



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE ONCOLOGICHE E
GASTROENTEROLOGICHE

Direttore: Prof. Fabio Farinati

ONCOLOGIA 2 – ISTITUTO ONCOLOGICO VENETO I.R.C.C.S. PADOVA

Direttore: Prof.ssa Guarneri Valentina

TESI DI LAUREA

**Valutazione dell'eterogeneità clinica ed immunologica in sottotipi
emergenti di carcinoma mammario: focus sulle categorie HER2-
low-positive ed ER-low-positive.**

Relatore: Prof.ssa Guarneri Valentina

Correlatori: Dott.ssa Miglietta Federica

Laureando: Alessandro Zamberlan

Anno accademico 2021/2022

INDICE

1. Introduzione	pag. 1
1.1 Epidemiologia	pag. 1
1.2 Classificazione	pag. 2
1.3 Principi di trattamento	pag. 5
1.4 Categorie emergenti	pag. 9
1.5 Sistema immunitario e tumore	pag. 18
1.6 Evoluzione biologica del BC durante l'evoluzione della malattia: focus sull'evoluzione tra malattia primitiva e metastatica	pag. 25
2. Scopo dello studio	pag. 28
3. Materiali e metodi	pag. 29
3.1 Popolazione	pag. 29
3.2 Patologia	pag. 29
3.3 Valutazione TILs	pag.29
3.4 Analisi statistiche	pag. 30
4. Risultati	pag. 31
4.1 Caratteristiche popolazione generale	pag. 31
4.2 Fenotipo carcinoma mammario a livello di tumore primitivo e metastatico	pag. 33
4.3 Conversione fenotipica da BC primitivo a metastatico	pag. 35
4.4 Landscape clinica	pag. 36
4.5 Landscape immunitaria.	pag. 40
4.6 Analisi di sopravvivenza	pag. 42
4.7 Conversione ER: Focus su pazienti con BC primitivo ER+ (ponendo il focus su coorte HER2-negativa)	pag. 45
5 Discussione	pag. 48
7. Conclusione	pag. 55
8. Bibliografia	pag. 56

Riassunto

Sfondo: Il carcinoma mammario è tradizionalmente classificato sulla base della dicotomia di recettori ormonali positivi/negativi e stato di HER2 positivo/negativo. Tuttavia, negli ultimi tempi si sta assistendo ad un sempre più acceso interesse nei confronti delle due nuove categorie emergenti di BC: HER2-low-positive ed ER-low-positive, caratterizzati, rispettivamente, da bassi livelli di espressione di HER2 e del recettore ormonale per l'estrogeno. Nei confronti di HER2-low-positive, l'interesse è principalmente guidato dai significativi risultati di attività antitumorale e di efficacia ottenuti tramite l'utilizzo di agenti anti-HER2 nei confronti di questa categoria, destinati a modificare l'algoritmo terapeutico del carcinoma mammario metastatico (MBC). Per quanto riguarda ER-low-positive invece, il quale formalmente viene inglobato nella categoria a recettori ormonali positivi, differenti studi hanno esplorato lo scenario clinico-biologico suggerendo come siano presenti caratteristiche che lo accomunano maggiormente al sottotipo ER-negativo. Lo scopo principale del presente lavoro è quello di esplorare l'eterogeneità clinica, biologica ed immunologica delle nuove categorie emergenti HER2-low-positive ed ER-low-positive.

Metodi: il presente studio rappresenta un'analisi retrospettiva monocentrica di pazienti con MBC sottoposte a biopsia di ricaratterizzazione di un sito metastatico, seguite presso l'UOC di Oncologia 2 dello I.O.V. di Padova. Lo stato HER2 è stato considerato: positivo (score immunoistochimico [IHC] 3+/amplificato in FISH), HER2-low-positive (IHC score 1+/ 2+ ISH-negativa) ed HER2-0 (IHC score 0). Per quanto riguarda lo stato di ER, esso è stato classificato come: positivo, ER-low-positive o ER-negativo in caso di espressione $\geq 10\%$, compresa tra 1% e 9% e = 0%, rispettivamente.

Risultati: Lo studio ha incluso 483 pazienti, di cui l'85.5% con malattia avanzata e 14.5% con recidiva locoregionale isolata. Dal punto di vista fenotipico, il sottotipo prevalente è risultato essere ER+/HER2-low-positive (29.8% nella malattia primitiva; 28% nella malattia metastatica) ed i più rari ER-low-positive/HER2-low-positive e ER-low-positive/HER2+ (ER-low-positive/HER2-low-positive, [1,2%] ed ER-low-positive/HER2+ [1,2%] nella malattia primitiva; ER-low-positive/HER2-low-positive, [1,7%] ed ER-low-positive/HER2+ [1,7%] nella metastatica). L'espressione di ER e di HER2 sono risultate essere significativamente associate, con casi ER+ che hanno arricchito la coorte HER2-

low-positive ($p=0,008$) e casi HER2-0 che hanno arricchito le coorti ER-low-positive ed ER-0 ($p=0.007$). Abbiamo inoltre osservato maggiore affinità in termini di caratteristiche cliniche ed immunologiche tra sottotipo ER-low-positive (HER2-low-positive /HER2-0) e sottotipo puramente triplo-negativo rispetto al sottotipo francamente ER+. Viceversa non abbiamo osservato peculiarità cliniche od immunologiche della categoria HER2-low-positive rispetto alla categoria HER2-0. L'analisi dell'evoluzione fenotipica tra malattia primitiva e malattia avanzata ha permesso di catturare un arricchimento della corte ER-0 (11%) a scapito della corte ER-positiva, e la conversione da fenotipo ER+ a ER-low-positive o ER-0 è risultato avere un impatto prognostico negativo.

Conclusioni: Abbiamo osservato come la malattia ER-low-positive sia biologicamente-immunologicamente-clinicamente molto più simile al sottotipo ER-0 rispetto che ad ER+. Inoltre è risultato come una conversione verso la categoria ER-low-positive da parte di un BC primariamente ER+ sia prognosticamente infausta, similmente a quanto avviene per la conversione a fenotipo puramente TN. Per quanto riguarda HER2 i dati non supportano la categoria HER2-low-positive come distinta dal punto di vista clinico-biologico-immunitario ma permettono di farla emergere come categoria “di convenienza” dal punto di vista terapeutico.

Abstract

Background: Breast cancer is traditionally classified on the basis of the dichotomy of positive/negative hormone receptors and positive/negative HER2 status. However, in recent times there has been an increasing interest in new emerging categories of BC: HER2-low-positive and ER-low-positive, characterized, respectively, by low expression levels of HER2 and estrogen receptor. With regard to HER2-low-positive, the interest is mainly driven by the significant results of antitumor activity and efficacy of novel anti-HER2 agents demonstrated in the context of clinical trials, intended to revolutionize the therapeutic algorithm of HER2-negative metastatic breast cancer (MBC). As for ER-low-positive, this category is formally incorporated into hormone receptor positive subtype, however, different studies exploring the clinical-biological scenario, overall suggested a higher biological and clinical affinity with triple-negative subtypes rather than hormone-receptor positive subgroup. The main purpose of this paper is to explore the clinical, biological and immunological heterogeneity of the emerging HER2-low-positive and ER-low-positive categories in MBC.

Methods: the present study represents a monocentric retrospective analysis of patients with MBC undergoing a biopsy of a metastatic site at the UOC of Oncology 2 of the I.O.V. of Padova. HER2 status was considered: positive (immunohistochemical [IHC] score 3+/amplified in FISH), HER2-low-positive (IHC score 1+/ 2+ ISH-negative) and HER2-0 (IHC score 0). ER was classified as: positive, ER-low-positive or ER-negative in case of expression 10%, between 1% and 9% and = 0%, respectively.

Results: The study included 483 patients, of whom 85.5% with advanced disease and 14.5% with isolated locoregional recurrence. Phenotypically, the predominant subtype was ER+/HER2-low-positive (29.8% in primary disease; 28% in metastatic disease) and the rarest ER-low-positive/HER2-low-positive (1.2% in primary BC; 1.7% in MBC) and ER-low-positive/HER2+ (1.2% in primary disease; 1.7% in metastatic). A significant association was observed between ER and HER2 expression, with ER+ cases enriching the HER2-low-positive cohort ($p=0.008$) and HER2-0 cases enriching the ER-low-positive and ER-0 cohorts ($p=0.007$). We also observed a greater affinity in terms of clinical and immunological characteristics between ER-low-positive subtype (either HER2-low-positive or HER2-0) and purely triple-negative subtype as compared to the subgroup frankly ER+.

Conversely, HER2-low-positive category did not show any clinical or immunological peculiarity as compared to the HER2-0 category. The analysis of the phenotypic evolution between primary BC and advanced disease allowed us to capture an enrichment of ER-0 cases (11%) at the expense of ER-positive cohort, and the conversion from ER+ to ER-low-positive or ER-0 phenotype was found to have a significant negative prognostic impact.

Conclusion: We observed that ER-low-positive disease is biologically-immunologically-clinically more akin to the ER-0 than ER+ subtype. In addition, we observed that patients exhibiting a phenotypic conversion from ER+ to ER-low-positive category during disease evolution experienced poorer outcome as compared to those with stable ER+ disease. As for HER2, our data support the notion that the category HER2-low-positive does not represent a distinct biological and clinical entity, thus emerging as a category of "convenience" from a therapeutic point of view.

1. Introduzione

1.1 Epidemiologia

Il carcinoma mammario (*Breast Cancer* BC) rappresenta il tumore solido più frequentemente diagnosticato nelle donne in tutto il mondo, rappresentando ad oggi il 25% di tutti i tumori maligni diagnosticati nel sesso femminile e giustificando 2,3 milioni di nuove diagnosi di neoplasia. Considerando le frequenze nelle varie fasce d'età, i BC rappresentano i tumori più frequentemente diagnosticati tra le donne sia nella fascia d'età 0-49 anni (41%), sia nella classe d'età 50-69 anni (35%), sia in quella più anziana +70 anni (22%).

Risulta inoltre essere la principale causa neoplastica di morte nel sesso femminile rappresentando circa il 15% dei decessi totali (responsabile di 685.000 decessi)¹.

1.1.1 In Italia

In Italia, circa una donna su tre con diagnosi di tumore è affetta da una neoplasia mammaria. Nel 2020 il numero stimato di nuove diagnosi di BC ammonta a 55.000 casi mentre i decessi ad esso correlato 12.3002. Si conferma, inoltre, una diminuzione della mortalità per BC (meno 6% dal 2015 al 2020), da attribuire sia alla maggiore diffusione dei programmi di diagnosi precoce sia ai progressi terapeutici².

L'incidenza del BC è progressivamente aumentata negli ultimi decenni (+0,3% per anno). In particolare, in Italia si è osservato un incremento del +2,0% tra il 2008 e il 2016, con l'incremento relativo più alto nella fascia di età più giovane (+1,6% 0-49; +0,7% 50-69; +0,8% 70+). Questo riflette, almeno in parte, la più ampia attuazione delle strategie di prevenzione secondaria attraverso un programma di screening organizzato in tutte le regioni italiane².

1.1.2 Sopravvivenza

Come già accennato, negli ultimi decenni i tassi di sopravvivenza del BC sono progressivamente migliorati grazie a due fenomeni in particolare: (I) attuazione e partecipazione da parte della popolazione ai programmi di screening organizzati a livello nazionale al fine di attuare una diagnosi precoce; (II) importante sviluppo di nuove strategie terapeutiche sia sistemiche che locoregionali.

In Italia, il tasso di sopravvivenza a 5 anni delle donne con BC, non selezionate per stadio né biologia, è, attualmente, pari a circa l'87%²

1.2 Classificazione

Il BC è una malattia eterogenea dal punto di vista biologico, clinico e di risposta ai trattamenti. Tale eterogeneità viene solo parzialmente compendiata dalla classificazione tradizionalmente utilizzata, basata su metodiche istopatologiche, di immunoistochimica (IHC) e di ibridazione in situ (FISH-ISH), le quali consentono di distinguere tre principali sottotipi di BC classificati sulla base di: (I) espressione dei recettori ormonali: estroprogestinico [ER] e progestinico [PgR]; (II) stato di over-espressione proteica e/o amplificazione genica del recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano [HER2]:

- BC a recettori ormonali positivi [HR+/HER2+]: HR \geq 1% (ER \geq 1% e/o PgR \geq 1%), HER2-0-1+, o 2+ con FISH non amplificata/equivoca;
- BC triplo negativo [HR-negative/HER2-negative]: HR $<$ 1% (ER $<$ 1% e PgR $<$ 1%), HER2-0-1+, o 2+ con FISH non amplificata/equivoca;
- BC HER2+: HER2 3+ e/o FISH amplificata, possono essere HR positivi o negativi.

Negli ultimi decenni la classificazione del BC si è affinata progressivamente utilizzando metodiche di gene expression profiling, che hanno consentito di identificare diversi sottotipi molecolari intrinseci di BC, che solo in parte si sovrappongono alla classificazione utilizzata in pratica clinica. I più rilevanti sottotipi molecolari intrinseci sono:

- Luminal-A;
- Luminal-B;
- HER2-enriched;
- Basal-like.

1.2.1 Luminal-A

Rappresenta il sottotipo più frequente, costituendo il 50-60% dei BC. Dal punto di vista clinico viene tipicamente profilato come neoplasia con: (I) positività dei recettori ormonali (ER/PgR+); (II) negatività per HER2; (III) bassa attività proliferativa valutata tramite determinazione di Ki67.

I BC Luminal-A sono caratterizzati da un'importante endocrino-sensibilità, essendo tumori a recettori ormonali positivi, ma una ridotta chemio-sensibilità visto il basso rate proliferativo. Sono inoltre associati a tassi prognostici più favorevoli rispetto agli altri sottotipi di BC ^{3,4}.

1.2.2 Luminal-B

Rappresenta il 10-20% di tutti i BC ed è caratterizzato da una maggiore aggressività biologica rispetto al sottotipo Luminal-A. Clinicamente spesso si profila come neoplasia caratterizzata da: (I) espressione di ER e/o PgR; (II) maggior espressione di geni correlati alla proliferazione, come Ki67 e ciclina B1; (III) possibile espressione di EGFR e HER2. Proprio sulla base dello stato di HER2 è possibile ulteriormente sotto-classificare il sottotipo Luminal-B in: (I) luminal B/HER2 negativi, caratterizzati da recettori ormonali positivi, HER2 negativo ed alta attività proliferativa; (II) luminal B/HER2 positivi presentante: recettori ormonali positivi, HER2 sovra-espresso (score 3+ delle reazioni di immunohistochimica) o amplificato, qualsiasi valore di attività proliferativa. Rispetto al sottotipo Luminal-A, i carcinomi Luminal-B presentano una minore endocrino-sensibilità ed una maggior risposta alla chemioterapia ^{3,4}.

1.2.3 HER2-enriched

Rappresenta il 10-15% di tutti i BC e sono tipicamente profilati come HER2 positivi, quindi caratterizzati da: HER2 sovra-espresso (score 3+ delle reazioni di immunohistochimica) o amplificato (FISH o altre metodiche) e negatività dei recettori ormonali. Circa il 50% dei tumori classificati come HER2+ all'IHC sono HER2-enriched nella classificazione molecolare. Essi si caratterizzano per: (I) elevato tasso di proliferazione; (II) elevato grado istologico; (III) mutazione di p53 nel 40% dei casi. Nonostante tale sottotipo di BC sia caratterizzato da elevata aggressività biologica, l'introduzione nella pratica clinica di farmaci a bersaglio molecolare anti-HER2, di cui l'anticorpo monoclonale trastuzumab ne rappresenta il capostipite, ha rivoluzionato la prognosi delle pazienti affette da questo sottotipo di BC ^{3,4}.

1.2.4 Basal-like

Rappresenta il 10-20% dei BC. Sebbene sia frequentemente surrogato dal BC triplo-negativo (TNBC) clinicamente definito (assenza dell'espressione di ER, PgR, HER2) tale sovrapposizione non è completa. Infatti, circa il 30% dei BC basal-like non si presentano come tripli-negativi e la definizione di “basal-like” fa in particolare riferimento all'espressione di geni tipicamente espressi a livello delle normali cellule mioepiteliali della mammella. I BC basal-like si caratterizzano per: (I) mutazioni somatiche molto frequenti con perdita di funzione di TP53, RB1 e BRCA1; (II) potenziamento dell'attività della via PI3K a causa dell'elevata frequenza di mutazioni somatiche nei geni associati a questa via; (III) alta espressione di geni associati alla proliferazione e alla progressione del ciclo cellulare; (IV) elevata aggressività biologica; (V) decorso clinico più sfavorevole rispetto agli altri sottotipi di carcinoma mammario. Dal punto di vista terapeutico, in virtù della negatività sia dei recettori ormonali, sia di HER2, non beneficiano né della terapia ormonale né di farmaci a bersaglio molecolare anti-HER2, e la principale strategia terapeutica risulta essere la chemioterapia ^{3,4}.

Sottotipi molecolari	Luminal A-like	Luminal B-like		HER2 Enriched	Basal Like
		HER2-	HER2+		
Biomarkers	ER+ PR+ HER2- Ki67 basso	ER+ PR+/- HER2- Ki67 alto	ER+ PR+/- HER2+ Ki67 basso/alto	ER- PR- HER2+ Ki67 alto	ER- PR- HER2- Ki67 alto
Frequenza	50-60%	10-20%		10-15%	10-20%
Trattamento	Terapia ormonale (+/- chemioterapia)	Terapia ormonale +/- Chemioterapia	Terapia Ormonale Chemioterapia Terapia anti-HER2	Chemioterapia Terapia anti-HER2	Chemioterapia Immunoterapia

Tabella I. Principali sottotipi molecolari di BC e relativi trattamenti.

1.3 Principi di trattamento

1.3.1 Trattamento stadio iniziale

Allo stadio iniziale, l'approccio terapeutico del BC può essere stratificato in due principali strategie: il trattamento adiuvante d'embalé e il trattamento neoadiuvante. In questo contesto il processo decisionale sul trattamento dovrebbe basarsi su diverse considerazioni quali: (I) sensibilità e beneficio atteso delle strategie disponibili; (II) rischio di recidiva individuale; (III) tossicità a breve e a lungo termine associate al trattamento; (IV) performance status, età biologica, comorbidità e anche preferenze del paziente ⁵.

- Adiuvante: in questo contesto il trattamento sistemico per il BC viene somministrato dopo il trattamento locoregionale (chirurgica +/- radioterapia) ad intento radicale.
- Neoadiuvante: trattamento sistemico somministrato prima del trattamento locoregionale ad intento radicale. Questo approccio si è dimostrato vantaggioso dal punto di vista clinico sotto diversi aspetti:
 - Espansione delle possibilità di trattamento locoregionale: (I) possibilità di rendere operabile una neoplasia primariamente inoperabile; (II) possibilità di determinare un down-staging della neoplasia primitiva, consentendo quindi un trattamento chirurgico di tipo conservativo in pazienti altrimenti candidate a trattamento chirurgico demolitivo; (III) miglioramento degli outcome estetici.
 - Possibilità di valutare in vivo la risposta della neoplasia primitiva al trattamento sistemico somministrato;
 - Possibilità di consentire una valutazione prognostica sulla base della risposta patologica dopo trattamento sistemico neoadiuvante in quanto una risposta patologica completa (pCR) dopo il trattamento, rappresenta un riconosciuto endpoint surrogato di miglior sopravvivenza a lungo termine;
 - Possibilità di calibrare il trattamento post-operatorio sulla base della presenza di malattia residua dopo trattamento sistemico neoadiuvante ³.

Una visualizzazione grafica delle principali strategie di trattamento sistemico per il BC in fase iniziale è riportata in tabella II.

Carcinoma Mammario Triplo Negativo			
	Trattamento Adjuvante	Neoadiuvante In pz ad alto rischio: \geq cT1c e/o cN+	Post-Neoadiuvante
Standard	Chemioterapia (antracicline + taxani)	Chemioterapia (antracicline + taxani)	Osservazione in caso di pCR
Escalation	Chemioterapia (antracicline + taxani) seguita da Olaparib in \geq pN1 in gBRCA+	- Inclusione di Carboplatino nel regime chemioterapico basato su taxani e antracicline - Pembrolizumab in combinazione con chemioterapia ad alto rischio.	- Capecitabina nei pazienti con RD - Olaparib in pz con RD e gBRCA+ - Pembrolizumab se presente nel regime neoadiuvante

Carcinoma Mammario HER2-Positivo			
	Trattamento Adjuvante	Neoadiuvante In pz ad alto rischio: \geq cT2 e/o cN+	Post-neoadiuvante
Standard	Chemioterapia (antracicline + taxani) + Trastuzumab +/- terapia ormonale in base allo stato recettoriale ormonale.	Chemioterapia (antracicline + taxani) + Trastuzumab +/- terapia ormonale in base allo stato recettoriale.	Trastuzumab (1 anno di durata totale) in caso di pCR
Escalation	- Chemioterapia + Trastuzumab + Pertuzumab - Chemioterapia + Trastuzumab + Neratinib dopo completamento regime adjuvante con Trastuzumab + terapia ormonale in pazienti con HR+	Chemioterapia + Trastuzumab + Pertuzumab	TDM1 nei pazienti con RD +/- terapia ormonale in base allo stato recettoriale.
De-escalation	Chemioterapia senza antracicline + Trastuzumab	Chemioterapia senza antracicline + Trastuzumab	

Carcinoma Mammario HR-Positivo/HER2 Negativo			
	Trattamento Adjuvante	Neoadiuvante → Ampliamento opzioni chirurgiche → Possibilità di personalizzare il trattamento post-neoadiuvante in base ad RD e alle caratteristiche ad alto rischio gBRCA+	Post-neoadiuvante
Standard	Endocrino terapia in tutti i pz.	Chemioterapia (antracicline + taxani)	Endocrino terapia in tutti i pz.
Escalation	<ul style="list-style-type: none"> - Regime chemioterapico (in quei pz aventi un rischio clinico e genomico elevato). - Terapia endocrina oltre i 5 anni. - Aggiunta di Olaparib in pz ad elevato rischio gBRCA+ (>pn2) dopo chemioterapia. - Aggiunta di Abemaciclib in pz N+ ad alto rischio 		<ul style="list-style-type: none"> - Escalation con Olaparib (in aggiunta alla terapia ormonale) in pz con: RD + caratteristiche ad alto rischio aggiuntive (CPS-EG score ≥ 3) con gBRCA+
De-escalation	Chemioterapia senza antracicline.	Terapia endocrina in casi selezionati.	

