

Liquid Biopsy

Flüssigbiopsien auf Basis freizirkulierender Nukleinsäuren, Exosomen und zirkulierender Tumorzellen versprechen neue Möglichkeiten für die Diagnose und Therapie von Krebs sowie anderen Krankheiten. Die Analyse freizirkulierender Nukleinsäuren ermöglicht zudem die frühe Bestimmung genetischer Veränderungen bei Ungeborenen, bei minimalem Risiko für die Mutter und das ungeborene Kind.



Gewebebiopsien nehmen bei der Diagnose von Krebs und anderer Krankheiten weiterhin einen festen Platz in der medizinischen Praxis ein. Die invasiven Verfahren gehen jedoch mit teils beträchtlichen Risiken und Belastungen für Patienten sowie hohen Kosten einher und weisen zahlreiche technische Limitierungen auf, die auf die Heterogenität der Tumore zurückzuführen sind. Mittlerweile treten aber Flüssigbiopsien immer mehr in den Vordergrund, welche die Diagnose und das

Beobachten transformieren, indem sie verändern, wie auf biologische Proben zugegriffen werden kann. Durch minimalinvasive Tests von Blut oder anderen Körperflüssigkeiten, entschlüsseln Flüssigbiopsien wertvolle molekulare Erkenntnisse – zum Vorteil des Patienten sowie des Dienstleisters.

Jedes Jahr erhalten über 450.000 Patienten in den USA und Europa die Diagnose Lungenkrebs. Bei der Mehrzahl wird zunächst eine chirurgische Resektion vorgenommen, gefolgt von einer Kombinations- und Chemotherapie. In den vergangenen acht Jahren ist eine Vielzahl neuer gezielter Therapien für primären sowie resistenten/wiederkehrenden Lungenkrebs entwickelt worden, die die Lebenserwartung erheblich steigern können. Diese Erfolgsmethoden verlangen die molekulare Überwachung der Krankheit, um zu bestimmen, welche Mutation die Vermehrung der Zellen verursacht und welche Therapie den Verlauf am besten angreift. Die Überwachung von Krankheitsverläufen und Rückfällen ist jedoch problematisch, da diese bis vor kurzem noch mit zusätzlichen chirurgischen Biopsien verbunden waren.

Für den Patienten können die Eingriffe mitunter recht schmerzhaft und belastend sein, weshalb viele Biopsien unter lokaler Betäubung oder gar Vollnarkose durchgeführt werden. Da hierbei selbst bei minimalinvasiven Eingriffen stets auch lebendiges Gewebe mit verletzt wird, besteht zudem ein Infektionsrisiko.¹ Gewebeproben können aufgrund der Tumorerogenität auch zu wenige relevante Informationen enthalten. Zudem kann es bei bestimmten Krebsarten alleine aufgrund der Lage des Tumors schwierig sein, genug aussagekräftiges Gewebe für eine Analyse zu erhalten. Ein Tumor ist stets recht heterogen und enthält Zellen mit unterschiedlichen Mutationen.

Flüssigbiopsien: Früher, schneller, preiswerter und schonender

Mithilfe sogenannter Flüssigbiopsien werden viele Gewebebiopsien oder ähnliche Prozeduren immer unnötiger. QIAGEN ist weltweit führend dabei Forscher bei der Implementierung von

Flüssigbiopsie-Technologien zu unterstützen, um molekulare Biomarker zur Überwachung von Krebs und anderen Krankheiten minimalinvasiv aus Blut, Urin oder anderen Körperflüssigkeiten zu gewinnen. Im Zentrum der klinischen Forschung stehen dabei frei zirkulierende Nukleinsäuren, Exosomen und zirkulierende Tumorzellen.

