



Position Paper: “Test di analisi dei profili di espressione genica nel carcinoma della mammella”

A cura del Gruppo di Lavoro AIOM – SIAPEC-IAP – SIBIOC – SIF

Giordano Beretta, Massimo Barberis, Ettore Capoluongo, Isabella Castellano, Saverio Cinieri, Laura Cortesi, Romano Danesi, Lucia Del Mastro, Marzia Del Re, Serena Di Cosimo, Stefania Gori, Lorena Incorvaia, Nicla La Verde, Giuseppe Perrone, Nicola Silvestris, Pierosandro Tagliaferri, Antonio Russo

Luglio 2020



Società Italiana di Anatomia Patologica
e Citologia Diagnostica - Divisione Italiana
della International Academy of Pathology



SOCIETÀ ITALIANA
DI FARMACOLOGIA



1. Introduzione

Nelle pazienti operate di carcinoma mammario, il trattamento sistemico adiuvante deve essere preso in considerazione in funzione della significativa riduzione del rischio di recidiva e di morte ottenuta con la poli-chemioterapia, con la terapia endocrina e con la terapia biologica, in seguito a una attenta valutazione di precisi fattori prognostici, fattori predittivi di risposta a specifici trattamenti, benefici assoluti attesi e, non ultime, comorbidità e preferenza delle pazienti. Mentre per i carcinomi HER2-positivi e triplo-negativi la chemioterapia è spesso indispensabile e il beneficio è evidente, nei carcinomi con recettori ormonali positivi (ER e/o PgR positivi) e HER2-negativo il beneficio dell'aggiunta della chemioterapia alla terapia endocrina adiuvante è controverso nelle pazienti non ad alto rischio di ripresa.

Per definire con maggiore precisione la prognosi e selezionare il miglior trattamento per la singola paziente sono stati elaborati test di analisi dei profili di espressione genica ed alcuni di questi test sono già in uso in alcuni Paesi. Sono oggi disponibili in commercio principalmente cinque test di analisi dei profili di espressione genica nel carcinoma mammario: Prosigna (PAM-50), Mammaprint, Oncotype DX, Breast Cancer Index ed Endopredict. Tutti sono eseguibili a partire da tessuto paraffinato. Nonostante la robusta valutazione retrospettiva, dati di validazione su base prospettica sono disponibili solo per due di questi classificatori, Oncotype DX e Mammaprint. Nonostante i test multigenici possano rappresentare in alcune situazioni cliniche un'opportunità importante nella scelta del trattamento ottimale, per l'introduzione nella pratica clinica occorre una regolamentazione che ne governi l'esecuzione, la qualità, l'applicazione e la sostenibilità.

2. Definizione di Test di espressione genica

Il profilo di espressione genica è un processo in cui i geni espressi in una cellula o in un tessuto possono essere misurati in un momento specifico. Questa metodologia calcola simultaneamente i livelli di trascritti (mRNA) di migliaia di geni che definiscono il profilo di espressione dei geni della cellula. Pertanto, attraverso il profilo di espressione genica possono essere scoperte le funzioni di una cellula in un determinato momento e ciò può essere applicato nelle cellule tumorali. Lo sviluppo di una neoplasia può essere determinato da mutazioni con acquisizione di funzione nei proto-oncogeni (con effetto dominante dovuto a sovra-espressione o a mutazioni attivanti) insieme alla perdita (o alla sotto-espressione) di geni soppressori del tumore che portano a una divisione cellulare incontrollata. Utilizzando quindi il profilo di espressione genica si può studiare la differenza tra cellule normali e cellule metastatiche per determinare l'origine genetica di percorsi deregolati che sono una caratteristica del cancro e fornire potenziali bersagli per il trattamento. Oltre al trattamento, questa analisi di espressione genica serve ad identificare nuovi biomarcatori e firme genomiche.

I profili di espressione genica possono essere ottenuti attraverso vari tipi di analisi tra cui le più diffuse sono:

- a) DNA Microarrays
- b) RNA-seq

c) qPCR

Ognuna di queste tecniche ha specifiche peculiarità, ma tutte partono da due tappe fondamentali: a) l'estrazione di RNA totale dal materiale biologico di interesse; b) la conversione di RNA in complementary DNA (cDNA), ovvero la molecola di DNA a filamento singolo che viene prodotta sullo stampo di RNA a opera dell'enzima trascrittasi inversa. La creazione di una libreria di cDNA è un passo fondamentale nel profilo di 'espressione genica.

Lo sviluppo di High-Throughput Next Generation Sequencing (sequenziamento di nuova generazione -NGS- ad alto rendimento) ha rivoluzionato il profilo dell'espressione genica. NGS offre la capacità di sequenziare gli acidi ribonucleici attraverso il sequenziamento del cDNA (RNA-seq) in modalità alto rendimento. Al termine dell'analisi, il livello di espressione di ciascun gene viene stimato contando il numero di letture che si allineano a ciascuna trascrizione integrale dello specifico RNA (cDNA).

La tecnica di qPCR è utilizzata per quantificare l'espressione genica: in tal modo, uno specifico target o biomarcatore può essere valutato sia in fase diagnostica o in seguito, durante il follow-up, per verificare l'efficacia della terapia.

I test che profilano l'espressione genica analizzano una serie di geni diversi all'interno delle cellule tumorali per prevedere il rischio di recidiva del tumore.

I risultati aiutano gli specialisti, in particolare gli oncologi, a valutare nelle donne con carcinoma mammario operato, in fase iniziale, con recettori ormonali positivi e HER2-negativo, la prognosi e la probabilità di trarre beneficio dall'aggiunta della chemioterapia adiuvante all'ormonoterapia.

3. Tipologie di test e studi di validazione:


3.1. Oncotype DX

Oncotype DX è uno dei primi test genomici messi a punto per valutare il profilo molecolare del carcinoma mammario ER-positivo e HER2-negativo.

Il test Oncotype DX analizza, mediante qRT-PCR, l'espressione di 21 geni su tessuto paraffinato. Di questi 21 geni, 16 sono correlati al carcinoma mammario (inclusi quelli coinvolti nella segnalazione e proliferazione degli estrogeni) e 5 sono geni di controllo. Tale test classifica i tumori con recettori ormonali positivi ed HER2-negativo in base ad un "recurrence score" (RS) che varia da 0 a 100. Oncotype DX è stato testato in diversi studi retrospettivi, ma i risultati definitivi dello studio prospettico di validazione clinica TAILORx [Trial Assigning Individualized Options for Treatment (Rx)], sono stati solo recentemente pubblicati e discussi.

3.1.1. Tipologia di popolazione

Oncotype DX è stato sviluppato per identificare le pazienti che hanno una prognosi talmente buona da poter evitare la chemioterapia e prevedere i reali benefici della chemioterapia adiuvante in aggiunta alla terapia endocrina. Rispetto al primo punto, lo score RS ottenuto mediante Oncotype DX ha un significato *prognostico* perché permette di identificare le pazienti che trattate con la sola terapia



endocrina si mantengono libere da recidiva a distanza di 10 anni dalla diagnosi. Rispetto al secondo punto, il test Oncotype DX, abbinato ai fattori di rischio clinico, sarebbe in grado di individuare le pazienti con rischio clinico più elevato che potrebbero trarre beneficio dalla chemioterapia, quest'ultimo dato sul significativo *predittivo* del test proviene da analisi secondarie non programmate che necessitano di ulteriori conferme.

Inizialmente, nello studio ancestrale retrospettivo di Oncotype DX, il RS suddivideva le pazienti in tre gruppi:

- Rischio Basso (RS 0-17);
- Rischio Intermedio (RS 18-30);
- Rischio Alto (RS 31-100).

In particolare, il RS = 31 identificava le pazienti con carcinoma della mammella ER/PgR positivi HER2-negativi e senza metastasi linfonodali, che beneficiavano della chemioterapia adiuvante in aggiunta alla terapia endocrina, mentre il RS <18 quelle con il beneficio minimo (NSABP B-14 e B-20 trials).

Nel più recente studio prospettico TAILORx, le pazienti sono state classificate come segue:

- Rischio Basso (RS 0-10);
- Rischio Intermedio (RS 11-25);
- Rischio Alto (RS 26-100).

D'accordo ai risultati dello studio TAILORx, la Società Americana di Oncologia Clinica (ASCO) ha stabilito le seguenti raccomandazioni con i corrispondenti livelli di evidenza.

Per le pazienti con rischio intermedio (RS 11-25) una raccomandazione di livello "forte" (ASCO 2019) è stata data al trattamento con sola terapia endocrina per:

- pazienti con età superiore ai 50 anni e RS<26
- pazienti con età inferiore o uguale a 50 anni e RS<16

e per un trattamento con terapia endocrina e chemioterapia per le pazienti con RS>30.

Una raccomandazione di livello "moderato" è stata data, invece, nel considerare il trattamento con terapia endocrina e chemioterapia per:


- pazienti con età inferiore o uguale a 50 anni con RS 16-25;
- pazienti con RS 26-30.

Un'analisi secondaria dello studio TAILORx ha dimostrato che le pazienti con età inferiore o uguale a 50 anni e RS compreso tra 16 e 25 traggono vantaggio dalla chemioterapia nella riduzione del rischio di recidiva/morte indipendentemente dal rischio clinico.

L'utilizzo del test non è raccomandabile nei tumori HER2-positivi o triplo-negativi (TNBC).

3.1.2. Studi clinici

L'Oncotype DX è stato valutato per la prima volta nel 2004 retrospettivamente su pazienti con carcinoma mammario ormonoresponsivo, con linfonodi negativi, trattati con tamoxifene adiuvante nell'ambito dello studio NSABP-B14. Su 668 blocchetti relativi a 675 pazienti dello studio, è stata condotta una RT-PCR dei 21 geni dell'Oncotype DX e sulla base della loro espressione è stato



calcolato il rischio di recidiva (RS) e le pazienti sono state classificate in rischio basso, intermedio e alto.


Il primo obiettivo è stato quello di verificare se la proporzione di pazienti liberi da recidive a distanza a 10 anni fosse maggiore nel gruppo a basso rischio rispetto a quello ad alto rischio. Il secondo obiettivo era definire se ci fosse una relazione statisticamente significativa tra lo score definito dall'Oncotype DX e il rischio di recidiva a distanza.

Le recidive a distanza a 10 anni, erano nel basso, intermedio e alto rischio, pari al 6,8%, 14,3 % e 30,5 %, rispettivamente ($p < 0,001$ tra basso e alto rischio). Inoltre il RS, in analisi multivariata, risultava avere un valore indipendente predittivo di recidiva a distanza rispetto all'età del paziente e alla dimensione del tumore¹.

Il successivo studio ha esplorato l'interazione tra Oncotype DX e chemioterapia relativamente a 651 pazienti con tumore ormono-responsivo e linfonodi negativi, arruolati nello studio NSABP-B20, per testare la validità del CMF o MF in aggiunta alla terapia per 5 anni con tamoxifene rispetto al solo tamoxifene, nei pazienti. Lo studio si prefiggeva di valutare il beneficio della chemioterapia in termini di Distant-DFS (DDFS). Sulla base del RS, sono state considerate le curve di DDFS. Il test d'interazione tra chemioterapia e RS è risultato statisticamente significativo ($p = 0,038$): le pazienti con alto RS (≥ 31) avevano un grande vantaggio dall'aggiunta della chemioterapia (RR, 0,26; 95% CI, 0,13 to 0,53; riduzione assoluta del rischio di recidiva a distanza a 10 anni del 27,6%). Le pazienti con rischio intermedio non avevano un vantaggio significativo, mentre quelle a basso rischio sembravano trarre uno svantaggio dall'aggiunta della chemioterapia².

Uno studio analogo, ma condotto nel setting di pazienti sottoposti a chemioterapia neo-adiuvante, ha valutato se la risposta al trattamento fosse correlata all'Oncotype DX. Su 89 pazienti trattate con antracicline e taxani, 11 ottenevano una pCR. Il RS era positivamente associato alla probabilità di risposta completa patologica ($p = 0,005$), suggerendo che le pazienti a maggior rischio di recidiva ($RS > 30$) traggono il maggior vantaggio dalla chemioterapia. Pazienti con $RS < 18$ raramente hanno ottenuto una pCR³.

Lo studio di fase III S8814, condotto su donne in post-menopausa con carcinoma mammario con recettori ormonali positivi e linfonodi positivi ha dimostrato un vantaggio del regime CAF associato alla terapia ormonale con tamoxifene rispetto alla sola terapia ormonale. Sul tessuto tumorale è stato valutato il valore del RS sulla DFS per i due gruppi di trattamento, aggiustando la regressione di Cox per numero di linfonodi. Nel gruppo di pazienti trattate con sola ormonoterapia il RS era prognostico: la DFS a 10 anni era pari al 60%, 49% e 43% per le categorie $RS < 18$, $RS 18-30$, $RS > 30$, rispettivamente ($p = 0,017$). Anche per l'OS è stata dimostrata una correlazione significativa con i gruppi di rischio ($p = 0,003$). Non è stato invece evidenziato alcun vantaggio dall'aggiunta della chemioterapia nel basso rischio ($p = 0,97$; HR=1,02, 95% CI 0,54, 1,93), ma è stato dimostrato un miglioramento della DFS a 10 anni ($p = 0,03$; HR=0.59, 95% CI 0,35, 1,01) e dell'OS ($p = 0,027$) per il gruppo ad alto rischio aggiustato per numero di linfonodi. Per il gruppo a rischio intermedio non si evidenziava alcun vantaggio dall'aggiunta della chemioterapia adiuvante⁴.



Lo studio prospettico TAILORx, rivolto a pazienti con carcinoma mammario operato con i recettori positivi e i linfonodi negativi, è stato disegnato con l'obiettivo di confermare in modo prospettico che il RS 0-10 si associa a un basso rischio di recidiva a distanza quando i pazienti sono trattati con la sola terapia endocrina e dimostrare la non inferiorità della sola terapia endocrina rispetto all'aggiunta di chemioterapia in termini di sopravvivenza libera da malattia invasiva (iDFS) nelle pazienti definite a rischio intermedio (RS 11-25).

