

Konsensus zur *ESR1*-Testung in ctDNA beim fortgeschrittenen und metastasierten Mammakarzinom

Einleitung

Am 27.5.2024 wurde auf Initiative der Firma STEMLINE ein Expertenpanel beauftragt, um mit der rezenten Zulassung von Elacestrant einhergehende Herausforderungen in der Diagnostik von Estrogenrezeptor 1 (*ESR1*)-Mutationen mittels ctDNA und formalinfixiertem (FFPE) Gewebe zu diskutieren. Die Resultate der Diskussion werden in diesem Dokument mitsamt anschließenden Fallbeispielen vermittelt.

Autoren: S. Jahn, A. Nader, G. Höfler, L. Müllauer, S. Petschnak, A. Oszwald

Zusammenfassung

- Die Sequenzierung von *ESR1* im Rahmen des metastasierten Mammakarzinoms erfolgt bevorzugt aus zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA, „Liquid Biopsy“), und nur ausnahmsweise aus Gewebe.
- Die Häufigkeit von *ESR1* Mutationen nimmt unter endokriner Therapie im Verlauf stark zu; daher sollte das Probenmaterial (Liquid Biopsy) unbedingt rezent und im klinisch gesicherten Progress nach Therapie entnommen werden. Bei eventueller Testung von FFPE-Gewebe ist eine Probe aus der rezenten, progredienten Tumoraläsion anzustreben.
- Die Testung (und ggf. Testwiederholungen) sollten nur bei unmittelbarer klinischer Konsequenz (Therapie) erfolgen.
- Eine Gewebeuntersuchung des Primärtumors ist nicht sinnvoll.
- Negative *ESR1*-Resultate aus Gewebe stellen ein positives *ESR1*-Resultat aus ctDNA nicht infrage. Ebenso stellen negative *ESR1*-Resultate aus ctDNA ein positives *ESR1*-Resultat aus FFPE-Gewebe nicht infrage. Es gilt immer das positive Testresultat.

Inhalte der Diskussion

Klinische Relevanz

Aktivierende (Liganden-unabhängige) *ESR1* Mutationen in Mammakarzinomen sind eine häufige Ursache für erworbene Therapieresistenz im Rahmen einer endokrinen Therapie¹ und in metastasierten Mammakarzinomen signifikant angereichert^{2-4,9}. Die Guidelines der ESMO und NCCN empfehlen bei progressiver metastasierter Erkrankung nach Erstlinientherapie eine molekulare Testung um die weitere Therapie festzulegen (u.a. *ESR1*, *PIK3CA*, *AKT1*, *PTEN*, *BRCA1/2*, *PALB2*)^{5,6}. Bei Vorliegen einer aktivierenden *ESR1* Mutation kann eine Therapie mit dem ER- α Antagonisten Elacestrant angeboten werden⁸.

Zeitpunkt der Untersuchung

Um einen möglichst hohen Informationswert des *ESR1* Mutationsnachweises sicherzustellen, sollte die Testung mittels ctDNA-Analyse im klinischen Progress erfolgen. Einerseits entstehen *ESR1* Mutationen häufig infolge einer vorangehenden endokrinen Therapie und werden im Krankheitsverlauf dadurch wesentlich häufiger detektiert⁹ (Abbildung 1). Andererseits wird

davon ausgegangen, dass die Tumorlast mit der Konzentration von ctDNA im Blut korreliert und bei progressiver Erkrankung eine höhere Abgabe von ctDNA in die Blutbahn zu erwarten ist¹⁰.

Das Auftreten einer *ESR1* Mutation geht dem klinisch sichtbaren Progress voraus, welcher somit prinzipiell anhand einer ctDNA Analyse vorzeitig detektiert werden könnte¹¹. Jedoch ist eine wiederholte Testung von ctDNA, oder eine Therapieänderung auf Basis eines Neuauftretens einer *ESR1* Mutation, abseits eines klinisch manifesten Progresses kein Standardvorgehen, sondern erst Gegenstand aktueller Studien¹². Eine *ESR1* Testung ohne unmittelbare therapeutische Konsequenz wird daher aus Kostengründen nicht empfohlen.

