

1222·2022
800
ANNI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Chirurgiche Oncologiche e Gastroenterologiche – DiSCOG

Direttore: Prof. Fabio Farinati

UOC Oncologia 2, IOV (IRCCS)

Direttrice: Prof.ssa Valentina Guarneri

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina e Chirurgia

TESI DI LAUREA

CHAMBER: UNO STUDIO PROSPETTICO SULL'ANALISI DELLO
STATUS MUTAZIONALE DI PIK3CA E ESR1 SU DNA CIRCOLANTE IN
PAZIENTI CON CARCINOMA MAMMARIO HR+/HER2-

Relatrice: Prof.ssa Maria Vittoria Dieci

Correlatrice: Dott.ssa Grazia Maria Vernaci

Laureanda: Simona Vallata

Matricola: 1152411

Anno accademico 2021/2022

INDICE

RIASSUNTO.....	3
ABSTRACT	5
1 INTRODUZIONE	7
1.1 Il tumore della mammella: epidemiologia e fattori di rischio.....	7
1.2 Classificazione del tumore della mammella	7
1.2.1 Classificazione istologica.....	7
1.2.2 Classificazione TNM.....	8
1.2.3 Classificazione molecolare	8
1.3 Il carcinoma infiltrante HR+ e HER2	9
1.3.1 Terapia del carcinoma mammario HR+ e HER2- metastatico.....	10
1.3.2 Terapia endocrina.....	10
1.3.3 Nuovi farmaci a bersaglio molecolare.....	12
1.4 Meccanismi di resistenza alla terapia endocrina.....	19
1.4.1 La via di PI3K/Akt/mTOR.....	19
1.4.2 Il gene ESR1.....	23
1.5 La biopsia delle lesioni metastatiche	27
1.5.1 La biopsia liquida	28
1.5.2 La biopsia liquida nel carcinoma mammario	29
1.5.3 Serialità delle biopsie liquide e follow-up.....	31
2 SCOPO DELLO STUDIO.....	33
3 MATERIALI E METODI	35
3.1 Disegno dello studio	35
3.2 Popolazione in studio.....	35
3.3 Estrazione e valutazione della qualità e quantità del cfDNA.....	36
3.3.1 NGS (Next Generation Sequencing).....	37
3.3.2 Sequenziamento cfDNA con KAPACustom HyperCap cfDNA kit (protocollo standard su pannello personalizzato).....	37
3.3.3 Analisi dei dati NGS	38
3.4 Analisi statistica	38
4 RISULTATI	39
4.1 Caratteristiche delle pazienti studiate	39
4.2 Analisi seriale del ctDNA con NGS	42
4.2.1. Overview	43
4.2.2 Focus sulle pazienti	45
5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	49
BIBLIOGRAFIA	57

RIASSUNTO

In Italia e nel mondo, il carcinoma della mammella è la prima causa di malattia oncologica nelle donne, contribuendo da solo ad oltre il 13% delle diagnosi di tumore: nella maggior parte dei casi si tratta del sottotipo a recettori ormonali positivi (HR+) e HER2 non amplificato (HER2-) e prevede la manipolazione ormonale quale cardine della terapia, cui è possibile associare farmaci a target molecolare quali gli inibitori delle CDK4/6. Tuttavia, circa il 20-30% delle pazienti è destinata ad andare incontro a recidiva e si rende necessario caratterizzare meglio la storia naturale della malattia metastatica, per la quale la sequenza ottimale di farmaci da impiegare non è stabilita. Ad oggi sono noti alcuni dei meccanismi responsabili della recidiva e, nella fattispecie, dello sviluppo di resistenza al trattamento ormonale, che vanno approfonditi e tradotti in strumenti impiegabili nell'ambito clinico: lo studio traslazionale CHAMBER è volto ad indagare lo status mutazionale di geni d'interesse (primi fra tutti ESR1 e PIK3CA) tramite biopsia liquida volta alla ricerca del DNA tumorale circolante. La biopsia liquida è uno strumento microinvasivo, ripetibile, che per quanto di recente introduzione in patologia mammaria sta vedendo il suo impiego diffondersi negli studi e la sua validità affermarsi in letteratura. Ad oggi, presso lo IOV IRCCS di Padova, sono state arruolate 71 pazienti alle quali è stato eseguito un prelievo di sangue aggiuntivo in sede di esami ematici routinari, dal quale è stato estratto il DNA libero circolante ed analizzato con metodica NGS, per ricercare mutazioni patogeniche. Basandoci sul razionale che è la farmacoterapia a selezionare i cloni resistenti, abbiamo stabilito il timepoint per il prelievo ad ogni progressione di malattia, con un prelievo aggiuntivo al 1° giorno del 2° ciclo di terapia con CDKi per le pazienti in trattamento con questa categoria di farmaci, sulla scorta di recenti evidenze per cui non solo lo status mutazionale, ma anche la *clearance* precoce del DNA tumorale dal circolo ematico sia un potenziale fattore prognostico. I dati preliminari raccolti ad oggi sui 4 prelievi consecutivi di 3 pazienti sono coerenti con i dati pubblicati da studi recenti e promettenti rispetto alle analisi da eseguirsi su un dataset a tutt'oggi in fase di ampliamento, forte di una profilazione longitudinale del ctDNA di pazienti *real-world*.

ABSTRACT

In Italy and worldwide, breast cancer is the main cause for oncologic disease in women, contributing alone for over 13% of cancer diagnoses: in most cases, it is subclassified as hormonal receptors positive (HR+) and HER2 amplification negative (HER2-), endocrine manipulation is the current therapeutic cornerstone and target therapy such as CDK4/6 inhibitors (CDK4/6i) can be added to. However, around 20-30% of patients is destined to relapse and it is necessary to better acknowledge metastatic disease's natural history, for which a standard therapeutic sequence is not set yet. To date, some of the molecular pathways involved in relapse and, specifically, in the development of endocrine therapy resistance, are known, but need to be studied deeper and translated into clinical tools: CHAMBER is a translational study aimed at investigating target genes' (first of all, ESR1 and PIK3CA) mutational status in relation to therapy, via liquid biopsy and, in particular, circulating tumor DNA (ctDNA). Liquid biopsy is a microinvasive, repeatable tool, as emerging in the breast cancer scenario as already widespread in clinical trials and validated throughout literature. To date, 71 patients have been enrolled at IOV IRCCS of Padova, who were asked to be taken a supplementar blood draw, during routinary blood exams, from which ctDNA was extracted and analysed through NGS, in order to investigate pathogenic mutations. According to evidences which underline the role of the therapy itself in selecting resistant clones, we set the moment of disease progression as our timepoint for specimen collection; patients undergoing CDK4/6i treatment were asked an additional collection at day 1 of cycle 2 of the therapy, on the basis of new evidences which suggest a prognostic impact of early clearance of tumor DNA from bloodstream during such treatment. Our early data, collected upon 3 patients' 4 consequent analyses, are solid with latest evidences and encouraging in regard to future studies to be performed on a wide dataset, currently in implementation, based upon a prospective profiling of ctDNA specimens collected from real-world patients.

1 INTRODUZIONE

1.1 Il tumore della mammella: epidemiologia e fattori di rischio

Il tumore della mammella è la neoplasia più frequente nelle donne: delle 9.227.500 neoplasie diagnosticate nelle donne nel 2020, 2.261.419 (circa il 12%) sono tumori della mammella (1). In Italia le neoplasie della mammella rappresentano il 13.3% delle nuove diagnosi di tumore nel sesso femminile (2).