Il gruppo a basso rischio veniva trattato con sola terapia ormonale, quello intermedio veniva randomizzato a sola terapia ormonale oppure chemioterapia e terapia ormonale, mentre il gruppo con RS alto riceveva chemioterapia e ormonoterapia.

Il range dei cut-off è stato modificato rispetto agli studi precedenti per ridurre al minimo il potenziale sotto-trattamento nei pazienti ad alto e intermedio rischio. Dalle stime dei nuovi range, il RS di 11 si associa ad un rischio di recidive locali e a distanza pari al 10%, che viene comunemente utilizzato per raccomandare la chemioterapia secondo le linee guida NCCN. Il primo risultato pubblicato durante lo studio TAILORx ha riguardato la popolazione a basso rischio (RS≤10). Delle 10.253 donne eleggibili arruolate, 1.626 (15,9%) avevano un RS=0-10 e avevano ricevuto solo ormonoterapia. A 5 anni, in questa coorte di pazienti, il rate di iDFS era pari al 93,8% (95% CI, 92,4 - 94,9), il tasso di pazienti libere da recidiva a distanza era 99,3% (95% CI 98,7 - 99,6), il tasso di pazienti libere da qualunque recidiva era 98,7% (95% CI 97,9 - 99,2), e il rate of sopravvivenza totale era 98,0% (95% CI 97,1 - 98,6).⁶

Il secondo risultato pubblicato durante lo studio TAILORx è stata la dimostrazione che nel gruppo di pazienti con tumore ormono-responsivo e linfonodi negativi, a rischio intermedio (RS=11-25), non vi è alcuna differenza tra la sola ormonoterapia e l'aggiunta della chemioterapia alla terapia ormonale in termini di iDFS (92,8% vs. 93,1%, p=0,26) e sopravvivenza libera da recidiva a distanza (98% vs. 98%, p=0,48). Il beneficio della chemioterapia per l'iDFS variava però con l'età. Infatti, considerando le pazienti più giovani di 50 anni e con RS compreso tra 16 e 25, è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa in iDFS a favore dell'aggiunta della chemioterapia rispetto alla sola terapia endocrina.⁷

Successivamente alla pubblicazione dello studio prospettico TAILORx, sono state riportate diverse analisi secondarie con intento esplorativo. Queste analisi per la loro stessa natura non possono essere considerate definitive e i risultati prodotti debbono essere ulteriormente confermati.

Uno studio di confronto tra il TAILORx e il rischio clinico definito dal T e dal grading tumorale, è stato presentato su 9.427 donne con tumore ormono-responsivo/HER2 negativo e linfonodi negativi. Il rischio clinico basso era definito o da T≤1cm e G3, o da T≤2 cm e G2 oppure da T≤3 cm e G1. L'alto rischio clinico era definito da tutti gli altri criteri.

Per i livelli di RS intermedio e alto, confrontati con il livello di RS basso, l'HR era 2,73 (95% CI, 1,93-3,87) per il gruppo randomizzato alla sola terapia ormonale, 2,41 (95% CI, 1,66-3,48) per il gruppo randomizzato alla chemioterapia e ormonoterapia e 3,17 (95% CI, 1,94-5,19) per il RS>25 che aveva ricevuto chemioterapia e ormonoterapia. Tra le donne con età ≤ 50 anni, che avevano ricevuto la sola terapia ormonale, le stime di recidiva a distanza a 9 anni erano inferiori al 5% (1,8±0,9%) con RS≤11 indipendentemente dal rischio clinico, e del 4,7±1,0% con RS intermedio e

basso rischio clinico.

Nello stesso gruppo di età delle pazienti, in caso di RS intermedio e rischio clinico alto, la recidiva a 9 anni era del 12,3% con solo terapia ormonale e 15,2% in caso di chemioterapia e ormonoterapia. Valutando le pazienti di età ≤ 50 anni e RS compreso tra 21 e 25, vi era un vantaggio con la chemioterapia in termini di riduzione del rischio di recidiva/morte indipendentemente dal rischio clinico (vantaggio del 6,4 e 8,7% in riduzione del rischio rispetto alla sola terapia ormonale)⁸. Dati simili sono stati evidenziati in uno studio di popolazione del SEER in pazienti con linfonodi negativi o positivi fino a 3 in cui il basso RS identifica più del 70% di pazienti con tumore mammario con ottima prognosi a lungo termine senza alcun vantaggio dall'aggiunta della chemioterapia, mentre il RS > 25 identifica una minoranza di pazienti in cui la chemioterapia riduce la mortalità specifica per tumore mammario. Questi dati se confermati prospetticamente indicherebbero che Oncotype DX mantiene il suo valore clinico anche nelle pazienti con i linfonodi positivi⁹.


All'interno dello studio TAILORx, 1.389 pazienti (14%) avevano un RS>25 di cui 598 (42%) aveva un RS di 26-30 e 791 (58%) aveva un RS > 30 fino a 100. A 5 anni, la libertà da recidiva a distanza di tumore mammario era pari al 93,0%, per tutte le sedi (locale e a distanza) del 91%, l'iDFS dell'87,6% e l'overall survival del 95,9%¹⁰Tali risultati dimostrano una prognosi migliore con la chemioterapia rispetto alla sola ormonoterapia nel gruppo con RS alto, se si considerano i dati dello studio NSABP B-20 in cui le pazienti con RS>25 avevano una probabilità di essere liberi da recidiva a distanza a 10 anni del 62%.¹¹

Test	Informazioni	Indicazioni attuali (ASCO)	Massimo livello di evidenza	Studi clinici prospettici (Nome)
Oncotype DX	<ul style="list-style-type: none">• Prognostico per rischio di ricorrenza a 10 anni• Predittivo per beneficio da chemioterapia adiuvante (analisi esplorative di sottogruppo per età, dimensioni del tumore e grading)	Carcinoma mammario operato con linfonodi negativi, recettori ormonali positivi e HER2-negativo, sia pre che post-menopausa	Studio di validazione prospettico randomizzato	TAILORx

3.1.3 Beneficio clinico

Il beneficio clinico di Oncotype DX è stato valutato in un grande studio clinico prospettico randomizzato come il TAILORx⁷, le cui principali conclusioni e le analisi esplorative di sottogruppe sono state discusse nel precedente paragrafo. Questo studio ha consentito ad Oncotype DX di raggiungere il livello di evidenza I ed un grado di raccomandazione A [I, A] almeno per le pazienti pN0.

Per sistematizzare le evidenze circa il beneficio clinico di Oncotype DX è opportuno classificare le



pazienti secondo specifiche categorie clinico-patologiche. Nelle pazienti reseccate con carcinoma invasivo duttale, lobulare o misto, pT1 e pT2, ER+/HER2-negativo, pN0, un RS compreso tra 0-10 significa un rischio di ricorrenza da metastasi a distanza inferiore al 4% a 10 anni dall'intervento chirurgico. In pazienti con RS compreso tra 11-25 lo studio TAILORx ha dimostrato che la terapia endocrina offre un beneficio non inferiore a quello dell'aggiunta della chemioterapia ⁷. Tuttavia va osservato quanto segue: lo studio è stato pianificato su una sopravvivenza libera da malattia invasiva (iDFS; endpoint primario) attesa dell'87% a 5 anni nel gruppo RS 11-25, mentre la iDFS osservata è risultata del 92,8%. Questa differenza tra quanto previsto e quanto realmente osservato si deve al fatto che la metà delle pazienti arruolate aveva un tumore di 1.5 cm (pT1c), solo il 14% aveva un tumore alto grado, e solo il 30% era in pre-menopausa. Il numero di eventi più basso del previsto pone delle difficoltà nell'interpretazione dello studio TAILORx. Nello specifico, il fatto che il 98% dei pazienti nel braccio solo endocrino era libero da recidive a distanza 5 anni, rende di fatto impossibile una valutazione del valore predittivo del test. Cionondimeno lo studio TAILORx offre un risultato positivo per i pazienti con tumori simili a quelli reclutati nello studio randomizzato, e pone delle sfide alla generalizzabilità del risultato a pazienti con stadi più alti di patologia.


In donne ≤ 50 anni con RS compreso tra 16-25, l'aggiunta di chemioterapia alla terapia endocrina ha mostrato essere associata ad un più basso tasso di recidiva a distanza della malattia comparato con la sola terapia endocrina. Infine, è opportuno specificare che il TAILORx non randomizzava le pazienti con RS compreso tra 26-30, pertanto in assenza di dati sulle conseguenze dell'omissione della chemioterapia, il clinico dovrebbe orientarsi per la scelta della terapia per queste pazienti in base alle sole variabili clinico-patologiche². Per quanto riguarda i valori di $RS \geq 31$, è stato dimostrato il beneficio della chemioterapia in aggiunta alla terapia endocrina².

Per quanto riguarda le pazienti con metastasi linfonodali locoregionali (pN+), l'RS ottenuto con Oncotype DX ha dimostrato una significatività prognostica per le pazienti trattate con terapia endocrina. In realtà alcune evidenze documentano che le pazienti con $RS < 18$ hanno dimostrato un rischio di recidiva a 5 anni del 2,7%¹³ altre hanno dimostrato che con $RS < 11$, la DFS a 5 anni di pazienti trattate con la sola ormonoterapia è del 94,4%¹².

Questi dati suggeriscono che al momento non è disponibile un cut-off univoco ($RS < 11$ vs $RS < 18$) per definire il basso rischio per le pazienti pN-positivo. Inoltre in questa categoria, un valore di $RS > 18$ indicherebbe una popolazione con alto rischio di ricorrenza di malattia in cui andrebbe presa in considerazione la chemioterapia adiuvante in aggiunta all'ormonoterapia⁴.

Bibliografia

1. Paik S, Shak S, Tang G, et al: A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:2817 -2826
2. Paik S, Tang G, Shak S, et al.: Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(23):3726-34.
3. Gianni L, Zambetti M., Clark K et al., Gene Expression Profiles in Paraffin-Embedded Core Biopsy Tissue Predict Response to Chemotherapy in Women With Locally Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2005;33(29):7265-7277
4. Albain KS, Barlow WE., Shak S. et al., Prognostic and Predictive Value of the 21-Gene Recurrence Score Assay in a Randomized Trial of Chemotherapy for Postmenopausal, Node-Positive, Estrogen Receptor-Positive Breast

- 
- Cancer. *Lancet Oncol.* 2010; 11(1): 55–65.
5. Sparano, J. A. TAILORx: Trial Assigning Individualized Options for Treatment (Rx). *Clinical Breast Cancer* 2006; 7(4), 347–350.
 6. Sparano JA1, Gray RJ, Makower DF, et al., Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2015 Nov 19;373(21):2005-14
 7. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF et al., Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(2):111-121
 8. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM, et al. Clinical and Genomic Risk to Guide the Use of Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2019 Jun 20;380(25):2395-2405
 9. Hortobagyi GN, Shak S, Sledge GW Jr, et al. Breast cancer-specific mortality (BCSM) in patients (pts) with node-negative (N0) and node-positive (N+) breast cancer (BC) guided by the 21-gene assay: a SEER-genomic population-based study. *Cancer Res* 2019;799:4 Suppl:P3-11-02.
 10. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF et al., Clinical Outcomes in Early Breast Cancer With a High 21-Gene Recurrence Score of 26 to 100 Assigned to Adjuvant Chemotherapy Plus Endocrine Therapy: A Secondary Analysis of the TAILORx Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2019 [Epub ahead of print]
 11. Geyer CE, Tang G, Mamounas EP et al., 21-Gene assay as predictor of chemotherapy benefit in HER2-negative breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2018 Nov 14;4:37
 12. Nitz U, Gluz O, Christgen M, et al. Reducing chemotherapy use in clinically high-risk, genomically low-risk pN0 and pN1 early breast cancer patients: five-year data from the prospective, randomised phase 3 West German Study Group (WSG) PlanB trial. *Breast Cancer Res Treat.* 2017 Oct;165(3):573-583. doi: 10.1007/s10549-017-4358-6.
 13. Stemmer SM, Steiner M, Rizel S, et al. *NPJ Breast Cancer.* 2017 Sep 8;3:32. Clinical outcomes in ER+ HER2 -node-positive breast cancer patients who were treated according to the Recurrence Score results: evidence from a large prospectively designed registry.

3.2 Mammaprint (70 geni)

Il Mammaprint è un test in microarray che può essere eseguito sia su campione congelato che paraffinato.

Il test è stato sviluppato su pazienti con carcinoma mammario operato e non trattato con terapia sistemica adiuvante e con un follow-up di 20 anni.

Sono stati confrontati 2 gruppi: un gruppo a basso rischio (senza recidive distanti entro 5 anni) ed uno a rischio elevato (con sviluppo di metastasi a distanza entro 5 anni). Dai risultati ottenuti in questi studi è stato sviluppato un test che analizza l'espressione di 70 geni che fornisce informazioni prognostiche per ricaduta entro i 5 anni dalla diagnosi. È importante sottolineare che ER, PgR, HER2 e Ki-67 non erano tra i 70 geni inclusi in questo test. Uno studio di validazione condotto in una coorte europea di 307 pazienti diagnosticato tra il 1980 e il 1998 dal consorzio TRANSBIG, con un follow-up mediano di 13,6 anni, ha dimostrato che la signature molecolare fornita da tali 70 geni è stata un forte indicatore prognostico sia per i tempi di sviluppo di metastasi a distanza (hazard ratio = 2,32) che di sopravvivenza globale (hazard ratio = 2,79). I risultati dello studio MINDACT hanno fornito l'evidenza per l'uso di MammaPrint in pazienti con tumore mammario ER positivo e HER2-negativo con linfonodi negativi (N0) o con un massimo di 3 linfonodi positivi.

3.2.1. Tipologia di popolazione

Mammaprint è un test genomico in grado di predire il rischio di recidiva a distanza entro 5 anni dalla diagnosi in pazienti con carcinoma mammario ER/PgR-positivo/HER2-negativo, senza metastasi linfonodali ascellari o con un numero massimo di 3 linfonodi metastatici ascellari.

Mammaprint fornisce un risultato dicotomico che suddivide le pazienti in un gruppo a basso rischio di ricaduta a distanza e un gruppo ad alto rischio di ricaduta a distanza.