Testumfang

In der Zulassungsstudie für Elacestrant (EMERALD¹³) wurde der Test Guardant360® CDx verwendet (Guardant Health, CA, USA), der sämtliche Missense-Veränderungen der *ESR1* Ligandenbindungsdomäne detektiert (NM_001122742, Codons 310-547). Aufgrund der deutlichen Hotspot-Charakteristik der Mutationsverteilung in *ESR1* ist die Untersuchung dieser gesamten Region nicht zwingend erforderlich, jedoch wünschenswert. Es sollten zumindest die Veränderungen E380Q, L536H, L536P, Y537S, Y537N, Y537C, D538G untersucht werden. Strukturelle Varianten (u.a. Fusionen) und Amplifikationen von *ESR1* gelten nicht als Indikation für eine Therapie mit Elacestrant und müssen daher bei entsprechender Fragestellung nicht untersucht werden.

Die Untersuchung weiterer im metastasierten Mammakarzinom häufig mutierter und klinisch relevanter Gene (z.B. AKT1, PIK3CA, PTEN, BRCA1/2, PALB2) kann sinnvoll sein, wenn bisher keine andere molekulare Testung der Erkrankung erfolgt ist (siehe z. B. Empfehlungen der ESMO^{6,14}). Bei einem negativen Ergebnis der Testung von *ESR1* kann das Vorliegen von somatischen Veränderungen in anderen Genen oder eine errechnete Schätzung des ctDNA Gehalts die Beurteilung der Repräsentativität der Probe unterstützen. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht zur *ESR1* Analyse für eine Elacestrant Therapie erforderlich. Des Weiteren sollte darauf geachtet werden, potenzielle Keimbahnvarianten nicht irrtümlich als Beweis für die Erfassung von ctDNA in der Probe fehlzuinterpretieren.

Interpretation

Technisch valide Testresultate sollen an einem Institut für Pathologie hinsichtlich ihrer Pathogenität bzw. Onkogenität beurteilt und anhand eines fünfstufigen Systems (nach ACMG¹⁵ oder ClinGen/CGC/VICC¹⁶) klassifiziert werden (pathogen bzw. onkogen; wahrscheinlich pathogen bzw. wahrscheinlich onkogen; Varianten unklarer Signifikanz; vermutlich benigne; benigne).

Es muss davon ausgegangen werden, dass pathogene/onkogene und *wahrscheinlich* pathogene/onkogene Varianten eine idente Behandlungsindikation für Patienten bewirken. Varianten, die mit einem Funktionsverlust des *ESR1* Gens einhergehen (z.B. Nonsense-, Frameshift-, inaktivierende Splice-site Alterationen), sowie Fusionen und Amplifikationen von *ESR1* sind keine Indikationen für eine Therapie mit Elacestrant.

Varianten unklarer Signifikanz sowie wahrscheinlich benigne und benigne Veränderungen sollten nicht als Therapieindikation angesehen werden. Insbesondere ist in uneindeutigen Fällen eine Diskussion der Testresultate in einem interdisziplinären molekularen Tumorboard sinnvoll. Entsprechend der Empfehlung der AMP/ASCO/CAP sollten benigne und wahrscheinlich benigne Veränderungen nicht in der Diagnose angeführt werden¹⁷.

Stellenwert von ctDNA vs. Gewebe

Von den Zulassungsbehörden EMA und FDA wurde folgend der Zulassungsstudie (EMERALD^{8,13}) eine Testung von ctDNA im klinischen Progress als Grundlage für die Medikationsgabe gefordert. Die Untersuchung von Gewebeproben wird in den

