

University of Science and Technology of Hanoi
Doctoral School



**Identifying *PIK3CA*, *ESR1* mutations and their relationship with
clinical outcome of breast cancer**

Dinh Thi Thao

Pharmacological, Medical and Agronomical Biotechnology

The thesis has been successfully defended in April 2025 in front of jury composed of:

Assoc. Prof. Nguyen Hai Dang, USTH, Jury chairman

Prof. Nong Van Hai, Institute of Genome Research, VAST, Reviewer

Assoc. Prof. Bui Khac Cuong, 103 Military Hospital, Reviewer

Assoc. Prof. Nguyen Thuy Duong, Institute of Genome Research, VAST, Member

Dr. Nguyen Thi Ngoc, USTH, Member, Secretary

Hanoi, April 25th 2025

KEYWORDS

Asymmetric PCR

Breast cancer

Cell-free DNA

Circulating tumor DNA

ESR1 mutations

Endocrine therapy resistance

PIK3CA mutations

Liquid biopsies

Abstract

Endocrine-based therapies are recommended as standard treatment for 70% hormone receptor positive (HR-positive) tumors in breast cancer (BC), the most malignant disease that specifically affects women. De novo resistance, which occurs in about 30% of HR-positive BC, and acquired resistance, which develops over time in most tumors that initially respond to treatment, are major obstacles to controlling the growth and metastasis of BC, which can result in metastasis, recurrence, or even death. Through *PIK3CA* gene mutations, the PI3K pathway becomes activated, stimulating the proliferation of cancer cells, their invasion of human organs, and the development of resistance to treatment. Moreover, the endocrine resistance caused by ligand-independent estrogen receptor activity could be increased by producing more mutant clones as a result of mutations in the estrogen receptor gene (*ESR1*). Therefore, screening for *PIK3CA* or *ESR1* mutations in plasma (so-called circulating cell-free DNA, cfDNA) is mandatorily recommended when considering HR-positive/HER2-negative advanced/metastatic BC patient candidates for mutant related target therapy, as alpelisib/capivasertib/inavolisib or elacestrant, respectively.

PIK3CA, which encodes the p110 α catalytic subunit of PI3K, is one of the most commonly mutated oncogenes in breast cancer (30-50% of cases). Nearly 80% of *PIK3CA* mutations occur at positions E545K in exon 9 and H1047R in exon 20, which activate PI3K signaling. The occurrence of these mutations has been associated to hormone receptor-positive (HR+) BC, which has major implications for patient prognosis and therapy response assessment.

ESR1 mutations evolve in the ligand-binding domain (LBD) of the endocytic receptor alpha that cause constitutive activity of the receptor independent of its LBD, resistance to various endocrine therapies (particularly aromatase inhibitor-AI), disease progression, or relapse. *ESR1* gene alterations occur in 20-40% of metastatic patients who have previously been treated with AI; the prevalence varies depending on the site of metastasis. Activating mutations in the *ESR1* gene are most common in the hotspot area containing amino acids 536-

538 in LBD, with a lower proportion occurring at other positions, including E380, V422, S463, and L469.

The majority of cfDNA approaches are currently showing promise. Here, we report an ultra-sensitive asymmetric PCR method based on adjusting the mutant-specific primer along with using wild-type clamping to get such a sensitive detection limit of 0.01%–0.1% for detection of *PIK3CA* and *ESR1* hotspot mutations. Compared with the most widely used PCR-based methods, our results showed that *PIK3CA* and *ESR1* hotspot mutations were effectively and reliably detected.

To identify the clinical feasibility of the established PCR assays, we applied our techniques using plasma samples from 196 breast cancer patients, and healthy female controls ($n = 20$). We identified 42.9% of all recruited BC cases carrying blood-circulating *PIK3CA* hotspot mutations, 16.7% HR-positive early BC and 59.8% HR-positive advanced BC patients with at least one *ESR1* mutant variants. Among the HR-positive early breast cancer (EBC) patients, 19 out of 66 had a *PIK3CA* gene mutation, 5 out of 66 had an *ESR1* gene mutation, and 6 out of 66 had both mutations. Of the 82 HR-positive advanced breast cancer (ABC) patients, 17 cases had a *PIK3CA* mutation, 21 cases had an *ESR1* mutation, and 28 had both gene mutations.