L'utilizzo di Mammaprint è supportato dal più alto livello di evidenza clinica (livello IA, che è stato ottenuto attraverso una robusta validazione retrospettiva su numerosi trial clinici randomizzati, a cui ha fatto seguito la validazione prospettica in un trial clinico dedicato (lo studio MINDACT)¹.

ASCO e ESMO, le principali società scientifiche internazionali^{2,3}, hanno posto una forte raccomandazione a considerare l'omissione della chemioterapia adiuvante nelle pazienti con carcinoma mammario ER/PgR-positivo/HER2-negativo, con meno di 4 linfonodi ascellari metastatici, che risultassero a basso rischio di ricaduta a distanza sulla base del test Mammaprint.

NON è raccomandabile l'aggiunta della terapia chemioterapica adiuvante nelle pazienti giudicate clinicamente a basso rischio ma che risultino essere ad alto rischio genomico secondo test Mammaprint².

Inoltre, l'utilizzo di Mammaprint non è indicato nelle pazienti con 4 o più linfonodi metastatici, e/o nelle pazienti con tumori HER2-positivi o tripli negativi.

3.2.2. Studi clinici


Sviluppo del test Mammaprint

Il test Mammaprint è stato sviluppato su un training set di 78 pazienti con carcinoma mammario non trattate con terapia sistemica adiuvante e con un follow-up di 20 anni⁴. Tutte le pazienti avevano un'età inferiore ai 55 anni, un pT inferiore ai 5 cm, e assenza di metastasi linfonodali (pN0). Il gruppo di van't Veer è partito dall'analisi di espressione di 5000 geni noti per essere implicati nei 6 principali processi biologici del cancro: proliferazione, perdita di controllo sull'apoptosi, elusione dell'inibizione della crescita, inibizione dell'apoptosi, angiogenesi, invasione e metastatizzazione. Da questi 5000 geni, attraverso un algoritmo di machine learning supervisionato, è stata ottenuta una firma di 70 geni in grado di distinguere le pazienti con recidiva a distanza nei primi 5 anni dalle pazienti libere da malattia. Il valore prognostico della firma genomica è risultato statisticamente significativo anche al netto dei classici fattori prognostici clinico-patologici.

Valutazione clinica del test: studi retrospettivi

Dopo il suo sviluppo, Mammaprint è stato valutato in diversi studi retrospettivi, che ne hanno riportato il valore prognostico in setting e popolazioni di pazienti differenti.

Il primo studio è stato effettuato su una serie consecutiva di 295 campioni tumorali di carcinoma mammario appartenenti a pazienti che avevano ricevuto la diagnosi di carcinoma tra il 1984 e il 1995⁵. Le caratteristiche delle pazienti erano simili a quelle del training set iniziale per età (minore di 53 anni) e tumore (inferiore ai 5 cm) ma differenti per quanto riguarda lo stato linfonodale (il 49% aveva metastasi nei linfonodi ascellari) e la terapia sistemica adiuvante ricevuta (il 44% aveva ricevuto



terapia sistemica adiuvante). In questa popolazione, Mammaprint ha confermato di essere un forte indicatore prognostico, con un hazard ratio per ricaduta a distanza di 5,1 (95% CIs 2,9-9,0) a sfavore del gruppo definito ad alto rischio genomico.

In seguito, altri studi hanno confermato il valore prognostico di Mammaprint in coorti di giovani pazienti con carcinoma mammario e assenza di metastasi linfonodali ascellari, con risultati sovrapponibili.


La valutazione dell'attendibilità prognostica di Mammaprint è stata in seguito estesa alle pazienti con linfonodi ascellari positivi. Un'analisi del gruppo TRANSBIG ha misurato l'attendibilità di Mammaprint nel predire il rischio di recidiva in una coorte di 241 pazienti con tumori T1-3 e N1-3 diagnosticati tra il 1984 e il 1996, confermandone la superiorità prognostica rispetto ai classici parametri clinicopatologici⁶. In questa coorte di validazione, solo il 18% delle pazienti aveva ricevuto terapia endocrina adiuvante, e nessuna era stata trattata con chemioterapia.

Viceversa, nelle pazienti con 4 o più linfonodi ascellari metastatici, Mammaprint non si è dimostrato in grado di identificare un sottogruppo con rischio di recidiva sufficientemente basso da poter considerare l'omissione della chemioterapia adiuvante: in una coorte consecutiva di 173 pazienti con N \geq 4 e trattate con chemioterapia, il sottogruppo a basso rischio genomico ha mostrato una sopravvivenza libera da recidiva a distanza dell'87% a 5 anni e del 67% a 10 anni⁷.

Poiché Mammaprint è stato inizialmente sviluppato e validato su coorti di pazienti con età inferiore ai 55 anni, due studi ne hanno poi valutato il valore prognostico nelle pazienti post-menopausali. In una delle due serie di pazienti, Mammaprint ha mostrato una scarsa accuratezza prognostica: solo il 27% delle pazienti è risultata essere a basso rischio, e la sopravvivenza libera da recidiva a distanza a 10 anni è risultata alta sia nel gruppo a basso rischio (100%) sia in quello ad alto rischio (90%)⁸. Tuttavia, in un'altra coorte di pazienti in post-menopausa, Mammaprint ha dimostrato un'accuratezza prognostica sovrapponibile a quella osservata nelle coorti di pazienti più giovani⁹.

Un update del follow-up condotto sulla prima serie di validazione del test ha permesso di valutare l'accuratezza prognostica di Mammaprint a lungo termine¹⁰. Mentre nei primi 5 anni dalla diagnosi la signature genomica è fortemente associata alla sopravvivenza libera da ricaduta a distanza (HR 9,6, 95% CIs 4,2-22,1), il suo valore prognostico perde significatività negli anni successivi (HR 1,1, 95% CIs 0,5-2,5). Tali risultati potrebbero essere legati al basso numero di eventi osservati dopo il quinto anno di follow-up; tuttavia, in base alle evidenze attuali Mammaprint non dovrebbe essere utilizzato come strumento prognostico per predire il rischio di recidiva a lungo termine.

Infine, diverse analisi aggregate hanno confermato l'accuratezza prognostica di Mammaprint su serie di pazienti con diverse caratteristiche e sottoposte a differenti trattamenti adiuvanti. In un'analisi aggregata che ha raccolto i dati di 541 pazienti¹¹, Mammaprint ha confermato di mantenere un'accuratezza prognostica statisticamente e clinicamente significativa a prescindere dallo stato



menopausale delle pazienti (più del 50% delle pazienti erano post-menopausali) e dell'interessamento dei linfonodi ascellari (il 50% delle pazienti aveva da 1 a 3 linfonodi metastatici).

In tale serie, in cui il 100% delle pazienti aveva ricevuto endocrinoterapia adiuvante ma solo il 44% era stata trattata con chemio-endocrinoterapia, il gruppo di pazienti ad alto rischio genomico ha mostrato un beneficio statisticamente significativo dall'aggiunta della chemioterapia adiuvante rispetto alla sola endocrinoterapia.

Validazione prospettica: lo studio MINDACT

Lo studio “Microarray In Node-negative Disease may Avoid ChemoTherapy” (MINDACT) è il trial clinico randomizzato che ha dimostrato prospetticamente l'efficacia prognostica e l'utilità clinica di Mammaprint¹. L'obiettivo dello studio era valutare se, tra i pazienti ad alto rischio clinico e basso rischio genomico non trattate con la chemioterapia, il limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% (cioè il limite di non inferiorità) per la sopravvivenza a 5 anni libera da metastasi a distanza fosse del 92% o superiore.

A tale scopo, lo studio ha arruolato 6693 donne con diagnosi di carcinoma mammario e un massimo di 3 linfonodi ascellari metastatici, indipendentemente dall'età e dalle caratteristiche immunistochimiche del tumore (ER/PgR-positivo, Her2-positivo, triplo negativo). Le pazienti sono state classificate in 4 gruppi prognostici sulla base del test Mammaprint e del software Adjuvant! Online: 1) basso rischio clinico/basso rischio genomico; 2) alto rischio clinico/alto rischio genomico; 3) alto rischio clinico/alto rischio genomico; 4) basso rischio clinico/alto rischio genomico. Le pazienti a basso rischio sia clinico che genomico sono state trattate con sola ormonoterapia adiuvante, omettendo la chemioterapia adiuvante, mentre le pazienti ad alto rischio sia clinico che genomico sono state trattate con chemioterapia adiuvante in aggiunta all'ormonoterapia. Le pazienti in cui il rischio clinico e il rischio genomico erano discordanti sono state invece randomizzate a ricevere o meno la chemioterapia adiuvante.

L'endpoint primario dello studio era dimostrare che nella coorte di pazienti ad alto rischio clinico/basso rischio genomico randomizzate a NON ricevere la chemioterapia adiuvante, la sopravvivenza libera da metastasi sarebbe stata maggiore o uguale al 92% a 5 anni. Dal punto di vista statistico, perché lo studio fosse positivo era necessario dimostrare che il limite inferiore dell'intervallo di confidenza per la sopravvivenza libera da metastasi a 5 anni fosse uguale o maggiore del 92%. E' importante sottolineare come tale disegno statistico non permettesse un confronto formale tra le pazienti randomizzate a chemioterapia vs le pazienti randomizzate a non riceverla, e che il MINDACT è da considerarsi come uno studio di non inferiorità “a singolo braccio”, con un cut-off di sopravvivenza del 92%.

Lo studio è risultato positivo, con una sopravvivenza libera da metastasi a 5 anni nelle pazienti ad alto rischio clinico/basso rischio genomico che NON erano state trattate con chemioterapia adiuvante in aggiunta all'ormonoterapia del 94,7% (95% CIs 92,5-96,2). Nelle pazienti ad alto rischio clinico e basso rischio genomico trattate con la chemioterapia, la sopravvivenza libera da metastasi a 5 anni

risultata di 1,5% superiore rispetto a quella delle pazienti trattate con la sola terapia endocrina (95,9% versus 94,4%; HR 0,78, 95% CIs 0,5-1,21). Tuttavia, poiché lo studio non era potenziato per confrontare i due bracci di trattamento, non è formalmente possibile stabilire il reale vantaggio della chemioterapia adiuvante rispetto alla terapia ormonale in questo gruppo di pazienti.

Nonostante lo studio MINDACT non prevedesse il confronto tra chemioterapia e ormonoterapia adiuvante nelle pazienti ad alto rischio genomico, da una prima disamina dei dati sembrerebbe che non ci sia alcuna differenza in termini di sopravvivenza libera da metastasi a 5 anni nei 2 bracci: 95,8% nelle pazienti randomizzate a chemioterapia in aggiunta all'ormonoterapia vs 95% nelle pazienti randomizzate a omettere la chemioterapia e tratte solo con ormonoterapia adiuvante. Pertanto MammaPrint non si è dimostrato in grado di predire il beneficio dell'aggiunta della chemioterapia adiuvante all'ormonoterapia in pazienti con caratteristiche cliniche favorevoli. Qualche osservatore ipercritico ha fatto notare che sono sovrapponibili anche le sopravvivenze libere da metastasi delle pazienti con rischio genomico alto e basso trattate con la sola terapia ormonale, a significare che nello studio MINDACT il classificatore di 70 geni non solo non sarebbe predittivo, ma neppure prognostico. Tuttavia si tratta di una lettura dei dati che esula da quella programmata nello studio prospettico e volta a definire la non inferiorità della terapia endocrina nelle pazienti trattate sulla base del test genomico e contrariamente alla valutazione clinica.


Alla luce dei risultati del MINDACT, MammaPrint sarebbe in grado di ridurre l'utilizzo della chemioterapia adiuvante nel 46% delle pazienti definite ad alto rischio clinico, che corrisponde a circa il 20% di tutte le pazienti con carcinoma mammario candidate a ricevere un trattamento adiuvante. Infine, i risultati del MINDACT confermano che l'utilità di MammaPrint è limitata alle pazienti con carcinoma mammario con ER/PgR-positivi/HER2-negativo: delle pazienti con tumori HER2-positivi e triplo negativi, solo l'8% e l'1% sono state riclassificate come basso rischio genomico.

Test	Indicazioni attuali (ASCO)	Massimo livello di evidenza	Studi clinici Prospettici (Nome)
MammaPrint	Carcinoma della mammella operato con linfonodi negativi o positivi (1-3) e recettori ormonali positivi e HER2-negativo, sia pre che in post-menopausa	Prospettica	MINDACT

3.2.3. Beneficio clinico

Due pubblicazioni hanno valutato la capacità di MammaPrint di predire i benefici della chemioterapia.

Knauer et al.¹¹ hanno riportato un'analisi aggregata di 541 pazienti (il 100% ha ricevuto la terapia endocrina, il 42% ha ricevuto la chemioterapia) ottenuta da 6 serie consecutive di cui il 90% dei pazienti erano ER + e l'89% erano HER2-, la metà pN0, l'altra metà pN1a (LN1-3). Lo studio di Mook et al.⁶ invece è una analisi aggregata di 2 delle 6 serie di pazienti di Knauer et al.¹¹, con un




follow-up di 10 anni, limitando la valutazione ai pazienti pN1a (LN1–3).

Dall'analisi aggregata di 541 pazienti¹¹ (50% pN0, 50% pN1a) trattati secondo la prassi abituale, è risultato statisticamente significativo il beneficio dell'aggiunta della chemioterapia adiuvante rispetto alla sola ormonoterapia nel gruppo ad alto rischio di MammaPrint in termini di Sopravvivenza Libera di Malattia a Distanza (DRFS) e dello Score di Severità del Carcinoma Mammario (BCSS) a 5 anni. Tuttavia, il test di interazione per il trattamento chemioterapico e il gruppo a rischio (per BCSS a 5 anni) non è risultato significativo ($p = 0,45$). Un'ulteriore analisi aggregata limitata ai pazienti pN1a non ha dimostrato significatività statistica tra il trattamento chemioterapico e il gruppo di rischio per BCSS a 10 anni ($p = 0,95$). Quindi le evidenze circa la capacità di MammaPrint di prevedere i benefici dell'aggiunta della chemioterapia risultano estremamente limitate.