entsprechenden Texten jedoch nicht diskutiert. Die Fachinformation des Präparats Orserdu® (Deutsche Version, Fachinformation, Anhang 1, 4.2²²) spezifiziert unter „Dosierung und Art der Anwendung“: „Patienten [...] sollten für eine Behandlung mit Orserdu® ausgewählt werden, wenn in den Plasmaproben eine aktivierende *ESR1* Mutation vorliegt [...]“. Aktuelle Empfehlungen von ASCO¹⁸, NCCN¹⁹, und AGO²⁰ zum metastasierten Mammakarzinom halten jedoch auch die Möglichkeit zur *ESR1* Testung aus Gewebe fest, wobei laut ASCO-Empfehlung **ctDNA das Material der ersten Wahl ist**. Dieser Meinung schließt sich das Panel an. Für Details zur diagnostischen Praxis siehe auch Fallbeispiele am Textende. Eine Gewebsuntersuchung anstelle einer ctDNA Analyse ist jedoch ausschließlich aus einer rezenten, d.h. **im Rahmen des aktuellen klinischen Progresses entnommenen Probe** (z.B. einer neu aufgetretenen Metastase) sinnvoll (s. Beispiel 5 unten). Für eine *ESR1* Analytik aus FFPE-Material **zusätzlich** zu einer bereits negativen *ESR1* ctDNA Analyse ist das rezenteste Material zu wählen, idealerweise wiederum aus dem aktuellen Progress (s.a. Beispiel 2,3 unten). Eine Untersuchung des Primärtumors ist hingegen in Anbetracht der Dynamik der *ESR1* Mutationen im Behandlungsverlauf **absolut ungeeignet**.

Eine Reversion einer *ESR1* Mutation zu einem *ESR1* Wildtyp im Krankheitsverlauf ist unwahrscheinlich; entsprechende Fälle oder Berichte sind dem Panel zum Zeitpunkt der Diskussion nicht bekannt. Daher ist nach Detektion einer pathogenen/onkogenen oder wahrscheinlich pathogenen/onkogenen *ESR1* Mutation in ctDNA **oder** im Gewebe (z.B. im Rahmen einer früheren Testung mittels Multigenpanels) eine erneute Untersuchung von *ESR1* nicht erforderlich. In diesem Kontext wäre das Risiko falsch-negativer bzw. nicht repräsentativer Resultate des ctDNA Tests höher als der Informationswert.

Im Fall einer negativen Untersuchung von ctDNA kann die Repräsentativität der Probe hinterfragt werden (aufgrund mangelnder Evidenz für die grundsätzliche Erfassung von TumordNA in der Probe). Eine weiterführende Gewebsuntersuchung (ggf. mit frischer Probenentnahme) kann jedoch nicht als Standardvorgehen empfohlen werden, da dies nicht dem Verfahren der Zulassungsstudie⁸ entspricht, und die Sensitivität der Untersuchung von ctDNA in diesem Kontext nach einer rezenten Metaanalyse²¹ (16 Studien, 2744 Proben) als zumindest gleichwertig einzustufen ist. Hier war die *ESR1* Mutationsrate aus ctDNA numerisch höher - 26% vs. 21% - der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Die rezente ASCO-Empfehlung zur *ESR1* Testung¹⁸ beurteilt die ctDNA hingegen als eindeutig sensitiver¹⁸ und als Material der ersten Wahl. Diese Einschätzung beruht insbesondere auf den Ergebnissen der prospektiven plasmaMATCH Studie²³ (siehe dort supplementary Figure S1). Hier zeigte sich in der Subgruppe mit paarweise vorhandenen Analysen von ctDNA und rezentem Gewebe (n=39, Gewebsentnahme maximal 60 Tage vor ctDNA Abnahme) kein einziger Fall mit zusätzlichem Informationsgewinn durch Gewebe, im Gegensatz zu ca. 20 % zusätzlichen *ESR1* Mutationen in ctDNA. Bei Einschluss auch älteren Materials in der Vergleichsanalyse (insgesamt n=77) vergrößerte sich der Vorteil der ctDNA Analytik weiter. Hier zeigte lediglich ein singulärer Fall zeigte ausschließlich in der Gewebsanalyse eine *ESR1* Mutation.

Allgemeine Argumente für die Untersuchung von ctDNA sind ein geringeres Risiko für PatientInnen im Rahmen der Probenentnahme, die Erfassung von ctDNA aus multiplen und heterogenen metastatischen Läsionen, sowie die Schonung eines oft spärlichen Biopsiematerials für exklusiv FFPE-basierte Analytik. Argumente für die Untersuchung von FFPE-Gewebe sind die relativ kosteneffiziente Analytik weiterer Targets im Rahmen eines Multigenpanels (evtl. mit Fusionen, TMB, MSI) für Therapietargets mitunter auch über die zugelassenen Standardtherapielinien hinaus), sowie ein histologisch verifizierter Tumorzellgehalt mit hierdurch gesicherter Repräsentativität der Analytik.