Tabella II Principali strategie di trattamento sistemico per il BC in fase iniziale: triplo negativo, HER2 positivo ed HR positivo/HER2. Abbreviazione: RD, malattia residua; pCR, risposta patologica completa.

1.3.2 Trattamento stadio avanzato

Negli ultimi decenni, grazie all'importante ampliamento dell'armamentario terapeutico, si è assistito ad un sostanziale miglioramento dell'outcome di pazienti affetti da malattia in stadio avanzato. Nonostante ciò, una volta metastatico, il BC rimane una condizione ad oggi incurabile. Dati recenti suggeriscono che il tasso di sopravvivenza a 5 anni di pazienti affetti da BC metastatico è di circa il 38%, con tassi di sopravvivenza nel complesso più sfavorevoli in caso di BC recidivato rispetto alla malattia in stadio IV de novo. La prognosi in questo contesto è altamente influenzata dal sottotipo di BC, dove il TNBC rappresenta quello associato ai tassi di sopravvivenza più sfavorevoli mentre i sottotipi HER2+ e

HR+/HER2- si caratterizzano per prognosi più favorevole, da imputare prevalentemente alla maggiore disponibilità di strategie terapeutiche efficaci.

L'evoluzione delle principali strategie terapeutiche a seconda del sottogruppo di BC sono illustrate in Figura 1 e Tabella III ^{7,8}.

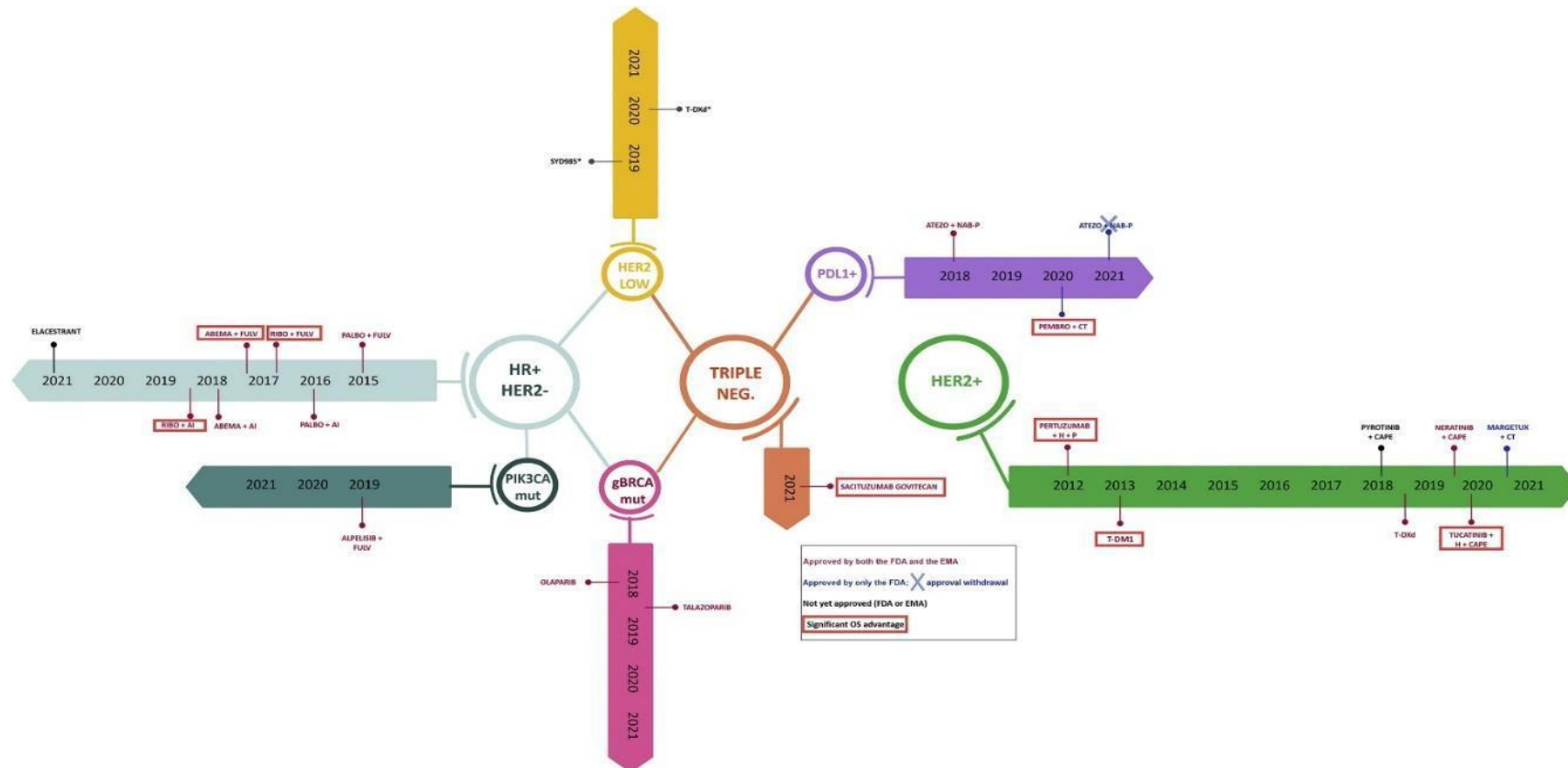


Figura SEQ Figura * ARABIC 1 Cronologia delle principali terapie innovative in differenti sottotipi di BC.

HR, recettore ormonale; PALBO, palbociclib; FULV, fulvestrante; AI, inibitore dell'aromatasi; RIBO, ribociclib; ABEMA, abemaciclib; mut, mutato; gBRCA, mutazione germinale di BRCA; negativo, negativo; PDL1, ligando di morte programmato 1; ATEZO, atezolizumab; NAB-P, nab-paclitaxel; PEMBRO, pembrolizumab, TC, chemioterapia; H, trastuzumab; P, docetaxel; T-DM1, trastuzumab emtansine; T-DXd, trastuzumab deruxtecan; CAPE, capecitabina; MARGETUX, margetuximab; FDA, Food and Drug Administration; EMA, Agenzia Europea dei Medicinali; OS, sopravvivenza globale ⁸.

Classe di trattamento	Sottotipo	Strategia terapeutica	Trial clinico in fase III	Risultati significativi (dell'endpoint primario)		
				PFS	OS	
CDK 4/6 inhibitors	HR+/HER2 –	CDK 4/6 inhibitors + AI	Palbociclib + letrozole	PALOMA-2	Si	N.A.
			Ribociclib + letrozole	MONALEESA-2	Si	Si
			Abemaciclib + NSAI	MONARCH-3	Si	N.A.
	HR+/HER2 –	CDK 4/6 inhibitors + endocrine therapy	Ribociclib + AI/Tam	MONALEESA-7	Si	Si
			Palbociclib + fulvestrant	PALOMA-3	Si	No
			Ribociclib + fulvestrant	MONALEESA-3	Si	Si
	HR+/HER2 –	CDK 4/6 inhibitors + fulvestrant	Abemaciclib + fulvestrant	MONARCH-2	Si	Si

PI3K inhibitors	HR+/HER2 –	Alpelisib + fulvestrant	SOLAR-1	Si (nelle corti PIK3CA-mutate)	No
Oral SERDs	HR+/HER2 –	Elacestrant	EMERALD	Yes (nelle corti ITT e ESR1-mutate)	No (immaturo)
mTOR inhibitors	HR+/HER2 –	Everolimus + exemestane	BOLERO-2	Si	No
Dual HER2 blockade with anti-HER2 MABS	HER2+	Pertuzumab + trastuzumab + CT	CLEOPATRA	Si	Yes
Anti-HER2 ADCS	HER2+	T-DM1	EMILIA	Si	Si
	HER2+	T-DXd	DESTINY-Breast03	Si	No (immaturo)
	HER2+	Trastuzumab duocarmazine	TULIP	Si	No
Anti-HER2 TKIs	HER2+	Tucatinib + trastuzumab + capecitabine	HER2CLIMB	Si	Yes
Novel anti-HER2 MAB	HER2+	Margetuximab + trastuzumab + CT	SOPHIA	Si	No

PAN-HER TKIs	HER2+	Neratinib + capecitabine	NALA	Si	No
	HER2+	Pyrotinib + capecitabine	PHOEBE	Si	No
Anti-PD-1/PD-L1 agents	TN—PD-L1+	Pembrolizumab + CT	KEYNOTE355	Si (in PD-L1+ CPS $\geq 10 \rightarrow$ PD-L1+ CPS $\geq 1 \rightarrow$ ITT)	Si (in PD-L1+ CPS $\geq 10 \rightarrow$ PD-L1+ CPS ≥ 1 non significativo \rightarrow ITT non testato)
	TN—PD-L1+	Atezolizumab + nab-paclitaxel	IMPASSION1 30	Si (in ITT)	No (in ITT non significativo \rightarrow PD-L1+ non testato)
Anti-TROP2 ADC	TN	Sacituzumab govitecan	ASCENT	Si (in pazienti senza metastasi cerebrali)	Si
PARP inhibitors	gBRCA+ HER2-	Olaparib	OlympiAD	Si	No
	gBRCA+ HER2-	Talazoparib	EMBRACA	Si	No

Tabella III Principali terapie innovative tra i sottotipi di BC nell'impostazione avanzata e il loro valore secondo la scala ESMO-Magnitude of Clinical Benefit ⁸.

1.4 Categorie emergenti

1.4.1 Carcinoma mammario HER2-low-positive

Negli ultimi mesi si sta assistendo ad un crescente interesse nei confronti di un sottotipo emergente di BC, il sottotipo HER2-low-positive, sulla scorta di promettenti risultati di attività anti-tumorale ed efficacia di agenti anti-HER2 in pazienti tradizionalmente definiti HER2-negativi, ma caratterizzati da bassi livelli di espressione di HER2. Nonostante non sia ancora unanimemente riconosciuta, la definizione di BC HER2-low-positive attualmente si basa sulle uniche metodiche ad oggi standardizzate per la valutazione dello stato di HER2: IHC e FISH. In particolare, per BC HER2-low-positive si intende una neoplasia esprime HER2 con le seguenti caratteristiche: score 1+ o 2+ alla valutazione IHC in assenza di amplificazione del gene HER2 in ISH (Figura 2).

Esso comprende circa la metà di tutti i BC HER2-negativi (45%) ed è tipicamente arricchito per neoplasie a recettori ormonali positivi. Alla base di tale associazione è stato suggerito un ruolo cruciale nella relazione stretta tra la via del recettore degli estrogeni e quella del recettore HER2. Il cross-talk tra le due vie di trasduzione del segnale porta ad una dis-regolazione della produzione di fattori di crescita cellulare sia attraverso l'attivazione diretta dell'espressione genica tramite la via genomica che attraverso quella non genomica ^{9,10}.

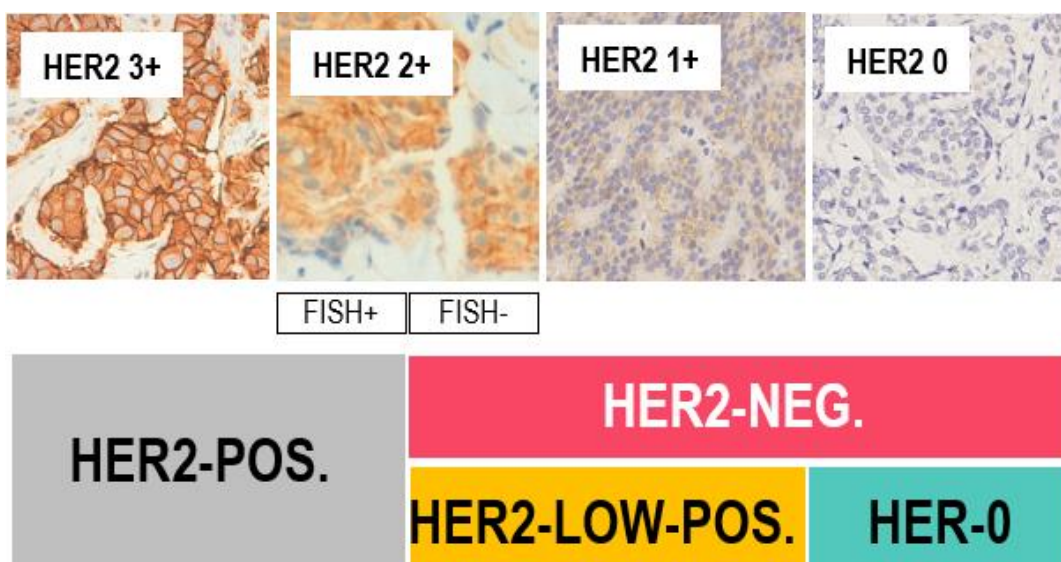


Figura 2 Classificazione sottotipi tumorali in base all'espressione del recettore HER2+.

1.4.1.1 Caratteristiche cliniche

Nonostante non abbiamo ad oggi solida evidenza che supporti il BC HER2-low-positive come entità clinico-biologica distinta, è stato riportato che pazienti con tale sottotipo di BC possano presentare le seguenti peculiarità cliniche rispetto al sottotipo HER2-0 (I) maggiori dimensioni del tumore primario; (II) maggiore coinvolgimento dei linfonodi ascellari; (III) maggiore prevalenza in pazienti più anziani e nel sesso maschile ¹¹. Inoltre, dati recenti, suggeriscono una sensibilità differenziale ai trattamenti citotossici tra BC HER2-0 e HER2-low-positive.

In particolare, in un recente studio di Denkert ¹² e colleghi, (analisi aggregata di studi prospettici neoadiuvanti), il sottotipo HER2-low-positive è risultato essere associato a tassi di pCR dopo chemioterapia neoadiuvante (NACT) significativamente inferiori rispetto ai pazienti con sottotipo HER2-0. Tale differenza è risultata essere sostanzialmente trainata dal sottogruppo a recettori ormonali positivi (17,5% contro 23,6%, rispettivamente, $p=0,0024$), mentre non è stata osservata alcuna associazione significativa nel sottotipo triplo negativo (tassi di pCR: 48,0% contro 50,1%, rispettivamente, $p=0,21$). È stata inoltre suggerita una correlazione tra BC HER2-low-positive e prognosi più favorevole nella popolazione globale dello studio, dato trainato dal sottogruppo triplo-negativo, in assenza di differenze significative nel sottogruppo a recettori ormonali positivi. Tale associazione prognostica tuttavia, si inserisce in un contesto di dati nel complesso contrastanti, imponendo pertanto cautela nell'interpretazione di tali osservazioni ^{12,19}. In particolare, in una recente analisi retrospettiva di un'ampia coorte di pazienti sottoposti ad intervento chirurgico radicale sono stati osservati tassi pressochè comparabili di DFS e OS tra i pazienti con BC HER2-low-positive rispetto a HER2-0 quando l'analisi veniva aggiustata per HR+ (separando pertanto i sottotipi HR+ da TNBC) ⁶⁹. Similmente, nessuna differenza in termini di tassi di pCR è stata osservata tra sottotipo HER2-low-positive versus HER2-0 nel sottogruppo di pazienti sottoposti a NACT, dopo correzione dell'analisi per stato di HR. Tali risultati nel complesso non supportano la categoria HER2-low-positive come entità biologica distinta.

1.4.1.2 Implicazioni terapeutiche

Finora, l'accesso agli agenti anti-HER2 è stato limitato ai soli pazienti classificati come HER2+ individuati sulla base della valutazione IHC e ISH. Tuttavia, la dicotomizzazione HER2+ versus HER2-0 il cui valore predittivo è stato stabilito nell'ambito degli studi pivotali di Trastuzumab ^{13,14}, potrebbe non catturare esaurientemente il valore predittivo in termini di beneficio a nuovi farmaci anti-HER2, quali gli anticorpi farmaco-coniugati (ADC). L'espressione di HER2, infatti, dovrebbe essere considerata un continuum e la semplice distinzione in due categorie non è in grado di ricapitolare interamente il gradiente di distribuzione del recettore, come ulteriormente suggerito dai dati derivanti da studi clinici che hanno valutato (e stanno valutando) nuovi ADC anti-HER2 in pazienti con MBC tradizionalmente classificati come HER2 negativi, ma che presentano bassa espressione di HER2.

1.4.1.2.1 Anticorpi anti HER2

Una delle prime evidenze che ha suggerito un possibile beneficio della terapia mirata anti-HER2 in pazienti con BC HER2-low-positive è rappresentata dallo studio NSABP B-31, che ha valutato l'aggiunta di trastuzumab alla chemioterapia adiuvante standard composta da antraciclina + taxano in soggetti presentati BC HER2+. In una valutazione post-hoc di tale studio è infatti emerso che circa il 10% dei pazienti è risultato essere HER2 negativo all'analisi centralizzata dello stato di HER2 e questo sottogruppo sembrava comunque beneficiare dell'aggiunta di trastuzumab al trattamento adiuvante ¹⁵. Sulla base di questo studio, è stato successivamente condotto lo studio randomizzato di fase III NSABP B-47 in modo da esaminare più nello specifico l'aggiunta di trastuzumab alla chemioterapia adiuvante standard nel BC HER2-low-positive. Tuttavia, l'aggiunta di trastuzumab alla chemioterapia non è risultata essere in grado di migliorare l'IDFS, l'RFI a distanza o l'OS ¹⁶. Risultati simili sono stati ottenuti con pertuzumab consolidando il ruolo limitato degli anticorpi anti-HER2 non coniugati in questo sottotipo di BC

1.4.1.2.2 Anti-HER2 ADCs

Risultati più promettenti sono stati ottenuti con gli ADC anti HER2. Tale classe di farmaci si caratterizza per la presenza di un anticorpo, un payload ed un linker con alcune differenze (Figura 3).

- La funzione primaria dell'anticorpo verte nella sua capacità di legarsi in maniera specifica ad un predeterminato bersaglio molecolare espresso sulla superficie delle cellule tumorali permettendo così di traghettare il farmaco citotossico ad esso associato in maniera selettiva riducendo al minimo gli effetti "off-target".
- Il payload o carico rappresenta la componente effettrice di un ADC ossia la componente citotossica. Il farmaco generalmente è in grado di inibire la polimerizzazione dei microtubuli o causare danni irreversibili al DNA causando morte cellulare.
- Il linker è quella componente che permette il collegamento tra l'anticorpo e il carico la cui funzione è di estrema importanza. Possono essere divisi in clivabili e non clivabili. Nel primo gruppo la scissione payload-anticorpo può avvenire mediante diversi meccanismi di lisi come scissione enzimatica dei legami ammidici o esteri, la scissione riduttiva dei legami disolfuro e l'idrolisi dei legami acido-labili mentre nei secondi, la divisione necessita della completa degradazione proteolitica lisosomiale dell'anticorpo.

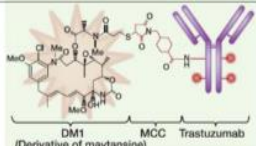
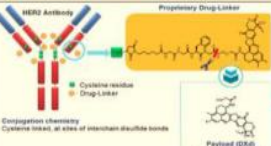
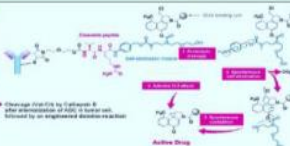
ADC	Trastuzumab Emtansine	Trastuzumab Deruxtecan (DS-8201)	Trastuzumab Duocarmazine (SYD985)
Structure			
Payload	Maytansine derivative	Topoisomerase I inh	Duocarmycin analogue
Drug/antibody ratio	3.5	7.7	2.8
Linker	NOT cleavable	Cleavable	Cleavable
Bystander activity	Minimal	Yes (membrane soluble payload)	Yes (extracellular cleavage)

Figura 3 Caratteristiche ADCs anti-HER2.

I principali ADC anti HER2 sono rappresentati da: TDM1 (trastuzumab-emtansine), T-DXd (trastuzumab-deruxtecan) e SYD895 (trastuzumab-duocarmazine)¹⁸.

In dettaglio, è stata recentemente segnalata una promettente attività antitumorale con i nuovi ADC T-DXd e trastuzumab-duocarmazina¹⁴ nei confronti di pazienti con MBC HER2-low-positive pesantemente pretrattati. In particolare, T-DXd ha determinato tassi di ORR (Overall Response Rate) del 37,0%, con 10,4 mesi di durata mediana della risposta; inoltre, la PFS (Progression Free Survival) mediana e la OS mediana erano rispettivamente di 11,1 e 29,4 mesi⁸.

Analogamente trastuzumab-duocarmazina è risultato essere associato a tassi di ORR del 28% e 4,1 mesi di PFS mediana nella coorte HR+/HER2-low-positive e il 40% dell'ORR e 4,9 mesi nella coorte HR-/HER2-low-positive. Sulla base di questi risultati, un gran numero di studi clinici di fase avanzata, inclusi due studi randomizzati di fase III (NCT03734029/Destiny-Breast04 e NCT04494425/Destiny-Breast06), sono stati avviati per approfondire l'attività e l'efficacia dei trattamenti anti-HER2 in pazienti con BC HER2-low-positive.