A fronte del lieve aumento annuo dell'incidenza (circa 0,3% per anno), si è assistito, negli ultimi decenni, ad una riduzione del tasso di mortalità cancro-specifica (-0,8%) grazie all'effetto della prevenzione secondaria attuata mediante screening mammografico ed ai progressi terapeutici.

Il rischio di ammalarsi di carcinoma della mammella per le donne aumenta con l'età ed è massimo subito dopo la menopausa: è pari, infatti, ad 1/43 per donne di età inferiore ai 49 anni, 1/18 nella fascia d'età 50-69 anni, 1/22 oltre i 70 anni.

Il tumore della mammella rappresenta inoltre la prima causa di morte nel sesso femminile in tutte le età, con una sopravvivenza globale a 5 anni dalla diagnosi dell'88% (3).

1.2 Classificazione del tumore della mammella

1.2.1 Classificazione istologica

Secondo la più recente classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (anno 2019), l'istotipo più frequente di tumore della mammella è il carcinoma infiltrante *non-special type* (NST), che rappresenta circa il 70-80% di tutte le neoplasie mammarie. Il carcinoma lobulare rappresenta invece la tipologia più frequente all'interno della categoria dei tumori con caratteristiche istologiche speciali (circa 10% dei tumori invasivi) (5).

1.2.2 Classificazione TNM

Secondo L'American Joint Committee on Cancer (AJCC) sulla base dell'estensione tumorale (parametro T), del coinvolgimento di eventuali linfonodi locoregionali (parametro N) e della presenza o meno di metastasi a distanza (parametro M) viene indicato lo stadio clinico-patologico di malattia. L'edizione più recente, l'ottava, prende in considerazione inoltre fattori biologici quali:

- *Grading* istologico G, espresso come 1, 2 o 3;
- Status dei recettori ormonali per estrogeni (ER) e progesterone (PgR), espresso come negativo o positivo;
- Status HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*), espresso come positivo o negativo (4)

In particolare, la valutazione dell'espressione dei recettori ormonali (di seguito *Hormone Receptors, HR*) e dello status di HER2, in virtù del suo potente significato prognostico e predittivo di risposta ai trattamenti, è entrato in pieno diritto nella stadiazione clinica TNM, superando i limiti della sola caratterizzazione anatomica della malattia (5).

1.2.3 Classificazione molecolare

Nella pratica clinica, i tumori della mammella sono, dunque, classificati, sulla base dell'espressione immunoistochimica dei recettori ormonali (estrogeni e progesterone) e dello stato di HER2 (valutato in immunoistochimica e/o *fluorescence in situ hybridization* [FISH]) in: tumori a recettori ormonali positivi, tumori HER2 positivi e tumori triplo negativi. Questa classificazione riflette solo parzialmente l'eterogeneità biologica delle neoplasie mammarie. Dal punto di vista molecolare, l'analisi del profilo di espressione genica consente di individuare quattro sottotipi intrinseci:

- Luminale A e B: rappresentano il sottotipo più comune (70-80%) ed a miglior prognosi. Dal punto di vista dell'espressione genica sono caratterizzati da un'alta espressione di geni dell'epitelio luminale. Dal punto di vista immunoistochimico sono caratterizzati dalla positività dei recettori per estrogeni e sono ulteriormente distinti

in *Luminal A-like* e *Luminal B-like* sulla base dell'indice di proliferazione (inferiore o superiore al 20%) (6) ed al livello di espressione del recettore progesteronico (PgR). In particolare, l'espressione del PgR con un *cutoff* del 20% si delinea come ulteriore fattore prognostico di distinzione tra i due sottotipi luminali: *Luminal A*, con spiccata ormonosensibilità e PgR>20% vs *Luminal B* con PgR<20% (7). La terapia ormonale rappresenta la base del trattamento sia negli stadi iniziali che avanzati. In una piccola percentuale di casi presentano iperespressione di HER2 (fino al 20% dei *Luminal B*).

- *HER2-enriched*: rappresenta il 15-20% dei carcinomi mammari, caratterizzato dall'iperespressione/amplificazione di HER2. La prognosi è peggiore rispetto ai tumori luminali, tuttavia l'introduzione del trastuzumab, anticorpo monoclonale anti-HER2, in combinazione con la chemioterapia, ha modificato in modo drastico la storia clinica di queste neoplasie (8).
- "*Basal-like*": costituisce circa il 15% dei tumori della mammella, è caratterizzato dall'espressione di marcatori delle cellule mioepiteliali quali: citocheratine 5/6 e 17, vimentina, CD10, α -actina del muscolo liscio ed EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Dal punto di vista fenotipico coincide nell'80% dei casi con il sottotipo triplo negativo, definito dall'assenza dell'espressione dei recettori ormonali ed HER2. È la neoplasia mammaria a prognosi peggiore e la chemioterapia rappresenta lo standard di cura.

1.3 Il carcinoma infiltrante HR+ e HER2-

Il sottotipo HR+/HER2- rappresenta, come precedentemente affermato, la tipologia più frequente di tumore della mammella. Nonostante i progressi diagnostico-terapeutici, l'accessibilità a nuovi farmaci antitumorali e l'integrazione di terapie locali con terapie sistemiche, il rischio stimato di recidiva a distanza a 20 anni dalla diagnosi è significativo: varia dal 10% al 50%, a seconda dello stadio TN rilevato alla diagnosi, ed è direttamente correlato all'estensione della malattia primitiva. In particolare, anche nel caso di tumore di dimensioni inferiori a 2 cm e senza coinvolgimento linfonodale (T1N0) il rischio di recidiva a 15 anni supera il 10% anche dopo una terapia ormonale adiuvante di 5 anni (9) (10) (11).

Circa il 5-7% delle pazienti con carcinoma mammario si presenta con malattia metastatica alla diagnosi: in Italia nel 2021 sono stati 37 mila i casi di diagnosi di malattia metastatica ad origine mammaria (3) (12) (13).

La sopravvivenza mediana è di 4,5 anni, con differenze a seconda del sottotipo molecolare di malattia primitiva: dai 4,9 anni per il sottotipo luminale ai 1,5 anni per i tumori triplo negativi (14).

1.3.1 Terapia del carcinoma mammario HR+ e HER2- metastatico

Nel setting del mBC (*metastatic Breast Cancer*), gli obiettivi del trattamento sono il controllo della malattia e della sintomatologia correlata, ai fini del miglioramento della qualità di vita e, possibilmente, del prolungamento della stessa.

La scelta del trattamento più adeguato dipende dalle caratteristiche biologiche del tumore, dal carico di malattia (presenza o assenza di metastasi viscerali, sintomi di malattia, alterazione dei parametri laboratoristici), dai precedenti trattamenti ricevuti, dalle condizioni generali, comorbidità e terapie concomitanti del paziente e dalla compliance. In questo sottotipo il cardine del trattamento è costituito dalla terapia ormonale (12) (15) (16).

1.3.2 Terapia endocrina

Le principali opzioni di terapia ormonale comprendono SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulators*, quali il tamoxifene), SERDs (*Selective Estrogen Receptor Down-regulators*, come fulvestrant) e gli inibitori dell'aromatasi (AI, a loro volta distinti in non steroidei, quali anastrozolo e letrozolo, e steroidei, come exemestane).

Nelle pazienti in premenopausa i farmaci LHRH analoghi, con azione inibitoria sull'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio, sono abitualmente associati all'ormonoterapia (12) (17) (18).