Testwiederholungen

Laut Empfehlung der ASCO¹⁸ kann Patientinnen – sofern bisher keine *ESR1* Mutation nachgewiesen wurde - bei jedem Progress eine erneute Testung angeboten werden. Ebenso kann bei uneindeutigen Testresultaten mit unmittelbarer klinischer Konsequenz (z. B. detektierte Veränderungen unterhalb der formalen Nachweisgrenze des Tests) eine

Testwiederholung empfohlen werden. Aus biologischer Sicht könnte ein niedrig-positives Testresultat unterhalb der Nachweisgrenze einen aufkommenden Tumorklon („emerging clone“) beschreiben. Aus technischer Sicht könnte es sich jedoch alternativ um ein Hintergrundsignal (d. h. ein falsch positives Resultat) handeln. Dieser Umstand muss klar im Befund dargestellt werden, um Fehlinterpretationen vorzubeugen. Formulierungsvorschlag: „Es wurde eine onkogene **Variante in ESR1 unterhalb der formalen Nachweisgrenze** detektiert. Dies geht mit einem höheren Risiko eines falsch positiven Resultats einher, könnte jedoch auch einen aufkommenden Tumorklon mit sehr geringer Allelfrequenz anzeigen. Das Ergebnis ist somit als hinweisend, **jedoch nicht beweisend für** das Vorliegen einer **aktivierenden ESR1 Variante** zu werten. Bei entsprechender klinischer Konsequenz wird eine Wiederholung der Untersuchung mit frischem Probenmaterial zu einem klinisch akkordierten Zeitpunkt empfohlen.“

Testwiederholungen ohne unmittelbare klinische Konsequenz werden hingegen selbst bei uneindeutigen Testresultaten nicht empfohlen. In solchen Fällen soll die Untersuchung nur unmittelbar vor einer klinischen Entscheidung wiederholt werden.

Dokumentation der Ergebnisse

Durch entsprechende Dokumentation soll sichergestellt werden, dass lokale Tumorboards eine präzise Zusammenfassung aller relevanten Befunde durch das lokale Institut für Pathologie erhalten. Es muss daher sichergestellt werden, dass Ergebnisse einer Untersuchung von ctDNA (insbesondere bei extern durchgeführten Untersuchungen) dem lokalen Institut für Pathologie zur Verfügung stehen.

Die Interpretation der ctDNA Untersuchung sollte in Zusammenschau mit vorangehenden histologischen Befunden erfolgen. Es ist notwendig, dass nachfolgende histologischen Untersuchungen in Zusammenschau aller bisherigen, molekularen Untersuchungen interpretiert werden können. Zu diesem Zweck empfiehlt sich bei externen Befunden eine zusammenfassende Interpretation im System der lokalen Pathologie. Diese Interpretation sollte grundsätzlich die aktuellen histologischen und molekularen Befunde mitberücksichtigen. Es wird empfohlen, externe Befunde in ursprünglicher Form zumindest als Anhang in den Befund zu übernehmen. Hierdurch wird der Verlust von kritischen Informationen vermieden.