In particolare, lo Destiny-Breast04⁹³ rappresenta un trial di fase III open-label che ha randomizzato 557 pazienti con carcinoma mammario HER2-low-positive, precedentemente trattati con 1-2 linee di chemioterapia nel setting metastatico, a ricevere trastuzumab-deruxtecan versus trattamento a scelta dell'investigatore (TPC: capecitabina, eribulina, gemcitabina, nab-paclitaxel, paclitaxel). L'endpoint primario era rappresentato dalla PFS nella popolazione a recettori ormonali positivi (n=394), mentre la PFS nella popolazione globale dello studio e OS rappresentavano endpoint secondari. Lo studio ha dimostrato un vantaggio statisticamente e clinicamente significativo a favore di trastuzumab-deruxtecan rispetto al braccio di controllo in termini di PFS nella popolazione a recettori ormonali positivi con una riduzione del rischio relativo di eventi PFS del 49% (HR 0.51, 95% CI 0.40-0.64, p<0.001) e la magnitudo di tale beneficio è risultata essere consistente nei principali sottogruppi analizzati, inclusi i sottogruppi definiti sulla base dello score in IHC di HER2 e del precedente utilizzo di inibitori CDK 4/6. Similmente, un vantaggio significativo in termini di PFS è stato osservato nella popolazione globale dello studio. Inoltre, l'analisi di OS ha rivelato un vantaggio significativo nella popolazione a recettori ormonali positivi (HR 0.64, 95% CI 0.48-

0.86, $p=0.0028$) e nella popolazione globale (HR 0.64, 95% CI 0.49-0.84, $p=0.0010$). Un'analisi esplorativa degli endpoint PFS e OS nel sottogruppo di pazienti con malattia a recettori ormonali negativi (coorte triplo-negativa) ha inoltre rilevato un beneficio a favore del braccio trastuzumab-deruxtecan rispetto al braccio di controllo. L'analisi di attività antitumorale ha inoltre evidenziato un vantaggio in termini di ORR sia in pazienti a recettori ormonali positivi (ORR per trastuzumab-deruxtecan vs TPC: 52.6% vs 16.3%) sia negativi (ORR per trastuzumab-deruxtecan vs TPC: 50.0% vs 16.7%). Dal punto di vista del profilo di tossicità, non sono emersi dati aggiuntivi rispetto agli studi pivotali di trastuzumab-deruxtecan (Destiny-Breast01 e Destiny-Breast03). Tra gli effetti collaterali riscontrati principalmente si annoverano in particolare la tossicità ematica, gastrointestinale, cutanea (alopecia), epatica e polmonare. Dal punto di vista ematico l'evento avverso più comune di grado 3 o superiore riscontrato è stata la neutropenia ma l'incidenza della neutropenia febbrile era bassa. Anche l'anemia è risultata frequente ma i casi superiore al grado 3 sono risultati più limitati. Molto frequenti sono risultati vomito, diarrea, astenia ed alopecia rimanendo comunque su livelli di severità inferiore a 3. Per quanto riguarda il danno polmonare (ILD interstitial lung disease) la tossicità è risultata generalmente di severità lieve e moderata, senza che siano stati segnalati eventi di grado 4 o 5. Risultati rassicuranti rispetto ai primi studi pivotali con trastuzumab-deruxtecan ^{111,112} nei quali la patologia interstiziale polmonare si è presentata più frequentemente e severamente. Differenza che può essere spiegata dal fatto che in questo studio è stata posta maggior attenzione verso la diagnosi precoce di questi eventi avversi e le linee guida per la gestione della malattia polmonare sono stata incorporate nel programma (pronta interruzione della dose e precoce trattamento con glucocorticoidi) ⁹³. Nel complesso, i risultati dello studio Destiny-Breast04 stabiliscono la popolazione di pazienti con malattia HER2-low-positive come una nuova popolazione suscettibile di terapia a bersaglio molecolare anti-HER2, con trastuzumab-deruxtecan a rappresentare il nuovo standard of care.

I dati positivi in termini di attività antitumorale ed efficacia osservata con gli ADC anti-HER2 nel BC HER2-low-positive rispetto agli scarsi risultati ottenuti dagli anticorpi anti-HER2 non coniugati può essere giustificata dal diverso meccanismo d'azione di tali agenti mirati anti-HER2. Difatti, è ampiamente riconosciuto che

l'efficacia degli anticorpi monoclonali anti-HER2 verta sul fenomeno della dipendenza da parte delle cellule tumorali su determinate proteine oncogeniche, fenomeno che risulta invece meno rilevante nel contesto degli ADC la quale attività farmacodinamica richiede la mera presenza del target (indipendentemente dall'"oncogene addiction" del tumore per tale target) per traghettare in maniera specifica il payload. Un numero crescente di evidenze, che provengono anche da studi su altri tumori solidi, supporta la nozione secondo cui l'efficacia degli ADC sia basata sul presupposto della rilevabilità del bersaglio più che sull'oncogenicità dello stesso ¹⁸⁻²⁰.

1.4.2 Carcinoma mammario ER-low-positive

Come risaputo lo stato dei recettori ormonali (HR), quali il recettore degli estrogeni (ER) e il recettore del progesterone (PR), rappresenta uno dei fattori prognostici e predittivi più rilevanti nell'ambito del BC. In particolare, la positività di HR si associa tipicamente a prognosi più favorevole rispetto a HR-negatività, e questo è in parte imputabile alla minore aggressività biologica delle neoplasie HR+ rispetto a quelle HR-0 ed in parte alla possibilità di accesso, in caso di HR+, alla terapia endocrina.

La positività di HR è stata tradizionalmente definita come $\geq 10\%$ delle cellule tumorali che presentano fissazione positiva nucleare in IHC. Tuttavia, nel 2010, le linee guida congiunte ASCO/CAP hanno abbassato la soglia per definire la positività di HR all'1% sulla base dei risultati di studi di terapia endocrina che hanno dimostrato un certo grado di beneficio dal trattamento ormonale anche in pazienti con HR compreso tra 1% e 9%¹. Tuttavia, in relazione all'evidenza crescente che suggerisce come neoplasie con bassa espressione di ER (1-9%) condividano caratteristiche biologiche e cliniche più con il sottotipo triplo-negativo che con il sottotipo francamente ER+, come esaustivamente discusso nei paragrafi successivi, è emersa la necessità di considerare la categoria ER 1-9% come entità distinta. Nel 2020, un aggiornamento delle linee guida ASCO/CAP ha introdotto pertanto una nuova categoria definita come "ER-low-positive", caratterizzata da una positività del ER all'IHC tra 1%-9%, indipendentemente dallo stato di PR²¹.

1.4.2.1 Caratteristiche cliniche

Come già accennato, nonostante la maggior parte dei BC mostri o la completa assenza di colorazione ER (0%) all'IHC o la positività di ER ($\geq 10\%$), un piccolo sottogruppo di BC presenta bassi livelli di espressione di ER (colorazione IHC tra 1% e 9%).

È stato riportato che questi tumori a bassa espressione di ER presentano caratteristiche biologiche più simili ai tumori ER-negativi²⁴⁻²⁷ e sono per lo più classificati come basali o arricchiti con HER2 dalla sotto-tipizzazione intrinseca PAM50²². Oltre a ciò, dal punto di vista clinico, presentano un comportamento clinico tipico del sottotipo triplo-negativo in termini di caratteristiche clinico-patologiche, chemio-sensibilità e prognosi più sfavorevole, rispetto al sottotipo caratterizzato da $ER \geq 10\%$.

In particolare, è stato riportato che il BC ER-low-positive presenti caratteristiche clinico-patologiche almeno altrettanto aggressive di quelle riportate per i BC ER-negativi in termini di: livelli di Ki67 elevati, grado istologico elevato, età relativamente giovane di insorgenza. Inoltre, il sottotipo ER-low-positive è stato associato a stadio d'esordio meno favorevole rispetto al sottotipo ER-negativo. Interessanti sono i dati di un recente studio di Dieci, MV et al.²³ condotto in una coorte di 406 pazienti con neoplasia $ER < 10\%$ sottoposti a chemioterapia neoadiuvante, dove non sono state osservate differenze significative in termini di endpoint di sopravvivenza (invasive relapse-free survival e OS) a seconda del livello di espressione di ER ($ER < 1\%$ vs $ER 1-9\%$), consistentemente con quanto riportato nell'ambito di altri studi^{24,25,28}. Inoltre, non sono state osservate significative differenze in termini di tassi di pCR tra tumori puramente tripli negativi e tumori ER-low-positive.

Questi dati, nel complesso, suggeriscono come l'uso di una soglia dell'1% per definire la positività di ER potrebbe non riflettere accuratamente il continuum biologico di bassi livelli di espressione di ER.

1.4.2.2 Implicazioni terapeutiche

Sebbene relativamente rari (circa il 2-3% dei BC ER-positivi), questi BC invasivi rappresentano una sfida clinica poiché sono disponibili solo dati limitati relativi al trattamento più corretto di queste neoplasie. Infatti, è importante sottolineare come da un punto di vista terapeutico, se da un lato la positività di ER determini la

possibilità di accesso alla terapia a base endocrina, dall'altro, la negatività di ER impone generalmente di considerare un trattamento chemioterapico indipendentemente dal carico di malattia (ad eccezione delle neoplasie T1aN0), eventualmente associato ad immunoterapia. Sulla base di ciò, la neoplasia ER-low-positive si configura come scenario intermedio, delineando pertanto un'area grigia in termini di raccomandazioni terapeutiche. In questo contesto, il St. Gallen Consensus 2015 ha fornito indicazioni in merito, riportando che valori di espressione di ER compresi tra 1 e 9% dovrebbero essere considerati equivoci e che il solo trattamento endocrino, in assenza di chemioterapia, non dovrebbe essere considerato un trattamento adiuvante sufficiente per questi pazienti. Nel precedentemente citato studio di Dieci, MV et al.²³ sono state descritte le caratteristiche clinico-patologiche, i trattamenti e gli esiti clinici nel BC ER-low-positive stadio I-III e sono stati confrontati con la controparte ER-negative. Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati trattati con NACT o chemioterapia adiuvante senza differenze in termini di tipo di regime chemioterapico applicato. Inoltre, solo 6 pazienti (14%) nel sottogruppo ER-low-positive hanno ricevuto una terapia endocrina adiuvante, nonostante il basso numero di questo sottogruppo precluda la possibilità di trarre conclusioni sull'impatto del trattamento endocrino nel BC ER-low-positive. Nel complesso, questi dati suggeriscono che in uno scenario di pratica clinica tali neoplasie vengono tipicamente gestite terapeuticamente alla stregua di neoplasie triplo-negative.

1.5 Sistema immunitario e tumore

1.5.1 Microambiente tumorale

Il microambiente tumorale (denominato nella letteratura scientifica internazionale tumor micro-environment o TME) è l'ambiente cellulare ed extracellulare attorno al quale esiste e si sviluppa il tumore. Esso è costituito sia dalla componente tumorale sia da cellule e matrice stromale dell'ospite ed è un fattore chiave per lo sviluppo e la progressione della neoplasia. Le due componenti costituenti il microambiente sono a loro volta costituite da una porzione cellulare ed una porzione non cellulare (matrice extracellulare). La porzione cellulare stromale può essere divisa in una componente non immunitaria composta da, cellule endoteliali ematiche e linfatiche, periciti, cellule muscolari lisce, fibroblasti, adipociti, cellule mesenchimali e in una componente immunitaria composta dalle cellule MDSC (myeloid-derived suppressor cell), TAM (tumor-associated macrophages) e TILs (tumor-infiltrating lymphocytes, linfociti infiltranti il tumore). L'interazione fra le cellule tumorali e il microambiente è essenziale per stimolare: l'eterogeneità tumorale, l'evoluzione clonale, la farmaco resistenza e il processo metastatico. Questo avviene per una comunicazione tra cellule tumorali e non, mediata da citochine, chemochine, mediatori dell'infiammazione, fattori di crescita ed enzimi rimodellanti la matrice che dirottano le cellule dello stroma limitrofo al fine di renderle fenotipicamente affini allo sviluppo tumorale. Questa comunicazione può inibire le cellule immunitarie, sopprimendo la risposta antitumorale, oppure indurre una risposta pro-infiammatoria e pro-angiogenica a favore della crescita tumorale. Numerosi studi suggeriscono un ruolo chiave nel controllo della crescita tumorale da parte dei linfociti infiltranti il tumore. L'interesse nello studio dell'infiltrato immunitario è di acceso interesse per i suoi risvolti a livello prognostico, predittivo, e terapeutico, come riportato in seguito ³¹.

1.5.2 Immunoediting tumorale

L'immunoediting è un processo dinamico avviato dalle cellule tumorali in risposta all'immunosorveglianza del sistema immunitario, il quale è caratterizzato da tre fasi: (I) eliminazione, in cui il sistema innato e adattativo sono in grado di attuare un'efficace immunosorveglianza; (II) equilibrio, fase in cui le cellule tumorali sopravvissute alla precedente fase di eliminazione, vengono plasmate dal sistema immunitario stesso. La costante pressione selettiva esercitata dal sistema

immunitario sul tumore fa sì che nel tempo si vadano a selezionare dei sub-cloni a bassa immunogenicità in grado di evadere il riconoscimento immunitario ed avanzare alla terza fase; (III) evasione, fase in cui il tumore diventato immuno-resistente è in grado di crescere in maniera incontrollata fino a diventare clinicamente rilevabile nonostante il sistema immunitario dell'ospite sia competente ^{31,32} (figura 4).

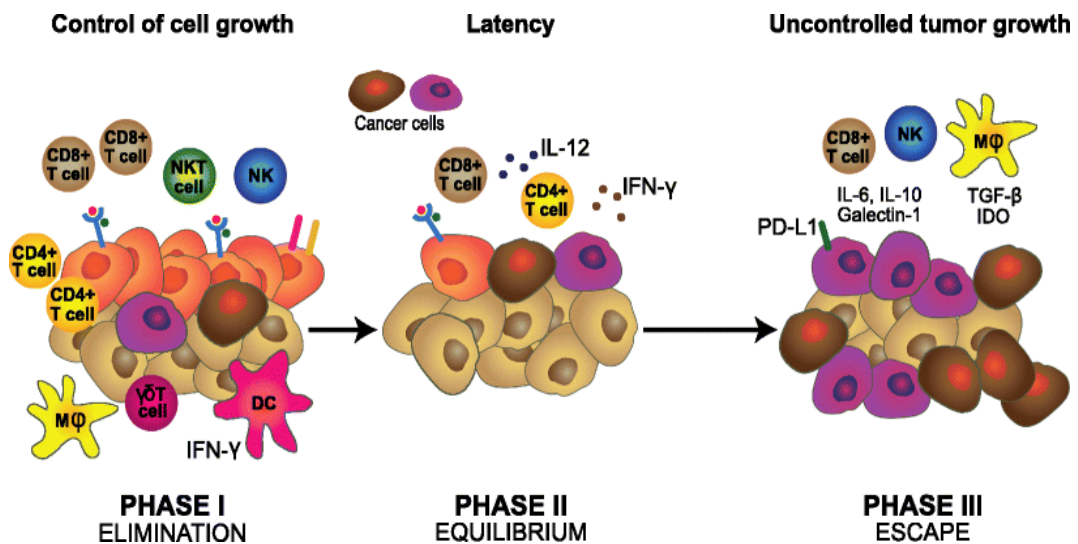


Figura 4 Le tre fasi dell'immunoediting tumorale.

Abbreviazioni: cellule dendritiche DC, cellule natural killer NK, macrofagi MΦ, cellule T natural killer NKT, linfociti T citotossici CTL, Th1 T helper 1, PD-L1 ligando di morte programmato 1, IDO indolamine 2,3 -diossigenasi, interleuchina IL, interferone IFN, fattore di crescita trasformante TG ³.

1.5.3 Sistema immunitario e tumore mammario

Negli ultimi decenni, è stato consistentemente riportato che il microambiente tumorale del BC (BC-TME) comprende un'ampia gamma di popolazioni cellulari del sistema immunitario biologicamente/clinicamente rilevanti a vari livelli. L'infiltrato immunitario comprende cellule immunitarie sia direttamente a contatto con le cellule tumorali, note come "intratumorali" (int), sia all'interno dello stroma tumorale circostante, noto come "stromale" (str).

Il BC non è tradizionalmente considerato un tumore altamente immunogenico, soprattutto se confrontato con altri tipi di neoplasie solide, quali il melanoma o il carcinoma polmonare. Tuttavia, anche dal punto di vista immunogenico, il BC si caratterizza per un'importante eterogeneità. In particolare, diversi sottotipi di BC mostrano gradi di infiltrazione immunitaria differente. In dettaglio: il BC triplo

negativo (TNBC) e BC HER2-positivo (HER2+), sono caratterizzati da un'elevata instabilità genomica e carico mutazionale tumorale (TMB), caratteristiche che favoriscono ed alimentano la generazione di neo-antigeni stimolando l'attività del sistema immunitario anti-tumorale. Nonostante questo, nel tumore triplo negativo, è stata evidenziata una correlazione negativa tra burden mutazionale, eterogeneità genomica e livelli di infiltrazione linfocitaria. Per quanto apparentemente controintuitiva, questa osservazione può chiarire la fase di eliminazione tumorale adempiuta da un efficace sistema di sorveglianza immunitaria che porta all'eliminazione di cloni tumorali immunogenici con conseguente minore eterogeneità genomica clonale. Al contrario, una maggiore eterogeneità clonale può riflettere la fase di fuga del processo di immunoediting, in cui la selezione dei cloni della neoplasia si traduce in una ridotta immunogenicità^{32,33}.

Inoltre, è stato consistentemente riportato come l'immunogenicità dei sottotipi di BC triplo-negativo e HER2+, sia, almeno in parte, plasmata anche dai trattamenti sistemici, con particolare riferimento al trattamento citotossico e ai trattamenti anti-HER2, che determinano, rispettivamente, morte cellulare immunogenica (ICD) e citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC).

Per morte cellulare immunogenica (ICD) si intende un meccanismo di induzione dell'apoptosi cellulare che risulta essere altamente immunogenica, in grado quindi di stimolare le cellule dendritiche (DCs) e altre cellule presentanti l'antigene. Alcuni studi condotti su popolazioni di pazienti affette da BC hanno infatti suggerito che agenti citotossici come antracicline, taxani e carboplatino, possono indurre una risposta immunitaria in grado di determinare attrazione dei linfociti nel letto tumorale, suggerendone, pertanto capacità di enhancement della risposta immunitaria anti-tumorale. Per ADCC si intende invece un meccanismo di difesa in base al quale anticorpi specifici riconoscono e legano specifici antigeni di superficie di membrana agendo come "flags" in modo tale che la cellula tumorale venga riconosciuta dal sistema immunitario e lisa. Nel caso del BC HER2+ gli anticorpi monoclonali utilizzati a scopo terapeutico si legano al recettore HER2, il quale agisce come neo-antigene tumore-associato, e svolgono una duplice funzione:

inibire la pathway del segnale trasmesso dal recettore e stimolare una risposta del sistema immunitario verso la cellula riconosciuta ³²⁻³⁴.

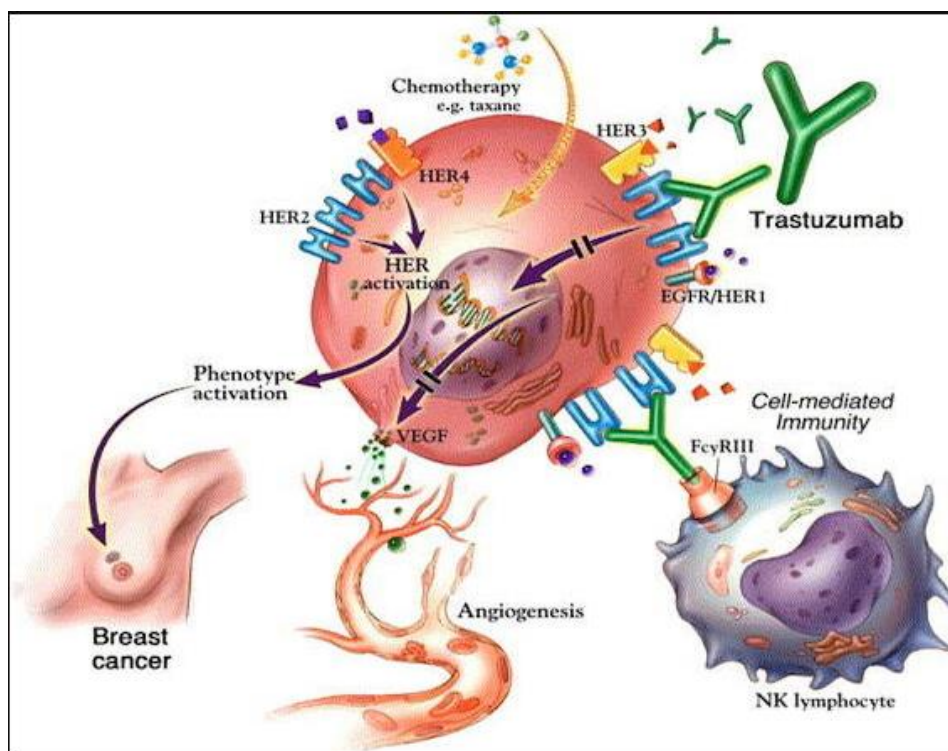


Figura 5 Esempificazione meccanismo d'azione di Herceptin.

Per quanto riguarda il sottotipo BC HR+/HER2-negativo (HER2-0), noto anche come BC luminale, è tradizionalmente considerato meno immunogeno rispetto ai due sottotipi sopra descritti a causa della minore instabilità genomica e carico mutazionale. Ciò nondimeno, evidenze disponibili suggeriscono che l'immunogenicità di questo sottotipo BC si basi su meccanismi più sottili che riflettono la relazione complessa e dinamica tra: cellule BC HR+, mediatori infiammatori, livelli di estrogeni, trattamenti endocrini, stato menopausale.

Questa ampia eterogeneità immunogenica del BC può essere in parte catturata dalla valutazione dell'infiltrato linfocitario tumorale (TILs). Quest'ultimo presenta gradi di infiltrazioni differenti tra i vari sottotipi di BC, con i sottotipi TNBC ed HER2+ che esibiscono tassi maggiori rispetto al sottotipo BC luminal-like ³³.