Circa l'utilità clinica di MAMMAPRINT, lo studio "Microarray In Node-negative Disease may Avoid ChemoTherapy" (MINDACT) è uno studio controllato randomizzato che valuta l'impatto di MammaPrint nella pratica clinica¹. Secondo i risultati di questo studio per le 1.550 pazienti ad alto rischio clinico e basso rischio genomico secondo MammaPrint non randomizzate a ricevere la chemioterapia, la sopravvivenza libera da metastasi a 5 anni è stata del 94,7%. La differenza assoluta in sopravvivenza tra queste pazienti e quelle che hanno ricevuto chemioterapia è stata dell'1,5% permettendo agli autori dello studio di poter concludere che alla luce dei risultati circa il 46% delle pazienti ad alto rischio clinico potrebbero risparmiare chemioterapia adiuvante in aggiunta all'ormonoterapia.

Bibliografia

1. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 2016;375:717–29. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602253>.
2. Andre F, Ismaila N, Henry NL, Somerfield MR, Bast RC, Barlow W, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update—Integration of Results From TAILORx. *JCO* 2019;37:1956–64. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00945>.
3. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2019;30:1194–220. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz173>
4. Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530–6. <https://doi.org/10.1038/415530a>.
5. Van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, et al. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. <http://DxDoiOrg/101056/NEJMoa021967> 2009. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021967>.
6. Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat* 2009;116:295–302. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0130-2>.
7. Saghatchian M, Mook S, Pruneri G, Viale G, Glas AM, Guerin S, et al. Additional prognostic value of the 70-gene signature (MammaPrint®) among breast cancer patients with 4-9 positive lymph nodes. *Breast*

- 
- 2013;22:682–90. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2012.12.002>.
8. Mook S, Schmidt MK, Weigelt B, Kreike B, Eekhout I, van de Vijver MJ, et al. The 70-gene prognosis signature predicts early metastasis in breast cancer patients between 55 and 70 years of age. *Ann Oncol* 2010;21:717–22. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp388>.
 9. Wittner BS, Sgroi DC, Ryan PD, Bruinsma TJ, Glas AM, Male A, et al. Analysis of the MammaPrint breast cancer assay in a predominantly postmenopausal cohort. *Clin Cancer Res* 2008;14:2988–93. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4723>.
 10. Drukker CA, van Tinteren H, Schmidt MK, Rutgers EJT, Bernardis R, van de Vijver MJ, et al. Long-term impact of the 70-gene signature on breast cancer outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2014;143:587–92. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2831-4>.
 11. Knauer M, Mook S, Rutgers EJT, Bender RA, Hauptmann M, van de Vijver MJ, et al. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120:655–61. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0814-2>.

3.3 Prosigna (PAM-50)

PROSIGNA (NanoString Technologies) è un test con certificazione CE-IVD (test in vitro ad uso diagnostico) progettato per valutare DRFS a 10 anni dall'intervento chirurgico per carcinoma mammario.

E' stato sviluppato partendo dalla firma genomica PAM50¹ permettendo quindi di classificare i carcinomi mammari nei quattro sottotipi biologici (Luminal A, Lumina B, HER2-enrich e Basal-Like). Oltre ai 50 geni della firma genomica al PAM50, PROSIGNA valuta l'espressione di 8 geni house-keeping per la normalizzazione dei risultati, 6 geni di controllo positivi e 8 geni di controllo negativi.

PROSIGNA si basa sull'analisi diretta del l'RNA estratto dal campione di tessuto tumorale mammario fissato in formalina (FFPE) senza necessità della fase di retrotrascrizione ed amplificazione del cDNA ottenuto. La valutazione viene eseguita con il sistema di analisi nCounter® (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA, USA).

PROSIGNA è un test di “seconda generazione” poiché, differentemente dai test di prima generazione (es. Oncotype e MAMMAPRINT), l'algoritmo di calcolo mette insieme i dati del profilo di espressione genica con variabili clinico-patologiche come la dimensione della neoplasia (espressa come minore o maggiore di 2 cm) e la presenza o assenza di metastasi linfonodali [b], per generare una categoria di rischio e uno score numerico che permette di valutare il rischio di ripresa di malattia a distanza.

L'algoritmo del software produce un punteggio numerico da 1 a 100–detto ROR score (Risk Of Recurrence) che predice la sopravvivenza libera da ripresa a distanza della malattia (DRFS) a 10 anni dall'escissione chirurgica del carcinoma mammario (presupponendo 5 anni di trattamento ormonale). Nella Tabella 1 sono riportate le tre categorie di rischio delle pazienti in base al valore di ROR (basso, intermedio, alto) definite in base a uno studio su 1.007 campioni di carcinoma mammario che ha associato lo score Prosigna con l'outcome a lungo termine delle pazienti, definito come sopravvivenza libera da ripresa a distanza (DFRS) a 10 anni.

Tabella 1 -Valori di ROR (Risk Of Recurrence) e definizione della categoria di rischio nelle pazienti pN0 e pN1a.

Stato patologico linfonodale	Valore di ROR	Categoria di rischio
pN0	0-40	Basso rischio
	41-60	Rischio intermedio
	61-100	Alto rischio
pN1a (LN+:1-3)	0-15	Basso rischio
	16-40	Rischio intermedio
	41-100	Alto rischio

Nota: Il punteggio ROR (Risk Of Recurrence) predice la DRFS a dieci anni dall'escissione chirurgica del carcinoma mammario (presupponendo 5 anni di trattamento ormonale). Il punteggio ROR è un punteggio numerico su una scala da 0 a 100.

3.3.1 Tipologia di Popolazione

Il PAM50 è la firma genetica che ha permesso di identificare i sottotipi molecolari intrinseci (Luminal A, Luminal B, HER2enriched, basal like) del carcinoma mammario istologia duttale, lobulare o misto duttule-lobulare, indipendentemente dal T, N, M, stato recettori ormonali, stato HER2 e stato menopausale¹.


Il test PROSIGNA definisce uno score (ROR score) di rischio di ripresa a distanza, a 10 anni dalla chirurgia, attraverso un algoritmo che mette insieme dalla firma genetica PAM50, la dimensione della neoplasia e lo stato linfonodale.

In questo modo il risultato del test PROSIGNA è duplice: 1) restituisce il sottotipo molecolare intrinseco per una corretta classificazione biologica della neoplasia, 2) predice il rischio di recidiva a distanza a 10 anni dalla chirurgia per carcinoma mammario.

Per la predizione del rischio di recidiva, il ROR score è stato valutato su 8 datasets: 6 rappresentati da pazienti arruolate in trial prospettici randomizzati e rivalutate retrospettivamente (ATAC², ABCSG^{3,4}, CALGB 9741⁵, NCIC-MA.21⁶, GEICAM-9906108⁷, NCIC-MA.12⁸) e 2 da coorti prospettiche rivalutate retrospettivamente (DBCG cohort⁹, British Columbia cohort^{10,11}).

Sulla base di queste analisi, il test PROSIGNA ha ottenuto certificazione della Food and Drug Administration (FDA) per determinare il rischio di ripresa a distanza a 10 anni nelle donne con carcinoma mammario sottoposte a chirurgia in combinazione con un trattamento loco-regionale standard. FDA sottolinea che PROSIGNA è un test prognostico per valutare il rischio di ripresa a distanza a 10 anni in:

1. donne in post-menopausa con carcinoma mammario stadio I o II recettori ormonali positivi (HR+), linfonodi negativi, da trattare con terapia ormonale adiuvante da sola, quando usato in combinazione con altri fattori clinico-patologici;
2. donne in post-menopausa con carcinoma mammario stadio II, linfonodi positivi (1-3), recettori ormonali positivi (HR +), da trattare con terapia adiuvante endocrina da sola, quando usato in



combinazione con altri fattori clinicopatologici. Il test non è indicato in pazienti con 4 o più linfonodi positivi.

3.3.2 Studi clinici

Gli studi pubblicati sono relativi alla validazione del test PROSIGNA per la predizione del rischio di recidiva a distanza a 10 anni su 8 datasets.

Sei sono casistiche rappresentate da pazienti arruolate in trial prospettici randomizzati, per le quali erano disponibili campioni di tessuto tumorale FFPE, e in cui è stata eseguita rivalutazione retrospettiva (TransATAC², ABCSG8^{3,4}, CALGB 9741⁵, NCIC-MA.21⁶, GEICAM-9906108⁷, NCIC-MA.12⁸) e due sono casistiche costituite da coorti prospettiche rivalutate retrospettivamente (DBCG cohort⁹, British Columbia cohort^{10,11}).

Dowsett M et al² hanno valutato in ROR-score con PAM50 in una parte dei campioni tissutali tumorali dello studio TransATAC: 1.007 pazienti in post-menopausa, con carcinoma mammario in fase iniziale, ER-positivo, operate e trattate con sola terapia ormonale adiuvante (tamoxifene o anastrozolo) nell'ambito dello studio randomizzato di fase III ATAC. Di queste 1.007 pazienti, 739 erano pN0. Delle 739 pazienti pN0, il 57,9% sono risultate ROR-basso rischio, il 26% ROR-rischio intermedio e il 16% ROR- alto rischio.

Il ROR-score è risultato essere correlato in maniera statisticamente significativa al rischio di ripresa a 10 anni in tutte le pazienti testate e in tutti i sottogruppi (pN0, pN+, HER2-negativi).

Il ROR score ha fornito maggiori informazioni prognostiche rispetto al Recurrence Score calcolato con il test Oncotype DX 21. Gli autori concludono sottolineando che l'uso del ROR score nella scelta delle pazienti da trattare con chemioterapia adiuvante merita tuttavia degli studi ad hoc.

Gnant M et al³ hanno valutato PAM50 in 1.478 pazienti post-menopausali con carcinoma mammario in fase iniziale, ER-positivo, operato, e trattate con sola ormonoterapia adiuvante delle 3.901 arruolate nello studio clinico randomizzato prospettico di fase III ABCSG8 (tamoxifene per 5 anni vs tamoxifene per 2 anni seguito da anastrozolo per 3 anni). Delle 1.472 pazienti valutate con PAM50, 1.047 erano pN0 e 431 erano pN+; 1.397 pazienti avevano un tumore HER2-negativo e solo 77 HER2-positivo. Delle 1.478 pazienti, 502 (34%) sono risultate ROR-basso rischio, 478 (32%) ROR-rischio intermedio e 498 (34%) ROR-alto rischio. La sopravvivenza a 10 anni libera da recidiva a distanza è risultata essere pari al 96,7% nel gruppo ROR- basso rischio, del 91,3% nel ROR- rischio intermedio e del 79,9% nel ROR- alto rischio. I risultati hanno evidenziato che il ROR-score aggiunge in maniera statisticamente significativa informazioni prognostiche alle variabili cliniche standard ($p < 0.0001$).

Inoltre il PAM50 identifica i sottogruppi intrinseci in tutti i casi e la coorte Luminal A evidenzia un ROR significativamente più basso a 10 anni rispetto alla coorte Luminal B ($p < 0.0001$). Gli autori concludono che un rischio di metastasi a 10 anni inferiore a 3,5% nel gruppo ROR-basso rischio potrebbe aiutare ad evitare over-treatment non necessari. Questi risultati sono simili a quelli riportati da Dowsett M².

Negli studi CALGB 9741⁵, NCIC-MA.21⁶, GEICAM-9906108⁷, NCIC-MA.12⁸ le pazienti avevano ricevuto chemioterapia adiuvante.

Per predire la ripresa a distanza a 10 anni, il Prosigna-PAM50 è stato esaminato in una coorte danese⁹ di donne in post-menopausa con carcinoma mammario in fase iniziale, operato e diagnosticato dal 2000 al 2003, trattate con sola ormonoterapia adiuvante per 5 anni secondo le linee guida nazionali. Sono stati testati 2.558 campioni tumorali con PROSIGNA e, dopo la determinazione di HER2, sono stati analizzati i dati derivanti da 2.558 campioni recettori ormonali positivi/HER2 negativi. 1.163 erano pazienti pN0 (=46%) e 1.395 (=54%) erano pN-positivi.

I risultati hanno evidenziato, nelle pazienti pN0 ROR-basso rischio, una ripresa a distanza a 10 anni del 5% vs un 17,8% nelle pazienti pN0 ROR-alto rischio. Nelle pazienti pN+, un 26% sono risultate ROR-basso rischio con un tasso di ripresa a distanza a 10 anni del 3,5% rispetto al 22,1% del gruppo ROR-alto rischio. Il ROR score ha dimostrato nella popolazione danese, in un setting “real world” la capacità di identificare pazienti pN0 e una porzione di pazienti pN+ da 1 a 3 con basso rischio di ripresa a distanza a 10 anni.

Inoltre, 1.474 donne (=58%) sono risultate Luminal A e 947 (=37%) Luminal B: la ripresa a distanza a 10 anni è stata del 7,6% nel primo sottotipo molecolare rispetto al 18,4% nel secondo (p< 0.001). Anche nella coorte di pazienti con carcinoma mammario diagnosticato tra il 1986 e il 1992 al British Columbia^{10,11}, operate e trattate con ormonoterapia adiuvante: il PAM50 ha fornito informazioni prognostiche superiori alle variabili cliniche.

Nel trial OPTIMA¹² è stato effettuato un confronto della stratificazione del rischio di ripresa e della classificazione in sottotipi molecolari tra vari test: Prosigna, Mammaprint, MammaTyper, NexCourse Breast (IH4-AQUA) e IHC4 eseguiti direttamente nella stessa popolazione: 313 pazienti con carcinoma mammario ER+/HER2-negativo con 1-9 linfonodi positivi oppure con linfonodi negativi e con T uguale o superiore a 3cm, randomizzate a ricevere terapia standard (chemioterapia seguita da ormonoterapia adiuvante) o terapia adiuvante in base al test Oncotype DX. I risultati dei test sono stati disponibili per 236 pazienti e hanno evidenziato una bassa concordanza sia nel gruppo a rischio basso/intermedio che nel gruppo ad alto rischio (39,4%).

Non sono disponibili studi clinici prospettici randomizzati.