We also discovered that *ESR1* and *PIK3CA* mutations are significant contributors to the poor prognosis of BC. *PIK3CA* mutations have been identified to be significantly frequent in metastatic breast cancer (MBC) patients with multiple metastatic sites, especially those with lung invasion, brain metastases, or bone disease ($p < 0.05$). Fulvestrant-treated HR-positive ABC and radiation-treated BC patients had significantly greater rates of *PIK3CA* mutations. *PIK3CA* E545K was more prevalent in MBC with lung or bone metastasized BC or radio-received HR-positive BC, while the *PIK3CA* H1047R mutation was more frequently seen in brain-metastasized BC or radio-received HER2-positive BC ($p < 0.05$). *PIK3CA* E545K-mutant BC patients exhibited significantly shorter progression-free survival (PFS) compared to *PIK3CA* E545K-wild-type carriers ($p < 0.05$), indicating that the *PIK3CA* E545K mutation may be a poor predictor of

MBC. Our study demonstrated that ABC/MBC patients typically had *ESR1* mutations, which were associated with a shorter PFS. Patients with HR-positive MBC may have poor outcomes if they have *ESR1* mutations. Radiation-treated EBC patients were more likely to have *PIK3CA* and/or *ESR1* gene mutations. Furthermore, gene alterations were frequently detected in ABC patients who had recurrence, many metastatic locations, or lung metastasis. MBC patients who have mutations in both the *PIK3CA* and *ESR1* genes appear to have a shorter PFS than patients who have mutations in only one gene or none of them. The independent predictive effect of *PIK3CA* and *ESR1* mutations in breast cancer should be verified in larger patient populations through randomized prospective clinical studies.

In this thesis, Chapter I provides an overview of breast cancer treatment, mechanism of endocrine therapy resistance in breast cancer, *PIK3CA* mutations and its role in breast cancer, *ESR1* mutations and its role in breast cancer, liquid biopsies, circulating cell-free DNA, preanalytical variables affecting cell-free DNA analysis, and technologies for DNA mutation detection in liquid biopsies. In Chapter II, a blocker-mediated asymmetric PCR assay integrated with an allele-specific (AS) primer was established to identify the *PIK3CA* mutations (H1047R and E545K). Our newly optimized method was used to investigate the *PIK3CA* point mutations (H1047R and E545K) from BC patients' peripheral blood samples and the relationship between *PIK3CA* mutant occurrence and BC patients' characteristics. In Chapter III, wild-type-blocking-mediated ARMS PCR assays were optimized to detect plasma-circulating *ESR1* hotspot mutations. The novel assays were performed to evaluate the *ESR1* point mutations in codons 537, 538, and 380 from HR-positive BC patients' plasma and nexus of the *ESR1* mutations with these patients' characteristics.

Tóm tắt

Ung thư vú (UTV) là căn bệnh ác tính phổ biến hàng đầu ở nữ giới. Khoảng 70% các khối u vú dương tính với thụ thể nội tiết (HR dương tính), do đó liệu pháp nội tiết là phác đồ điều trị hiệu quả nhất với nhóm bệnh nhân này. Có khoảng 30% trường hợp xuất hiện kháng nội tiết dẫn đến tái phát, tiến triển bệnh, di căn và tử vong. Thông qua đột biến gen *PIK3CA*, con đường tín hiệu PI3K được kích hoạt, xuất hiện tình trạng kháng thuốc và kích thích sự tăng sinh, xâm lấn của tế bào ung thư vào các cơ quan. Bên cạnh đó, đột biến gen thụ thể nội tiết 1 (*ESR1*) dẫn đến tăng hoạt động của thụ thể estrogen độc lập với phối tử bằng cách tạo ra nhiều dòng vô tính đột biến gây ra đề kháng nội tiết. Do đó, việc sàng lọc đột biến gen *PIK3CA* và *ESR1* trong huyết tương (còn gọi là ADN không tế bào tuần hoàn, cfDNA) được khuyến nghị là bắt buộc khi xem xét lựa chọn thuốc điều trị đích alpelisib/capivasertib/inavolisib hoặc elacestrant cho bệnh nhân UTV tiến triển/di căn có khối u HR dương tính/HER2 âm tính.