1.3.2.1 Tamoxifene (SERM)

Il tamoxifene è un modulatore selettivo del recettore degli estrogeni con attività tessuto-specifica: a livello mammario, in particolare, esercita una parziale inibizione della dimerizzazione del recettore degli estrogeni (19). È attualmente utilizzato come terapia adiuvante per le pazienti in premenopausa, mentre nel setting metastatico rappresenta un'alternativa meno utilizzata (20) (21) (22) (23).

1.3.2.2 Inibitori dell'aromatasi (AI)

I farmaci inibitori dell'aromatasi steroidei (exemestane) e non steroidei (anastrozolo e letrozolo) agiscono inibendo l'enzima aromatasi, deputato alla sintesi di estrogeni a partire dagli androgeni nei tessuti periferici; costituiscono lo standard di cura in prima linea nelle pazienti non precedentemente esposte a terapia ormonale o che non hanno dimostrato recidiva di malattia in corso/entro breve tempo dall'inizio della terapia ormonale. In virtù del comprovato beneficio in sopravvivenza libera da malattia sono preferiti rispetto al tamoxifene anche nelle pazienti in premenopausa, in quanto caso con associazione di LHRH analoghi (24).

1.3.2.3 Fulvestrant (SERD)

Il fulvestrant appartiene alla classe dei SERD: deregolatori selettivi del recettore estrogenico. A livello molecolare, il legame di fulvestrant ad ER ne impedisce la dimerizzazione e, di conseguenza, la traslocazione nucleare, promuovendo la degradazione del recettore per via proteasomiale. Il risultato netto è un effetto anti-estrogenico puro con inibizione dell'espressione dei geni estrogeno-dipendenti (25) e perdita di espressione di ER, riduzione di espressione di PgR e Ki-67 (26) (27) (28).

Lo studio CONFIRM, di confronto tra un dosaggio di 500 mg ogni mese ed un dosaggio di 250 mg con la stessa cadenza, ha dimostrato la superiorità in termini di sopravvivenza globale (OS: *Overall Survival*) della dose più elevata, stabilendo lo standard di cura (26.4 mesi vs 22.3 mesi HR 0.81; 95% CI 0.69–0.96; p = 0.02) (29). Lo studio di fase III FALCON, che ha incluso 462 donne in postmenopausa non

precedentemente esposte a endocrinoterapia ha confermato l'efficacia di un trattamento di I linea con fulvestrant 500 mg ogni 28 giorni, rispetto ad anastrozolo, con un significativo miglioramento della progressione libera da malattia (PFS: *Progression-Free Survival*) *end-point* primario dello studio (16.6 mesi con fulvestrant vs 13.8 mesi con anastrozolo HR = 0.797; 95% CI 0.637–0.999; p = 0.0486) e simili tassi di eventi avversi (30).

1.3.3 Nuovi farmaci a bersaglio molecolare

Nel corso della storia naturale della malattia mammaria a recettori ormonali positivi circa la metà dei pazienti è destinato ad acquisire resistenza alla terapia endocrina (9).

In ambito clinico, la condizione di endocrino-resistenza è definita come primaria o secondaria (31) a seconda che la recidiva o progressione sia avvenuta rispettivamente nel corso dei primi 2 anni di terapia endocrina adiuvante o entro i 6 mesi in corso di terapia endocrina per malattia metastatica (32).

I principali meccanismi alla base della resistenza comprendono la sovra-regolazione del recettore estrogenico e suoi coattivatori, o di pathway a valle di esso, come le vie mitogene mediate da PI3-K e RAS, e la sotto-regolazione delle proteine inibitrici delle chinasi ciclina-dipendenti.

La definizione della resistenza alla terapia endocrina è cruciale nella scelta dell'algoritmo di cura e, negli ultimi anni, lo scenario clinico di è arricchito di molecole attive sulle *pathways* implicate nell'endocrinoresistenza.

1.3.3.1 Inibitori di CDK4/6

Le chinasi ciclina-dipendenti (CDK, *cycline-dependant kinase*) 4 e 6 sono enzimi che, una volta stimolati da segnali mitogeni (quali fattori di crescita o molecole di adesione cellulare), formano un complesso con la ciclina D1 che, a sua volta, va a fosforilare ed inibisce pRb. L'azione normale di pRb è mantenere inattivo il fattore di

trascrizione E2F, deputato alla trascrizione dei geni che determinano la progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. È stato osservato che CD1 e CDK4/6 sono stimolate direttamente dal recettore per gli estrogeni e frequentemente amplificate nel tumore della mammella (fino al 15% dei tumori a recettori ormonali positivi), delineandosi quindi come potenziale target farmacologico (33) (34) (35).

I farmaci inibitori di CDK4/6 (CDKi, *CDK inhibitors*) attualmente approvati sono palbociclib, ribociclib ed abemaciclib, in prima e seconda linea. Il palbociclib, primo farmaco ad aver ricevuto approvazione dalle Unità Regolatorie, in associazione alla terapia ormonale si è dimostrato superiore alla sola terapia endocrina nello studio registrativo PALOMA-2, con una PFS (*end-point* primario dello studio) di 24.8 mesi versus 14.5 mesi (HR 0.58; 95% CI, 0.46 – 0.72; P <0.001) (36). Più recentemente, la combinazione di terapia endocrina e ribociclib o abemaciclib si è dimostrata efficace non solo in termini di PFS, ma anche in termini di OS, rispetto alla sola terapia endocrina (37) (38) (39) (40). Lo studio MONALEESA-7, dedicato specificamente alle donne in premenopausa, ha confermato l'efficacia di ribociclib, con una PFS di 23.8 mesi (95% CI 19.2 – *non raggiunto*) rispetto ai 13.0 mesi del placebo (HR 0.55, 95% CI 0.44 – 0.69; p <0.0001) (41) (42) .

Una recente revisione sistematica della letteratura conclude che i farmaci inibitori di CDK4/6 associati all'ormonoterapia, rispetto all'ormonoterapia da sola, migliorano la sopravvivenza libera da progressione secondaria (PFS2) ed il tempo alla ripresa di un trattamento chemioterapico (TTC: *Time To Chemotherapy*), ritardando così l'inizio di trattamenti a maggior profilo di tossicità e, potenzialmente, l'insorgenza dell'endocrino-resistenza (43).

Nella figura 1 vengono schematizzati i meccanismi d'azione delle CDK4/6 ed i rispettivi farmaci mirati (44).