Test	Indicazioni attuali FDA	Massimo livello di evidenza	Studi clinici prospettici
Prosigna (PAM50)	Il test Prosigna (PAM50) è indicato da FDA come test prognostico per la valutazione del rischio di ripresa a distanza a 10 anni in: 1. donne in post-menopausa con carcinoma mammario stadio I o II recettori ormonali positivi (HR+), linfonodi negativi, da trattare con terapia ormonale adiuvante da sola, quando usato in combinazione con altri fattori clinico-patologici; 2. donne in post-menopausa con carcinoma mammario stadio II, linfonodi positivi (1-3), recettori ormonali positivi (HR +), da trattare con terapia adiuvante endocrina da sola, quando usato in combinazione con altri fattori clinicopatologici. Il test non è indicato in pazienti con 4 o più linfonodi positivi.	Retrospectiva	Non disponibili

3.3.3. Beneficio clinico


Prosigna (PAM50) valutato negli studi sopra riportati ha evidenziato il suo ruolo prognostico, pur con il limite di essere stato valutato solo retrospettivamente senza validazioni prospettiche, oltremodo necessarie.

Nello studio di Ohnstad et al. sono stati valutati pazienti con carcinoma mammario in fase iniziale ad un follow-up di 17 anni evidenziando i sottotipi come PAM e gli score ROR migliorino la classificazione prognostica oltre gli attuali parametri clinicopatologici¹⁴. Sebbene il test PAM50 permetta di effettuare una valutazione prognostica, ad oggi non è predittivo di beneficio clinico da un trattamento chemioterapico adiuvante.¹⁵

Prosigna, pertanto, ha significato prognostico con possibilità di identificare una popolazione a rischio di recidiva oltre i 5 anni, ma questa informazione non è attualmente utilizzabile in pratica clinica a causa della mancanza di studi interventistici prospettici.¹³

Bibliografia

1. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27:1160–7.
2. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J Clin Oncol* 2013;31:2783–90.
3. Gnant M, Filipits M, Greil R, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol* 2014;25:339–45.
4. Filipits M, Nielsen TO, Rudas M, et al. The PAM50 risk-of-recurrence score predicts risk for late distant recurrence after endocrine therapy in postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20:1298–305.
5. Liu MC, Pitcher BN, Mardis ER, et al. PAM50 gene signatures and breast cancer prognosis with adjuvant anthracycline- and taxane-based chemotherapy: correlative analysis of C9741 (Alliance). *NPJ Breast Cancer* 2016;2:15023.
6. Liu S, Chapman JA, Burnell MJ, Levine MN, Pritchard KI, Whelan TJ, et al. Prognostic and predictive investigation of PAM50 intrinsic subtypes in the NCIC CTG MA.21 phase III chemotherapy trial. *Breast Cancer Res Treat* 2015;149:439–48.
7. Martin M, Brase JC, Calvo L, Krappmann K, Ruiz-Borrego M, Fisch K, et al. Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2– breast cancer patients: results from the GEICAM 9906 trial. *Breast Cancer Res* 2014;16:R38.
8. Chia SK, Bramwell VH, Tu D, et al. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2012;18:4465–72.
9. Laenkholm A, Jensen M, Eriksen J, et al. PAM50 risk of recurrence (DR) predicts 10 years distant recurrence in Comprehensive Danish cohort of postmenopausal women allocated to 5 years of endocrine therapy for hormone receptor-positive early breast cancer. *J Clin Oncol* 2018; 36:735-740
10. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:5222–32.
11. Wallden B, Storhoff J, Nielsen T, et al. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Med Genomics* 2015;8:54. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0129-6>



Bartlett JMS, Bayani J, Marshall A, et al. Comparing breast cancer multiparameter tests in the OPTIMA preliminary trial: no test is more equal than the others. *JNCI* 2016; 108:djw050

12. M.C. Chang, L.H. Souter, S. Kamel-Reid, M. Rutherford, P. Bedard, M. Trudeau, J. Hart, A. Eisen, and the Molecular Oncology Advisory Committee. Clinical utility of multigene profiling assays in early-stage breast cancer. *Curr Oncol.* 2017 Oct;24(5):e403-e422
13. Hege O, Ohnstad, Elin Borgen, Ragnhild S. Falk, Tonje G. Lien, Marit Aaserud, My Anh T. Sveli, Jon A. Kyte, Vessela N. Kristensen, Gry A. Geitvik, Ellen Schlichting, Erik A. Wist, Therese Sørlie, Hege G. Russnes and Bjørn Naume. Prognostic value of PAM50 and risk of recurrence score in patients with early-stage breast cancer with long-term follow-up. *Breast Cancer Research* (2017) 19:120
14. Minetta C Liu, Brandelyn N Pitcher, Elaine R Mardis, Sherri R Davies, Paula N Friedman, Jacqueline E Snider, Tammi L Vickery, Jerry P Reed, Katherine DeSchryver, Baljit Singh, William J Gradishar, Edith A Perez, Silvana Martino, Marc L Citron, Larry Norton, Eric P Winer, Clifford A Hudis, Lisa A Carey, Philip S Bernard, Torsten O Nielsen, Charles M Perou, Matthew J Ellis and William T Barry. PAM50 gene signatures and breast cancer prognosis with adjuvant anthracycline- and taxane-based chemotherapy: correlative analysis of C9741 (Alliance). *npj Breast Cancer* (2016)

3.4 Endopredict

Il test EndoPredict, effettuato da Myriad Genetics, è un test genomico per le persone a cui è stato recentemente diagnosticato un carcinoma mammario, in stadio iniziale, ER-positivi e HER2 negativo.

I dati scientifici suggeriscono che il test EndoPredict può essere ampiamente utilizzato per aiutare a prendere decisioni terapeutiche basate sul rischio di sviluppare metastasi a distanza entro 10 anni dalla diagnosi. Il test EndoPredict fornisce un punteggio di rischio (basso od alto rischio) di carcinoma mammario ricorrente come metastasi a distanza. La conoscenza del rischio di recidiva può aiutare le donne e i clinici a decidere se siano necessari la chemioterapia o altri trattamenti per ridurre il rischio dopo l'intervento chirurgico.

Il test EndoPredict analizza l'attività di 12 geni (8 target e 4 di controllo) nelle cellule neoplastiche. Nel calcolo del punteggio di rischio, EndoPredict include anche la dimensione del tumore e lo stato patologico dei linfonodi ascellari.


I risultati di EndoPredict sono riportati come punteggio di rischio (EPclin risk score), corrispondente ad un valore compreso tra 1,1 e 6,2 che corrisponde a un rischio percentuale di ricorrenza. I punteggi sono considerati a basso o alto rischio:

- a) un punteggio di rischio di EPclin superiore a 3,3287 (rischio di recidiva superiore al 10%) e viene interpretato come un tumore con un alto rischio di recidiva
- b) un punteggio di rischio di EPclin inferiore a 3,3287 (rischio di recidiva inferiore al 10%) e viene interpretato come un tumore a basso rischio di recidiva

3.4.1. Tipologia di popolazione

In pazienti con tumore mammario in stadio iniziale, ER-positivi e HER2-negativo in terapia ormonale adiuvante, il test Endopredict offre informazioni prognostiche, valutando la probabilità di recidiva a distanza.

In questa popolazione di pazienti, un elevato score (EPclin) è correlato ad un aumento delle recidive



a distanza e può essere utilizzato per valutare l'aggiunta della chemioterapia all'ormonoterapia. Il test può essere effettuato sia nelle pazienti con linfonodi negativi, sia nelle pazienti con 1-3 linfonodi positivi. Poiché il valore prognostico è particolarmente evidente nelle recidive tardive, risulta utile nella scelta della terapia ormonale oltre i 5 anni di trattamento.

3.4.2. Studi clinici


Il risk score dell'Endopredict (EP) fornisce informazioni prognostiche aggiuntive rispetto al rischio di recidiva a distanza indipendentemente dai parametri clinico patologici classici ottenuti con Adjuvant!Online e dal Ki67. Combinando l'EP risk score con lo stato linfonodale e la dimensione tumorale, sono stati identificati pazienti a basso rischio di recidiva che possono essere trattati con la sola terapia ormonale, dimostrando che l'EP clinico è un fattore predittivo indipendente rispetto ai soli fattori clinicopatologici nei pazienti arruolati negli studi ABCSG-6 ($p=0,010$) e ABCSG-8 ($p<0,001$). Le pazienti a basso rischio clinico avevano un rischio di recidiva a distanza del 4% in entrambi gli studi, mentre le pazienti con rischio clinico alto avevano un 28% di recidiva nello studio ABCSG-6 ($P < 0,001$) and ABCSG-8 ($p < 0,001$)¹.

In uno studio di confronto su 1.702 donne in post-menopausa affette da carcinoma mammario recettori positivi/HER2 negativo, trattate con la sola endocrinoterapia, in cui la prognosi era stata assegnata in accordo con le linee guida NCCN, tedesche e di St.Gallen, è stato fatto un confronto con l'EP clinico, dimostrando che l'EP score è in grado di predire una prognosi favorevole nella maggior parte dei pazienti attribuiti a rischio intermedio-alto. Infatti il 47% di pazienti a rischio alto secondo St.Gallen, il 49% a rischio alto secondo le linee guida tedesche e il 57% a rischio alto secondo l'NCCN, erano a rischio basso secondo EP clinico, rispettivamente, e avevano una significativa migliore prognosi rispetto a quelle a rischio alto ($HR>5$ in tutte le categorie di rischio). L'EP clinico è pertanto in grado di ridurre l'indicazione alla chemioterapia, in quasi la metà dei pazienti con fattori di rischio clinico².

Uno studio di confronto tra EP e Oncotype DX condotto su 34 pazienti ha mostrato una significativa ma moderata concordanza (76%) e una moderata correlazione (0,65) tra le due firme genomiche³.

Successivamente uno studio molto più ampio condotto su 928 pazienti a recettori positivi trattati con anastrozolo o tamoxifene per 5 anni ha confrontato EP ed Oncotype DX rispetto alle recidive a distanza a 5 e 10 anni in rapporto allo stato linfonodale. EP risultava più prognostico di Oncotype DX, identificando il 58,8% e 61,7% di pazienti a basso rischio, con HR per i non basso rischio vs. basso rischio di 5,99 (95% [CI] = 3,94 - 9,11) e 2,73 (95% CI = 1,91 - 3,89), rispettivamente, poiché integrava i dati molecolari con lo stato linfonodale e la dimensione tumorale⁴.

Inoltre l'EP fornisce indicazioni sul rischio di recidive tardive a distanza. Sulle 1702 donne in post-menopausa ER+/HER2- provenienti dagli studi di fase III ABCSG6 e ABCSG8, trattate per 5 anni con tamoxifene, l'EPclinico stratificava il 64% delle pazienti a rischio dopo 5 anni in un ulteriore



sottogruppo a basso rischio, con rischio assoluto pari all'1.8% di metastasi a distanza a 10 anni di follow-up. Pertanto, l'EP clinico era in grado di identificare un gruppo ad eccellente prognosi dopo 5 anni di terapia, evitando un trattamento ormonale prolungato ed i suoi relativi eventi avversi⁵.

L'EP clinico è stato validato anche su pazienti con linfonodi positivi, trattati con chemioterapia nell'ambito dello studio GEICAM9906. 1246 pazienti trattate con 6 FEC oppure con 4 FEC e 8 somministrazioni settimanali di taxolo, seguite da ormonoterapia in caso di linfonodi positivi venivano classificate in basso (25%) e alto rischio (75%) secondo EP. La sopravvivenza libera da metastasi era pari al 93% nel gruppo a basso rischio e 70% nel gruppo ad alto rischio (con una riduzione assoluta del rischio del 23%, (HR = 4,8; 95% CI = 2,5 - 9,5; p< 0,0001). Un'analisi multivariata mostrava che nel gruppo a recettori ormonali positivi, EP era un parametro prognostico indipendente dopo aggiustamento per età, grading, stato linfonodale, dimensione tumorale, trattamento, stato dei recettori ormonali, e Ki67. L'EP score classificava il 13% dei pazienti come basso rischio, con ottima prognosi e senza recidive a distanza (riduzione rischio assoluto vs. alto rischio = 28%; p< 0,0001). Inoltre, EP era prognostico nelle pazienti in premenopausa (HR = 6,7; 95% CI = 2,4 - 18,3; P = 0,0002) e post-menopausa (HR = 3,3, 95% CI = 1,3 - 8,5; P = 0,0109). Non vi erano differenze statisticamente significative tra i due bracci di trattamento sia nel basso sia nell'alto rischio.⁶

In uno studio di confronto tra 6 diversi profili genomici, valutati su 776 pazienti con recettori ormonali negativi o positivi fino a 3, arruolati nello studio ATAC a ricevere tamoxifene o anastrozolo per 5 anni, EP clin aveva un significato prognostico per recidiva a distanza a 10 anni maggiore di Oncotype DX e Mammaprint nelle pazienti a linfonodi negativi (HR=2.14 ; CI=1.71-2.68) ed anche nelle pazienti a linfonodi positivi (HR= 1,69; CI=1,29-2,22) . 429 donne (72,6%) erano classificate a basso rischio secondo EP, di cui 27 svilupparono una recidiva a distanza (rischio di recidiva a distanza a 10 anni, 6,6%; 95% CI, 4,5%-9,7%). EPclin classificava come alto rischio le pazienti con rischio di recidiva a distanza a 10 anni del 22,1% (95% CI, 16,2%-29,8%). EP clin era inoltre in grado di classificare il rischio di recidiva a distanza tra i 5 e 10 anni (HR=2,19;CI 1,62-2,97) e (HR=1,87; CI= 1,27-2,76) nei linfonodi negativi e positivi rispettivamente. La maggior parte delle pazienti ricadeva comunque nel gruppo a basso rischio con un rischio tra i 5 e i 10 anni inferiore al 5%. EPclin categorizzava 142 pazienti (26,5%) nel gruppo ad alto rischio, con la minore probabilità di recidiva a distanza a 10 anni pari al 14,6% (95% CI, 9,6%-22,0%). EP clin risultava quindi maggiormente prognostico nei pazienti con linfonodi negativi per quanto riguardava le recidive a distanza e soprattutto le recidive tardive, e forniva maggiori indicazioni anche nelle pazienti con 1-3 linfonodi⁷.