Zirkulierende Nukleinsäuren sind der Wissenschaft bereits seit dem 19. Jahrhundert bekannt. **Frei zirkulierende Nukleinsäuren** stammen aus absterbenden Zellen, deren Bestandteile ins Blut und andere Körperflüssigkeiten freigesetzt werden.² Dieses Phänomen tritt bei allen Menschen auf, doch bei einigen physiologischen Zuständen und Krankheitsbildern ist die Konzentration der frei zirkulierenden Nukleinsäuren deutlich höher – so etwa bei schwangeren Frauen oder Patienten mit Tumor- oder Autoimmunerkrankungen.³

Exosomen wiederum sind sogenannte Mikrovesikel, die von Zellen als Teil des körpereigenen Kommunikationssystems ausgeschieden werden. Exosomen können kleine Mengen an Erbinformationen in Form von RNA-Molekülen durch Blut, Urin oder andere Körperflüssigkeiten von Zelle zu Zelle transportieren. Daher werden Exosomen auch als „Twitter der Zellen“ bezeichnet.

Zirkulierende Tumorzellen sind von soliden Tumoren losgelöste Zellen. Das Auftreten solcher Zellen kann ein Hinweis für den Fortschritt der Krankheit und mit konventionellen Methoden analysiert worden sein, zum Beispiel durch Zählung vorhandener Zellen im Blut. Immer mehr Wissenschaftler werten diese Zellen als wertvolle zusätzliche Quelle für molekulare Informationen, die für die Überwachung des Krankheitsverlaufs, wie auch für die Bestimmung alternativer Therapiepläne relevant sind.

Im Falle von Krebs konnte gezeigt werden, dass Tumore schon lange bevor sie auf herkömmlichem Weg mittels Ertasten, Röntgenbild, Computertomographie, Kernspintomografie oder Sonografie erkannt werden können, Spuren in Form von genetischen Molekülen hinterlassen. Erste Studien und Expertenmeinungen zu Flüssigbiopsien legen daher nahe, dass die Technologie zur früheren Diagnose zahlreicher Krebserkrankungen beitragen könnte.^{4,5}

„Die Aussicht, anhand einer simplen Blutprobe bestimmte Biomarker nachweisen zu können, ist sehr vielversprechend. Wir werden in der Lage sein eine Krankheit zu diagnostizieren, selbst wenn sie sich im Körper eines Patienten versteckt, weil sie Nukleinsäuren in den Blutkreislauf entlässt“, erklärt Prof. Dr. Christian Thiede von der Universität Dresden.

Hinzu kommt, dass durch Flüssigbiopsien prinzipiell Informationen über den **Status des gesamten Organismus** und nicht lediglich eines bestimmten Gewebetypus erhoben werden können. Auf diese Weise könnten zukünftig zum Beispiel mehrere Tumore gleichzeitig nachgewiesen und im Hinblick auf ihre Beschaffenheit und Lage im Körper charakterisiert werden. Damit eröffnen Flüssigbiopsien bisher ungeahnte Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Methoden zur Früherkennung – und damit zur wirksameren Behandlung – von Krebs.

Auch bei Schwangeren werden frei zirkulierende Nukleinsäuren zur Verbesserung der Diagnostik herangezogen. Hier können Flüssigbiopsien, bei denen Erbinformationen des Fötus aus dem Blut der Mutter isoliert werden, bei Risikoschwangerschaften den Verzicht auf risikoreiche Fruchtwasseruntersuchungen der Mutter ermöglichen. Testverfahren für die Diagnose von Trisomie 21 und anderer Chromosomenanomalien sowie einer möglichen Unverträglichkeit der Blutgruppen befinden sich in vielen Ländern bereits in der praktischen Anwendung.

Die Anwendungsmöglichkeiten von Flüssigbiopsien reichen jedoch noch weiter. Da die Entnahme von Blut oder anderen Körperflüssigkeiten minimalinvasiv verläuft, können Flüssigbiopsien ohne eine große Belastung für den Patienten so häufig wie nötig wiederholt werden. Damit er-

öffnen Flüssigbiopsien etwa bei Krebspatienten prinzipiell eine Möglichkeit zum genauen **Monitoring des Behandlungs- und Krankheitsverlaufs** sowie zur therapeutischen Nachkontrolle zwecks Früherkennung möglicher Rückfälle. Hiervon dürften auch die wissenschaftliche Forschung und die Entwicklung neuer Therapien profitieren, denn durch Flüssigbiopsien werden praktisch in Echtzeit Einblicke in die Tumorbiologie und Veränderung des Gewebes – die zur Unverträglichkeit bestimmter Mittel führen kann – möglich.⁶ Ebenso versprechen sich Forscher von Exosomen neue Einblicke in Erkrankungen des Herz-Kreislaufs und des zentralen Nervensystems.