Ulteriori fonti di eterogeneità sono rappresentate da: stadio della malattia, trattamento e sedi metastatiche. È stato evidenziato infatti che l'infiltrazione di TILs tenda a indebolirsi nel corso della storia naturale del BC con livelli di TILs maggiori nelle fasi iniziali e minori nella malattia avanzata ed oltre a ciò è emerso che in pazienti pesantemente trattati rispetto a quelli trattati nel setting di prima linea, il

grado di infiltrazione era minore. È stato inoltre osservato che la sede metastatica può influenzare il grado di infiltrazione immunitaria, la quale appare maggiore a livello delle sedi polmonari e minore a livello di fegato e cute ^{33,35}.

1.5.4 Raccomandazioni del TILs Working group

Il crescente interesse verso la valutazione dei TILs nell'ambito del BC ha portato l'International Working Group on Immuno-Oncology Biomarkers a fornire una metodologia standardizzata per la valutazione del TILs nei campioni BC con l'obiettivo di migliorare l'agreement inter-patologico e quindi la riproducibilità tra gli studi in vista dell'implementazione in clinica della valutazione dei TILs. In questo contesto, spinto dalla crescente necessità di una valutazione quantitativa affidabile e accurata dei TIL da parte dei patologi, l'International Working Group on Immuno-Oncology Biomarkers ha condotto due studi RING al fine di determinare la riproducibilità inter-patologica della misurazione TILs su campioni BC non trattati, fornendo una forte evidenza che i TILs possono essere valutati in modo accurato e affidabile, soprattutto con il supporto di visualizzatori guidati da software. Oltre a ciò, allo stesso modo, sono stati ottenuti risultati incoraggianti in un successivo studio RING che ha testato l'accordo inter-osservatore nella valutazione TILs sulla malattia residua (RD) dopo NACT ³³.

1.5.5 Linfociti infiltrante il tumore (TILs): rilevanza clinica

Lo sviluppo di surrogati per migliorare la stratificazione prognostica e terapeutica delle pazienti affette da BC sta diventando una sfida importante nella ricerca traslazionale.

In questo contesto, negli ultimi anni, il ruolo dei TILs sta acquisendo grande interesse in virtù del sempre crescente corpo di evidenza che ne suggerisce un ruolo nell'influenzare la prognosi e la risposta ai trattamenti sistemici soprattutto nei pazienti con BC in fase iniziale. Come riassunto in tabella III questa rilevanza dipende dal sottotipo biologico di BC preso in considerazione: è noto che nei TNBC vi sia una relazione lineare e robusta tra aumento di TILs (sTIL) e la sopravvivenza libera da malattia (DFS) in pazienti trattati con intervento chirurgico d'emblè e successiva chemioterapia adiuvante, come riportato in più analisi retrospettive e prospettiche ^{33,36-43}. Associazione che similmente è stata riportata in pazienti con BC HER2-positivi trattati nel setting adiuvante con chemioterapia adiuvante (+/-

terapia anti-HER2), nonostante l'interpretazione dei risultati meriti cautela a causa del diverso uso di trastuzumab nei primi studi ^{40,41,48-60}.

Nel complesso, l'evidenza disponibile supporta l'integrazione dei sTIL in un modello prognostico clinico-patologico per i pazienti con carcinoma mammario TN e HER2+. In queste popolazioni i sTIL potrebbero potenzialmente aiutare ad identificare un gruppo di pazienti con esiti eccellenti che potrebbero giovare di una de-escalation del trattamento. È interessante notare come un recente studio condotto in pazienti con TNBC in stadio iniziale non trattate con chemioterapia adiuvante ma solo con approccio chirurgico abbia mostrato tassi di sopravvivenza eccellenti in pazienti con sTILs $\geq 30\%$ suggerendo che la valutazione dell'infiltrato potrebbe aiutare ad identificare un sottogruppo di pazienti che potrebbe potenzialmente essere risparmiato dal trattamento citotossico ⁸⁴. Una simile osservazione è emersa nell'ambito di uno studio di De Jong e colleghi ⁸⁵, che si è focalizzato su una coorte di pazienti con TNBC, pN0 ed età inferiore ai 40 anni, dove livelli elevati di TILs ($\geq 75\%$) sono risultati essere associati a prognosi favorevole, con incidenza cumulativa a 15 anni di metastasi a distanza o morte di solo il 2.1%, rispetto al 38.4% in pazienti con livelli di TILs inferiori.

Il ruolo prognostico positivo dei TILs valutati su campioni di BC non-trattato è stato inoltre confermato in pazienti affette da TNBC e HER2+ BC sottoposte a trattamento sistemico nel setting neoadiuvante. Viceversa, un ruolo prognostico in direzione opposta è stato suggerito nel sottotipo HR+/HER2-, soprattutto nel sottogruppo che non aveva raggiunto la pCR dopo NACT. Quest'ultima osservazione, apparentemente controintuitiva, suggerisce la necessità di approfondire maggiormente aspetti qualitativi in questo sottotipo di BC, nonostante non sia escludibile un possibile effetto confondente esercitato dai trattamenti di tipo endocrino somministrati nel setting post-neoadiuvante. Nel medesimo setting, i TILs sono stati riportati come in grado di predire l'attività antitumorale di trattamenti citotossici. Più nello specifico, maggiori livelli di TILs sono stati significativamente associati a maggiori tassi di pCR dopo NACT in tutti i sottogruppi, con una più solida associazione nei sottotipi a maggiore aggressività biologica, quali TNBC e HER2+.

La rilevanza clinica dei TILs è stata inoltre investigata quando valutati su malattia residua in pazienti che non raggiungono la pCR dopo NACT, con risultati contrastanti per il sottotipo HER2+ e TNBC. In particolare, maggiori livelli di TILs

su RD sono risultati avere un impatto prognostico positivo nel TNBC, con un effetto in direzione opposta nel BC HER2+. In questo contesto, una più approfondita analisi della composizione dell'infiltrato immunitario dopo esposizione alla NACT (+ terapia anti-HER2 in pazienti con BC HER2+) potrebbe aiutare a meglio comprendere la base biologica di tale associazione.

Anche per quanto concerne la malattia metastatica, TILs elevati si sono dimostrati un marker prognostico positivo in pazienti affetti da TNBC associandosi positivamente con l'OS. Tale associazione non è stata invece osservata nel sottotipo HER2+ BC ⁷³, dove è stata invece osservato un trend prognostico in direzione opposta. Tale risultato, apparentemente in conflitto con i dati dello studio Cleopatra ⁸⁸, può essere in parte spiegato dal fatto che nell'ambito dello studio Cleopatra la maggior parte dei campioni proveniva dal tumore primario, precludendo pertanto la possibilità di trarre conclusioni solide circa il ruolo prognostico dei TILs su metastasi.

Sottotipo BC	Validità clinica (prognostica)	LoE	Approvata da Linee guida	Potenziale utilità clinica (da dimostrare)
TNBC	<p>Ruolo prognostico setting adiuvante e neoadiuvante</p> <p>Valori di It-TIL e/o Str-TIL >60% sono stati segnalati come fattore prognostico positivo per pazienti trattati con chemioterapia adiuvante e neoadiuvante convenzionale^{33,36-43}.</p> <p>Associazione con pCR nel setting neoadiuvante</p> <p>TILs elevati sono associati ad un aumento della pCR dopo chemioterapia neoadiuvante⁴⁰.</p> <p>Ruolo prognostico su malattia residua post neoadiuvante</p> <p>Livelli elevati di RD TILs sono stati associati ad esiti eccellenti suggerendo un possibile ruolo nella selezione di pazienti ad alto rischio che rispondono bene al farmaco^{39,40,44-47}.</p>	IB ^a	<p>Si: parere di esperti alla 16a conferenza internazionale sul cancro al seno di San Gallo.</p> <p>Linee guida ESMO 2019 sul cancro al seno precoce³.</p> <p>Classificazione OMS dei Tumori, Tumori della Mammella, 5a edizione;</p>	<p>Integrazione con altre variabili clinico-patologiche per guidare la de-escalation del trattamento nei pazienti a basso rischio (cioè, nessuna antraciclina o addirittura nessun trattamento).</p> <p>Stratificazione del rischio in ambito post-neoadiuvante basata su TILs e RCB per guidare la decisione di un ulteriore trattamento adiuvante.</p> <p>Fattore di stratificazione negli studi clinici.</p>

HER2 BC	TILs hanno dimostrato un ruolo predittivo nei confronti della chemioterapia adiuvante e neoadiuvante potenziata da terapia anti-HER2 ^{40,41,48-60} .	IB ^a Sì: linee guida ESMO 2019 sul cancro al seno precoce ³ . Classificazione OMS dei Tumori, Tumori della Mammella, 5a edizione.	Integrazione in punteggi multiparametrici (ad esempio, HER2DX) per guidare l'escalation e la de-escalation del trattamento identificando pazienti a basso, medio ed alto rischio in termini di DFS.
HR+/HER2-BC	Non è stato dimostrato, vi sono stati risultati contrastanti provenienti da studi incentrati sul setting adiuvanti: alti livelli di TILs si sono visti associati ad un aumento del tasso di pCR ma ad una minore sopravvivenza ^{39,61,62} .	-	No Integrazione nei modelli di previsione del rischio nei confronti della NACT. Previsioni più accurate nel raggiungimento pCR. Progettazione di studi e selezione di pazienti.

Tabella III Sintesi della validità clinica dei TIL come marker prognostico e potenziale utilità clinica in pazienti con BC in fase iniziale.

1.6 Evoluzione biologica del BC durante l'evoluzione della malattia: focus sull'evoluzione tra malattia primitiva e metastatica

1.6.1 Evoluzione immunologica

Durante la storia naturale della patologia il BC continua ad evolvere spinto dalla stretta e continua interazione che possiede con le cellule immunitarie che costituiscono il microambiente tumorale ³⁵. In questo contesto, è noto come l'infiltrato immunitario sia dinamico nel corso dell'evoluzione della patologia, modificandosi a seguito del trattamento neoadiuvante e dall'evoluzione tra malattia in stadio iniziale e malattia avanzata.

1.6.1.2 Evoluzione malattia in stadio iniziale-malattia avanzata

In contrasto con il setting iniziale, il microambiente immunitario del BC metastatico è largamente inesplorato. Come precedentemente descritto, il BC metastatico sembra essere più “freddo” rispetto alla malattia in stadio iniziale, come supportato dall'osservazione di livelli di TILs inferiori ^{57-59,68}. Inoltre, il microambiente immunitario del BC avanzato si caratterizza, rispetto al BC in stadio iniziale, per funzioni immunitarie impoverite, dovute: (I) alla down-regulation delle molecole immuno-attivanti; (II) alla sovra-regolazione di quelle con proprietà immunosoppressive, rafforzando l'ipotesi della fase di evasione del tumore della sorveglianza immunitaria ⁷³.

Nello studio Ogiya R, et al. ⁶⁸ è emerso che i tumori HER2+ e TN alla prima recidiva metastatica sono caratterizzati da livelli di TILs inferiori e una composizione dell'infiltrato polarizzata in senso immuno-soppressorio, suggerendo il ruolo della fuga immunitaria nella progressione del tumore. Inoltre recentemente è stato riportato che pazienti affetti da TNBC trattati con più linee di trattamento presentavano livelli inferiori di TILs rispetto ai pazienti trattati in linee più precoci suggerendo pertanto una progressiva evoluzione del microambiente immunitario in senso immunosoppressorio con l'avanzare della storia naturale della neoplasia. Tale osservazione trova riscontro clinico dai risultati degli studi di immunoterapia condotti in pazienti con TNBC avanzato che suggeriscono un'attività antitumorale mitigata in pazienti pesantemente pretrattati rispetto a pazienti trattati in prima linea metastatica.

1.6.2 Evoluzione fenotipica/recettoriale

Una sempre crescente mole di dati suggerisce che il BC possa evolvere dal punto di vista fenotipico nel corso dell'evoluzione stessa della malattia. In particolare, è stato ampiamente descritto come l'espressione recettoriale e fenotipica possano evolvere sia tra malattia primitiva e metastatica, sia tra malattia basale e residua post NACT⁶⁴⁻⁶⁶. Questi aspetti sono risultati rilevanti anche dal punto di vista dell'impatto prognostico, sia per quanto riguarda perdita di espressione del recettore singolo tra BC primario e siti metastatici^{65,66}, che per quanto concerne alla discordanza fenotipica riscontrata fra malattia primitiva e recidiva metastatica.

1.6.2.2 Evoluzione malattia in stadio iniziale-malattia avanzata

La discrepanza recettoriale e l'impatto prognostico negativo associato alla perdita d'espressione recettoriale è stato ampiamente descritto nell'ambito di diversi studi^{64, 77-83, 89}. In particolare, nello studio Dieci M.V. e colleghi⁶⁴, sono emersi tassi di discordanza recettoriale tra malattia primaria e metastatica nei confronti di ER, PgR e HER2 rispettivamente del 13,4%, 39% e 11,8% evidenziando come il recettore soggetto a maggiore instabilità sia quello del progesterone mentre il più stabile appaia l'HER2.

Nei confronti di quest'ultimo è interessante anche evidenziare come, tra i casi discordanti, vi siano stati più pazienti che ne hanno guadagnato l'espressione rispetto a quelli che l'hanno persa. Questi risultati sono stati ulteriormente confermati anche da altri studi su serie retrospettive e prospettiche^{80-83, 89}.

Riguardo HER2 è stata di recente interesse la presa in considerazione della nuova categoria emergente HER2-low-positive durante l'evoluzione recettoriale tra malattia primitiva e avanzata.

Nello studio Miglietta F. et al.⁶⁷ è stata identificata una sostanziale instabilità dell'espressione di HER2 tra BC primario a quello metastatico il quale ha mostrato una discordanza di espressione HER2-low-positive da o verso il fenotipo HER2-zero in una percentuale non trascurabile di pazienti soprattutto dal sottogruppo HR-positivo/HER2-negativo. Tale instabilità è stata confermata anche nel sottogruppo di pazienti che presentavano fenotipo stabile nel corso dell'evoluzione della malattia. Tali dati nel complesso enfatizzano l'importanza di riprofilare la biologia della malattia alla recidiva con l'obiettivo di espandere il pool di paziente che

potrebbero avere accesso a strategie anti-HER2, che a breve saranno disponibili per il sottotipo HER2-low-positive.

Di ulteriore interesse in questo campo di ricerca risulta essere il ruolo prognostico evidenziato dalla perdita di espressione recettoriale e l'eventuale evoluzione fenotipica nella malattia avanzata. Come descritto nello studio Dieci M. V. et al ⁶⁴, basato sull'analisi di 119 casi di recidiva di BC, la perdita dell'espressione recettoriale piuttosto che il guadagno, e la discordanza fenotipica con un'evoluzione verso un sottotipo TN risulta associata ad una prognosi sfavorevole testimoniata da una Post-Recurrence Survival e OS significativamente più brevi rispetto alla controparte concordante. Esito peggiore che verosimilmente può essere attribuito ad una selezione di cloni resistenti come conseguenza di pre-trattamenti o al passaggio verso un fenotipo a maggior aggressività. Risultati simili sono stati riportati anche da altri studi ⁹⁰⁻⁹².

2. Scopo dello studio

Il presente lavoro è uno studio retrospettivo volto ad esplorare l'eterogeneità clinica, biologica ed immunologica delle nuove categorie emergenti HER2-low-positive ed ER-low-positive.

Quello che si prefigge il seguente elaborato è di:

- Indagare l'eterogeneità clinico-biologica-immunitaria di ER-low-positive ed HER2-low-positive;
- Valutare l'evoluzione fenotipica, includendo le categorie HER2-low-positive e ER-low-positive tra campioni abbinati di recidive locoregionali o metastasi a distanza;
- Indagare l'impatto prognostico della conversione fenotipica.

3. Materiali e metodi

3.1 Popolazione

Sono state identificate retrospettivamente pazienti con carcinoma mammario avanzato sottoposte a biopsia di ricaratterizzazione di un sito metastatico, con status matched di HER2 ed ER noto, seguite presso l'UOC di Oncologia 2 dell'Istituto Oncologico Veneto I.R.C.C.S. – Padova (Italia).

I dati clinico-patologici sono stati retrospettivamente recuperati dalle cartelle cliniche ed inseriti in forma anonimizzata in un database dedicato.

3.2 Patologia

Gli stati di HER2 e di ER sono stati classificati utilizzando le raccomandazioni ASCO/CAP in vigore attualmente. Nel dettaglio, lo stato HER2 è stato considerato positivo in caso di punteggio 3+ in IHC e/o amplificazione HER2 in ISH, mentre è stato classificato come negativo in caso di punteggio 0/1+ o /2+ in IHC in assenza di amplificazione di HER2 in ISH. I casi HER2-negativi sono stati ulteriormente sotto-classificati come: HER2-0 in caso di punteggio in IHC = 0 ed HER2-low-positive in caso di punteggio IHC = 1+/2+ in assenza di amplificazione del gene HER2 in ISH.

Per quanto riguarda lo stato di ER, esso è stato classificato come segue:

- positivo in caso di colorazione $\geq 10\%$ in IHC;
- ER-low-positive in caso di colorazione in IHC compresa tra 1% e 9%;
- ER-0 in caso di colorazione in IHC = 0%.

3.3 Valutazione TILs

I TILs stromali sono stati valutati sulle sezioni colorate in ematossilina/eosina relative al tumore primitivo (campioni “treatment-naive” relativi all'intervento chirurgico della neoplasia primitiva o alla biopsia diagnostica) e metastatico (tessuto relativo a campione bioptico o di resezione chirurgica di sito metastatico) adottando le raccomandazioni del Working Group Internazionale sui Biomarcatori Immunologici. Le aree selezionate sono state analizzate ad un ingrandimento 200X al fine di caratterizzare l'infiltrazione linfocitaria stromale.

Il livello di TILs è stato definito come rapporto tra area stromale intratumorale occupata da infiltrato infiammatorio mononucleato e area stromale intratumorale totale.

I TILs sono stati considerati sia come variabile continua, sia come variabile categorica, adottando i cutoff precedentemente suggeriti da Dentkert et al ¹²:

- TILs bassi: <11%;
- TILs intermedi: 11-59%;
- TILs elevati: >59%.

3.4 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state eseguite con software IBM SPSS Statistics (versione 22.0, IBM Corp, Armonk, NY, USA). Analisi di statistica descrittiva sono state applicate per riportare le caratteristiche demografiche e clinico-patologiche delle pazienti. Le variabili continue sono state descritte calcolando media, mediana e differenza interquartile. Le differenze in termini di distribuzione di variabili continue in vari sottogruppi sono state valutate applicando i test non parametrici di Mann-Whitney and Kolmogorov-Smirnov mentre il test Chi-quadrato (χ^2) è stato adottato per eseguire confronti di variabili categoriche tra sottogruppi. L'evoluzione fenotipica tra malattia primitiva e metastasi è stata graficamente riportata mediante i diagrammi di Sankey. Per le analisi di sopravvivenza abbiamo adottando come endpoint l'overall survival, intesa come il tempo intercorso dalla diagnosi alla morte o ultimo follow up e la post-progression-survival (PPS), intesa come il tempo intercorso dalla diagnosi di malattia recidivata/stadio IV alla morte o ultimo follow up. Il modello di regressione di Cox è stato adottato per calcolare gli hazard ratio (HR) e gli intervalli di confidenza al 95%, il metodo di Kaplan Meier è stato applicato per costruire le curve di sopravvivenza ed il log-rank test è stato utilizzato per eseguire confronti tra gruppi per variabili dipendenti dal tempo. I p-value sono stati riportati a 2 code ed il livello di significatività è stato posto a $p < 0.05$.

4. Risultati

4.1 Caratteristiche popolazione generale

Nel presente studio sono state incluse 483 pazienti con carcinoma mammario avanzato sottoposte a ricaratterizzazione di malattia tra febbraio 2002 e marzo 2019.

Le principali caratteristiche clinico-patologiche della popolazione globale dello studio sono riportate in Tabella IV. L'età media e mediana alla diagnosi è risultata rispettivamente di 53,3 (21,25 – 94,38) e 51,6 anni (Q1-Q3 43,4 - 62,6). La maggior parte dei pazienti con diagnosi di carcinoma mammario in stadio iniziale presentava stadio clinico II alla diagnosi (34,6%). Il 5,1% si presentava in stadio IV de novo. Il tipo istologico maggiormente rappresentato è risultato essere l'istotipo duttale (81,4%) e nel 56,7% dei casi il grado istologico era scarsamente differenziato (G3). Per quanto riguarda i trattamenti somministrati nel setting di malattia iniziale, il 51,8% ha effettuato chemioterapia e il 64,6% ha ricevuto un trattamento ormonale. Su 118 pazienti con malattie HER2+, il 54,2% ha ricevuto terapia anti-HER2.

Per quanto riguarda i trattamenti effettuati in contesto metastatico, circa l'80% ha effettuato chemioterapia, il 24,2% ha ricevuto trattamento anti-HER2, il 65,6% terapia endocrina e circa l'8% un trattamento con inibitore CDK 4/6.

La maggior parte delle pazienti è stata sottoposta a biopsia di ricaratterizzazione a livello di un sito metastatico a distanza (56,9%). Delle pazienti sottoposte a ricaratterizzazione a carico di una recidiva locoregionale (n=208), il 14,5% presentavano recidiva locoregionale isolata.

Il tempo medio e mediano tra la diagnosi di recidiva e la biopsia di ricaratterizzazione era di 7 mesi (0,00 – 121,99) e 0,00 (0,00 – 6,16), suggerendo pertanto che la maggior parte dei pazienti è stata sottoposta a ricaratterizzazione della malattia metastatica contestualmente alla diagnosi di recidiva.