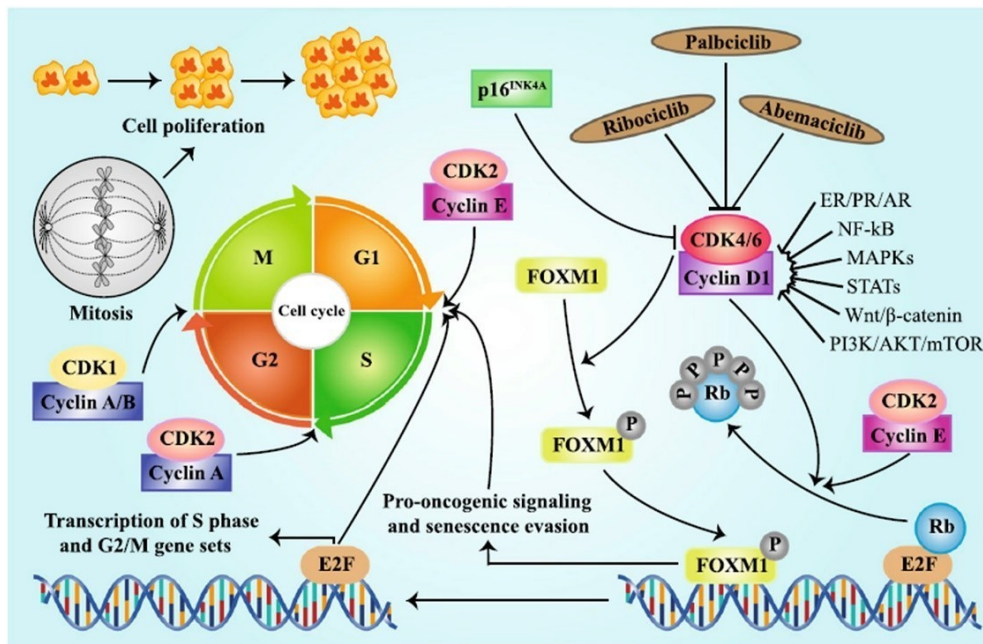


Figura 1: la Ciclina D1 insieme alle CDK4/6 formano un complesso che fosforila pRb, rendendolo inattivo, promuovendo quindi l'azione di E2F, il quale trascrive i geni i cui prodotti sono necessari alla progressione del ciclo cellulare e, quindi, la proliferazione dei tessuti e crescita tumorale. Questa pathway mitogena è connessa a numerosi stimoli, fra cui quelli di ER e PgR, che sono caratteristici delle cellule di tumore mammario Luminale A e B. Abemaciclib, Ribociclib e Palbociclib sono inibitori selettivi di CDK4/6.

1.3.3.2 Inibitori di mTOR

Il *mammalian target of rapamycin* (mTOR) rappresenta un altro potenziale target nel trattamento del carcinoma alla mammella metastatico HR+/HER2-. mTOR è un componente di due complessi (mTORC1 e mTORC2), che svolgono un ruolo chiave nello stimolo alla proliferazione cellulare indotta dal segnale estrogenico e mediata dalla via di PI3K/Akt (45) (46).

Everolimus, farmaco orale attivo sulla pathway di mTOR, si è dimostrato efficace, in associazione alla terapia ormonale a base di inibitore dell'aromatasi exemestane, con un prolungamento della PFS rispetto alla sola terapia ormonale (mediana di 10.6 mesi vs 4.1 mesi, HR 0.36; 95% CI, 0.27 – 0.47; P <0.001) (47) (48).

La Figura 2 mostra il *crosstalk* fra recettore per gli estrogeni e via di segnale di crescita cellulare (49).

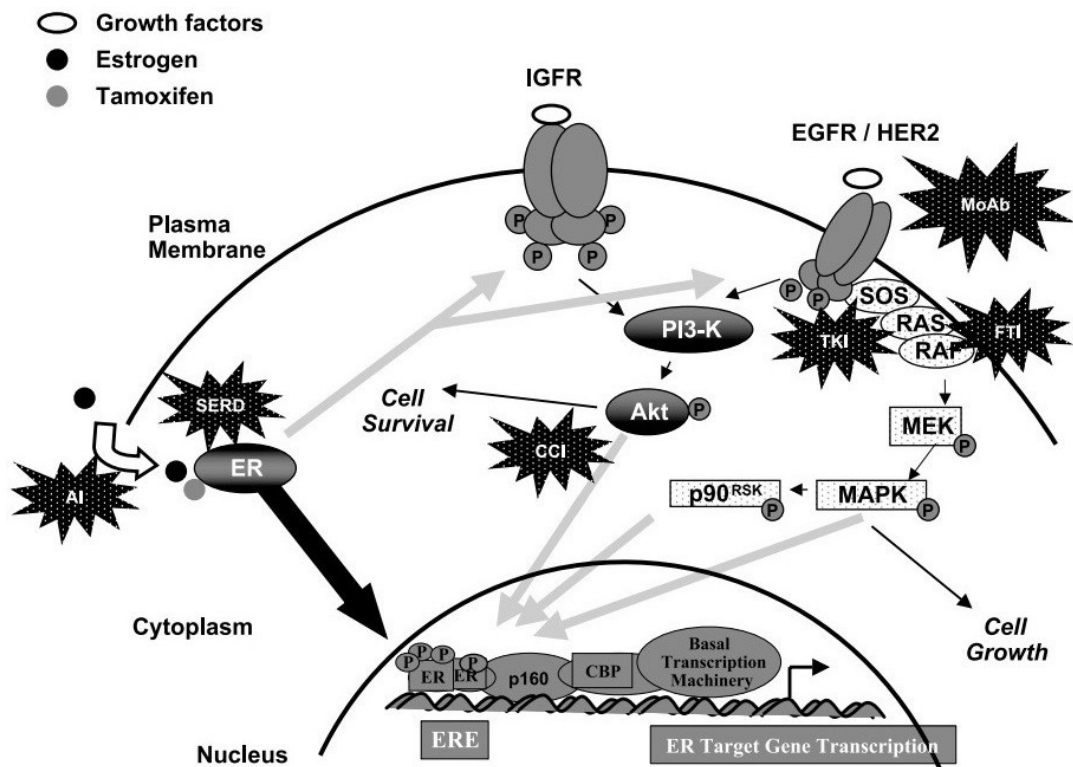


Figura 2: il recettore per gli estrogeni ER dialoga con altri recettori di membrana, quali il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR o HER2) e il recettore per il fattore di crescita simil-insulinico (IGFR: Insulin-like Growth Factor Receptor). A livello nucleare si ha la promozione della trascrizione dei geni responsivi agli estrogeni (ERE: Estrogen Responsive Elements) coadiuvata dai secondi messaggeri PI3-K, Akt, MAPK stimolati da IGFR e EGFR/HER2.

1.3.3.3 SERD orali

Numerose nuove molecole sono in fase di studio con lo scopo di superare la resistenza alla terapia ormonale e potenziarne l'efficacia, in particolare i SERD di nuova generazione hanno una maggiore potenza farmacodinamica e migliorate proprietà cinetiche, prima fra tutte la biodisponibilità orale. Un esempio è elacestrant, primo SERD orale sperimentato in un trial clinico di fase III: ai due bracci randomizzati di pazienti con BC HR+/HER2- localmente avanzato o metastatico sono stati assegnati elacestrant vs terapia ormonale standard, dimostrando che i tassi di progressione a 6 e 12 mesi sono ridotti del 30% in più rispetto al braccio con terapia standard e del 45% in più analizzando il sottogruppo con documentata mutazione in ESR1, la quale è un'impronta molecolare di endocrinoresistenza (50) (51). Inoltre, dopo aver superato le sperimentazioni in vitro e nei modelli in vivo (52), anche la molecola giredestrant sta attualmente venendo testata nel trial clinico di fase III persevERA Breast Cancer, in due bracci di pazienti con BC HR+/HER2- localmente avanzato o metastatico randomizzati al trattamento con giredestrant + palbociclib vs letrozolo + palbociclib (NCT04546009).

Di seguito, in figura 3, l'algoritmo terapeutico proposto nel quinto consensus internazionale di ESO-ESMO sull'ABC (*Advanced Breast Cancer*) (16).