QIAGEN und Flüssigbiopsien

QIAGEN hat das umfassendste Portfolio von Lösungen für die Entwicklung von Technologien für Flüssigbiopsien in der klinischen Forschung und Diagnostik aufgebaut. Damit ist es das einzige Unternehmen, das sich mit allen Flüssigbiopsiemethoden beschäftigt: frei zirkulierende DNA, RNA, miRNA, zirkulierende Tumorzellen und Exosomen. Die Lösungen decken den gesamten Workflow von der Probenisolierung bis hin zur bioinformatischen Auswertung ab. QIAGEN engagiert sich in unterschiedlichen Projekten zur Weiterentwicklung existierender Technologien im Bereich der Flüssigbiopsien sowie zu ihrer Implementierung in der klinischen Forschung und Diagnostik:

- QIAGEN ist weltweit führend bei Technologien für die Extraktion und Isolation von Nukleinsäuren aus biologischen Proben. Mit einem Marktanteil von etwa 70 % gelten QIAGENS Probentechnologien als „Goldstandard“ für die Extraktion frei zirkulierender Nukleinsäuren, einschließlich DNA, RNA und miRNA, und bilden die Grundlage für zahlreiche Testverfahren. Ohne QIAGEN gäbe es die Technologie für Flüssigbiopsien nicht.
- QIAGEN bietet Arbeitsabläufe und automatisierte Lösungen zur Analyse durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Next-Generation-Sequencing (NGS). QIAGENS Technologie hat zudem mehr Berührungspunkte mit Flüssigbiopsie-Tests, molekularen Diagnostik- und laborentwickelten Tests als jedes andere Unternehmen. Das Flüssigbiopsie-Portfolio umfasst integrierte Workflows von der Probenvorbereitung über QIAamp Kits hin zur Bioinformatik.
- 2016 hat QIAGEN seinen Flüssigbiopsie-Workflow für die klinische Krebsforschung auf den Markt gebracht. Dieser Workflow nutzt das GeneReader NGS System. Das Actionable Insights Tumor Panel gehört zur wachsenden Familie der GeneRead QIAact Panels und ist die branchenweit erste Sample-to-Insight-NGS-Komplettlösung sowohl für nicht-invasive Flüssigbiopsien als auch FFPE-Gewebeproben. Das Panel, das auch für die NGS-Analyse von Blutplasma mit den QIAGEN-Probentechnologien für zirkulierende, zellfreie DNA (cfDNA) optimiert wurde, ermöglicht sowohl die Tumorcharakterisierung als auch das Monitoring von Resistenzmarkern als Ergänzung zu vorausgegangenen Gewebebiopsien.
- QIAGEN hat ein beachtliches Biomarker-Portfolio für Flüssigbiopsien aufgebaut. Zu diesen Biomarkern gehören das AdnaTest Prostate Cancer Panel AR-V7, das zur Erkennung der Androgenrezeptor-Spleißvariante 7 (AR-V7) aus Flüssigbiopsien dient, um eine Resistenz gegen potenzielle Medikamente bei fortgeschrittenem Prostatakrebs zu untersuchen. QIAGEN vermarktet außerdem das QIAseq® cfDNA All-in-One Kit für die Extraktion zellfreier DNA und Bibliotheksvorbereitung zur Analyse von Flüssigbiopsien auf jeder NGS-Plattform. Das neue Kit ist auf QIAGENS PAXgene® Blood ccfDNA Tube für die Entnahme und Stabilisierung von Blutproben abgestimmt.