Un recente studio su 3746 donne, di cui 2630 avevano ricevuto terapia ormonale per 5 anni e 1116 terapia ormonale più chemioterapia, ha valutato la capacità di EPclin di stimare il rischio di recidiva a distanza a 10 anni per i due gruppi di trattamento. EPclin era prognostico di recidiva a distanza per donne che avevano ricevuto terapia ormonale (HR 2,79 (2,49-3,13), p < 0,0001) così come la terapia combinata (HR 2,27 (1,99-2,59), p< 0,0001). Le pazienti trattate con chemioterapia e terapia ormonale avevano un lieve incremento di recidive a distanza a 10 anni con l'aumentare progressivo

dell'EP score, rispetto alle pazienti trattate con la sola terapia ormonale (EPclin = 5; 12% OT + C vs. 20% OT da sola). Questo confronto dimostra che un alto EP clin score può predire un beneficio della chemioterapia in pazienti con tumori ormonoresponsivi⁸.

Uno studio prospettico ha valutato l'utilizzo di EP clin nelle pazienti con tumore ormonoresponsivo HER2 negativo a rischio intermedio, nella scelta di effettuare o meno la chemioterapia sulla base del test genomico. Un terzo delle 200 pazienti in studio aveva un alto EP clin score (HR=3.3 ricadute a distanza a 10 anni). 72% delle pazienti aveva ricevuto un cambiamento di terapia, con un 13% di recidive nel gruppo che aveva fatto la chemioterapia e un 17% di recidive nel gruppo che non aveva cambiato la terapia sulla base dell'EP clin score⁹.


3.4.3. Beneficio clinico

Il beneficio clinico di Endopredict concerne soprattutto la probabilità di predire le recidive tardive a distanza nei tumori ormonoresponsivi. Pertanto, è utile nella scelta della terapia ormonale oltre i 5 anni di trattamento. Inoltre, in un confronto diretto rispetto alle altre firme genomiche, risulta maggiormente prognostico in termini di recidive a distanza a 10 anni nelle pazienti a linfonodi negativi, ma anche in quelle con 1-3 linfonodi positivi. L'aumento del EP clin score correla con l'aumento delle recidive a distanza nelle pazienti con tumore mammario a recettori ormonali positivi e pertanto può essere utilizzato per ridurre questo rischio attraverso l'aggiunta della chemioterapia all'ormonoterapia. La scelta del trattamento, modulata sulla base dell'EP score nel gruppo di rischio clinico intermedio, incrementa la quota di pazienti che ricevono chemioterapia riducendo il rischio di recidive a distanza rispetto a chi non ha modificato tale trattamento.

Test	Indicazioni attuali (?)	Massimo livello di evidenza	Studi clinici Prospettici (Nome)
Endopredict	Early Breast Cancer con Linfonodi Negativi o Positivi (1-3) e Recettori Ormonali Positivi e HER2-negativo, sia Pre che in post-menopausa	Prospettica	UCBG 2-14 (2020)

Bibliografia

1. Filipits M, Rudas M, Jakesz R et al., A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. Clin Cancer Res. 2011;17(18):6012-20.
2. Dubsy P, Filipits M, Jakesz R, et al., EndoPredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in ER-positive, HER2-negative early breast cancer. Ann Oncol. 2013;24(3):640-7.
3. Varga Z, Sinn P, Fritzsche F, et al., Comparison of EndoPredict and Oncotype DX test results in hormone receptor positive invasive breast cancer. PLoS One. 2013;8(3):e58483.

- 
4. Buus R, Sestak I, Kronenwett R, et al., Comparison of EndoPredict and EPclin With Oncotype DX Recurrence Score for Prediction of Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(11).
 5. Dubsky P, Brase JC, Jakesz R, et al., The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients. *Br J Cancer.* 2013;109(12):2959-64
 6. Martin M, Brase JC, Calvo L, et al., Clinical validation of the EndoPredict test in node-positive, chemotherapy-treated ER+/HER2- breast cancer patients: results from the GEICAM 9906 trial. *Breast Cancer Res.* 2014;16(2):R38
 7. Sestak I, Buus R, Cuzick J et al., Comparison of the Performance of 6 Prognostic Signatures for Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2018;4(4):545-553
 8. Sestak I, Martín M, Dubsky P et al., Prediction of chemotherapy benefit by EndoPredict in patients with breast cancer who received adjuvant endocrine therapy plus chemotherapy or endocrine therapy alone. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;176(2):377-386
 9. Penault-Llorca F, Kwiatkowski F, Arnaud A et al. Decision of adjuvant chemotherapy in intermediate risk luminal breast cancer patients: A prospective multicenter trial assessing the clinical and psychological impact of EndoPredict® (EpClin) use (UCBG 2-14). *Breast.* 2020;49:132-140

3.5 Breast Cancer Index (BCI)

Il Breast Cancer Index (BCI) è un test molecolare che si basa sulla determinazione di 7 geni, di cui 5 sono correlati al ciclo cellulare e fanno parte del cosiddetto Molecular Grade Index (MGI) e 2 (HOXB13/IL17BR) forniscono un valore di ratio che tanto è maggiore, quanto più è alta la probabilità della paziente di recidivare/non rispondere all'ormonoterapia adiuvante.


Le due signatures, MGI e HOXB13/IL17BR (H/I) ratio, danno informazioni rispettivamente sulla proliferazione e sulla attivazione del pathway estrogenico e fanno parte di un algoritmo che consente di classificare le pazienti in gruppi ad alto e basso rischio di recidiva.^{1,2,3}

Gli studi di validazione hanno dimostrato che BCI nei tumori luminali è in grado di dare informazioni sia prognostiche che predittive.

MGI fornisce dati sulla proliferazione tumorale e ha un significato prognostico nei confronti dei tumori ER+ poiché quantifica il rischio di recidiva a distanza sia complessiva (anni 0-10), sia tardiva (anni 5-10).^{3,4,5} Il dato della H/I ratio, sviluppato in diversi studi indipendentemente da MGI, ha anche una valenza predittiva di beneficio nei confronti della terapia adiuvante estesa oltre i 5 anni.^{4,6,7} L'ultima edizione dell'AJCC 2018 prevede l'utilizzo di BCI nella stadiazione prognostica del tumore alla mammella e ribadisce che i tumori ER+/HER2- senza coinvolgimento linfonodale, se classificati a "basso rischio da BCI devono essere considerati nella stessa categoria dei tumori T1a-T1b indipendentemente dalla loro dimensione (Livello di evidenza II).⁸

3.5.1. Tipologia di popolazione

Il carcinoma mammario con recettori ormonali positivi è una patologia con un rischio di recidiva che persiste per almeno quindici anni dalla diagnosi.⁹ Il follow-up a lungo termine di alcuni studi di ormonoterapia adiuvante con inibitore dell'aromatasi up-front, inclusi lo studio ATAC e BIG 1-98, evidenziano un tasso di recidiva annuale di circa il 2% per anno, con più della metà delle recidive che avvengono dopo cinque anni di terapia ormonale.^{10,11,12} Alcuni trials internazionali (aTTom e



ATLAS) hanno dimostrato che il prolungamento del trattamento con tamoxifene adiuvante oltre i 5 anni, porta un beneficio in termini di sopravvivenza globale e libera da malattia.¹³ Gli studi con gli inibitori dell'aromatasi "extended", cioè proseguiti oltre il quinto anno, eventualmente come switch dopo terapia iniziale con tamoxifene, hanno dimostrato che il beneficio clinico è limitato ad un sottogruppo di pazienti sfavorevoli.^{14,15} Infatti, la prosecuzione della terapia ormonale oltre i cinque anni determina un incremento delle iatrogenicità, ad esempio sulla salute dell'osso, per cui occorre selezionare attentamente le pazienti a cui proporre la prosecuzione della terapia ormonale "extended", valutando attentamente il bilancio rischi/benefici.¹⁵ Pertanto, l'utilizzo del BCI consentirebbe una personalizzazione del trattamento, con una miglior selezione delle pazienti da destinare alla prosecuzione dell'ormonoterapia adiuvante oltre i cinque anni.

3.5.2. Studi clinici e beneficio clinico

Il BCI è stato validato grazie ad un'analisi retrospettiva condotta sullo studio Stockholm, che randomizzava pazienti con carcinoma mammario operato early stage (T < 30 mm, N0), ER positive, a ricevere tamoxifene adiuvante per 2-5 anni versus nessuna terapia adiuvante.¹⁶

MGI e H/I sono stati misurati utilizzando Real Time RT-PCR su 588 campioni tumorali di pazienti ER positivi, e hanno definito tre gruppi di rischio: basso, intermedio e alto. Tra i pazienti trattati con tamoxifene, più del 50% sono stati definiti "a basso rischio" secondo l'indice MGI + H/I; in questi pazienti il tasso di recidiva a distanza o morte a 10 anni è stato inferiore al 3%; il 23% di pazienti sono state classificate come pazienti "a rischio intermedio" e hanno avuto un tasso di recidiva a distanza a 10 anni del 16,9% e di morte del 13,8%; infine, nelle pazienti ad alto rischio (18%) il tasso di recidiva a distanza è stato del 16,3% e di morte dell'11%. La correlazione tra l'indice MGI e H/I e il rischio di recidiva a distanza e morte è stata evidenziata anche nella coorte di pazienti che hanno ricevuto placebo. In entrambi i gruppi il valore prognostico dell'indice MGI e H/I sono risultati indipendenti da dati clinico-patologici, quali diametro tumorale, grading, stato di ER o HER2.

Il valore prognostico di BCI è stato confrontato con la classificazione del rischio basata sui fattori clinico-patologici secondo le linee guida di St. Gallen. Tale classificazione pone una elevata percentuale di pazienti nella categoria a "rischio intermedio" di ricaduta, mentre il BCI ha consentito di ridurre questa fetta di pazienti, riclassificandone una parte nelle altre due categorie di rischio "basso" o "alto".¹⁷

Sgroi et al. hanno confrontato il valore prognostico del BCI sia sulla recidiva precoce (entro il quinto anno) che tardiva (dal quinto al decimo), con il valore prognostico dell'Oncotype DX e di un modello prognostico immunohistochimico (IHC4), effettuando un'analisi su 655 campioni tumorali di pazienti ER positivi e N0 arruolati nello studio ATAC.

Il rischio di recidiva precoce (0-5 anni) è risultato sovrapponibile, e pari circa al 2,6%, tra i pazienti "a basso rischio" e quelli "a rischio intermedio" secondo BCI e del 18% nei pazienti definiti "ad alto rischio". Per quanto riguarda il tasso di recidiva tardiva (5-10 anni), questo è stato sovrapponibile, e pari al 13,4%, nei gruppi di rischio "intermedio" e "alto", e del 3,5% nei pazienti "a basso rischio". Questi risultati suggeriscono la possibilità di raggruppare i pazienti in due categorie di rischio, omettendo quella del "rischio intermedio", sia per la recidiva precoce che per quella tardiva,



facilitando quindi la scelta del clinico rispetto alla scelta della terapia adiuvante.

Un confronto effettuato tra BCI, IHC4 e Oncotype DX ha dimostrato un valore prognostico sovrapponibile delle tre signature sulla recidiva precoce (BCI-L HR 2,77 [95% CI 1,63–4,70], LR- $\Delta\chi^2=15,42$, $p<0,0001$), mentre solo il BCI ha dimostrato una valenza prognostica sulle recidive tardive. (BCI-L HR 1,95 [95% CI 1,22–3,14], LR- $\Delta\chi^2=7,97$, $p=0,0048$; 21-gene recurrence score HR 1,13 [0,82–1,56], LR- $\Delta\chi^2=0,48$, $p=0,47$; IHC4 HR 1,30 [0,88–1,94], LR- $\Delta\chi^2=1,59$, $p=0,20$).¹⁸

Gli stessi autori hanno condotto uno studio retrospettivo disegnato come nested case-control su 83 campioni tumorali di pazienti ricadute, confrontati con 166 campioni tumorali di pazienti non ricadute, all'interno dello studio MA.17, che randomizzava pazienti con early breast cancer ER positive trattate con cinque anni di tamoxifene adiuvante, in postmenopausa, a ricevere terapia con letrozolo o placebo.¹⁹ Su questi campioni tumorali è stato calcolato il rapporto H/I; nei pazienti con elevato valore di H/I si è evidenziata una riduzione del rischio relativo di recidiva a 5 anni del 67% e una riduzione del rischio assoluto del 16.5% nella coorte che aveva assunto terapia con letrozolo in extended, rispetto al placebo (odds ratio [OR] = 0,35; 95% CI, 0,16-0,75; $p = 0,007$); le pazienti definite ad alto rischio da H/I hanno ottenuto un beneficio statisticamente significativo dalla terapia con letrozolo in extended (OR = 0,33; 95% CI, 0,15-0,73; $p = 0,006$), suggerendo quindi come un alto valore di H/I permetta di identificare un sottogruppo di pazienti che possa beneficiare della prosecuzione della terapia ormonale oltre i cinque anni⁴

Il valore prognostico del BCI è stato infine testato anche nelle pazienti con tumore mammario operato con linfonodi positivi: su 292 campioni tumorali di pazienti arruolati nello studio MA.14 è stato effettuato il BCI. Lo studio MA.14 ha randomizzato le pazienti ER positive, indipendentemente dallo stato linfonodale, a ricevere terapia adiuvante con tamoxifene o con tamoxifene associato ad otreotide LAR.²⁰

Il tasso di disease free survival a 10 anni è risultato dell'87,5% nei pazienti “a basso rischio” secondo BCI, dell'83,9% nei pazienti “a rischio intermedio” e del 74,7 % nei pazienti “ad alto rischio”.²¹ Anche in questo caso, i risultati sono risultati in accordo con quelli riportati in altri studi su pazienti N0.^{17,18,22}

È stato in seguito sviluppato un ulteriore profilo genico (**BCIN+**) che integra il BCI con le dimensioni tumorali e il grading. Il BCIN+ è stato validato su una casistica mono-istituzionale retrospettiva del Massachusetts General Hospital, che includeva 402 pazienti ER+ con 1-3 linfonodi positivi. Il BCIN+ ha identificato 81 pazienti a basso rischio con un tasso di recidiva a 15 anni dell'1,3% e 321 pazienti ad alto rischio, con un tasso di recidiva a 15 anni del 29%, selezionando quindi una sottopopolazione di pazienti pN1 a basso rischio di recidiva in cui la terapia ormonale in extended potrebbe essere eventualmente omessa.