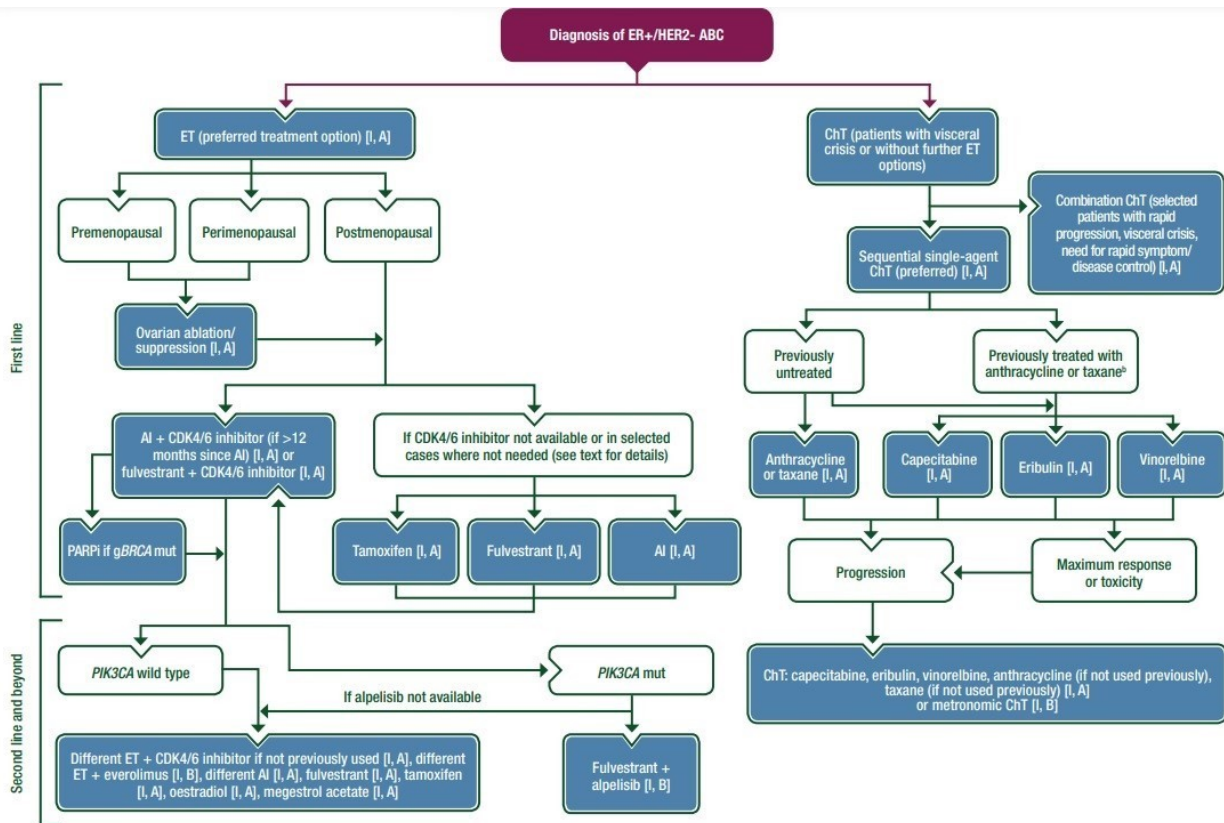


Figura 3: la terapia d'elezione è l'ormonoterapia, fatta eccezione per le pazienti con crisi viscerale nelle quali si somministra chemioterapia; le pazienti candidate a terapia ormonale ancora fertili vengono sottoposte a soppressione farmacologica della funzione ovarica. Tamoxifene, fulvestrant ed Inibitori dell'aromatasi sono i primi farmaci ad essere adoperati e qualora vi fosse progressione di terapia vi è l'indicazione a passare allo schema AI + inibitori delle CDK (Chinasi Ciclina-Dipendenti). In caso di ulteriore progressione, vi è l'indicazione all'assessment dello status di PIK3CA per eventuale trattamento con inibitore specifico del prodotto mutato, alpelisib

1.4 Meccanismi di resistenza alla terapia endocrina

1.4.1 La via di PI3K/Akt/mTOR

PI3K/Akt/mTOR è una via di trasduzione di segnale che fisiologicamente regola i processi di crescita, differenziazione e sopravvivenza cellulare. La fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) è una chinasi lipidica composta di una unità catalitica ed un dominio regolatorio che, in seguito all'attivazione di recettori di membrana di tipo GPCR o RTK (rispettivamente *G-Proteins Coupled Receptors* e *Receptor Tyrosine Kinases*), media la fosforilazione di PIP2 (fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato) in PIP3 (fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato) il quale, a sua volta, attiva la chinasi Akt, principale effettore della via di trasduzione. La fosfatasi PTEN funge da regolatore negativo di questa pathway. Esistono diverse classi di PI3K: classe I, classe II, classe III; in particolare la classe I è ulteriormente suddivisa in quattro sottoclassi in base alla subunità catalitica p110, che può essere di tipo α , β o δ nella sottoclasse IA, ricettiva ai RTK, e di tipo γ nella sottoclasse IB, ricettiva ai GPCR (53) (54) (55).

Come anticipato, questa via di segnale è una delle più frequentemente coinvolte nella patogenesi tumorale: il gene PIK3CA, che codifica per la subunità catalitica p110 α , può essere mutato nel 30-40% dei tumori in stadio iniziale e in fino al 60% circa delle biopsie di sedi metastatiche: una revisione di letteratura riporta la prevalenza mediana della mutazione nelle biopsie di metastasi del 36.4%, con intervalli dal 20.8% al 61.5% (56). L'80% delle mutazioni è a carico di tre *hotspots* ricorrenti: a livello dell'esone 9 (E542K ed E545K), che codifica per il dominio ad elica, e dell'esone 20 (H1047R), che codifica per il dominio catalitico; esse comportano un *gain of function* dell'enzima (57) (58) (54) (59) (60). Diversi studi evidenziano, inoltre, che le mutazioni in PIK3CA sono più frequenti nel tumore a recettori ormonali positivi che nei tumori HER2-erniched o triplo negativi (61) (62) e più spesso associate a decorso clinico più sfavorevole (63).

In linee cellulari di tumore mammario esposte a deprivazione di estrogeni (LTED: *long term estrogen deprivation*, ricostruzione in vitro della condizione tipica delle cellule tumorali esposte a terapia ormonale), analisi di profilazione proteomica hanno mostrato

un'alterazione dell'espressione di ER e della sensibilità a estrogeni endogeni ed esogeni, tuttavia in maniera non univoca, mentre l'aumentata fosforilazione e attivazione dei substrati di mTOR e PI3K è risultata essere il pattern adattativo maggiormente correlato con la sopravvivenza e crescita cellulare, infatti somministrando farmaci anti-PI3K la proliferazione delle linee cellulari LTED veniva inibita (*Miller et al.*) (64). Tuttavia, è stato evidenziato che la risposta terapeutica maggiore la si ha con la combinazione di farmaci anti-PI3K con anti-estrogeni rispetto ai soli anti-PI3K (64), in quanto, seppur ligando-indipendente, la via molecolare di crescita cellulare verte sugli ERE anche nelle cellule endocrino-resistenti (65).

In figura 4 sono esposti alcuni dei principali meccanismi di endocrino-resistenza ed i farmaci potenzialmente attivi (60).