- 2015 hat QIAGEN ein vollautomatisiertes Protokoll zur Isolierung freizirkulierender DNA aus menschlichem Plasma auf der QIASymphony Plattform für Forschungszwecke auf den Markt gebracht.
- Mit den jüngsten Erweiterungen von QIAGENS QIAseq NGS-Lösungen können in kurzer Zeit hochqualitative Datensätze zur Sequenzierung erstellt werden. Dies ist sogar mit sehr wenig Ausgangsmaterial möglich, was bei Flüssigbiopsien oft eine Herausforderung darstellt. In Verbindung mit spezifischen DNA- und RNA-Panels bietet QIAGEN vollständige Lösungen für spezifische und nicht-spezifische Sequenzierung an. QIAGENS REPLI-g Kits erlauben Wissenschaftlern ausgehend von einzelnen Zellen auf Basis von Next-Generation-Sequencing die Analyse des gesamten Genoms sowie Transkriptoms und ermöglichen damit wichtige Fortschritte bei der Arbeit mit zirkulierenden Tumorzellen.
- QIAGEN hat aktuell mehr Pharma-Partnerschaften zur Entwicklung und Einführung von auf Flüssigbiopsien basierenden begleitdiagnostischen Tests als jedes andere Unternehmen und ist kürzlich CANCER-ID beigetreten, einem öffentlich-privaten Konsortium, das sich die Entwicklung von Standardprotokollen und die klinische Validierung blutbasierter Biomarker bei Lungen- und Brustkrebs zum Ziel gesetzt hat. Das CANCER-ID Konsortium, das sich aus 36 Partnern aus 13 Ländern zusammensetzt, wird im Rahmen seiner Arbeit an der beschleunigten Entwicklung besserer und sichererer Medikamente für Patienten auch klinische Studien zu Flüssigbiopsiemethoden durchführen.
 - 2015 hat QIAGEN den weltweit ersten therapiebegleitenden Test für Lungenkrebs auf Basis von Flüssigbiopsien eingeführt– das CE-markierte therascreen EGFR RGQ Plasma PCR Kit. Der Test wurde gemeinsam mit AstraZeneca entwickelt und dient zur Steuerung von Behandlungsentscheidungen mit dem Lungenkrebsmedikament IRESSA. Der Test erleichtert die EGFR-Mutationsanalyse bei Patienten, bei denen eine herkömmliche, invasive Biopsie nicht durchführbar ist und hilft Ärzten dabei zu bestimmen, welche Patienten von IRESSA profitieren könnten.
- QIAGENS neuartige AdnaGen-Technologie dient zur Analyse zirkulierender Tumorzellen (CTCs) aus Blutproben.
- QIAGENS industrieführende Bioinformatiklösungen ermöglichen Wissenschaftlern und Klinikärzten von rohen Sequenzierungsdaten zu aussagekräftigen Erkenntnissen zu gelangen – und das innerhalb von Tagen oder Stunden im Vergleich zu Wochen oder Monaten. Damit erhalten Anwender Zugriff auf Komplettlösungen, die alle Arbeitsschritte von der Probe zur Erkenntnis abdecken, und optimal aufeinander abgestimmt sind.
- QIAGEN hat den RNA-seq Explorer eingeführt, der Bioinformatik mit Probentechnologien verknüpft und Erkenntnisse aus Flüssigbiopsien wie Exosomen für die Krebsforschung liefert. Der RNA-seq-Explorer arbeitet mit Ingenuity Pathway Analysis und Biomedical Genomics Workbench zur Analyse und Auswertung von „Omics“-Daten, um den veräuschten Daten aus der Sequenzierung von Körperflüssigkeiten einen Sinn zu geben,

¹ J Int Soc Prev Community Dent. 2014 Jan-Apr; 4(1): 5–11, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4015162/>

² National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3794814/>

³ Pinzani et al., Circulating nucleic acids in cancer and pregnancy, In: Methods 50 (2010) 302-307

⁴ New York Times, http://www.nytimes.com/2014/04/08/business/cancer-analysis-tools-circumvent-biopsies.html?_r=0

⁵ ZEIT Online, <http://www.zeit.de/2013/17/genests-krebs-heilchancen>

⁶ Cancer Research UK, <http://www.cancerresearchuk.org/about-us/cancer-news/news-report/liquid-lung-cancer-biopsies-will-speed-up-drug-resistance-research>