I risultati di questi studi supportano il valore prognostico del BCI sia sulla recidiva precoce che tardiva e il valore predittivo sul beneficio della terapia ormonale in extended. Non esistono tuttavia evidenze prospettiche che validino l'utilizzo di BCI. Le più recenti linee guida ASCO e NCCN supportano l'utilizzo del BCI come test prognostico ma non come test predittivo.^{23,24,25}

Test	Indicazioni attuali (?)	Tipo di Evidenza (Retrospettiva/prospettiva)	Studi clinici Prospettivi
BCI	ER+/HER2-/N0 o N1	retrospettiva	nessuno

Bibliografia

1. Ma XJ, Salunga R, Dahiya S, Wang W, Carney E, Durbecq V, Harris A, Goss P, Sotiriou C, Erlander M and Sgroi D, A Five-Gene Molecular Grade Index and *HOXB13:IL17BR* Are Complementary Prognostic Factors in Early Stage Breast Cancer Clin Cancer Res May 1 2008 (14) (9) 2601-2608.
2. Jankowitz RC, Cooper K, Erlander MG, et al. Prognostic utility of the breast cancer index and comparison to Adjuvant! Online in a clinical case series of early breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2011;13(5):R98. Published 2011 Oct 14.
3. Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder BE, et al. Breast cancer index identifies early-stage estrogen receptor-positive breast cancer patients at risk for early- and late-distant recurrence. *Clin Cancer Res.* 2013;19(15):4196-4205.
4. Sgroi DC, Carney E, Zarrella E, et al. Prediction of late disease recurrence and extended adjuvant letrozole benefit by the *HOXB13/IL17BR* biomarker. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(14):1036-1042.
5. Bartlett JMS, Sgroi DC, Treuner K, et al. Breast Cancer Index and prediction of benefit from extended endocrine therapy in breast cancer patients treated in the Adjuvant Tamoxifen-To Offer More? (aTTom) trial. *Ann Oncol.* 2019;30(11):1776-1783.
6. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, Muir B, Mohapatra G, Salunga R, Tuggle JT, Tran Y, Tran D, Tassin A, Amon P, Wang W, Wang W, Enright E, Stecker K, Estepa-Sabal E, Smith B, Younger J, Balis U, Michaelson J, Bhan A, Habin K, Baer TM, Brugge J, Haber DA, Erlander MG, Sgroi DC. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen *Cancer Cell.* 2004 Jun;5(6):607-16.
7. Ma XJ, Hilsenbeck SG, Wang W, Ding L, Sgroi DC, Bender RA, Osborne CK, Allred DC, Erlander MG J The *HOXB13:IL17BR* Expression Index Is a Prognostic Factor in Early-Stage Breast Cancer *Clin Oncol.* 2006 Oct 1;24(28):4611-9.
8. Giuliano, A.E., Edge, S.B. & Hortobagyi, G.N. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* 25, 1783–1785 (2018).
9. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005; 365:1687–717.
10. Cuzick J, Sestak I, Baum M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol.* 2010; 11:1135–41.
11. Regan MM, Neven P, Giobbie-Hurder A, et al. Assessment of letrozole and tamoxifen alone and in sequence for postmenopausal women with steroid hormone receptor-positive breast cancer: the BIG 1-98 randomised clinical trial at 8. 1 years median follow-up. *Lancet Oncol.* 2011; 12:1101–8.
12. Forbes JF, Cuzick J, Buzdar A, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol.* 2008; 9:45–53.
13. Davies C, Pan H, Godwin J, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* 2013;381:805–16
14. Blok EJ, Kroep JR, Meershoek-Klein Kranenbarg E, et al. Relevant factors for the optimal duration of extended endocrine therapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2018;168(2):413–20

- 
15. Rossi L , McCartney A , De Santo I , Risi E , Moretti E , Malorni L , Biganzoli L , Di Leo A The optimal duration of adjuvant endocrine therapy in early luminal breast cancer: A concise review. *Cancer Treatment Reviews* 74 (2019) 29-34
 16. Rutqvist LE, Johansson H (2007) Long-term follow-up of the randomized Stockholm trial on adjuvant tamoxifen among postmenopausal patients with early stage breast cancer. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 46: 133 – 145
 17. Jerevall PL, Ma XJ, Li H, et al. Prognostic utility of HOXB13:IL17BR and molecular grade index in early-stage breast cancer patients from the Stockholm trial. *Br J Cancer*. 2011;104(11):1762-1769.
 18. Sgroi D. C., Sestak I, Cuzick J, Zhang Y, Schnabel C.A., Schroeder B., Erlander M.G., Dunbier Sidhu K., Lopez-Knowles E., Goss P.E., Dowsett M.. Prediction of late distant recurrence in patients with oestrogen-receptor-positive breast cancer: a prospective comparison of the breast-cancer index (BCI) assay, 21-gene recurrence score, and IHC4 in the TransATAC study population. *Lancet Oncol* 2013; 14: 1067–76
 19. Goss PE, Ingle JN, Martino S, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med*. 2003;349:1793–1802
 20. Pritchard KI, Shepherd LE, Chapman JA, Norris BD, Cantin J, Goss PE, et al. Randomized trial of tamoxifen versus combined tamoxifen and octreotide LAR therapy in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer in postmenopausal women: NCIC CTG MA.14. *J Clin Oncol*. 2011;29:3869–76
 21. Sgroi DC, Chapman JA, Badovinac-Crnjevic T, et al. Assessment of the prognostic and predictive utility of the Breast Cancer Index (BCI): an NCIC CTG MA.14 study. *Breast Cancer Res*. 2016;18(1):1. Published 2016 Jan 4.
 22. Habel LA, Sakoda LC, Achacoso N, Ma XJ, Erlander MG, Sgroi DC, et al. HOXB13:IL17BR and molecular grade index and risk of breast cancer death among patients with lymph node-negative invasive disease. *Breast Cancer Res*. 2013;15:R24
 23. Goetz MP, Gradishar WJ, Anderson BO, et al. NCCN guidelines insights: breast cancer, version 3.2018. *J Natl Compr Canc Netw* 2019; 17:118-26
 24. National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology: breast cancer, version 4.2020. May 8, 2020. Available at: [https:// www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx). Accessed: May 17, 2020.
 25. Kittaneh M, Badve S, Caldera H, Coleman R, Goetz MP, Mahtani R, Mamounas E, Kalinsky K, Lower E, Pegram M, Press MF, Rugo HS, Schwartzberg L, Traina T, Vogel C Case-Based Review and Clinical Guidance on the Use of Genomic Assays for Early-Stage Breast Cancer: Breast Cancer Therapy Expert Group (BCTEG). *Clin Breast Cancer*. 2020 Jan 8. pii: S1526-8209(20)30004-5.

4. Utilità clinica vs validità clinica e accessibilità nel mondo e nelle regioni italiane

Il semplice fatto che un test sia commercializzato come un "test per una neoplasia" non indica che esso sia clinicamente utile.

Ad esempio, sebbene sia vero che un clinico potrebbe utilizzare alcuni dei test comunemente inclusi in un profilo multigenico tumorale eseguito in NGS (come le mutazioni di EGFR e ALK in un paziente con carcinoma polmonare), non è chiaro che lo stesso specialista vorrebbe conoscere o che sappia utilizzare i risultati degli altri test forniti nell'ambito del pannello eseguito. Inoltre, sebbene il test multigenico sia in grado, attraverso la profilazione genica di discernere i pazienti con una prognosi peggiore, se queste informazioni non servono a migliorare l'esito di questi pazienti, la firma molecolare potrebbe essere di fatto considerata come non clinicamente utile.



A livello generale, vi sono alcuni importanti credenziali che vanno richieste ad un test diagnostico:

- a) **la validità analitica**, che implica che il test per il biomarcatore è tecnicamente accurato (in termini di specificità e sensibilità) e riproducibile;
- b) **la validità clinica**, il che implica che il marcatore analizzato divide un gruppo di soggetti in due o più sottoclassi, i cui risultati clinici differiscono;
- c) **l'utilità clinica**, che implica che, in uno specifico conteso clinico, sono stabiliti alti livelli di evidenza che dimostrano che l'applicazione del test migliora gli esiti clinici rispetto al non conoscerne i risultati.


Esistono molti esempi di test di singoli biomarcatori con comprovata utilità clinica, come:

- a) la sovra-espressione di HER2, per selezionare pazienti per il trattamento con trastuzumab nel carcinoma mammario o gastrico
- b) la presenza di mutazione BRAF V600E per selezionare per il trattamento con specifici inibitori nel melanoma
- c) le mutazioni di ALK per identificare i pazienti idonei al trattamento con specifici inibitori nel polmone
- d) le mutazioni di EGFR per selezionare i pazienti candidati all'uso di specifici inibitori nel carcinoma polmonare.

Esistono anche diversi esempi di test che analizzano firme (signatures) multiparametriche in grado di fornire informazioni utili per guidare i percorsi di cura dei malati di cancro. Ad esempio, i test OncotypeDx, PAM50/Prosigna Breast Cancer Index, ed EndoPredict sembrano identificare una popolazione di pazienti con carcinoma mammario ER-positivo, linfonodo-negativo, la cui prognosi è così favorevole da poter tranquillamente evitare la chemioterapia adiuvante che, prima della disponibilità di questi test, era precedentemente applicata alla maggior parte di tale categoria di pazienti. Il successo di questi particolari test è anche dipeso dal processo di sviluppo delle piattaforme tecnologiche su cui erano stati messi a punto, ma il cui miglioramento è dipeso fortemente dalla correlazione con gli esiti clinici pertinenti (buona prognosi senza chemioterapia), valutata retrospettivamente e poi prospetticamente, con l'obiettivo di determinarne l'utilità clinica.

Contrariamente a questo tipo di approccio, molti pannelli commerciali sul rischio di cancro sono stati sviluppati sulla base della conoscenza della biologia del cancro stesso e della tecnologia analitica in grado di tirar fuori dal contesto dei dati mutazionali o di espressione, piuttosto che sulla capacità di influenzare gli esiti clinici. Sebbene possano essere eseguiti in laboratori con certificazione di qualità, con eccellente affidabilità analitica e con indicazioni circa una potenziale validità clinica, raramente viene messa alla prova l'utilità clinica del test effettuato. Ad esempio, l'identificazione di mutazioni germinali in noti geni di suscettibilità al cancro, come *BRCA1* e *BRCA2*, *PTEN* e *p53*, quando applicata razionalmente alle famiglie la cui storia medica suggerisce una sindrome familiare del cancro, è utile per fornire consulenza, stratificare il rischio e avviare procedure di tipo preventivo o profilattico.

Tuttavia, i panel di rischio genomico recentemente commercializzati forniscono oltre a questi test di rischio, anche altre analisi genetiche germinali per pazienti in cui è assente una anamnesi indicativa di rischio familiare. Questi panel hanno pochi o addirittura nessun dato a supporto della validità ed utilità clinica. La stessa preoccupazione si applica ad alcuni prodotti commerciali di profilazione del



tumore, che si sforzano di estendere l'uso di biomarcatori sia convalidati che non convalidati su più tipi di tumore con l'assunto tacito che se un farmaco mirato funziona in un contesto (come il cancro del polmone) che contiene quell'alterazione molecolare, funzionerà (in modo surrogato in altri (come carcinoma della mammella o del colon). Al momento, però, e con qualche eccezione, come gli inibitori di PARP, questo presupposto è lontano dall'essere provato con qualsiasi livello di evidenza (*Genome Medicine in Cancer: What's in a Name? Schott AF, Perou CM, Hayes DF. Cancer Res 2015 15;75(10):1930-5*).

Nella valutazione del possibile inserimento di un test molecolare nei LEA è necessario valutarne l'affidabilità, che si traduce in efficacia, in termini di validità clinica e di utilità clinica, termini che non possono essere considerati quali sinonimi.

Infatti, la “validità clinica” è definita, nel nostro ambito di valutazione come “Abilità di un test di identificare o predire un endpoint di sopravvivenza”, mentre l’“utilità clinica”, è definita come “Abilità di un test di guidare una decisione terapeutica e di migliorare l’outcome di salute¹ (nel carcinoma mammario operabile)”.

La validità clinica e la utilità clinica rappresentano ambiti diversi e presuppongono una validazione prospettica.

Se infatti la validità clinica può avvenire come validazione interna, per esempio nell’ambito di uno studio clinico, la validazione clinica dell’utilità clinica deve avvenire nell’ambito della dimostrazione prospettica di un valore aggiunto nello specifico ambito decisionale e considerando la disponibilità di fattori prognostici e predittivi e di algoritmi presenti sul WEB. Ad esempio, è facile comprendere come non esista al momento un algoritmo in grado di sostituire la determinazione di HER2.

Una recente review sistematica francese affronta il tema in termini proprio di validità ed utilità.

In questo studio, le principali obiezioni poste allo studio TAILORx in termini di validazione della clinical Utility del test Oncotype DX recurrence score sono:

- a) la popolazione analizzata a rischio molto basso di recidiva;
- b) le ripetute modifiche nelle soglie fra i diversi livelli di rischio;
- c) la non comparazione con gli algoritmi predittivi più avanzati.

Endopredict si basa su dati molto interessanti ma retrospettivi. Non sono disponibili dati prospettici in termini di clinical utility.

PAM50/Prosigna ha dati molto interessanti ma in chiave retrospettiva. Non sono disponibili dati prospettici in termini di clinical utility².

La problematica di impiego dei test di espressione genica nell’early breast cancer ha prodotto raccomandazioni di cui è necessario tenere conto.

Raccomandazioni NICE (19 /12/2018) www.nice.org.uk/guidance/dg34

Endopredict, Oncotype DX Breast Recurrence score e Prosigna sono raccomandati come opzioni per guidare le decisioni sulla CT adiuvante per pazienti ER+ HER2- LN-(includendo la malattia micro metastatica nell’early breast cancer solo nel caso in cui vi sia un rischio intermedio di recidiva adistanza come PREDICT o il Nottingham Prognostic Index, se le informazioni provviste portino a decisioni che considerino le preferenze delle pazienti, se le company accettino lo sconto richiesto dal

NHS, se i dati siano resi disponibili ad NCRAS.

MammaPrint non è raccomandato per guidare decisioni sulla CT adiuvante in pazienti ER positive, HER2 negative e LN-negativi con early breast cancer perché considerato non costo-efficace.