PIK3CA, gen mã hóa tiểu đơn vị xúc tác p110 α của phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), là một trong những gen gây ung thư bị đột biến phổ biến nhất trong UTV (30 – 50% các trường hợp). Gần 80% đột biến gen *PIK3CA* xảy ra tại vị trí *PIK3CA* E545K ở exon 9 và *PIK3CA* H1047R ở exon 20, dẫn đến kích hoạt tín hiệu PI3K. Sự hiện diện của các đột biến này có liên quan đến UTV dương tính với thụ thể nội tiết (HR+) và có ý nghĩa quan trọng đối với tiên lượng bệnh nhân và đánh giá đáp ứng điều trị.

Đột biến gen *ESR1* là các đột biến mắc phải trong miền liên kết phối tử (ligand-binding domain, LBD) của thụ thể nội tiết alpha, dẫn đến hoạt động cấu thành của thụ thể nội tiết không phụ thuộc phối tử của nó, gây ra tình trạng kháng các liệu pháp nội tiết khác nhau (đặc biệt là kháng thuốc ức chế aromatase-AI), tiến triển hoặc tái phát bệnh. Đột biến gen *ESR1* phát sinh ở 20–40% bệnh nhân di căn được điều trị AI trước đó, tỷ lệ này khác nhau tùy thuộc vị trí di căn. Kích hoạt đột biến gen *ESR1* thường xảy ra nhiều nhất ở vùng điểm nóng bao gồm các axit amin 536–538 trong miền LBD, với số lượng nhỏ hơn xảy ra ở E380, V422, S463 và L469.

Các phương pháp phân tích cfDNA hiện nay mang lại nhiều hứa hẹn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát triển một phương pháp PCR bất đối xứng siêu nhạy dựa

trên việc sử dụng mỗi đặc hiệu với trình tự đột biến phối hợp với đoạn nucleotit kẹp đặc hiệu với trình tự gen kiểm đại, làm tăng khả năng phát hiện đến 0,01%-0,1% đột biến điểm nóng trên 2 gen *PIK3CA* và *ESR1*. So sánh với các phương pháp dựa trên nguyên lý PCR đang được sử dụng hiện nay, kết quả của chúng tôi cho thấy phương pháp mới có thể phát hiện các đột biến điểm nóng gen *PIK3CA* và *ESR1* một cách hiệu quả và đáng tin cậy.

Để xác định tính khả thi của xét nghiệm PCR bất đối xứng mới phát triển khi áp dụng vào thực tiễn lâm sàng, chúng tôi thực hiện trên 196 mẫu huyết tương của bệnh nhân ung thư vú và đối chứng từ 20 mẫu máu của phụ nữ khỏe mạnh. Chúng tôi xác định có 42,9% bệnh nhân ung thư vú có ít nhất 1 đột biến điểm nóng trên gen *PIK3CA*, 16,7% bệnh nhân ung thư vú HR dương tính giai đoạn sớm và 59,8% bệnh nhân ung thư vú HR dương tính giai đoạn tiến triển có ít nhất một đột biến điểm nóng trên gen *ESR1*. Phân tích trong nhóm 66 bệnh nhân ung thư vú HR dương tính giai đoạn sớm: 19 bệnh nhân có đột biến gen *PIK3CA* gene, 5 bệnh nhân có đột biến gen *ESR1*, và 6 trường hợp có đột biến trên cả 2 gen. Phân tích trong nhóm 82 bệnh nhân ung thư vú HR dương tính giai đoạn tiến triển: 17 bệnh nhân có đột biến gen *PIK3CA*, 21 bệnh nhân có đột biến gen *ESR1*, và 28 trường hợp có đột biến trên cả 2 gen.