Caratteristiche	Variabili	N (%)	Media (Min- Max)	Mediana (Q1- Q3)
Sesso	F	479 (99,2%)		
	M	4 (0,8%)		
Età			53,29 (21,25- 94,38)	51,57 (43,40 - 62,58)
Stadio alla diagnosi	Stadio I	108 (23,4%)		
	Stadio II	167 (34,6%)		
	Stadio III	165 (34,1%)		
	Stadio IV	25 (5,1%)		
	Totale	465 (96,3%)		
	N.A.	18 (3,7%)		
Stadio IV alla diagnosi	No	455 (94,2%)		
	Si	25 (5,1%)		
	N. A.	3 (0,6)		
Istologia BC alla diagnosi	Duttale infiltrante	393 (81,4%)		
	Lobulare infiltrante	57 (11,8%)		
	Altro	29 (6,0%)		
	N. A.	7 (1,4%)		
Grading alla diagnosi	1	25 (5,2%)		
	2	166 (34,4%)		
	3	274 (56,7%)		
	N. A.	21 (4,4%)		
Sede biopsia metastasi	Locale	208 (43,1%)		
	A distanza	275 (56,9%)		
Sede biopsia metastasi (organo)	Fegato	128 (26,5%)		
	Tessuti molli/ cicatrice chirurgica	161 (33,3%)		
	Polmone	32 (6,6%)		
	SNC	27 (5,6%)		
	Osso	30 (6,2%)		
	Altro	19 (3,9%)		
	Infiltrazione linfonodi	86 (17,8%)		
Tempo tra recidiva e biopsia metastasi (mesi)			7,93 (0,00 - 121,99)	0,00 (0,00 - 6,16)

CT neoadiuvante	0	336 (69,6%)
	1	147 (30,4%)
CT adiuvante	0	228 (47,2%)
	1	250 (51,8%)
	N.A.	5 (1%)
Terapia ormonale adiuvante	0	153 (31,7%)
	1	312 (64,6%)
	N.A.	18 (3,7%)
Terapia anti-HER2 adiuvante	0	401 (83%)
	1	64 (13,3%)
	N.A.	18 (3,7%)
Regime CT per MBC	0	84 (17,4%)
	1	381 (78,9%)
	N.A.	18 (3,7%)
Terapia anti-HER2 per MBC	0	349 (72,3%)
	1	117 (24,2%)
	N.A.	17 (3,5%)
Terapia endocrina per MBC	0	151 (31,3%)
	1	317 (65,6%)
	N.A.	15 (3,1%)
Terapia con CDK per MBC	0	368 (76,2%)
	1	38 (7,9%)
	N.A.	77 (15,9%)

Tabella IV Caratteristiche clinico patologiche popolazione partecipanti allo studio.

4.1.1 Status di ER

L'espressione media e mediana di ER è risultata essere rispettivamente 54,67% (0.00-100.00%) e 70.00% (5.00-90.00%) a livello di malattia primitiva e rispettivamente 48.12% (0.00-100.00%) e 60.00% (0.00-90.00%) a livello dei siti metastatici.

La distribuzione delle categorie sulla scorta dell'espressione di ER nel contesto della neoplasia primitiva è risultata essere come segue:

- ER-0 → 22,2%;
- ER-low-positive → 4,6%;
- ER-positivo → 73,3%.

La distribuzione delle categorie sulla scorta dell'espressione di ER a livello dei siti metastatici è risultata essere come segue:

- ER-0 → 32,9%;
- ER-low-positive → 5,4%;
- ER-positivo → 61,7%.

4.1.2 Status di HER2

La distribuzione delle categorie sulla base dello status di HER2 a livello della neoplasia primitiva è risultata essere come segue:

- HER2-0 → 40,6%;
- HER2-low-positive → 35,0%;
- HER2-positivo → 24,4%.

La distribuzione delle categorie sulla base dello status di HER2 nel contesto dei siti metastatici è risultata essere come segue:

- HER2-0 → 40,2%;
- HER2-low-positive → 36,9%;
- HER2-positivo → 23,0%.

Tumore primitivo	Espressione	N	%	Tumore Metastatico	Espressione	N	%
ER	Negativo (0)	107	22,2%	ER	Negativo (0)	159	32,9%
	Low-positive	22	4,6%		Low-positive	26	5,4%
	Positivo	354	73,3%		Positivo	298	61,7%
HER2	Negativo (0)	196	40,6%	HER2	Negativo (0)	194	40,2%
	Low-positive	169	35,0%		Low-positive	178	36,9%
	Positivo	118	24,4%		Positivo	111	23,0%

Tabella V Stato di espressione HER2 ed ER nel contesto della malattia primitiva e metastatica.

4.2 Fenotipo carcinoma mammario a livello di tumore primitivo e metastatico

Secondo l'espressione di ER e HER2, i pazienti sono stati classificati come segue in figura 6.

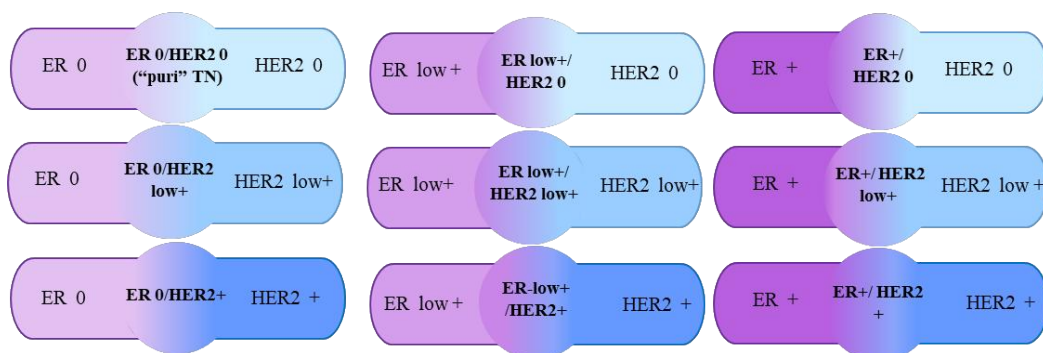


Figura 6 Classificazione fenotipica carcinoma mammario.

Per quanto riguarda il fenotipo tumorale in figura 7 viene raffigurata la distribuzione recettoriale nel tumore primitivo ed emerge come il fenotipo maggiormente rappresentato sia risultato essere ER+/HER2-low-positive (29,8%) mentre quelli più rari, con parità di frequenza, sono risultati essere quelli caratterizzati da bassa espressione di ER (ER-low-positive/HER2-low-positive, [1,2%] ed ER-low-positive/HER2 + [1,2%]).

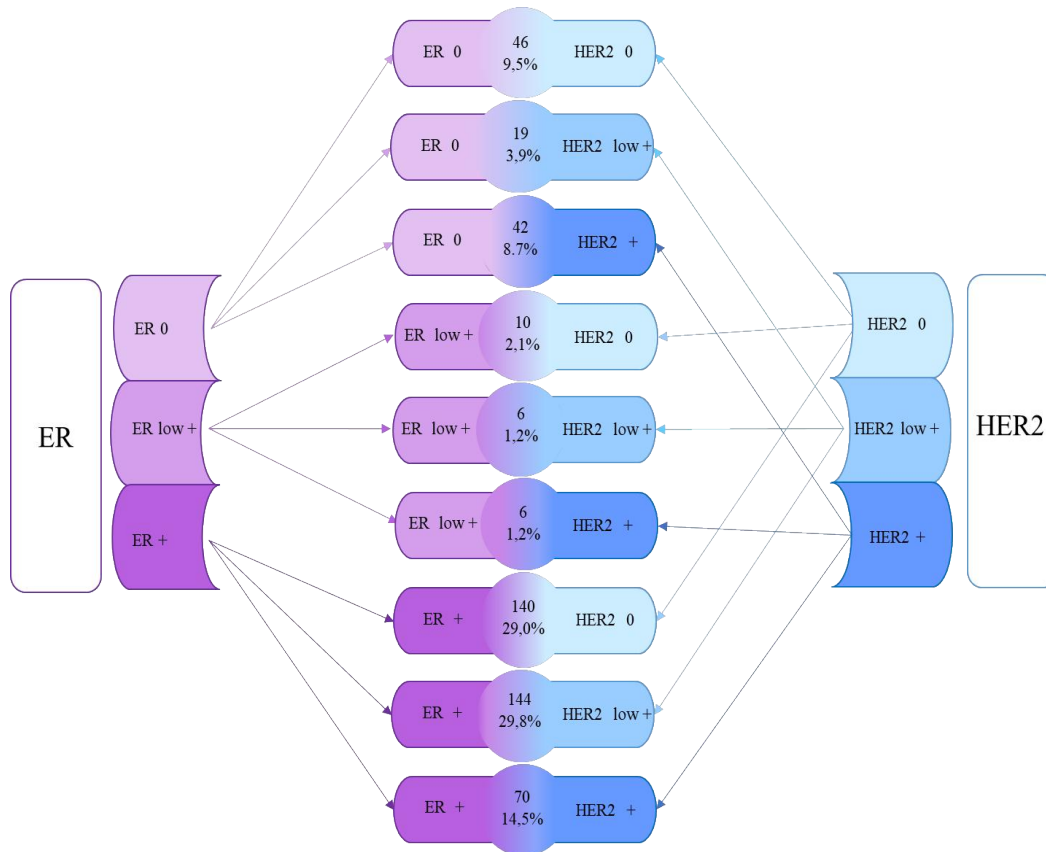


Figura 7 Fenotipo malattia primitiva.

Una simile distribuzione di prevalenza è stata osservata nell'ambito del fenotipo della malattia metastatica, come mostrato in figura 8.

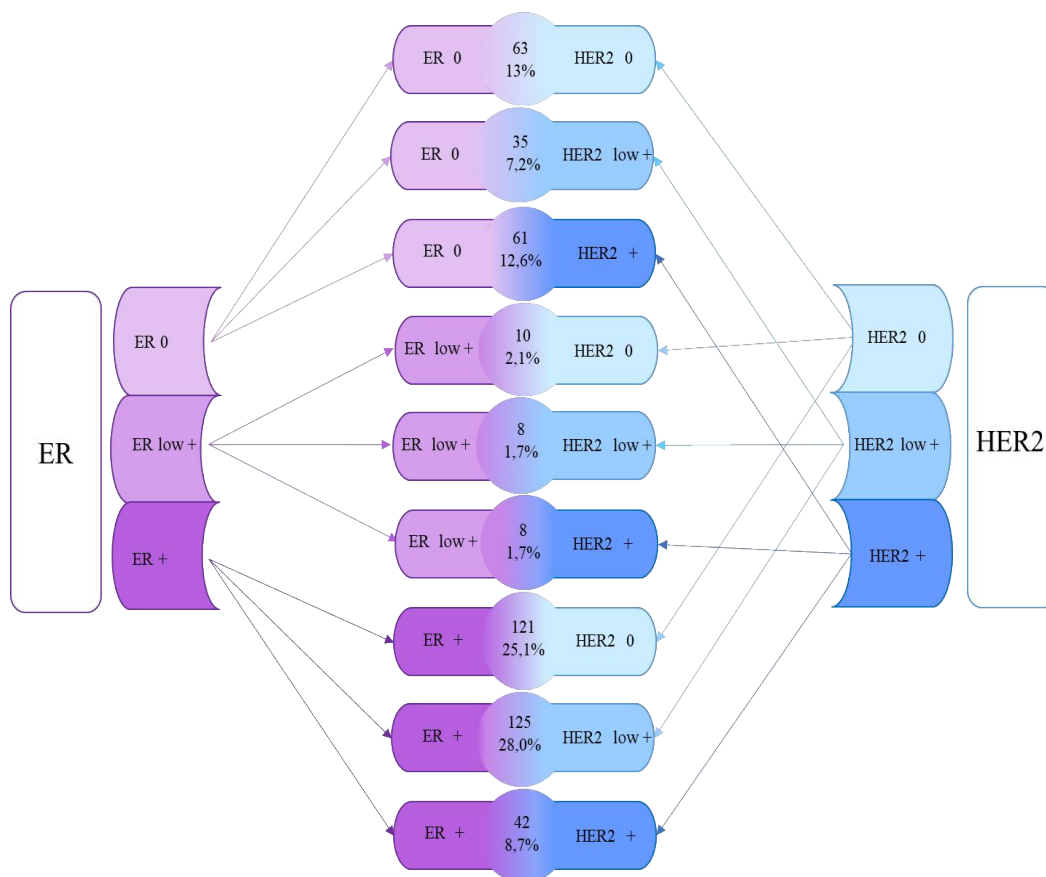


Figura 8 Fenotipo malattia metastatica.

4.3 Conversione fenotipica da BC primitivo a metastatico

Nella figura 9 sono mostrati i tassi di conversione fenotipica da malattia primitiva a malattia metastatica. In particolare ER-0/HER2+ è risultato essere il fenotipo più stabile, con una percentuale di concordanza dell'88.1%, mentre i fenotipi più instabili sono risultati essere ER-low-positive/HER2-0 ed ER-low-positive/HER2-low-positive i quali hanno mostrato una conversione verso altri fenotipi tumorali rispettivamente del 2,1 e 1,2%. In particolare tutti i casi di queste ultime categorie si sono convertiti verso fenotipi differenti.

Globalmente è possibile apprezzare come la categoria ER-0 da malattia primitiva a metastatica si sia arricchita di casi a scapito della categoria ER+.

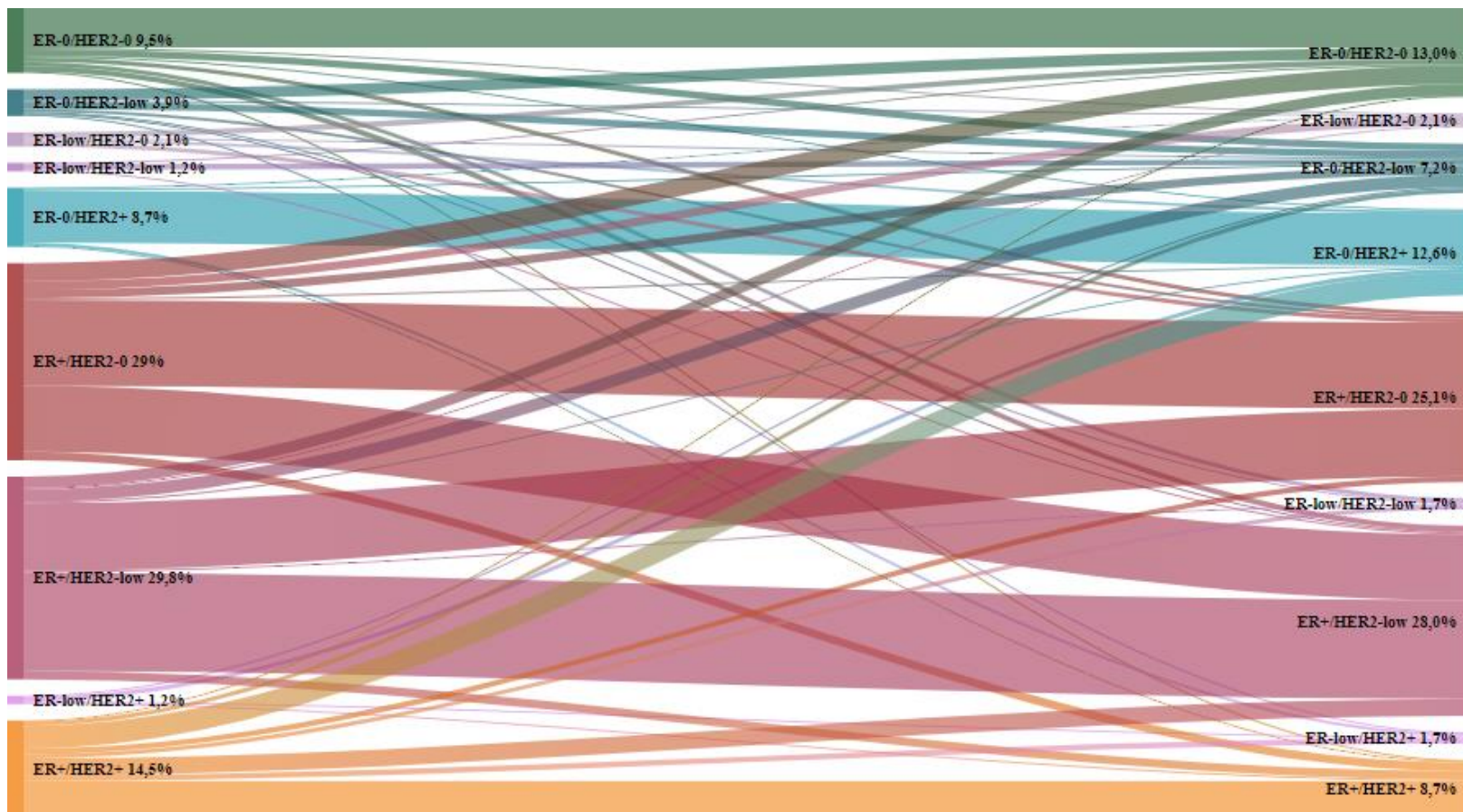


Figura 9 Sankey diagram tassi di conversione fenotipica da malattia primitiva a malattia metastatica.

Fenotipo primitivo		Fenotipo metastatico								Totale	
		ER-0/HER2-0	ER-0/HER2-low+	ER-0/HER2+	ER-low+/HER2-0	ER-low+/HER2-low+	ER-low+/HER2+	ER+/HER2-0	ER+/HER2-low+		ER+/HER2+
ER-0/HER2-0	N (%)	28 (5,8%)	5 (1,0%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)	3(0,6%)	0 (0,0%)	3 (0,6%)	4(0,8%)	1 (0,2%)	46 (9,5%)
ER-0/HER2-low+	N (%)	8 (1,7%)	5 (1,0%)	0 (0,0%)	1 (0,2%)	1(0,2%)	1 (0,2%)	2 (0,4%)	1(0,2%)	0 (0,0%)	19 (3,9%)
ER-0/HER2+	N (%)	0 (0,0%)	1 (0,2%)	37 (7,7%)	1 (0,2%)	0(0,0%)	2 (0,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,2%)	42 (8,7%)
ER-low+/HER2-0	N (%)	4 (0,8%)	1 (0,2%)	2 (0,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (0,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	10 (2,1%)
ER-low+/HER2-low+	N (%)	1 (0,2%)	4 (0,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,2%)	0 (0,0%)	6 (1,2%)
ER-low+/HER2+	N (%)	0 (0,0%)	1 (0,2%)	3 (0,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,2%)	6 (1,2%)
ER+/HER2-0	N (%)	13 (2,7%)	6 (1,2%)	1 (0,2%)	6 (1,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	61 (12,6%)	47 (9,7%)	6 (1,2%)	140 (29,0%)
ER+/HER2-low+	N (%)	8 (1,7%)	9 (1,9%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)	0 (0,0%)	48 (9,9%)	70 (14,5%)	6 (1,2%)	144 (29,8%)
ER+/HER2+	N (%)	1 (0,2%)	3 (0,6%)	16 (3,3%)	0 (0,0%)	3(0,6%)	4 (0,8%)	4 (0,8%)	12 (2,5%)	27 (5,6%)	70 (14,5%)
Totale	N (%)	63 (13,0%)	35 (7,2%)	61 (12,6%)	10 (2,1%)	8 (1,7%)	8 (1,7%)	121 (25,1%)	135 (28,0%)	42 (8,7%)	483 (100,0%)

Tabella VI Tassi di conversione fenotipica da malattia primitiva a malattia metastatica. Conteggio N.

4.4 Landscape clinica

La tabella VII e la tabella VIII riassumono le associazioni tra le categorie definite sulla base dello status di HER2 ed ER rispettivamente della malattia primitiva e metastatica.

Per quanto concerne la malattia primitiva abbiamo osservato un'associazione significativa tra espressione di ER ed espressione di HER2 ($p < 0.001$). In particolare, considerando la popolazione HER2-negativa (HER2-0 + HER2-low-positive) abbiamo osservato un arricchimento per casi ER+ all'interno della categoria HER2-low-positive. Inoltre, nell'ambito dei casi ER-0 ed ER-low-positive, la maggior parte presentava fenotipo HER2-0, mentre nell'ambito dei casi ER-positivi, abbiamo osservato una sostanziale equidistribuzione tra casi HER2-0 ed HER2-low-positive, come mostrato in tabella VII.

		ER primitivo			Totale	p
		ER-0	ER- low+	ER+		
HER2	HER2-0	N	44 (12,7%)	8 (2,3%)	133 (38,4%)	0,008
	HER2-low +	N	18 (5,2%)	6 (1,7%)	137 (39,6%)	
Totale		N	62	14	270	
		% sul totale di HER2	17,9%	4,0%	78,0%	100,0%
		% sul totale di ER	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		% sul totale	17,9%	4,0%	78,0%	100,0%

Tabella VII Tavola di contingenza HER2/ER nel contesto della malattia primitiva esclusi pazienti HER2 +. Conteggio N.

Simili associazioni sono state osservate nell'ambito dell'espressione di ER e HER2 a carico dei siti metastatici, come mostrato in tabella VIII.

		ER metastatico			Totale	p
		ER-0	ER-low+	ER+		
HER2	HER 2-0	N	62 (17,9%)	9 (2,6%)	117 (33,8%)	188 (54,3%)
	HER 2-low+	N	30 (8,7%)	5 (1,4%)	123 (35,5%)	
Totale		N	92	14	240	346
		% sul totale di HER2	26,6%	4,0%	69,4%	100,0%
		% sul totale di ER	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		% sul totale	26,6%	4,0%	69,4%	100,0%

Tabella VIII Tavola di contingenza HER2 - ER nel contesto della malattia metastatica esclusi pazienti HER2 +. Conteggio N.