IHC4+C non è raccomandato per guidare decisioni sulla CT adiuvante in pazienti ER positive, HER2 negative e LN-negativi con early breast cancer perché di incerta validità analitica.

Recentemente, il Breast Cancer Therapy Expert Group (BCTEG) [*Muaiad Kittaneh et al. Clin Breast Cancer 2020*], ha pubblicato una revisione accurata sui test molecolari di profilazione proposti dal mercato, le cui differenze in termini prognostici e predittivi sono aggiornati alle evidenze del 2020. Tale lavoro sottolinea come i test disponibili si differenziano per il tipo di informazioni che forniscono e per le popolazioni di pazienti e di studi clinici condotti per convalidarli.

Inoltre, dall'expert panel del BCTEG sono state fornite, riguardo l'impiego di test genomici nel tumore mammario, le seguenti indicazioni.

- a) I test di espressione genica sono generalmente indicati solo in pazienti con carcinoma mammario con recettori-positivi (ER+ /PgR+) e HER2 negativo e in quelli con un massimo di 3 linfonodi positivi.
- b) I test di espressione genica in genere non devono essere eseguiti su pazienti con carcinoma mammario con recettori ormonali negativi, o con più di 3 linfonodi positivi o con positività HER2 o con tumori tripli negativi (TNBC) al di fuori del contesto di una sperimentazione clinica.
- c) I test di espressione genica in genere non devono essere eseguiti in pazienti con carcinoma mammario per le quali i risultati dei test non influenzano il corso del trattamento.
- d) È importante sottolineare che né le linee guida ASCO né NCCN attualmente implicano la superiorità di un test di espressione genica su un altro.
- e) Si prevede una discordanza tra i test di espressione genica disponibili poiché i diversi test sono stati sviluppati e validati su una gamma varia di popolazione di pazienti e contesti di trattamento; l'esecuzione di più di un test genomico su una paziente deve essere evitata, poiché potrebbero verificarsi incertezze nell'assegnazione del rischio di ripresa.

Lo scenario applicabile alle donne in giovane età (40 anni), con carcinoma mammario pN+ , G2 (T2/N1), ER+, e HER2-, risulta essere il seguente:

Test	Applicabilità	Tipo di Evidenza (Trials prospettici)
MammaPrint	++	Prospettica (MINDACT)
Oncotype DX	+	Prospettica (WSG PLaNB)
Prosigna (PAM50)	+	Retrospettiva
EndoPredict	+	Retrospettiva

Tabella mod. da *M. Kittaneh et al.; Clinical Breast Cancer 2020*

Accessibilità ai test in Italia

In Italia esistono differenze tra le varie regioni nell'accessibilità ai test di espressione genica nell'early breast cancer.

A luglio 2019 la Regione Lombardia (Delibera N. 11/1986 seduta del 23/07/2019) ha deliberato i seguenti criteri di accesso al test.

“Pazienti con carcinoma della mammella endocrino responsivo in stadio precoce considerate a rischio intermedio per le quali il clinico potrebbe porre una indicazione a chemioterapia adiuvante. Vengono, pertanto escluse dalla possibilità di effettuare il test gratuitamente tutte le pazienti a basso rischio, per le quali è indicata la sola ormonoterapia, e ad alto rischio per le quali è indicata l'associazione ormono-terapia-chemioterapia. Le pazienti a basso rischio sono definite in base alle caratteristiche descritte nella tabella seguente:

Basso Rischio	Alto Rischio
Almeno 4 delle seguenti caratteristiche	Almeno 4 delle seguenti caratteristiche
G1	G3
T1 (a-b)	T3 T4
Ki67<15%,	Ki67 >30%
ER>80%	ER<30%
N Negativo	N positivo


Erogabilità del test e compartecipazione alla spesa. Alle pazienti residenti in Lombardia con le caratteristiche sopra declinate, è garantito l'accesso al test seguendo le regole della compartecipazione alla spesa vigenti (ticket). Alle pazienti non residenti in Lombardia, la prestazione può essere erogata a carico del Servizio Sanitario della Regione di appartenenza qualora l'Azienda Sanitaria di residenza accetti preventivamente l'addebito, ovvero previa accettazione della paziente che l'onere sia posto a suo totale carico.

Bibliografia

1. Teutsch SM, Bradley LA, Palomaki GE, et al. The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group Genet Med. 2009 Jan;11(1):3-14. doi: 10.1097/GIM.0b013e318184137c.PMID: 18813139)
2. Alexandre M, Maran-Gonzalez A, Viala M, et al. Decision of Adjuvant Systemic Treatment in HR+ HER2- Early Invasive Breast Cancer: Which Biomarkers Could Help?Cancer Manag Res. 2019 Dec 11;11:10353-10373. doi: 10.2147/CMAR.S221676. eCollection 2019.PMID: 31849525

5. *Materiale biologico e requisiti per l'analisi molecolare*

I test di analisi dei profili di espressione genica valutano i campioni tumorali al fine di determinare l'attività dei geni in esame per predire il comportamento biologico delle neoplasie. È, quindi, requisito indispensabile che l'analisi venga svolta su un campione tumorale rappresentativo della neoplasia che contenga un sufficiente numero e percentuale di cellule neoplastiche. Tutti i test di questa categoria



hanno come obiettivo l'analisi delle molecole di mRNA derivate dai geni oggetto dell'analisi.

Il processo sperimentale prevede: 1) estrazione dell'RNA dal tessuto tumorale selezionato; 2) retrotrascrizione delle molecole di RNA per ottenere filamenti di cDNA complementari; 3) amplificazione e caratterizzazione dei filamenti di cDNA ottenuti.

Questo approccio è comune alla maggior parte dei test di profilazione genomica, anche se adottano strategie di analisi differenti (RT-PCR: B.C.I., ENDOPREDICT, ONCOTYPE DX; NGS-Illumina: MAMAMPRINT). Fa differenza l'approccio metodologico adottato da PROSIGNA, per il quale è utilizzata una tecnologia alternativa che permette la caratterizzazione diretta delle molecole di mRNA estratte dal tessuto tumorale (N-COUNTER, Nanostring).

Tutti i test si effettuano su tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE), pertanto i trattamenti preanalitici sono di fondamentale importanza per la fattibilità ed attendibilità del test. Di seguito sono specificati i requisiti del materiale biologico necessario e le caratteristiche di analisi di ogni singolo test.

BREAST CANCER INDEX

Il Breast Cancer Index test viene effettuato in laboratorio centralizzato (BioTheragnostics, San Diego, CA, USA) valutando l'espressione di 7 geni con tecnica RT-PCR. Il test si esegue su tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE). Non sono ammessi tessuti trattati con fissativi alternativi.

È necessario mettere a disposizione l'inclusione in paraffina maggiormente rappresentativa della malattia o, in alternativa, 3-4 sezioni non colorate di 10 µm di spessore montate su vetrini ed un corrispondente vetrino istologico colorato in ematossilina-eosina. Il materiale istologico deve essere valutato dall'anatomopatologo e deve contenere almeno il 40% di cellule neoplastiche invasive. Il test è effettuato sul tessuto neoplastico preferenzialmente derivante da resezione chirurgica o biopsia escissionale, ma è anche effettuabile su "core needle biopsy".


- Tessuto neoplastico che non ha ricevuto precedenti trattamenti antineoplastici
- Il test è stato validato in popolazioni pre- e post-menopausa

Il test non ha approvazione U.S. Food and Drug Administration e non ha marchio CE-IVD

ENDOPREDICT

Endopredict viene effettuato presso i Laboratori Myriad Genetic (Svizzera e Stati Uniti), ma può essere anche effettuato in Laboratori istituzionali accreditati. Il test valuta 12 geni (8 per la firma genetica, 3 per la normalizzazione dell'analisi ed 1 gene di controllo) attraverso tecnica RT-PCR e si esegue su tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE).

È necessario mettere a disposizione l'inclusione in paraffina maggiormente rappresentativa della malattia o, in alternativa, 2 sezioni non colorate di 10 µm di spessore montate su vetrini ed un corrispondente vetrino istologico colorato in ematossilina-eosina. Il materiale istologico deve essere valutato dall'anatomopatologo e deve contenere almeno il 30% di cellule neoplastiche invasive. In caso di tessuto bioptico, è raccomandata una proporzione di cellule tumorali infiltranti pari almeno al 50%. La sezione istologica colorata in ematossilina-eosina serve per effettuare una macrodissezione del tessuto al fine di massimizzare la componente infiltrante dalla quale verrà estratto l'RNA. Il test è



effettuato sul tessuto neoplastico preferenzialmente derivante da resezione chirurgica o biopsia escissionale ma è anche effettuabile su “core needle biopsy”.

Il test ha marchio CE-IVD; non ha approvazione dalla U.S. Food and Drug Administration.

MAMMAPRINT

MammaPrint viene effettuato in laboratorio centralizzato (Agendia’s central laboratory, Amsterdam, Netherlands) valutando l’espressione di 70 geni su piattaforma NGS illumina. Il test si effettua su tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE).

È necessario mettere a disposizione l’inclusione in paraffina maggiormente rappresentativa della malattia (è specificato che l’inclusione non dovrebbe avere più di 5 anni) o, in alternativa, 10 sezioni non colorate di 5 µm di spessore montate su vetrini ed un corrispondente vetrino istologico colorato in ematossilina-eosina. Il materiale istologico deve essere valutato dall’anatomopatologo e deve contenere almeno il 30% di cellule neoplastiche invasive. La sezione istologica colorata in ematossilina-eosina serve per effettuare una macrodissezione del tessuto al fine di massimizzare la componente infiltrante dalla quale verrà estratto l’RNA. Il test si effettua sul tessuto neoplastico derivante da resezione chirurgica o biopsia escissionale.

Il test ha approvazione U.S. Food and Drug Administration e ha marchio CE-IVD

ONCOTYPE DX

Oncotype DX viene effettuato in laboratorio centralizzato (Genomic Health Inc.’s Central Testing Lab) valutando l’espressione di 21 geni (16 per la firma genetica, 5 di controllo) con tecnica RT-PCR. Il test si esegue su tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE).

È necessario mettere a disposizione l’inclusione in paraffina maggiormente rappresentativa della malattia o, in alternativa, 15 sezioni non colorate di 5 µm di spessore montate su vetrini. Il materiale istologico deve essere selezionato dall’anatomopatologo e deve contenere la porzione di neoplasia con il grado di differenziazione più alto. Il test si effettua sul tessuto neoplastico derivante da resezione chirurgica o biopsia escissionale.

Il test non ha approvazione U.S. Food and Drug Administration e non ha marchio CE-IVD

PROSIGNA

PROSIGNA viene effettuato presso Laboratori istituzionali accreditati. Il test valuta 55 geni (50 per la firma genetica, 5 per la normalizzazione) con tecnica N-Counter, Nanostring. Il test si esegue su tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE).

Sono necessarie 1-6 sezioni non colorate di 10 µm di spessore montate su vetrini ed un corrispondente vetrino istologico colorato in ematossilina-eosina. Il materiale istologico deve essere valutato dall’anatomopatologo e deve contenere almeno il 10% di cellule neoplastiche invasive. La sezione istologica colorata in ematossilina-eosina serve per effettuare una macrodissezione del tessuto al fine di massimizzare la componente infiltrante dalla quale verrà estratto l’RNA. Il test è effettuato sul tessuto neoplastico derivante da resezione chirurgica o biopsia escissionale.

Il test è approvato dalla U.S. Food and Drug Administration e ha marchio CE-IVD.

Caratteristiche dei test multigenici per il carcinoma mammario

	B. C. I.	Endopredict	Mammaprint	Oncotype Dx	Prosigna
Numero di geni valutati	7	12 (8+4)	70	21 (16+5)	55 (50+5)
Effettuabile in laboratorio centralizzato	Si	Si	Si	Si	No
Effettuabile in laboratori Istituzionali	No	Si	No	No	Si
Certificazione FDA	No	No	Si	No	Si
Certificazione CE-IVD	No	Si	Si	No	Si
Definizione del sottotipo molecolare	No	No	No	No	Si
Definizione del rischio di recidiva	Si	Si	Si	Si	Si
Metodo di indagine	RT-PCR	RT-PCR	NGS-Illumina	RT-PCR	N-Counter
Approccio metodologico diretto al RNA	No	No	No	No	Si
Algoritmo GEP + dati patologici	Si	Si	No	No	Si

Conclusioni:

La personalizzazione dell'iter terapeutico e la possibilità di selezionare le pazienti che necessitano e beneficiano del trattamento chemioterapico è un obiettivo condiviso e perseguito come razionale da tutti i test di profilazione genica qui riportati. I limiti che derivano dalla maggior parte dei test noti dipendono dalla tipologia di disegno statistico degli studi condotti (spesso retrospettivi e non adeguatamente validati in studi prospettici) e dall'assenza di caratteristiche omogenee per l'identificazione delle pazienti candidate (rispetto ad esempio allo stato linfonodale). Inoltre nessuna firma genomica può sostituirsi alla valutazione clinica del medico orientata a parametri oggettivabili e clinico-patologici: età, Ki-67, grading, stato recettoriale (inteso come esatta percentuale) e non ultimo, la volontà della paziente.

In attesa di ulteriori risultati di studi clinici prospettici e randomizzati, come per esempio il RxPONDER, l'uso dei profili di espressione genica a supporto della decisione terapeutica adiuvante dovrebbe essere riservato alle pazienti in menopausa che sarebbero ipoteticamente entrate nelle casistiche degli studi prospettici di validazione del test prescritto, quindi per Oncotype Dx stadio I e II con pT massimo di 3 cm e per Mammaprint pT massimo di 5 cm e numero massimo di linfonodi metastatici pari a 3.

In conclusione, i test di espressione genica sono sicuramente un ausilio valido nel decision making per la pianificazione terapeutica nelle condizioni indicate dalla Conferenza di San Gallen 2019, pur non essendone dimostrata in maniera inconfutabile la Clinical Utility e con le sostanziali differenze fra i test stessi. Rientrano quindi a discrezione del clinico nel processo decisionale ma non sostituiscono gli altri strumenti di decisione in una delicata fase di scelta da effettuare della pienza della autonomia legata alla piena informazione nella moderna vision dell'alleanza terapeutica.