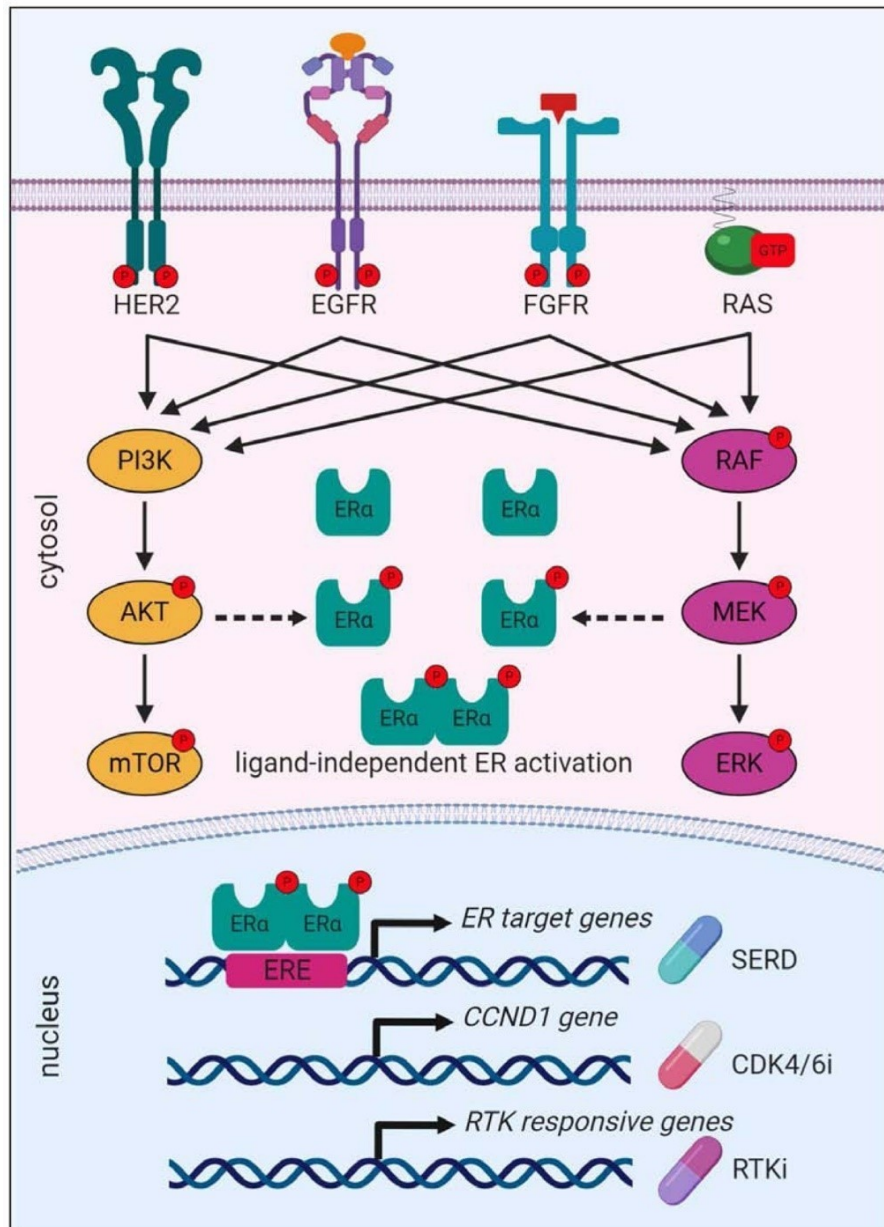


Figura 4: la pressione selettiva sul tumore sviluppa cellule le quali sono in grado di attivare la via mitogena regolata da ERα anche in assenza di ligando, tramite i secondi messaggeri PI3K ed mTOR.

Da queste osservazioni è nata la spinta verso la ricerca di molecole in grado di agire sulla via di segnale di PI3K/Akt/mTOR al fine di superare l'endocrino-resistenza. Nella tabella 1 (66) sono presentati i principali trial clinici che hanno investigato l'utilizzo di farmaci a bersaglio molecolare attivi sull'asse PI3K/Akt.

<i>NOME (numerosità)</i>	<i>Fase</i>	<i>Popolazione</i>	<i>Trattamento</i>	<i>Linea di trattamento</i>	<i>Outcome Test vs. placebo</i>
BELLE-2 (n=1147)	III	HR+/HER2- localmente avanzato/metast atico	Fulvestrant ± buparlisib	Linea successiva dopo progressione da AI	mPFS: 6.9 mesi vs 5.0 mesi (p<0.001) PIK3CA* mPFS: 7.0 mesi vs 3.2 mesi (HR 0.56, p<0.001)
BELLE-3 (n=432)	III	HR+/HER2- localmente avanzato/metast atico	Fulvestrant ± buparlisib	Linea successiva dopo progressione/recid iva da ET + everolimus	mPFS 3.9 mesi vs 1.8 mesi (HR 0.67; 95% CI 0.53- 0.84)
FAKTION (n=140)	II	HR+/HER2- localmente avanzato/metast atico	Fulvestrant ± capiasertib	Linea successiva dopo progressione/recid iva da AI	mPFS: 10.3 mesi vs 4.8 mesi (HR 0.58; 95% CI 0.39- 0.84)
SOLAR-1 (n=572)	III	HR+/HER2- metastatico	Fulvestrant ± alpelisib	Linea successiva a progressione da ET	PIK3CA* m PFS: 11.0 vs 5.7 (HR 0.65; 95% CI 0.50- 0.85; P<0.001)
SANDPIPER (n=516)	III	HR+/HER2- localmente avanzato/metast atico con mutazione PIK3CA	Fulvestrant ± taselisib	Linea successiva dopo progressione/recid iva da AI	m PFS: 7.4 vs 5.4 (HR 0.70, p=0.0037)
BYLIEVE (n=127)	II	HR+/HER2- metastatico con mutazione PIK3CA	ET ± alpelisib	Linea successiva dopo progressione da CDKi	ongoing

Tabella 1 - Abbreviazioni: ET= terapia endocrina; CDKi= CDK inhibitors; mPFS= PFS mediana; PIK3CA= pazienti con mutazione in PIK3CA; OR= Objective Response*

La combinazione di buparlisib, pan-PI3K inibitore, e fulvestrant, in pazienti con tumore HR+/HER2- localmente avanzato o metastatico, ha dimostrato un vantaggio in PFS rispetto alla sola terapia ormonale, in particolare nelle pazienti con mutazione PIK3CA: 7.0 mesi vs 3.2 mesi (HR 0.56, $p < 0.001$); tuttavia, lo spettro di tossicità del farmaco ne ha bloccato lo sviluppo (67) (68). Taselisib, inibitore α -specifico di PI3K, in associazione a fulvestrant, ha mostrato un beneficio in termini di PFS rispetto al solo fulvestrant in pazienti con malattia metastatica a recettori ormonali positivi precedentemente esposte a terapia endocrina (7.4 mesi vs 5.4 mesi; HR 0.70, $p = 0.0037$) (69); tuttavia anche questa molecola è risultata scarsamente tollerata ed il suo sviluppo è bloccato.

Lo studio randomizzato di fase III SOLAR-1 (70) ha testato l'efficacia di alpelisib, farmaco inibitore α -specifico di PI3K, e fulvestrant vs fulvestrant più placebo in una popolazione di 572 pazienti con carcinoma HR+/HER2- metastatico, precedentemente trattate con endocrinoterapia, stratificate in base allo status di PIK3CA. Al follow-up mediano di 20 mesi, nella coorte con documentata mutazione di PIK3CA, la combinazione ha determinato un beneficio statisticamente significativo in PFS, *end-point* primario dello studio (11 mesi vs 5.7 mesi HR 0.65; 95% CI 0.50-0.85; $P < 0.001$). Anche il tasso di risposta globale si è dimostrato migliore nel braccio trattato con alpelisib (26.6%) rispetto a quello trattato con solo fulvestrant (12.8%). I profili di sicurezza si sono dimostrati simili nei due bracci. Sulla base di questi risultati, alpelisib ha ottenuto l'approvazione da parte della FDA (Food and Drug Administration) nel 2019 per il suo uso in associazione a fulvestrant nelle pazienti con tumore mammario HR+/HER2-, PIK3CA mutato, localmente avanzato o metastatico (71).