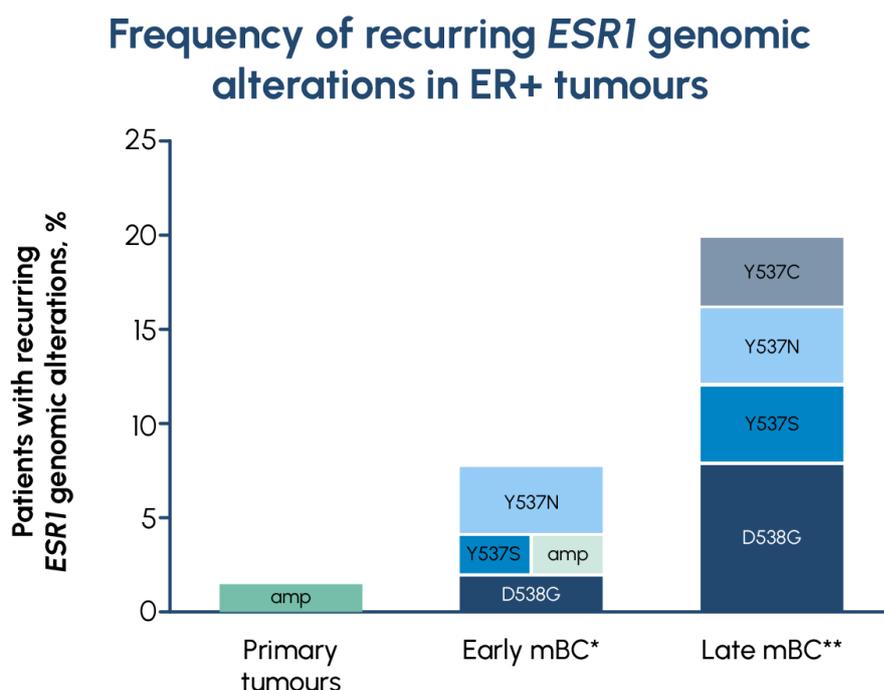


Abbildung 1: Zunahme der Häufigkeit von aktivierenden ESR1 Mutationen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom. Adaptiert aus Jeselsohn et al. ⁹

Fallbeispiele

Beispiel 1:

Situation: Es wurde eine technisch valide Untersuchung von *ESR1* in ctDNA durchgeführt und eine pathogene (aktivierende) *ESR1* Variante detektiert.

Frage: Ist eine zusätzliche Testung von Gewebe (aus rezenterem Progress oder vorher gewonnenem Material) erforderlich?

Antwort: Nein; eine Bestätigung aus Gewebe ist nicht informativ (da eine technisch valide *ESR1* Mutation in der ctDNA hierdurch nicht infrage gestellt werden sollte), daher ohne klinische Konsequenz und aus Kostengründen nicht empfohlen.

Beispiel 2:

Situation: Es wurde eine technisch valide Untersuchung von *ESR1* in ctDNA durchgeführt und keine Varianten/Mutationen im Befund berichtet.

Frage: Ist ein falsch-negatives Ergebnis aufgrund eines Tumors mit geringer Absonderung von DNA ins Blut („non-shedder“) möglich, bzw. ist die Untersuchung von ctDNA repräsentativ?

Antwort: Die Möglichkeit falsch-negativer Ergebnisse aufgrund unzureichender Repräsentativität ist eine immanente Herausforderung in der Untersuchung von ctDNA, sollte jedoch bei technisch valider Testung keine Änderung der Befundinterpretation bewirken. Eine zusätzliche Testung einer rezenteren Gewebeprobe ist nach klinischem Ermessen möglich, jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zusätzlich informativ und stellt somit kein Standardvorgehen dar.

Beispiel 3:

Situation: Es wurde eine technisch valide Untersuchung von *ESR1* in ctDNA durchgeführt und eine pathogene (aktivierende) *ESR1* Variante mit einer Allelfrequenz unterhalb der validierten Nachweisgrenze detektiert.

Frage: Sollte die Veränderung im Befund berichtet werden?

Antwort: Ja. Allerdings ist explizit auf ein Resultat unterhalb der definierten Nachweisgrenze hinzuweisen und klar zu kommunizieren, dass es sich **nicht** um einen validen Mutationsnachweis handelt („Hinweisend, jedoch nicht beweisend“, s. auch gesamter Formulierungsvorschlag unter „Testwiederholungen“ oben). Eine Kommentierung, *wie weit* unterhalb der Nachweisgrenze das erbrachte Resultat liegt, kann zur Orientierung für den/die KlinikerIn evtl. sinnvoll sein.

Frage: Sollte die Untersuchung aus ctDNA wiederholt werden, und gegebenenfalls wann?

Antwort: Bei uneindeutigen Testresultaten richtet sich das Vorgehen nach der klinischen Konsequenz bzw. Dringlichkeit, abhängig u. a. von zwischenzeitlichen, anderen Therapieoptionen (evtl. diesbezüglich Rücksprache mit der Klinik zu überlegen). Sollte es sich um einen aufkommenden Tumorklon handeln, ist die Wahrscheinlichkeit eines positiven ctDNA Nachweises zu einem späteren Zeitpunkt höher (sofern zwischenzeitlich keine effektive Therapie erfolgt). Eine ctDNA Re-testung im nächsten Progress wird häufig als geeigneter Zeitpunkt hierfür betrachtet. Begründung: Höherer ctDNA Gehalt und therapierelevanter Zeitpunkt.