Nella tabella IX vengono riportate le caratteristiche della popolazione segregate in base all'espressione di ER. In particolare, ponendo il focus sulla malattia HER2-negativa (HER2-0 + HER2-low-positive), emergono diverse associazioni tra il sottotipo ER-0 ed ER-low-positive. In particolare emerge che in, rapporto, i sottotipi ER-0 ed ER-low-positive: hanno presentato un grading alla diagnosi più indifferenziato (G3) rispettivamente nel 82,0 % in ER-0 e 85,7% in ER-low-positive rispetto al 42,5 % di ER+ mentre, per quanto riguarda la sede di recidiva preferenziale (surrogata dalla sede di biopsia), il sottotipo ER+ è risultato essere più frequentemente localizzato a livello del fegato mentre ER-low-positive ed ER-0 sono stati maggiormente associati a recidive a livello polmonare ed ER-low-positive anche al sistema nervoso centrale (SNC). Per quanto riguarda l'età non vi è alcuna differenza d'insorgenza di un sottotipo tumorale rispetto ad un altro mentre per quanto riguarda la distribuzione dei livelli di Ki-67 a livello dei sottotipi tumorali emerge come in ER-0 ed ER-low-positive la concentrazione media sia superiore rispetto al sottotipo ER+ (rispettivamente 49%, 43% per ER-0 ed ER-low-positive e 26% per ER+).

Per quanto concerne al regime terapeutico i sottotipi ER-0 ed ER-low-positive sono stati significativamente più soggetti a trattamenti neoadiuvante rispetto al sottotipo ER+, viceversa il sottotipo ER+ ha ricevuto maggiormente terapia ormonale rispetto ai sottotipi ER-low-positive ed ER-0 (rispettivamente 67,6% 48,9% e 36,4%). Simili associazioni sono state osservate per quanto riguarda i trattamenti per malattia avanzata, con i fenotipi ER-0 ed ER-low-positive meno sottoposti a terapia ormonale e CDK 4/6 inibitori rispetto la controparte ER+.

		N ER-0 (% di colonna a)	N ER-low (% di colonna a)	N ER+ (% di colonna a)	p	
		ER-0	ER-low	ER+		
Sesso	F	62 (100%)	14 (100,0%)	267 (98,9%)	N.S.	
	M	0 (0%)	0 (0,0%)	3 (1,1%)		
	N.A.	2 (0,9%)				
Età	Media (Min-Max)	51,7 (30,6 - 82,8)	54,14 (37,2 - 74,6)	54,9 (21,25 - 85,9)	N.S.	
	Mediana (Q1-Q3)	49,4 (41,8 - 59,6)	53,0 (41,9 - 65,5)	54,3 (45,3 - 64,0)		
Stadio IV alla diagnosi	no stage IV	62 (100%)	13 (92,9%)	253 (94%)	N.S.	
	stage IV	0 (0%)	1 (7,1%)	16 (6%)		
	N.A.	77 (22,3%)				
Istologia alla diagnosi	Duttale infiltrante	52 (83,9%)	13 (92,9%)	209 (78,0%)	N.S.	
	Lobulare infiltrante	3 (4,8%)	1 (7,1%)	40 (14,9%)		
	Altro	7 (11,3%)	0 (0,0%)	19 (7,1%)		
	N.A.	2 (0,6%)				
Grading alla diagnosi	1	0 (0,0%)	0 (0,0%)	21 (8,1%)	N.S.	
	2	11 (18,0%)	2 (14,3%)	128 (49,4%)	N.S.	0,05
	3	50 (82,0%)	12 (85,7%)	110 (42,5%)	0,05	N.S.
	N.A.	12 (3,5%)				

	Livelli Ki-67 alla diagnosi	Media (Min-Max)	49 (1-98)	43 (10-80)	26 (0-80)	< 0,001		N.S.
		Mediana (Q1-Q3)	50 (28-70)	35 (20-70)	22 (12-35)			
	Sede recidiva	Locale	48 (44,9%)	9 (40,9%)	151 (42,7%)	N.S.		
		Distanza	59 (55,1%)	13 (59,1%)	203 (57,3%)			
	Sede biopsia metastasi	Fegato	9 (14,5%)	0 (0,0%)	90 (33,3%)	N.S.		0,05
		Tessuti molli/ci catrice chirurgica	28 (45,2%)	5 (35,7%)	87 (32,2%)	N.S.		
		Polmone	9 (14,5%)	4 (28,6%)	9 (3,3%)	0,05		N.S.
		SNC	1 (1,6%)	2 (14,3%)	5 (1,9%)	N.S.	0,05	N.S.
		Osso	3 (4,8%)	0 (0,0%)	19 (7,0%)	N.S.		
		Altro	2 (3,2%)	0 (0,0%)	15 (5,6%)			
Linfonodi		10 (16,1%)	3 (21,4%)	45 (16,7%)				
Trattamenti per malattia in stadio iniziale	CT neoadiuvante	0	22 (48,9%)	4 (36,4%)	123 (67,6%)	NS		0,05
		1	23 (51,1%)	7 (63,6%)	59 (32,4%)	0,05		NS
		N.A.	128 (37%)					
	HT neoadiuvante	0	45 (100%)	10 (90,9%)	168 (93,9%)	N.S.		
		1	0 (0,0%)	1 (9,1%)	11 (6,1%)			
		N.A.	111 (32,1%)					
	CT adiuvante	0	22 (36,1%)	6 (42,9%)	137 (51,3%)	N.S.		
		1	39 (63,9%)	8 (57,1%)	130 (48,7%)			
	HT adiuvante	0	54 (91,5%)	6 (46,2%)	38 (14,6%)	0,05	NS	

		1	5 (8,5%)	7 (53,8 %)	222 (85,4 %)	N.S.	0,05
	Terapia anti HER2	0	80 (78,4 %)	16 (80,0 %)	305 (88,9 %)	N.S.	
		1	22 (21,6 %)	4 (20,0 %)	38 (11,1 %)		
Trattament i per malattia in stadio metastatico	CT		1 (1,6%)	0 (0,0%)	2 (0,7%)	N.S.	
		0	8 (12,9 %)	4 (28,6 %)	57 (21,1 %)		
		1	51 (82,3 %)	10 (71,4 %)	201 (74,4 %)		
		NA	2 (3,2%)	0 (0,0%)	10 (3,7%)		
	HT		1 (1,6%)	0 (0,0%)	2 (0,7%)	N.S.	
		0	47 (75,8 %)	9 (64,3 %)	34 (12,6 %)	0,05	N.S.
		1	12 (19,4 %)	4 (28,6 %)	228 (84,4 %)	N.S.	0,05
		NA	2 (3,2%)	1 (7,1%)	6 (2,2%)		
	Terapia CDK		22 (35,5 %)	5 (38,5 %)	5 (1,9%)	N.S.	
		0	39 (62,9 %)	8 (61,5 %)	231 (85,9 %)	0,05	N.S.
		1	1 (1,6%)	0 (0,0%)	33 (12,3 %)	N.S.	0,05
		NA	2 (1,9%)	1 (4,5%)	1 (0,3%)		

Tabella IX Differenze clinico-patologiche della popolazione in base allo stato recettoriale ER esclusi HER2+. Chemioterapia CT, Ormono terapia HT.

Per quanto riguarda la valutazione delle caratteristiche clinico-patologiche segregate in base allo stato recettoriale di HER2, e focalizzandosi sulla popolazione HER2-negativa (HER2-low-positive versus HER2-0) l'unica associazione statisticamente significativa è risultata essere quella con la somministrazione della terapia ormonale, risultata essere più frequente nel sottotipo HER2-low-positive. Nei confronti delle altre caratteristiche clinico patologiche non sono state riscontrate correlazioni statisticamente significative.

		HER20		HER2- low +	p	
					HER2-0	HER2- low +
Sesso	F	184 (99,5%)	159 (98,8%)	N.S.		
	M	1 (0,5%)	2 (1,2%)			
Età	Media (Min-Max)	53,0 (21,3- 85,9)	55,4 (30,6- 84,9)	N.S.		
	Mediana (Q1-Q3)	52,2 (42,8- 61,8)	54,8 (45,3- 65,5)			
Stadio IV alla diagnosi	no stage IV	175	153	N.S.		
	stage IV	9	8			
Istologia alla diagnosi	Duttale infiltrante	138 (75,4%)	136 (84,5%)	N.S.	0,05	
	Lobulare infiltrante	28 (15,3%)	16 (9,9%)	N.S.		
	Altro	17 (9,3%)	9 (5,6%)			
Grading alla diagnosi	1	8 (4,5%)	13 (8,2%)	N.S.		
	2	79 (44,9%)	62 (39,2%)			
	3	89 (50,6%)	83 (52,5%)			
Livelli Ki-67 alla diagnosi	Media (Min-Max)	32 (0-98)	30 (4-80)	N.S.		
	Mediana (Q1-Q3)	25 (12-50)	28 (15- 40)			
Sede recidiva	Locale	88 (44,9%)	66 (39,1%)	N.S.		
	Distanza	108 (55,1%)	103 (60,9%)			
Sede biopsia metastasi	Fegato	49 (26,5%)	50 (31,1%)	N.S.		
	Tessuti molli/cicatri ce chirurgica	68 (36,8%)	52 (32,3%)			
	Polmone	9 (4,9%)	13 (8,1%)			
	SNC	7 (3,8%)	1 (0,6%)			
	Osso	12 (6,5%)	10 (6,2%)			
	Altro	10 (5,4%)	7 (4,3%)			
	Linfonodi	30 (16,2%)	28 (17,4%)			

Trattamenti per malattia in stadio iniziale	CT neoadiuvante	0	86 (67,2%)	63 (57,3%)	N.S.	
		1	42 (32,8%)	47 (42,7%)		
		N.A. (% sul totale)	108 (31,2%)			
	HT neoadiuvante	0	123 (93,2%)	100 (91,2%)	0,05	N.S.
		1	9 (6,8%)	9 (8,3%)	N.S.	0,05
		N.A. (% sul totale)	105 (30,3%)			
	CT adiuvante	0	87 (47,3%)	78 (49,4%)	N.S.	
		1	97 (52,7%)	80 (50,6%)		
		N.A. (% sul totale)	4 (1,2%)			
	Ormono terapia adiuvante	0	64 (35,8%)	34 (22,2%)	0,05	N.S.
		1	115 (64,2%)	119 (77,8%)	N.S.	0,05
		N.A. (% sul totale)	14 (4,0%)			
Trattamenti per malattia in stadio avanzato	CT		2 (1,1%)	1 (0,6%)	N.S.	
		0	31 (16,8%)	38 (23,6%)		
		1	144 (77,8%)	118 (73,3%)		
		N.A.	8 (4,3%)	4 (2,5%)		
	HT		2 (1,1%)	1 (0,6%)	N.S.	
		0	54 (29,2%)	36 (22,4%)		
		1	123 (66,5%)	121 (75,2%)		
		N.A.	6 (3,2%)	3 (1,9%)		
	CDK		21 (11,4%)	11 (6,9%)	N.S.	
		0	146 (79,3%)	132 (82,5%)		
		1	17 (9,2%)	17 (10,6%)		

Tabella X Differenze clinico-patologiche della popolazione in base allo stato recettoriale HER2. Chemioterapia CT, Ormono terapia HT.

4.5 Landscape immunitaria.

Nella tabella XI sono stati riportati i valori dei TILs nel tumore primitivo e metastatico. Prendendo in considerazione il BC primitivo emerge come i TILs si distribuiscano in maniera significativamente differente a seconda dello stato recettoriale, in particolare, dall'analisi emerge una correlazione statisticamente significativa ($p < 0,009$) tra livelli di TILs e stato recettoriale ER, con le categorie ER-low-positive ed ER-0 caratterizzate da maggiori livelli di TILs (valore medio rispettivamente di 14,36 e 11,47) rispetto alla categoria ER + (valore medio 8,95).

Per quanto riguarda lo stato recettoriale di HER2 non è stata osservata alcuna correlazione statisticamente significativa tra distribuzione dei TILs e stato recettoriale (p 0,629) di fatti, come emerge dalla tabella XI e dalla figura 10 i TILs risultano equidistribuiti tra le varie categorie.

TILs_primitivo						
	Medio	Mediana	Massimo	Minimo	Percentile 25	Percentile 75
ER-0	11,47	5,00	73,75	0,00	2,50	15,00
ER-low +	14,36	15,00	28,00	5,00	8,75	20,00
ER +	8,95	2,50	91,25	,00	0,25	6,25

TILs_primitivo						
	Medio	Mediana	Massimo	Minimo	Percentile 25	Percentile 75
HER2-0	12,08	5,00	73,75	0,00	2,00	20,00
HER2- low +	9,24	5,00	50,00	0,00	2,50	11,88
HER2 +	10,68	2,50	91,25	0,00	2,00	10,00

Tabella XI Distribuzione TILs nella malattia primitiva segregato in base al grado di espressione recettoriale di ER ed HER2.

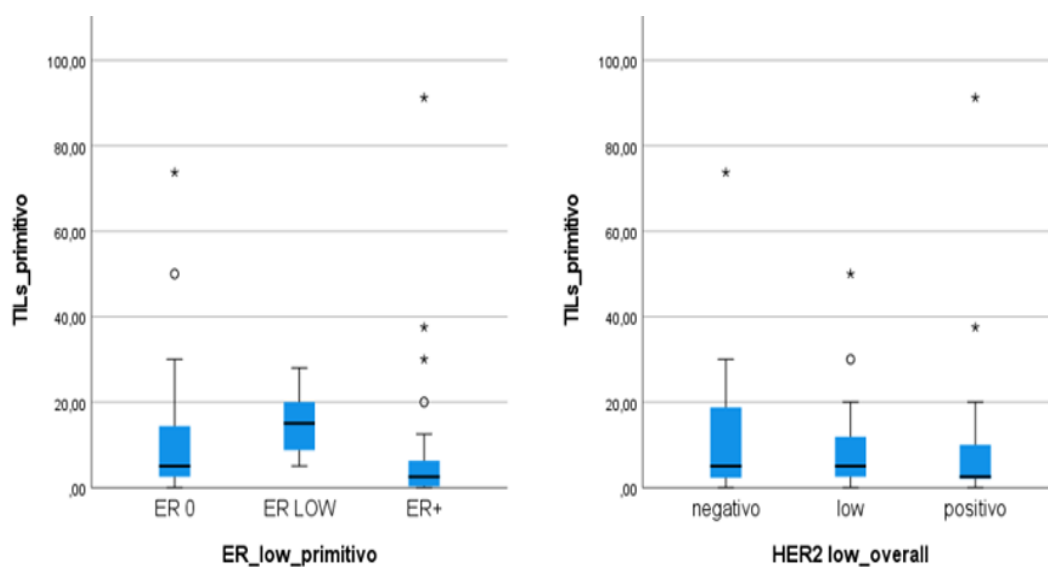


Figura 10 Distribuzione TILs in base al grado di espressione recettoriale indicizzato per ER ed HER2.

Per quanto riguarda la distribuzione dei TILs nell'ambito dei siti metastatici, non è stata individuata alcuna relazione statisticamente significativa fra stato recettoriale di ER e di HER2 e livelli di TILs, come illustrato in tabella XII.

TILs metastatico						
	Medio	Mediana	Massimo	Minimo	Percentile 25	Percentile 75
ER-0	9,48	5,00	80,00	0,00	2,13	11,00
ER-low +	7,06	3,25	35,00	0,00	,25	10,00
ER +	11,31	4,38	90,00	0,00	2,25	10,00

TILs metastatico						
	Medio	Mediana	Massimo	Minimo	Percentile 25	Percentile 75
HER2-0	9,84	5,00	80,00	0,00	1,75	10,00
HER2- low +	12,39	5,00	90,00	0,00	2,50	10,00
HER2 +	7,99	5,00	35,00	0,00	2,25	11,00

Tabella XII Distribuzione TILs nella malattia metastatica indicizzato in base al grado di espressione recettoriale di ER ed HER2.

Inoltre, non abbiamo osservato alcuna differenza tra distribuzione di TILs nella malattia primitiva e a livello delle sedi metastatiche (p 0,364).

4.6 Analisi di sopravvivenza

Abbiamo eseguito analisi esplorative di sopravvivenza a seconda dello status recettoriale. In particolare, abbiamo osservato un trend di significatività borderline (p=0.059) per quanto riguarda l'associazione tra OS e i diversi livelli di espressione di ER, in particolare, come emerge dalla figura 11, i pazienti affetti alla diagnosi di BC ER+ sono caratterizzati da OS più favorevole (113,97 mesi) rispetto alle categorie ER-0 ed ER-low-positive i quali presentano un andamento pressoché simile con OS numericamente inferiore per il secondo (73,95 mesi e 47.64 mesi).

Un simile trend è stato osservato escludendo i pazienti con malattia HER2+.

La valutazione dell'impatto prognostico di ER quando valutato sul sito metastatico ha permesso di catturare un'associazione significativa nella medesima direzione, come mostrato in figura 11. In particolare, pazienti con status ER-0 o ER-low-positive alla recidiva presentavano outcome a lungo termine significativamente più sfavorevole rispetto a pazienti con status ER+ sulla recidiva ($p=0.007$), dato confermato anche quando l'analisi veniva ristretta alla coorte HER2-negativa (HER2-0 + HER2-low-positive).

Fenotipo BC primitivo					
	Stima	Errore standard	Intervallo di confidenza del 95%		p
			Limite inferiore	Limite superiore	
ER-0	73,955	15,311	43,945	103,964	N.S.
ER-low +	47,639	18,431	11,513	83,764	
ER+	113,971	8,277	97,748	130,195	0,059
Globale	104,805	6,436	92,190	117,420	

Fenotipo BC Metastatico					
	Stima	Errore standard	Intervallo di confidenza del 95%		p
			Limite inferiore	Limite superiore	
ER-0	80,46	9,15	62,53	98,39	N.S.
ER-low +	73,23	17,16	39,61	106,86	
ER+	118,67	7,24	104,49	132,85	0,007
Globale	103,23	5,81	91,85	114,61	

Tabella XIII Mediana stima sopravvivenza in base allo stato recettoriale ER nella malattia primitiva e metastatica.

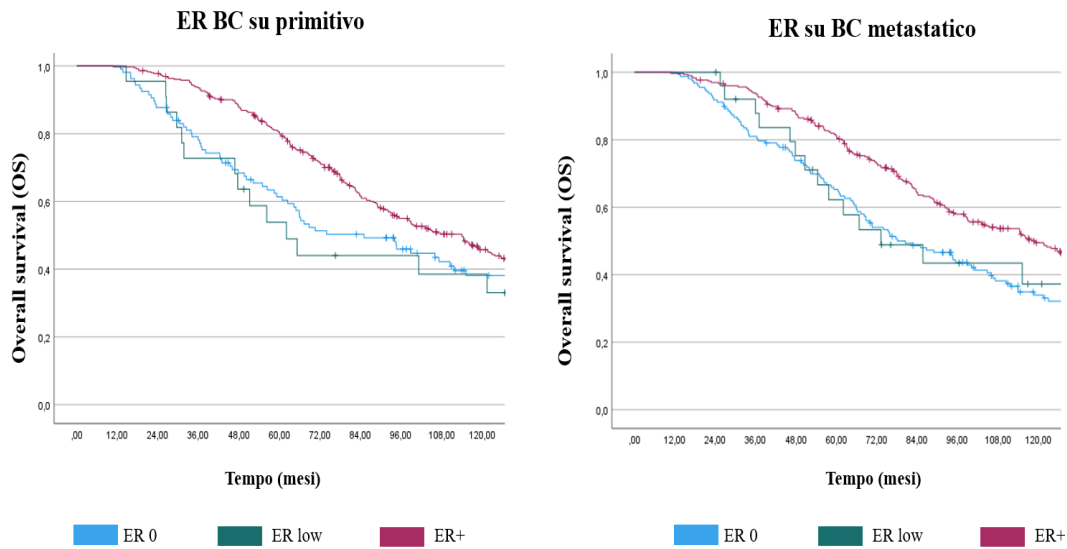


Figura 11 Sopravvivenza cumulativa in base allo stato recettoriale ER misurata in mesi su malattia primitiva e metastatica.

Non abbiamo invece osservato alcuna differenza in termini di OS a seconda dello status di HER2 né quando valutato su malattia primitiva né quando rideterminato su malattia metastatica, come illustrato in figura 12.

	Stima	Errore standard	Intervallo di confidenza del 95%	
			Limite inferiore	Limite superiore
HER2 0	115,187	10,091	95,409	134,965
HER2 low	92,189	9,938	72,710	111,668
HER2 +	100,172	11,689	77,262	123,083
Globale	103,228	5,805	91,850	114,606

Tabella XIV Mediana stima sopravvivenza in base allo stato recettoriale HER2 nella malattia primitiva e metastatica.

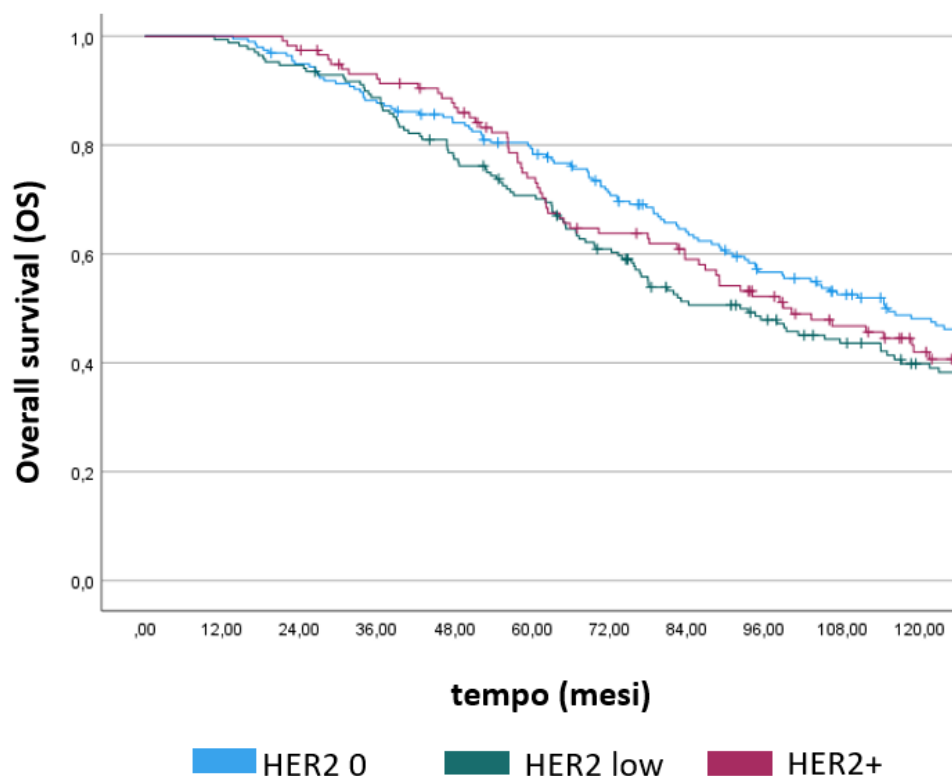


Figura 12 Curva di Kaplan Meier relativa all'analisi OS in base allo stato recettoriale di HER2.