1.4.2 Il gene ESR1

Un altro meccanismo coinvolto nello sviluppo dell'endocrinoresistenza è a carico del recettore per gli estrogeni ER, in particolare dell'isoforma ER α (72). ER α appartiene alla superfamiglia dei recettori nucleari, è codificato da ESR1 sito sul cromosoma 6 ed è composto dei seguenti domini: dominio N-terminale, altamente variabile in termini di sequenza aminoacidica e di lunghezza, contiene la regione AF1 (*Activation Function 1*) e lega fattori di trascrizione; dominio centrale C o DBD (*DNA Binding Domain*),

altamente conservato; dominio cerniera D, importante per la traslocazione nucleare di ER; dominio E, che contiene AF2 e regola la trascrizione grazie al sito LBD (*Ligand Binding Domain*) sensibile al legame con gli ormoni; dominio F al C-terminale (73). ER α è deputato alla trascrizione di geni associati alla proliferazione ed alla sopravvivenza cellulare: il legame con gli ormoni estrogenici, come anche il *crossstalk* con vie mitogene quali EGFR, HER2, PI3K, determina la dimerizzazione del recettore e la sua traslocazione a livello nucleare: ivi si lega a specifici siti del DNA, i cosiddetti ERE, *Estrogen Responsive Elements*, che regolano l'espressione dei geni responsivi agli estrogeni.

La perdita dell'espressione di ER ha luogo in circa il 10-20% dei casi nel corso della malattia metastatica (72). Mutazioni attivanti sono presenti in circa il 30% delle pazienti con malattia metastatica, mentre sono di raro riscontro negli stadi precoci. In una coorte di pazienti con carcinoma mammario metastatico, *Toy et al.* (74) hanno osservato una frequenza di mutazioni di ESR1 del 17.5% su 80 campioni a fronte del tasso mutazionale dello 0.5% su 962 campioni sequenziati nell'ambito del progetto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). L'analisi biochimica e strutturale dei campioni evidenziava mutazioni favorevoli la conformazione attiva di ER α in assenza di ligando, verosimilmente alla base della refrattarietà alla terapia ormonale. *Jeselson et al.* (75) hanno riportato, in una popolazione di pazienti con malattia metastatica, un tasso globale di mutazione di ESR1 del 12% (9 su 76; 95% CI 6-21%), che aumenta fino al 20% (5 su 25; 95% CI 7-41%) nel sottogruppo pretrattato con terapia ormonale. In uno studio di confronto tra 11 campioni biotici di tumori primitivi e le corrispondenti metastasi metacrone è stato osservato lo sviluppo di una mutazione di ESR1 nel 55% dei pazienti (6/11) che avevano status *wild-type* sul corrispondente tessuto primitivo (76).

Le mutazioni a carico di ESR1 coinvolgono più frequentemente il *ligand binding domain* (principalmente Y537S e D538G, a seguire Y537N, Y537C, E380Q, S463P, L536R) (77) (78). Esse comportano l'attivazione del recettore in maniera indipendente dal ligando, portando così la cellula ad essere refrattaria alle terapie basate sulla deprivazione ormonale; nei modelli in vitro un parziale effetto da parte di tamoxifene o fulvestrant è ancora raggiungibile ma a concentrazioni di farmaco superiori a quelle terapeutiche standard (79). La presenza di una mutazione di ESR1 rappresenta un fattore

prognostico negativo nei pazienti con mBC sottoposti a precedente terapia con AI, alcuni autori suggeriscono di sottoclassificare la malattia HR+/HER2- avanzata in base allo status ESR1 (80).

Nella figura 5 sono riassunti i meccanismi d'azione dei principi attivi finora trattati ed i principali meccanismi di resistenza (81).

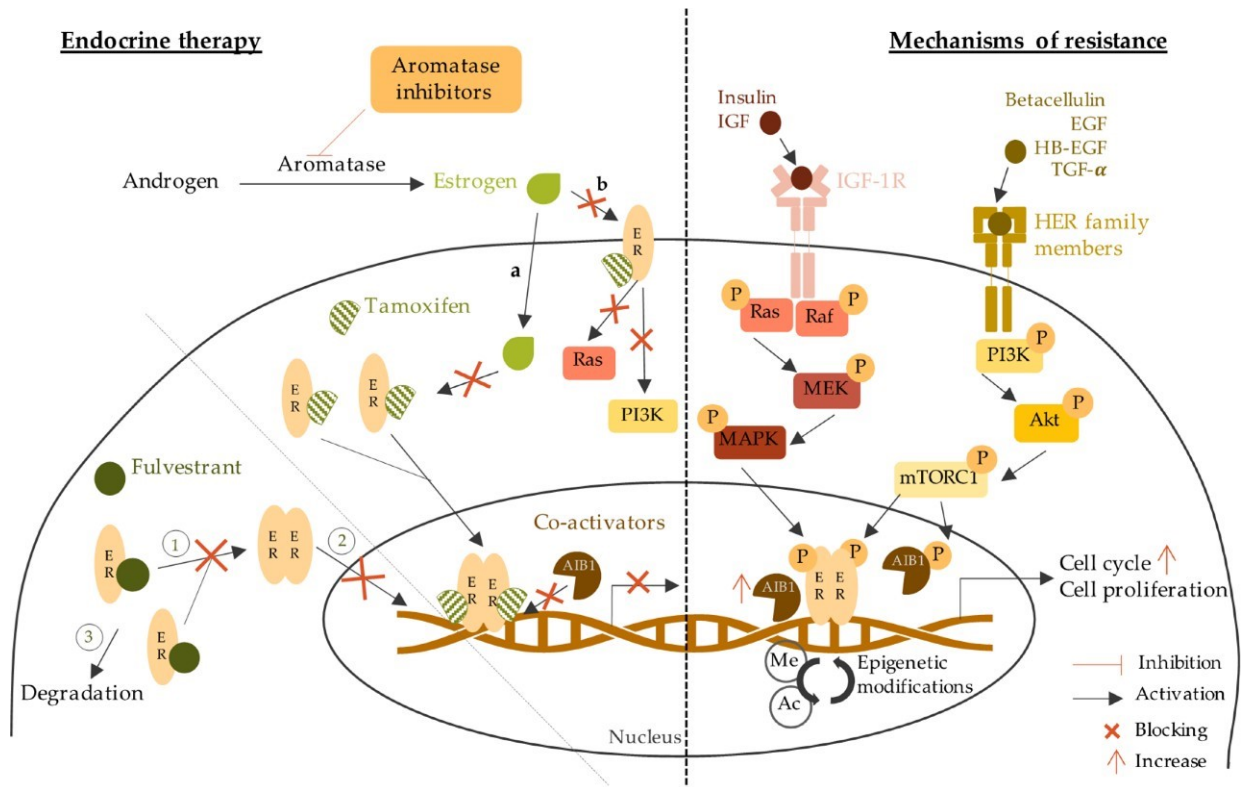


Figura 5: a sinistra sono mostrati i meccanismi di endocrinoterapia con tamoxifene, fulvestrant ed inibitori dell'aromatasi, a destra sono mostrati i meccanismi di resistenza alla terapia endocrina attraverso modifiche epigenetiche, aumentata attività di coattivatori ed effettori del ciclo cellulare. Gli estrogeni possono superare la membrana plasmatica sia per diffusione (a) sia attraverso il legame con ER (b). Fulvestrant inibisce la dimerizzazione di ER (1), ne impedisce la traslocazione nucleare (2) e quindi ne comporta la degradazione (3). La via PI3K/Akt/mTOR favorisce la trascrizione di geni normalmente regolati da ER anche in assenza della sua attività ligando-dipendente.