Frage: Sollte die Untersuchung aus FFPE-Gewebe wiederholt werden?

Antwort: Dies ist nur bei unmittelbarer klinischer Konsequenz sinnvoll (s. Antwort zur ctDNA Testwiederholung oben). Insbesondere bei rezenterem FFPE-Material ist die Wahrscheinlichkeit eines zusätzlichen Informationsgewinnes aus Tumorgewebe höher einzuschätzen als bei

einer unmittelbaren Wiederholung aus ctDNA, da die Wahrscheinlichkeit für einen identen ctDNA Befund hoch ist. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit eines weiteren Informationsgewinns bei Vorliegen eines validen, negativen ctDNA-Resultats insgesamt sehr gering. Sollte eine Gewebsuntersuchung angestrebt werden, sollte unbedingt das rezenteste Material – idealerweise aus aktuellem Progress unter Therapie – verwendet werden (vorhandenes, extramurales Material mitbedenken). **Material aus der Primärläsion ist nicht zielführend.**

Beispiel 4:

Situation: Es liegt bereits aus einer technischen validen Gewebsuntersuchung ein Nachweis einer pathogenen (aktivierenden) *ESR1* Mutation vor.

Frage: Muss eine bestätigende Untersuchung von ctDNA durchgeführt werden?

Antwort: Nein; ein Verlust einer bereits angeeigneten *ESR1* Mutation ist sehr unwahrscheinlich (das Risiko einer falsch-negativen ctDNA Testung ist jedoch weiterhin relevant), daher ist kein Informationsgewinn zu erwarten und eine bestätigende Untersuchung nicht ökonomisch.

Anmerkung: In Österreich wurde zum Zeitpunkt der Diskussion (05/2024) noch nicht formal geklärt, ob obligat eine ctDNA-Untersuchung für eine Kostenübernahme von Elacestrant beim zuständigen Chefarzt/ärztin beigebracht werden muss. In Einzelfällen wurde von einer chefarztlichen Ablehnung bei *ESR1* Mutationsnachweis aus Tumorgewebe berichtet. Die vorliegenden Konsensusempfehlungen haben zum Ziel zu einem tumorbiologisch sinnvollen und ökonomischen Testvorgehen beizutragen. Es ist möglich, dass sich die Situation in Österreich an diesbezügliche Überlegungen aus Nachbarländern (z. B. Schweiz) orientieren wird, mit genereller, problemloser Kostenübernahme bei Testung von ctDNA wie auch FFPE. Eine denkbare Hilfestellung beim Ansuchen auf Kostenübernahme besteht in einer gegebenenfalls kontextabhängigen Kommentierung: Formulierungsvorschlag: „Diese Mutation wurde bei Patientinnen im Rahmen der Zulassungsstudie für Elacestrant (EMERALD, NCT03778931) beobachtet“.

Beispiel 5:

Situation: Es soll eine Untersuchung von *ESR1* durchgeführt werden. **Rezente entnommenes Gewebe aus dem aktuellen Progress** (z. B. Biopsie einer Lebermetastase) ist vorhanden; eine Blutabnahme ist ebenso möglich.

Frage: Sollte die Untersuchung von *ESR1* in ctDNA (Blut) oder in dem rezenten Gewebe erfolgen?

Antwort: Diese Situation wird an unterschiedlichen Zentren unterschiedlich gehandhabt, wobei in diesem Fall nach Ansicht des Expertenpanels sowohl ctDNA- als auch FFPE-Analytik vertretbar sind (s.o., „Stellenwert von ctDNA vs. Gewebe“; auf die deutlichen Vorteile der ctDNA in der plasmaMATCH Studie²³ sei nochmals hingewiesen). Bei entsprechenden Ressourcen kann im Falle eines negativen Ergebnisses aus ctDNA oder FFPE-Gewebe eine Zweitanalyse aus der jeweils anderen Probenart durchgeführt werden, wobei der Mehrwert einer Zweitanalyse im Allgemeinen sehr gering ist. Die Konkordanz der *ESR1* Detektionsraten zwischen ctDNA und Gewebeanalytik aus rezentem Progress ist im Allgemeinen hoch²¹; ein Nachweis einer *ESR1* Mutation in jeweils nur einer der beiden Probenarten ist aber prinzipiell möglich, entsprechende Ereignisse wurden im Einzelfall von Panelteilnehmern berichtet.