Chúng tôi cũng thấy rằng đột biến *ESR1* và *PIK3CA* là những yếu tố góp phần đáng kể đến tiên lượng bất lợi của bệnh nhân ung thư vú. Đột biến gen *PIK3CA* được thường xuyên xảy ra ở những bệnh nhân ung thư vú di căn nhiều cơ quan, đặc biệt các bệnh nhân có di căn phổi, não, xương ($p < 0,05$). Tỷ lệ đột biến gen *PIK3CA* cao hơn đáng kể ở những bệnh nhân tiến triển đã điều trị bằng fulvestrant hoặc xạ trị. Đột biến *PIK3CA* E545K phổ biến hơn ở bệnh nhân ung thư vú di căn phổi hoặc xương, bệnh nhân HR dương tính điều trị bằng tia xạ. Trong khi đó, đột biến *PIK3CA* H1047R xuất hiện thường xuyên hơn trong máu các bệnh nhân di căn não, bệnh nhân có HER2 dương tính điều trị bằng tia xạ ($p < 0,05$). Những bệnh nhân mang đột biến *PIK3CA* E545K có thời gian sống không tiến triển (PFS) ngắn hơn so với nhóm không có đột biến *PIK3CA* E545K ($p < 0,05$), cho thấy đột biến *PIK3CA* E545K có thể là một yếu tố dự báo tiên lượng kém cho bệnh nhân ung thư vú di căn. Nghiên cứu của chúng tôi đã chứng minh

rằng bệnh nhân ung thư vú tiến triển/di căn thường có đột biến gen *ESR1*, và có thời gian PFS ngắn hơn bệnh nhân không có đột biến *ESR1*. Bệnh nhân ung thư vú giai đoạn sớm trước đó điều trị bằng tia xạ có nhiều khả năng mang đột biến gen *PIK3CA* và/hoặc *ESR1*. Hơn nữa, sự biến đổi gen thường quan sát thấy ở những bệnh nhân ung thư vú tiến triển có tái phát, di căn nhiều vị trí hoặc có di căn phổi. Những bệnh nhân di căn có đột biến trên cả 2 gen *PIK3CA* và *ESR1* có PFS ngắn hơn so với các trường hợp chỉ có đột biến trên 1 gen hoặc so với bệnh nhân không có bất cứ đột biến gen nào trên 2 gen đó. Vai trò tiên lượng độc lập của đột biến hai gen *PIK3CA* và *ESR1* trong ung thư vú cần được xác minh thêm trong những nghiên cứu theo dõi dọc với cỡ mẫu lớn hơn.

Trong luận án này, chương I trình bày tổng quan về điều trị ung thư vú, cơ chế kháng nội tiết trong ung thư vú, đột biến *PIK3CA* và vai trò trong ung thư vú, đột biến *ESR1* và vai trò trong ung thư vú, sinh thiết lỏng, ADN không tế bào tuần hoàn, các biến số ảnh hưởng trong giai đoạn tiền phân tích ADN không tế bào tuần hoàn, và các công nghệ phát hiện đột biến ADN trong sinh thiết lỏng. Trong chương II, phối hợp đoạn nucleotit kẹp phân tử kết hợp với mỗi đặc hiệu đã thiết lập xét nghiệm PCR bất đối xứng để xác định đột biến điểm gen *PIK3CA* (H1047R và E545K). Phương pháp mới được sử dụng để xác định đột biến gen *PIK3CA* (H1047R và E545K) từ máu ngoại vi bệnh nhân UTV và mối liên quan giữa đột biến gen với đặc điểm bệnh nhân UTV. Trong chương III, xét nghiệm ARMS PCR sử dụng đoạn oligo chặn trình tự kiểu đại được tối ưu để phát hiện đột biến “điểm nóng” gen *ESR1* trong huyết tương. Các xét nghiệm mới được tiến hành để đánh giá sự xuất hiện của đột biến gen *ESR1* tại các vị trí 537, 538, và 380 từ huyết tương bệnh nhân UTV dương tính với thụ thể nội tiết và tìm hiểu mối liên quan giữa đột biến gen *ESR1* và đặc điểm của nhóm bệnh nhân này.