4.7 Conversione ER: Focus su pazienti con BC primitivo ER+ (ponendo il focus su coorte HER2-negativa)

Il razionale dell'analisi è quella di valutare l'impatto prognostico della conversione fenotipica del BC primitivo a partenza ER+ verso un fenotipo ER-0 o ER-low-positive. In particolare, abbiamo osservato un significativo impatto prognostico negativo della conversione da fenotipo ER+ sul tumore primitivo a fenotipo ER0 o ER-low-positive su metastasi, come illustrato in figura 13 (OS mediana 121,5 vs 77,6 e 54,04 mesi rispettivamente delle conversioni verso ER-0 ed ER-low-positive $p < 0.001$). Similmente, l'impatto prognostico negativo è stato confermato quando adottato come endpoint di sopravvivenza la PPS (PPS mediana 48,7 vs 30.6 e 12.4 mesi, rispettivamente delle conversioni verso ER-0 ed ER-low $p < 0.001$) come mostrato in figura 14.

	Stima	Errore standard	Intervallo di confidenza del 95%	
			Limite inferiore	Limite superiore
ER-0	77,634	7,695	62,552	92,717
ER-low +	54,407	11,383	32,095	76,718
ER+	121,528	8,231	105,396	137,660
Globale	114,398	8,232	98,265	130,532

Tabella XV Mediana stima sopravvivenza pazienti in base alla concordanza recettoriale con malattia primitiva ER+.

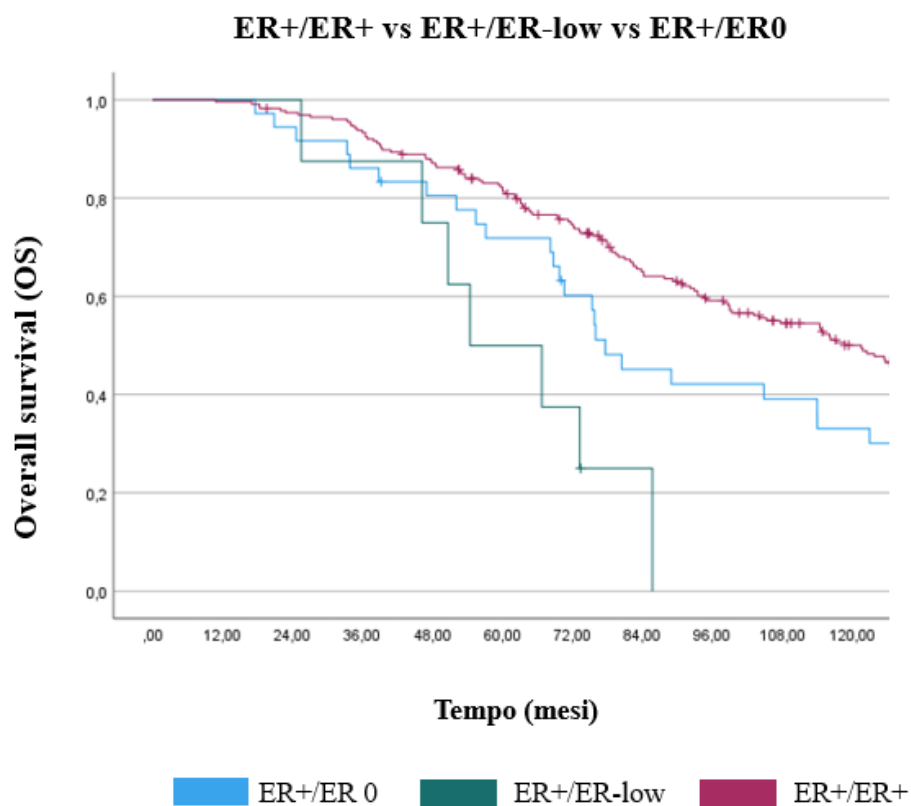


Figura 13 Overall survival in base alla concordanza recettoriale tra malattia ER+ primitiva e malattia metastatica concordante e discordante.

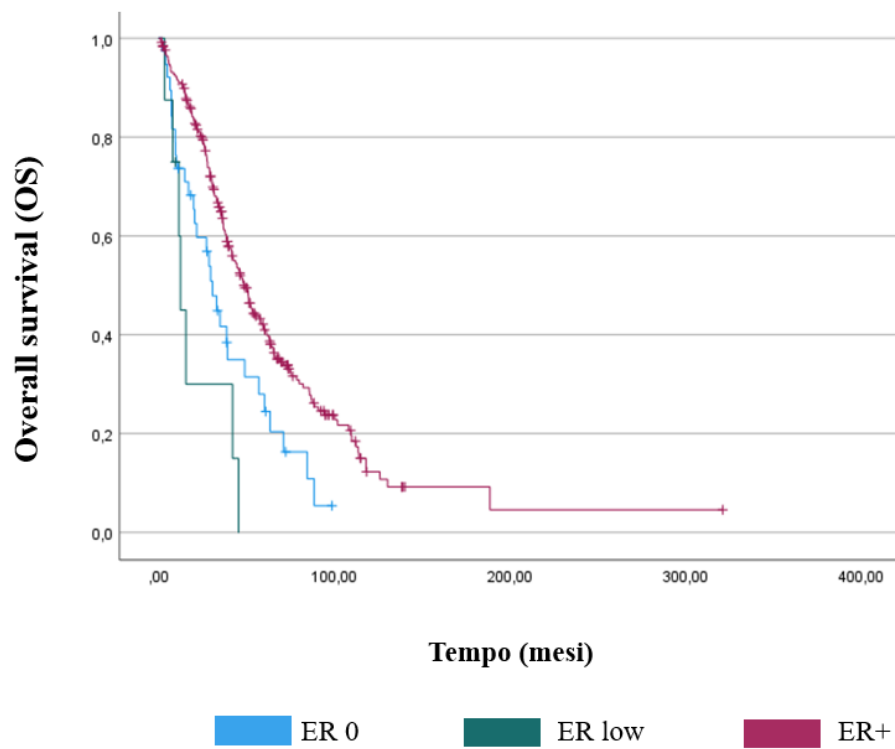


Figura 14 Post progression survival in base alla concordanza recettoriale tra malattia ER+ primitiva e malattia metastatica concordante e discordante.

5 Discussione

I carcinomi mammari HER2-low-positive ed ER-low-positive stanno emergendo come nuove entità nell'ambito della classificazione immunofenotipica del carcinoma mammario, contribuendo a definirne la complessità clinica. Inoltre, l'importanza che i TILs rivestono dal punto di vista della prognosi e della risposta al trattamento è consolidato in letteratura nei confronti di alcuni fenotipi tumorali quali TNBC e HER2+ BC.

L'elaborato si prefigge di valutare l'eterogeneità clinica, biologica ed immunologica delle nuove categorie emergenti HER2-low-positive ed ER-low-positive in 483 pazienti con carcinoma mammario avanzato/recidivato a livello locoregionale sottoposte a ricaratterizzazione immunofenotipica della malattia alla recidiva. La prevalenza della categoria ER-low-positive è risultata essere del 4.5% e del 5.4% a livello di neoplasia primitiva e recidiva, confermando, da un lato, che ER-low-positive rappresenta una categoria caratterizzata da bassa prevalenza e suggerendo dall'altro un lieve arricchimento di tale entità quando valutato su siti metastatici. La prevalenza della malattia HER2-low-positive è risultata essere circa di circa il 35% nell'ambito della popolazione globale e di circa il 45% della popolazione HER2-negativa. Tali dati appaiono consistenti con quanto riportato in studi precedenti, suggerendo come la coorte HER2-low-positive rappresenti circa la metà dell'intera popolazione con malattia tradizionalmente definibile come HER2-negativa.

In accordo con i dati disponibili, abbiamo inoltre osservato una relazione altamente significativa tra espressione di ER ed espressione di HER2. Infatti, da un lato abbiamo osservato una prevalenza di casi ER+ nell'ambito della malattia HER2-low-positive, dall'altro abbiamo osservato come la malattia ER-0 ed ER-low-positive sia arricchita in modo sostanziale di casi HER2-0. Questo risulta coerente con quanto suggerito dallo studio Tarantino et al.⁶⁹ il quale ha individuato un'associazione statisticamente significativa nei confronti di ER e di HER2 ($p < 0,001$) in particolare all'aumentare del tasso di espressione di ER si associava un aumento del tasso di tumori HER2-low-positive. Tale associazione è stata confermata anche focalizzandosi esclusivamente sulla popolazione non-HER2+. Tali risultati consolidano la nozione della stretta relazione tra la via del recettore degli estrogeni e quella del recettore HER2, tra le quali è presente un cross-talk bidirezionale che porta ad una dis-regolazione della produzione di fattori di crescita

attraverso un loop di segnalazione. In particolare un aumento della segnalazione della via di HER2 porta a potenziare la via di ER il quale, a sua volta ri-attiva la segnalazione del fattore di crescita epiteliale tramite la via genomica (lenta) e non genomica (rapida)⁹. Tali risultati supportano inoltre la tendenza nell'ambito dello scenario sperimentale internazionale, di focalizzare lo sviluppo di agenti anti-HER2 per la malattia HER2-low-positive a recettori ormonali positivi, come evidenziato nell'ambito del sopracitato studio Destiny-Breast04 e dello studio di fase III attualmente ongoing Destiny-Breast-06, in cui l'endpoint primario è rappresentato dalla PFS proprio nel sottogruppo a recettori ormonali positivi, portando pertanto verosimilmente a prioritizzare l'approvazione di tale agente farmacologico in questo sottotipo di carcinoma mammario.

Abbiamo successivamente analizzato la landscape clinico-biologico-immunologica delle categorie emergenti di carcinoma mammario. In particolare, ponendo il focus sullo stato recettoriale di ER, è emerso come il sottotipo ER-low-positive presenti caratteristiche di aggressività biologica simile al sottotipo ER-0 e maggiori rispetto al sottotipo ER+, con implicazioni prognostiche rilevanti. Infatti, abbiamo osservato una relazione significativa tra stato di ER e OS, con i sottotipi ER-0 ed ER-low-positive caratterizzati da tassi di sopravvivenza a lungo termine più sfavorevoli rispetto al sottotipo ER+, soprattutto quando considerando lo status di ER sulla recidiva. Inoltre, tumori ER-low-positive sono risultati essere, nella presente analisi, caratterizzati da livelli di TILs significativamente superiori rispetto alla malattia ER+ e simili rispetto al sottogruppo ER-0, consolidando pertanto la maggiore affinità biologica, anche dal punto di vista immunitario, di questo sottotipo con il fenotipo puramente triplo-negativo rispetto al sottotipo ER puramente positivo. È importante sottolineare come il presente, rappresenti il primo studio ad investigare la landscape immunitaria del fenotipo emergente ER-low-positive.

È inoltre estremamente interessante notare come anche la percezione da parte del clinico vada nella stessa direzione, tale da giustificare scelte terapeutiche per il fenotipo ER-low-positive molto più affini al fenotipo puramente triplo-negativo rispetto al sottotipo puramente ER-positivo. In particolare, abbiamo osservato come pazienti appartenenti a tale categoria emergente di carcinoma mammario vengano da un lato sottoposti maggiormente a chemioterapia e dall'altro ricevano meno

frequentemente trattamento a base endocrina in tutti i setting di malattia rispetto al fenotipo ER +, confermando pertanto la maggiore affinità, anche dal punto di vista delle scelte terapeutiche, con il fenotipo puramente triplo-negativo.

Ponendo ora il focus sulla landscape clinico-biologica-immunitaria della malattia HER2-low-positive, è emerso come, fatta eccezione per la già discussa associazione con l'espressione di ER e la conseguente associazione con il maggior utilizzo di terapia endocrina in questo sottotipo rispetto al gruppo di pazienti con malattia HER2-0, non abbiamo osservato significative differenze né dal punto di vista patologico, né dal punto di vista del grado di infiltrazione immunitaria, né dal punto di vista prognostico. Dati coerentemente supportati da studi presenti in letteratura quale Trantino et al.⁶⁹ dove non si è individuata nessuna differenza significativa tra HER2-low-positive ed HER2-0.

Questi dati nel complesso non supportano la categoria HER2-low-positive come un'entità clinico-biologica distinta, la quale altresì emerge come categoria "di convenienza" ad esclusiva utilità di selezione terapeutica in termini di accesso agli ADC anti-HER2. Tuttavia, come emerso nell'ambito dello studio DAISY⁹⁷, c'è evidenza di attività antitumorale degli ADC anti-HER2 anche nel contesto della categoria HER2-0. Nello studio in questione è stata valutata l'attività antitumorale e l'efficacia di T-DXd nel contesto di MBC in base al grado di espressione di HER2. Nei soggetti con patologia HER2-low-positive è stata osservata una maggiore distribuzione del farmaco rispetto alla categoria HER2-0, tuttavia, in quest'ultima categoria, la distribuzione è risultata essere bassa ma non nulla, suggerendo che l'attività di T-DXd in queste cellule fosse dovuta all'effetto "spettatore" per il quale il carico utile fornito alle cellule tumorali target si diffonde attraverso le membrane cellulari alle cellule vicine. Evidenze che nel loro insieme fanno emergere come la risposta al trattamento non sia influenzata solo in base all'espressione di HER2 ma anche dalla sua distribuzione spaziale, con tassi di risposta maggiore se le cellule esprimenti HER2 sono raggruppate e minori quando più distanziate^{12,69}. Queste osservazioni fanno emergere l'importanza di focalizzare la ricerca futura su metodiche maggiormente sensibili per la detezione di bassi livelli di espressione di HER2, ponendo il focus non solo su aspetti quantitativi ma anche qualitativi, allo scopo di migliorare la nostra capacità di selezione dei pazienti classificabili HER2-low-positive che potrebbero beneficiare di strategie terapeutiche anti-HER2.

Per quanto riguarda l'evoluzione dell'espressione di ER ed HER2 da BC primario a campioni abbinati di recidive locoregionali o metastasi a distanza, si è notato un arricchimento della corte ER-0 a scapito della corte ER-positiva, in particolare del fenotipo ER+/HER2+. In dettaglio la categoria ER+ nel tumore primitivo si è ridotta del 11,5% a favore della categoria ER-0 la quale si è arricchita di circa 11% in accordo con quanto riportato da studi presenti in letteratura nei quali emerge come nella malattia metastatica la corte si polarizzi verso i sottotipi recettoriali negativi, in particolare verso il fenotipo TN^{64, 77-83, 89}.

In questo contesto merita una più approfondita discussione l'osservazione per cui il 3% di pazienti hanno esibito una conversione da ER+ a ER-low-positive per i quali, se dal punto di vista formale è ancora considerabile l'accesso a terapia endocrina, dall'altro emerge un certo grado di incertezza riguardo la reale efficacia di strategie a base endocrina in pazienti con perdita subtotale di ER. In questo contesto è stato di estremo interesse osservare che l'acquisizione di un fenotipo ER-low-positive da parte di tumori primitivamente ER+/HER2-negativi è risultato essere associato ad un impatto prognostico significativamente sfavorevole e sovrapponibile a quello osservato per l'acquisizione di un fenotipo puramente triplo-negativo. Tali dati generano due ordini di considerazioni: nel complesso abbiamo confermato che la perdita di positività recettoriale con acquisizione di un fenotipo triplo-negativo determina un effetto detrimentalmente sulla prognosi dei pazienti, riportando, per la prima volta, come la perdita sub-totale di espressione di ER (acquisizione di fenotipo ER-low-positive) sia sostanzialmente assimilabile alla completa perdita di espressione di ER (acquisizione di un fenotipo puramente triplo-negativo), non solo in termini di overall survival, ma anche in termini di post-progression survival, suggerendo pertanto un impatto detrimentalmente sulla sopravvivenza strettamente correlata alla storia naturale della malattia metastatica.

Tali dati confermano quanto solamente ipotizzabile nell'ambito dello studio pivotale di Dieci et al.⁶⁴, nel quale, se da un lato era stato similmente dimostrato un impatto prognostico negativo della conversione a fenotipo triplo-negativo inteso come ER <10%, dall'altro non era possibile estrapolare dati specifici per la conversione a fenotipo ER-low-positive. La seconda considerazione riguarda lo scenario terapeutico della malattia ER-low-positive metastatica. In particolare, abbiamo osservato come la conversione da fenotipo ER+ primitivo a fenotipo ER-low-positive sulla recidiva fosse addirittura associato a tassi di OS numericamente

inferiori anche rispetto alla conversione a fenotipo ER-0, e tale osservazione, nonostante meriti di essere confermata in studi più ampi ed auspicabilmente prospettici, potrebbe sottendere al fatto che se per la malattia puramente triplo-negativa (ER-0) e la malattia ER+ esistono trattamenti sistemici standard nel setting metastatico, la categoria ER-low-positive risulta essere ancora una categoria controversa la cui gestione non è ancora altrettanto efficiente quanto quella adottata per le altre due categorie. Di fatti, è importante notare come gli studi registrativi delle principali strategie terapeutiche ad oggi disponibili nel setting metastatico in particolare per il TNBC, come immunoterapia¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ e ADC anti-TROP2 abbiano adottato come cutoff per definire la positività di ER le raccomandazioni ASCO/CAP 2010 ossia una positività ai nuclei tumorali $\geq 1\%$, non contemplando la categoria ER-low-positive (tra 1% e 9%).

Viceversa abbiamo osservato il 21% di pazienti presentare un'acquisizione recettoriale tra malattia primitiva e recidiva. In particolare, l'11% di pazienti con malattia ER+/HER2-0 si è convertita verso la categoria HER2-low-positive. Sulla scorta del fatto che i pazienti con fenotipo ER+/HER2-low-positive rappresenteranno a breve il pool per cui verrà verosimilmente prioritizzato l'accesso ai nuovi agenti anti-HER2, i risultati del presente studio sottolineano l'importanza di ricaratterizzare la malattia alla recidiva, in quanto tale approccio consente di espandere le possibilità terapeutiche per una proporzione non trascurabile di pazienti che non sarebbero altrimenti stati candidati a tali trattamenti sulla scorta del fenotipo della malattia primitiva.

Un'ulteriore osservazione interessante risultata essere la quota di pazienti a partenza da fenotipo "triplo negativo puro" ER-0/HER2-0 i quali, nella malattia metastatica, si sono convertiti verso categorie HER2-low-positive (26,1%), HER2+ (4,4%) e ER+ (17,4%), i quali sottotipi potrebbero beneficiare di strategie terapeutiche mirate (anti-HER2 o a base endocrina) non altrimenti considerabili sulla scorta del fenotipo della malattia in stadio iniziale.

Viceversa, rispetto il fenotipo iniziale ER+, vi è stata complessivamente una conversione del 3% verso la categoria ER-low-positive nella malattia metastatica. Come emerso dalle analisi di sopravvivenza l'effetto sulla prognosi è detrimentalmente se confrontato ai casi che hanno mantenuto una concordanza fenotipica e a coloro che hanno avuto una conversione verso il fenotipo ER-0. Dal punto di vista

terapeutico, la strategia da adottare nei confronti di questa categoria rimane ancora una grande incognita

Lo studio presenta importanti punti di forza. In particolare, il presente studio presenta un'ampia numerosità campionaria; inoltre esso rappresenta il primo studio ad aver proposto una classificazione del carcinoma mammario sulla base della combinazione dello stato di ER e di HER2 includendo le categorie emergenti ER-low-positive e HER2-low-positive. Inoltre, tutti i campioni presi in esame sono stati valutati nell'ambito dello stesso laboratorio, limitando pertanto il possibile impatto negativo della variabilità inter-laboratorio sulla affidabilità analitica dello studio.

Vanno evidenziate anche alcune limitazioni dell'elaborato. In primo luogo, la natura retrospettiva del presente studio potrebbe essere stata responsabile dell'arricchimento della coorte di pazienti con comportamenti insoliti. In secondo luogo c'è da considerare che attualmente non è disponibile una definizione formale per l'espressione HER2-low-positive e la sua identificazione è dipendente dalla metodologia d'indagine applicata per testare i livelli di espressione recettoriale. Nel presente studio sono state applicate IHC e ISH per definire i tumori HER2-low-positive, le quali rappresentano le uniche procedure standardizzate e consolidate per valutare lo stato di HER2 e che, sulla scorta dei risultati dello studio Destiny-Breast04, rappresenteranno le metodiche che in ambito registrativo verranno verosimilmente riconosciute come companion diagnostics per l'identificazione di pazienti HER2-low-positive da candidare a trastuzumab-deruxtecan. I tumori HER2-low-positive sono stati definiti con: punteggi HER2 1+ e 2+ al IHC in assenza di amplificazione genica da parte di ISH, coerentemente con altri studi. Nonostante questo l'affidabilità analitica di entrambe le tecniche non è ottimale. La colorazione e l'interpretazione dei punteggi di HER2 all'IHC possono essere influenzate infatti dal tipo di cloni di anticorpi anti-HER2, variabili e artefatti di fissazione della formalina, nonché dall'eterogeneità intra-tumorale. In merito a quest'ultimo punto, lo studio di Fernandez et al.⁹⁸ ha evidenziato come l'agreement inter-patologico crolla quando ci si focalizza sulla distinzione tra HER2-0 ed HER2-low-positive in quanto il test diagnostico basato sull'immunoistochimica che viene utilizzato per determinare la positività di HER2 non è idoneo nel discriminare bassi livelli di espressione recettoriale. Un'altra potenziale limitazione risiede nella

valutazione immunohistochimica dello stato recettoriale di ER nel corso degli anni e tra diversi laboratori e paesi nel mondo. È stato dimostrato che questo rischio è maggiore nei confronti delle espressioni ER basse o medie ⁹⁴ ma è notevolmente ridotto se considerato a confronto ad altri biomarcatori del cancro al seno come HER2 e Ki-67 ^{95,96}. Tuttavia, come già discusso, la valutazione di ER è stata eseguita nell'ambito del medesimo centro, ridimensionando pertanto il possibile impatto di tale bias.