Referenzen:

1. Dustin, D., Gu, G. & Fuqua, S. A. W. ESR1 mutations in breast cancer. *Cancer* **125**, 3714–3728 (2019).
2. Lefebvre, C. *et al.* Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis. *PLOS Med.* **13**, e1002201 (2016).
3. Rinaldi, J. *et al.* The genomic landscape of metastatic breast cancer: Insights from 11,000 tumors. *PLOS ONE* **15**, e0231999 (2020).
4. Aftimos, P. *et al.* Genomic and Transcriptomic Analyses of Breast Cancer Primaries and Matched Metastases in AURORA, the Breast International Group (BIG) Molecular Screening Initiative. *Cancer Discov.* **11**, 2796–2811 (2021).
5. Gennari, A. *et al.* ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer☆. *Ann. Oncol.* **32**, 1475–1495 (2021).
6. ESMO Living Guidelines | ESMO. <https://www.esmo.org/living-guidelines/esmo-metastatic-breast-cancer-living-guideline>.
7. Orserdu | European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/orserdu>.
8. Bidard, F.-C. *et al.* Elacestrant (oral selective estrogen receptor degrader) Versus Standard Endocrine Therapy for Estrogen Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: Results From the Randomized Phase III EMERALD Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **40**, 3246–3256 (2022).
9. Jeselsohn, R. *et al.* Emergence of constitutively active estrogen receptor- α mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 1757–1767 (2014).
10. Dawson Sarah-Jane *et al.* Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1199–1209 (2013).
11. Fribbens, C. *et al.* Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **29**, 145–153 (2018).
12. UNICANCER. *Randomized, Open Label, Multicentric Phase III Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of Palbociclib in Combination With HT Driven by ctDNA ESR1 Mutation Monitoring in ER+, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer Patients.* <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03079011> (2023).
13. Stemline Therapeutics, Inc. *Elacestrant Monotherapy vs. Standard of Care for the Treatment of Patients With ER+/HER2- Advanced Breast Cancer Following CDK4/6 Inhibitor Therapy: A Phase 3 Randomized, Open-Label, Active-Controlled, Multicenter Trial.* <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03778931> (2024).
14. Pascual, J. *et al.* ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann. Oncol.* **33**, 750–768 (2022).
15. Richards, S. *et al.* Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **17**, 405–424 (2015).
16. Horak, P. *et al.* Standards for the Classification of Pathogenicity of Somatic Variants in Cancer (Oncogenicity): Joint Recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC). *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **24**, 986–998 (2022).
17. Li, M. M. *et al.* Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer. *J. Mol. Diagn. JMD* **19**, 4–23 (2017).
18. Burstein, H. J., DeMichele, A., Somerfield, M. R., Henry, N. L., & Biomarker Testing and Endocrine and Targeted Therapy in Metastatic Breast Cancer Expert Panels. Testing for ESR1 Mutations to Guide Therapy for Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Metastatic Breast Cancer: ASCO Guideline Rapid Recommendation Update. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **41**, 3423–3425 (2023).
19. NCCN Guidelines Version 2.2024, Invasive Breast Cancer. *NCCN* <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1419>.
20. Kommission Mamma | Leitlinien & Empfehlungen | Leitlinien & Stellungnahmen | AGO - Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie. <https://www.ago-online.de/leitlinien-empfehlungen/leitlinien-empfehlungen/kommission-mamma>; : abgerufen 29.08.2024: AGO_2024D_04_Pathologie.pdf
21. Najim, O., Papadimitriou, K., Broeckx, G., Huizing, M. & Tjalma, W. Validation of liquid biopsy for ESR1-mutation analysis in hormone-sensitive breast cancer: a pooled meta-analysis. *Front. Oncol.* **13**, (2023).
22. ORSERDU Fachinformation A+DE , Stand 05/2024
23. Turner, N. C. *et al.* Circulating tumour DNA analysis to direct therapy in advanced breast cancer (plasmaMATCH): a multicentre, multicohort, phase 2a, platform trial. *Lancet Oncol.* **21**, 1296–1308 (2020).

