewswire.co.uk/news-releases/merck-to-collaborate-with-sysmex-inostics-on-a-blood-based-ras-biomarker-test-261394471.html>

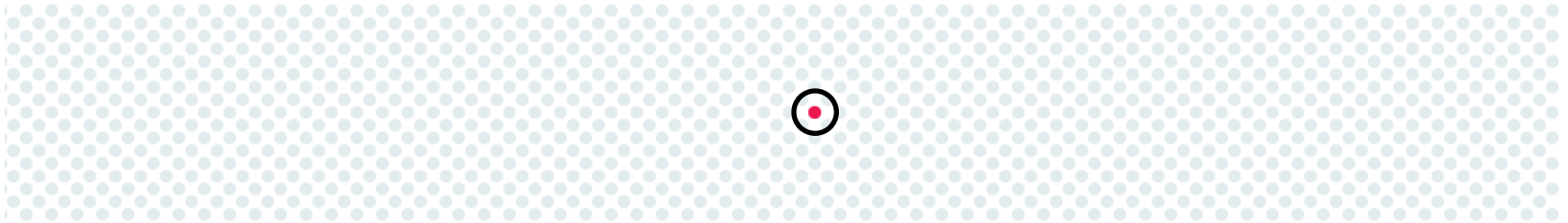
Merck to Collaborate with Sysmex Inostics on a Blood-Based RAS Biomarker Test

- **Development and commercialization agreement on blood-based RAS biomarker mutation status test for (metastatic) colorectal cancer (mCRC)**
- **This non-invasive, fast and easy-to-perform diagnostic test is expected to provide a real-time reflection of a patient’s RAS mutation status to help guide clinical decision making in mCRC**

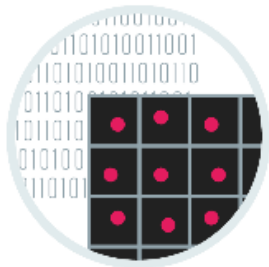
Neue Technologien: Beispiel Epic Sciences

EPIC'S PLATFORM...1 IN 50,000,000,000

Epic's platform can find unique cells at a resolution of 1 cancer cell in 50,000,000,000 cells, making it one of the most sensitive rare cell detection technologies developed.



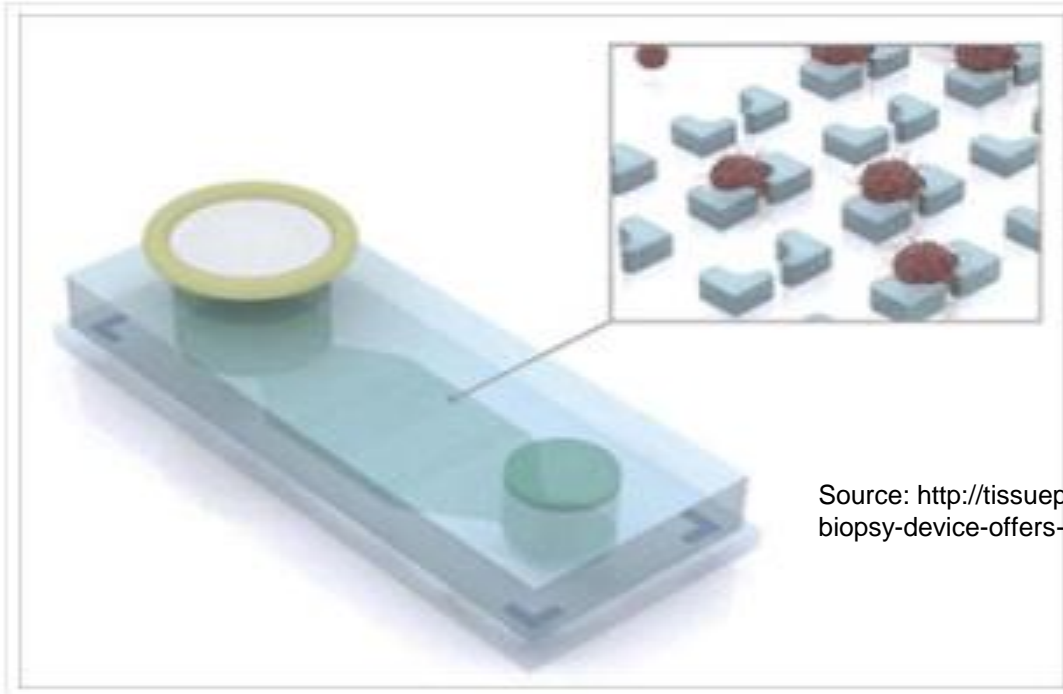
NO CELL LEFT BEHIND



Großer Markt für “Point of Care” Monitoring erwartet

\$1 Dollar Liquid Based Biopsy Device Offers Way to Monitor Cancer Patients

Keith J. Kaplan, MD | February 15, 2014 | 0 Comments



Courtesy of Dark Daily:

Pathologists will be interested to learn that researchers at Harvard Medical

Source: <http://tissuepathology.com/2014/02/15/1-dollar-liquid-based-biopsy-device-offers-way-to-monitor-cancer-patients/#axzz3MLNiof6M>

School and Massachusetts General Hospital are developing a “liquid biopsy” technology specifically to enable point-of-care monitoring of the progress of patients undergoing treatment for certain types of cancers.

Agenda

1. Krebs-DNA Analyse aus dem Blut: Analyte und ihre Herkunft

2. Wegweisende Arbeiten zur cfDNA und CTC-Analyse

3. cfDNA-Analytik im Rahmen von klinischen Studien

4. Die Rolle von Pharma-/Biotech / Technologische Neuentwicklungen

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung und Ausblick

- Neue hoch-sensitiver DNA-Analysetechniken erlauben den Vorstoß in neue Grenzbereiche der Analytik
- Das Potential der Liquid Biopsy Diagnostik liegt vor allem in der Analyse der cfDNA/CTC-Veränderung über die Zeit / unter Therapie
- Bezug der cfDNA/CTCs zur pathologisch klassifizierten Erkrankung und dem Krankheitsverlauf ist noch kaum verstanden
- Biobanken können über ihr hochqualitatives Biomaterial einen wichtigen Beitrag zur Weiterentwicklung der Liquid Biopsy Diagnostik leisten