7. Conclusione

In conclusione i risultati nel loro insieme supportano come la categoria ER-low-positive sia da un punto di vista biologico-immunologico-clinico molto più simile al sottotipo ER-0 rispetto al sottotipo ER+. Inoltre, di notevole rilevanza, è risultato essere l'impatto prognostico significativamente negativo associato alla conversione da parte di tumori primitivamente ER+/HER2-0 verso il fenotipo ER-low-positive osservando per la prima volta che l'impatto dovuto alla perdita sub-totale di espressione di ER sia sovrapponibile a quello osservato per l'acquisizione di un fenotipo puramente triplo-negativo. Al contrario, i risultati del presente studio non supportano la categoria HER2-low-positive come entità clinico-biologica-immunitaria distinta, con l'unica eccezione rappresentata dalla solida e nota correlazione tra stato HER2-low-positive e positività dei recettori ormonali, delineando pertanto HER-low-positive come categoria "di convenienza" dal punto di vista terapeutico, per la definizione dell'accesso alle terapie con ADC anti-HER2.

8. Bibliografia

1. World Health Organization. (2021). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
2. I numeri del cancro in Italia 2020. AIOM-AIRTUM-Siapec-Iap. Available from: https://www.aiom.it/wpcontent/uploads/2020/10/2020_Numeri_Cancro-operatori_web.pdf
3. Cardoso, F. *et al.* Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology* 30, 1194–1220 (2019).
4. Prat, A. & Perou, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology* 5, 5 (2011).
5. Linee guida neoplasia della mammella. Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM) 11.11.2021
6. Cortazar, P. *et al.* Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet* 384, 164–172 (2014).
7. Gennari, A. *et al.* ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 32, 1475–1495 (2021).
8. Miglietta, F. *et al.* Major advancements in metastatic breast cancer treatment: when expanding options means prolonging survival. *ESMO Open* 7, 100409 (2022).
9. Schiff, R. *et al.* Cross-Talk between Estrogen Receptor and Growth Factor Pathways as a Molecular Target for Overcoming Endocrine Resistance. *Clinical Cancer Research* 10, 331s–336s (2004).
10. Wolff, A. C. *et al.* Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast. *Journal of Clinical Oncology* 31, 3997–4013 (2013).
11. Schettini, F. *et al.* Clinical, pathological, and PAM50 gene expression features of HER2-low-positive breast cancer. *npj Breast Cancer* 2021 7:1 7, 1–13 (2021).
12. Denkert, C. *et al.* Clinical and molecular characteristics of HER2-low-positive breast cancer: pooled analysis of individual patient data from four prospective, neoadjuvant clinical trials. *The Lancet Oncology* 22, 1151–1161 (2021).
13. Modi, S. *et al.* Antitumor activity and safety of trastuzumab deruxtecan in patients with HER2-low-positive –expressing advanced breast cancer: Results from a phase Ib study. *Journal of Clinical Oncology* 38, 1887–1896 (2020).

14. Banerji, U. *et al.* Trastuzumab duocarmazine in locally advanced and metastatic solid tumours and HER2-expressing breast cancer: a phase 1 dose-escalation and dose-expansion study. *Lancet Oncol* 20, 1124–1135 (2019).
15. Paik, S., Kim, C. & Wolmark, N. HER2 Status and Benefit from Adjuvant Trastuzumab in Breast Cancer. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc0801440> 358, 1409–1411 (2009).
16. Fehrenbacher, L. *et al.* NSABP B-47/NRG oncology phase III randomized trial comparing adjuvant chemotherapy with or without trastuzumab in high-risk invasive breast cancer negative for HER2 by FISH and with IHC 1+ or 2+. *Journal of Clinical Oncology* 38, 444–453 (2020).
17. Gianni, L. *et al.* Open-label, phase II, multicenter, randomized study of the efficacy and safety of two dose levels of pertuzumab, a human epidermal growth factor receptor 2 dimerization inhibitor, in patients with human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28, 1131–1137 (2010).
18. Jabbour, E., Paul, S. & Kantarjian, H. The clinical development of antibody–drug conjugates — lessons from leukaemia. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2021 18:7 18, 418–433 (2021).
19. Dieci, M. V. & Miglietta, F. HER2: a never-ending story. *The Lancet Oncology* 22, 1051–1052 (2021).
20. Garvin, D. *et al.* Determining ADCC Activity of Antibody-Based Therapeutic Molecules using Two Bioluminescent Reporter-Based Bioassays. *Current Protocols* 1, e296 (2021).
21. Allison, K. H. *et al.* Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: ASCO/CAP guideline update. *Journal of Clinical Oncology* 38, 1346–1366 (2020).
22. Ohara, A. M. *et al.* PAM50 for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy for ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2018 173:3 173, 533–543 (2018).
23. Dieci, M. V. *et al.* ARTICLE Impact of estrogen receptor levels on outcome in non-metastatic triple negative breast cancer patients treated with neoadjuvant/adjuvant chemotherapy. doi:10.1038/s41523-021-00308-7.
24. Raghav, K. P. S. *et al.* Impact of low estrogen/progesterone receptor expression on survival outcomes in breast cancers previously classified as triple negative breast cancers. *Cancer* 118, 1498–1506 (2012).
25. Deyarmin, B. *et al.* Effect of ASCO/CAP Guidelines for Determining ER Status on Molecular Subtype. *Annals of Surgical Oncology* 2012 20:1 20, 87–93 (2012).
26. Iwamoto, T. *et al.* Estrogen Receptor (ER) mRNA and ER-related gene expression in breast cancers that are 1% to 10% ER-positive by immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology* 30, 729–734 (2012).

27. Prabhu, J. S. *et al.* A Majority of Low (1-10%) ER Positive Breast Cancers Behave Like Hormone Receptor Negative Tumors. *J Cancer* 5, 156 (2014).
28. Fujii, T. *et al.* Revisiting the definition of estrogen receptor positivity in HER2-negative primary breast cancer. *Ann Oncol* 28, 2420–2428 (2017).
29. Landmann, A. *et al.* Low Estrogen Receptor (ER)-Positive Breast Cancer and Neoadjuvant Systemic Chemotherapy: Is Response Similar to Typical ER-Positive or ER-Negative Disease? *Am J Clin Pathol* 150, 34–42 (2018).
30. Poggio, F. *et al.* Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol* 29, 1497–1508 (2018).
31. Baghban, R. *et al.* Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling* 2020 18:1 18, 1–19 (2020).
32. Teng, M. W. L., Kershaw, M. H. & Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: From Surveillance to Escape. *Cancer Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth: Second Edition* 85–99 (2013) doi:10.1016/B978-0-12-394296-8.00007-5.
33. Dieci, M. V., Miglietta, F. & Guarneri, V. Immune Infiltrates in Breast Cancer: Recent Updates and Clinical Implications. *Cells* 10, 1–27 (2021).
34. Garvin, D. *et al.* Determining ADCC Activity of Antibody-Based Therapeutic Molecules using Two Bioluminescent Reporter-Based Bioassays. *Curr Protoc* 1, (2021).
35. Szekely, B. *et al.* Immunological differences between primary and metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 29, 2232–2239 (2018).
36. Loi, S. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis: A pooled individual patient analysis of early-stage triple-negative breast cancers. *Journal of Clinical Oncology* 37, 559–569 (2019).
37. Leon-Ferre, R. A. *et al.* Impact of histopathology, tumor-infiltrating lymphocytes, and adjuvant chemotherapy on prognosis of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2017 167:1 167, 89–99 (2017).
38. Park, J. H. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with early-stage triple-negative breast cancers (TNBC) who did not receive adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol* 30, 1941–1949 (2019).
39. Denkert, C. *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet Oncology* 19, 40–50 (2018).
40. Denkert, C. *et al.* Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28, 105–113 (2010).

41. Dieci, M. v. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol* 25, 611–618 (2014).
42. Loi, S. *et al.* Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *Journal of Clinical Oncology* 31, 860–867 (2013).
43. Brown, L. C., Salgado, R., Luen, S. J., Savas, P. & Loi, S. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: Update for 2020. *Cancer Journal (United States)* 27, 25–31 (2021).
44. Luen, S. J. *et al.* Prognostic implications of residual disease tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden in triple-negative breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol* 30, 236–242 (2019).
45. Criscitiello, C. *et al.* A gene signature to predict high tumor-infiltrating lymphocytes after neoadjuvant chemotherapy and outcome in patients with triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* 29, 162–169 (2018).
46. Loi, S. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis: A pooled individual patient analysis of early-stage triple-negative breast cancers. *Journal of Clinical Oncology* 37, 559–569 (2019).
47. Symmans, W. F. *et al.* Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 25, 4414–4422 (2007).
48. Loi, S. *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: Results from the FinHER trial. *Annals of Oncology* 25, 1544–1550 (2014).
49. Perez, E. A. *et al.* Association of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Recurrence-Free Survival in the N9831 Adjuvant Trial in Patients With Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. *JAMA Oncol* 2, 56–64 (2016).
50. Kim, R. S. *et al.* Stromal Tumor-infiltrating Lymphocytes in NRG Oncology/ NSABP B-31 Adjuvant Trial for Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. doi:10.1093/jnci/djz032.
51. Krop, I. E. *et al.* Genomic correlates of response to adjuvant trastuzumab (H) and pertuzumab (P) in HER2+ breast cancer (BC): Biomarker analysis of the APHINITY trial. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.1012 37, 1012–1012 (2019).
52. Dieci, M. v. *et al.* Association of tumor-infiltrating lymphocytes with distant disease-free survival in the ShortHER randomized adjuvant trial for patients with early HER2+ breast cancer. *Ann Oncol* 30, 418–423 (2019).

53. Conte, P. *et al.* Nine weeks versus 1 year adjuvant trastuzumab in combination with chemotherapy: final results of the phase III randomized Short-HER study[‡]. *Ann Oncol* 29, 2328–2333 (2018).
54. Prat, A. *et al.* Development of a multi-parameter prognostic score to guide systemic therapy in early-stage HER2-positive breast cancer: a retrospective study with an external evaluation. *Lancet Oncol* 21, 1455 (2020).
55. Solinas, C. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib or their combination: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Treatment Reviews* 57, 8–15 (2017).
56. Ignatiadis, M. *et al.* Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients Receiving Trastuzumab/Pertuzumab-Based Chemotherapy: A TRYPHAENA Substudy. *J Natl Cancer Inst* 111, (2019).
57. Bianchini, G. *et al.* Immune modulation of pathologic complete response after neoadjuvant HER2-directed therapies in the NeoSphere trial. *Annals of Oncology* 26, 2429–2436 (2015).
58. Adams, S. *et al.* Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol* 30, 397–404 (2019).
59. Adams, S. *et al.* Phase 2 study of pembrolizumab as first-line therapy for PD-L1-positive metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): Preliminary data from KEYNOTE-086 cohort B. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.1088 35, 1088–1088 (2017).
60. Loi, S. *et al.* Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b–2 trial. *The Lancet Oncology* 20, 371–382 (2019).
61. Criscitiello, C. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2–breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2020 183:2 183, 347–354 (2020).
62. Symmans, W. F. *et al.* Long-Term Prognostic Risk After Neoadjuvant Chemotherapy Associated With Residual Cancer Burden and Breast Cancer Subtype. *Journal of Clinical Oncology* 35, 1049 (2017).
63. Luen, S. J. *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes in advanced HER2-positive breast cancer treated with pertuzumab or placebo in addition to trastuzumab and docetaxel: a retrospective analysis of the CLEOPATRA study. *The Lancet Oncology* 18, 52–62 (2017).
64. Dieci, M. v. *et al.* Discordance in receptor status between primary and recurrent breast cancer has a prognostic impact: a single-institution analysis. *Ann Oncol* 24, 101–108 (2013).

-
65. Ignatov, T., Gorbunow, F., Eggemann, H., Ortmann, O. & Ignatov, A. Loss of HER2 after HER2-targeted treatment. *Breast Cancer Research and Treatment* 2019 175:2 175, 401–408 (2019).
 66. McAnena, P. F. *et al.* Breast cancer subtype discordance: impact on post-recurrence survival and potential treatment options. *BMC Cancer* 18, (2018).
 67. Miglietta, F. *et al.* AUTHOR CORRECTION OPEN Author Correction: Evolution of HER2-low-positive expression from primary to recurrent breast cancer. doi: 10.1038/s41523-021-00359-w.
 68. Ogiya, R. *et al.* Comparison of tumor-infiltrating lymphocytes between primary and metastatic tumors in breast cancer patients. *Cancer Science* 107, 1730 (2016).
 69. Tarantino, P. *et al.* 1MO Prognostic and biologic significance of HER2-low-positive expression in early breast cancer. *Annals of Oncology* 33, S124 (2022).
 70. Miglietta, F., *et al.* 26P Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes on matched baseline and residual disease samples of triple-negative breast cancer patients treated with anthracycline-taxane based neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin. *Annals of Oncology* 33, S135–S136 (2022).
 71. Mittendorf EA., *et al.* Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res* 2009; 15(23): 7381-8.
 72. Branco FP., *et al.* Loss of HER2 and disease prognosis after neoadjuvant treatment of HER2+ breast cancer. *Am J Transl Res* 2019; 11(9): 6110-6.
 73. Dieci M.V., *et al.* Immune characterization of breast cancer metastases: Prognostic implications. *Breast Cancer Res.* 2018; 20:62. doi: 10.1186/s13058-018-1003-1
 74. Miglietta, F., *et al.* "212P HER2-low-positive breast cancer: Evolution from primary tumor to residual disease after neoadjuvant treatment." *Annals of Oncology* 32 (2021): S451.
 75. Niikura N., *et al.* Changes in tumor expression of HER2 and hormone receptors status after neoadjuvant chemotherapy in 21,755 patients from the Japanese breast cancer registry. *Ann Oncol* 2016; 27(3): 480-7.
 76. Van de Ven S., *et al.* Discordances in ER, PR and HER2 receptors after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2011; 37(6): 422-30.
 77. Liedtke C., *et al.* Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer. *Ann Oncol.* 2009; 20: 1953-1958

-
- 78 Karlsson E., *et al.* Discordance in hormone receptor status in breast cancer during tumor progression. *J Clin Oncol.* 2010; 28 (suppl; abstr 1009): 116s
- 79 Wilking U., *et al.* HER2 status in a population-derived breast cancer cohort: discordances during tumor progression. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 125: 553-561
- 80 Amir E., *et al.* Tissue confirmation of disease recurrence in breast cancer patients: Pooled analysis of multi-centre, multi-disciplinary prospective studies. *Cancer Treat Rev.* 2011; ([Epub ahead of print])
- 81 Lower E.E., *et al.* Impact of metastatic estrogen receptor and progesterone receptor status on survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2005; 90: 65-70
- 82 Guarneri V., *et al.* Comparison of HER-2 and hormone receptor expression in primary breast cancers and asynchronous paired metastases: impact on patient management. *Oncologist.* 2008; 13: 838-844
- 83 Karlsson E., *et al.* Discordance in hormone receptor status in breast cancer during tumor progression. *J Clin Oncol.* 2010; 28 (suppl; abstr 1009): 116s
- 84 Park JH., *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with early-stage triple-negative breast cancers (TNBC) who did not receive adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol.* 2019 Dec 1;30(12):1941-1949. doi: 10.1093/annonc/mdz395.
- 85 I TIL indicano l'esito nei pazienti giovani che non ricevono sistemici. (n.d.). Retrieved May 13, 2022, from <https://www.esmo.org/oncology-news/tils-indicate-outcome-in-young-patients-not-receiving-systemic-adjuvant-treatment-for-tnbc>.
- 86 Demaria S., *et al.* Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2001 Oct;7(10):3025-30.
- 87 Ladoire S., *et al.* In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *J Pathol.* 2011 Jul;224(3):389-400. doi: 10.1002/path.2866. Epub 2011 Mar 25.
- 88 Swain SM., *et al.* CLEOPATRA Study Group. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2015 Feb 19;372(8):724-34. doi: 10.1056/NEJMoa1413513.
- 89 Amir E., *et al.* Tissue confirmation of disease recurrence in breast cancer patients: pooled analysis of multi-centre, multi-disciplinary prospective studies. *Cancer Treat Rev.* 2012 Oct;38(6):708-14. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.11.006.
- 90 Macfarlane R., *et al.* Molecular alterations between the primary breast cancer and the subsequent locoregional/metastatic tumor. *Oncologist.* 2012;17(2):172-8. doi: 10.1634/theoncologist.2011-0127.

-
- 91 Lower EE., *et al.* Impact of metastatic estrogen receptor and progesterone receptor status on survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Mar;90(1):65-70. doi: 10.1007/s10549-004-2756-z.
- 92 Niikura N., *et al.* Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors. *J Clin Oncol.* 2012 Feb 20;30(6):593-9. doi: 10.1200/JCO.2010.33.8889.
- 93 Modi S., *et al.* Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-low Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2022 Jun 5. doi: 10.1056/NEJMoa2203690. Epub ahead of print. PMID: 35665782.
- 94 Rhodes A. Immunohistochemical demonstration of oestrogen and progesterone receptors: correlation of standards achieved on in house tumours with that achieved on external quality assessment material in over 150 laboratories from 26 countries. *J Clin Pathol.* 2000; 53: 292-301
- 95 De Schutter H. *et al.* Quality of pathology reporting is crucial for cancer care and registration: a baseline assessment for breast cancers diagnosed in Belgium in 2008. *Breast.* 2015; 24: 143-152
- 96 Acs B. *et al.* Variability in breast cancer biomarker assessment and the effect on oncological treatment decisions: a nationwide 5-year population-based study. *Cancers.* 2021; 13: 1166
- 97 Mosele, M. F., *et al.* "LBA1 Unraveling the mechanism of action and resistance to trastuzumab deruxtecan (T-DXd): Biomarker analyses from patients from DAISY trial." *Annals of Oncology* 33 (2022): S123.
- 98 Fernandez AI., *et al.* Examination of Low ERBB2 Protein Expression in Breast Cancer Tissue. *JAMA Oncol.* 2022 Apr 1;8(4):1-4. doi: 10.1001/jamaoncol.2021.7239.
- 99 André F., *et al.* Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Ann Oncol.* 2021 Feb;32(2):208-217. doi: 10.1016/j.annonc.2020.11.011.
- 100 Rugo HS., *et al.* Palbociclib plus letrozole as first-line therapy in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer with extended follow-up. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Apr;174(3):719-729. doi: 10.1007/s10549-018-05125-4.
- 101 Cristofanilli M., *et al.* Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2016 Apr;17(4):425-439. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00613-0.
- 102 Hortobagyi GN., *et al.* Updated results from MONALEESA-2, a phase III trial of first-line ribociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in

-
- hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer. *Ann Oncol.* 2018 Jul 1;29(7):1541-1547. doi: 10.1093/annonc/mdy155.
- 103 Slamon DJ., *et al.* Phase III Randomized Study of Ribociclib and Fulvestrant in Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: MONALEESA-3. *J Clin Oncol.* 2018 Aug 20;36(24):2465-2472. doi: 10.1200/JCO.2018.78.9909.
- 104 Lu YS, *et al.* Updated Overall Survival of Ribociclib plus Endocrine Therapy versus Endocrine Therapy Alone in Pre- and Perimenopausal Patients with HR+/HER2- Advanced Breast Cancer in MONALEESA-7: A Phase III Randomized Clinical Trial. *Clin Cancer Res.* 2022 Mar 1;28(5):851-859. doi: 10.1158/1078-0432.
- 105 Sledge GW., *et al.* MONARCH 2: Abemaciclib in Combination With Fulvestrant in Women With HR+/HER2- Advanced Breast Cancer Who Had Progressed While Receiving Endocrine Therapy. *J Clin Oncol.* 2017 Sep 1;35(25):2875-2884. doi: 10.1200/JCO.2017.73.7585.
- 106 Goetz MP, *et al.* MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2017 Nov 10;35(32):3638-3646. doi: 10.1200/JCO.2017.75.6155.
- 107 Schmid P, *et al.* IMpassion130 Trial Investigators. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Nov 29;379(22):2108-2121. doi: 10.1056/NEJMoa1809615.
- 108 Miles D., *et al.* Impassion131 investigators. Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomised phase III trial of first-line paclitaxel with or without atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2021 Aug;32(8):994-1004. doi: 10.1016/j.annonc.2021.05.801.
- 109 Cortes J., *et al.* KEYNOTE-355 Investigators. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet.* 2020 Dec 5;396(10265):1817-1828. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32531-9.
- 110 Bardia A., *et al.* ASCENT Clinical Trial Investigators. Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2021 Apr 22;384(16):1529-1541. doi: 10.1056/NEJMoa2028485. PMID: 33882206.
- 111 Powell CA, Modi S, Iwata H, *et al.* Analysis of study drug-related interstitial lung disease (ILD) in patients (pts) with HER2+ metastatic breast cancer (mBC) treated with trastuzumab deruxtecan (T-DXd). *Ann Oncol* 2021;32: S61-S62. abstract.

-
- 112 Powell CA, Modi S, Iwata H, et al. Pooled analysis of drug-related interstitial lung disease (ILD) in 8 single-arm trastuzumab deruxtecan (T-DXd) studies. *Cancer Res* 2021;81:Suppl 13:CT167. abstract.