1.5 La biopsia delle lesioni metastatiche

Nell'evoluzione della patologia neoplastica possono verificarsi importanti modifiche biologiche, pertanto le linee guida raccomandano una biopsia delle lesioni metastatiche, ove fattibile, per confermare l'origine delle lesioni e ricaratterizzare la biologia della malattia (32). Una discordanza dello stato recettoriale tra tumore primitivo e metastasi è stata infatti riportata fino al 40% dei casi per quanto riguarda i recettori ormonali e in circa il 10-15% dei casi per HER2, con impatto sul comportamento biologico (82).

Pazienti con perdita dell'espressione di ER nella metastasi hanno un aumento del 48% del rischio di morte rispetto alle pazienti con fenotipo concorde (HR 1.48, 95% CI 1.08-2.05) (82) e la conversione dallo status HR+ a HR- è un fattore prognostico negativo indipendente (83).

In uno studio italiano pubblicato nel 2013 emerge che il 22,7% delle pazienti muta status recettoriale durante la progressione della malattia e che la perdita dell'espressione di ER o di HER2 comporta una peggiore sopravvivenza globale (mediana di 59 mesi rispetto ai 130 mesi delle pazienti con espressione conservata (P=0.0002) (84).

Il cambiamento dello status recettoriale è da correlare all'intrinseca eterogeneità delle cellule tumorali ed alla pressione selettiva esercitata dalle terapie oncologiche. La caratterizzazione del fenotipo tumorale è, dunque, cruciale per la scelta dell'iter terapeutico.

La biopsia tissutale è una procedura invasiva e non scevra da complicanze, la cui ripetizione sistematica risulta discutibile dal punto di vista del rapporto rischio-beneficio. Nonostante i progressi delle tecniche di radiologia interventistica, non sempre le lesioni metastatiche sono facili da raggiungere, come nel caso dei secondarismi cerebrali o linfonodali profondi. Alle possibili complicanze procedurali (rischio di sanguinamenti, infezioni, lesioni di strutture sane quali vasi e nervi, eventuale rischio anestesilogico) si possono aggiungere delle difficoltà tecniche di analisi, dovute ad esempio alla necessità di decalcificazione per le lesioni ossee. In questo scenario, l'identificazione di potenziali

biomarcatori nel sangue periferico rappresenta un metodo minimamente invasivo e ripetibile per consentire la caratterizzazione in tempo reale della malattia e la personalizzazione delle cure.

1.5.1 La biopsia liquida

1.5.1.1 Il razionale della biopsia liquida

Per biopsia liquida si intende la tecnica in grado di isolare e caratterizzare cellule tumorali o i loro prodotti dal sangue, tramite una venipuntura. Il DNA libero circolante (*circulating free DNA*, cfDNA) è composto di brevi sequenze di DNA, in numero di 150-200 coppie di basi azotate (bp, *base pair*) (85) (86) ed è prodotto principalmente da cellule emopoietiche. È stato osservato che anche le cellule neoplastiche sono in grado di rilasciare frammenti del loro DNA (*circulating tumor DNA*, ctDNA), che provengono principalmente da cellule apoptotiche, dato suggerito dalla presenza dei *ladder* contenenti nucleosomi. La frazione di ctDNA sul DNA tumorale totale è estremamente variabile, dallo 0,1% al 90% (86) (87) (88).

Il principale vantaggio della biopsia liquida è quello di ottenere informazioni di importante utilità clinica tramite una procedura semplice e ben tollerata dal paziente come un prelievo di sangue. La biopsia liquida consente inoltre di definire il *mutational burden* e l'eterogeneità della malattia, in termini di (89) (90):

- Eterogeneità intra-tumorale: carico mutazionale all'interno dello specifico tumore; la biopsia di una singola lesione tissutale non può rappresentare questo aspetto, in quanto non completamente informativa dell'insieme;
- Eterogeneità inter-tumorale: è la diversità genetica di una stessa malattia in pazienti diversi;
- Eterogeneità spaziale: differenze tra i diversi siti metastatici nel singolo paziente;
- Eterogeneità temporale: modifiche che le cellule acquisiscono nel tempo, specialmente sotto la pressione selettiva esercitata dall'esposizione ai trattamenti medici.

Il primo ambito oncologico in cui è stata standardizzata la biopsia liquida è quello del tumore del polmone non a piccole cellule per la ricerca delle mutazioni in EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) predittive di risposta alla terapia a bersaglio molecolare con TKIs (*Tyrosin Kinase Inhibitors*) (91) (92).

1.5.1.2 Metodiche di biopsia liquida

Le tecnologie per l'analisi del ctDNA ad oggi disponibili sono quelle basate sulla PCR e quelle basate sul sequenziamento di nuova generazione (NGS, *Next Generation Sequencing*). La PCR non discrimina tra sequenze *wild-type* e mutanti ed amplifica entrambi i tipi con la stessa efficienza, ostacolando la rilevazione di mutazioni scarsamente rappresentate nel campione: per questo sono state sviluppate delle metodiche per superare questa limitazione, alcune con selettività verso gli alleli meno frequenti, come la ARMS-qPCR, Cold-PCR, PCR metilazione-specifica (con sensibilità, in base alla metodica, dal 1% fino al 0,01%), altre con la digitalizzazione del segnale per fornire una quantificazione assoluta delle sequenze mutanti, come la Droplet Digital PCR e la Microfluidics Digital PCR (con sensibilità, in base alla metodica, dal 0,1% fino allo 0,005%); per la maggior parte delle metodiche è necessario partire da quantità di plasma dell'ordine dei mL (89). Mentre mediante PCR vengono ricercate mutazioni note a priori, la NGS permette di individuare mutazioni puntiformi, riarrangiamenti cromosomici quali amplificazioni, delezioni e fusioni dal significato clinico noto o non ancora determinato, a livello di genoma intero, esoma o trascrittoma, potendo anche quantificare il *mutational burden* con elevata sensibilità; il pannello di geni target può essere costituito da discreti hotspots noti o può essere esteso ad intere regioni del genoma (93), con sensibilità dall'1% fino allo 0,05% partendo da quantità di cfDNA dell'ordine dei ng (89).

1.5.2 La biopsia liquida nel carcinoma mammario

Benché non sia ancora entrata nella pratica clinica quotidiana, la raccolta del plasma per la ricerca di biomarcatori tumorali è ormai lo standard nella maggior parte dei trial clinici.

La prima rilevazione della mutazione di ESR1 nel plasma di pazienti con tumore della mammella risale al 2015. Analogamente a quanto osservato nei tessuti, le mutazioni più frequenti hanno sede presso gli aminoacidi 537, 538 e 380 e sono più frequenti nelle pazienti precedentemente esposti ad AI (94) (95).

Studi esplorativi sulla concordanza fra matrice liquida e tissutale hanno dimostrato che è possibile, affinando la tecnica, allineare l'informatività della biopsia liquida con quella del tessuto ed anzi superarla: analisi preliminari hanno offerto evidenze discordanti (96), però a breve distanza di tempo ulteriori studi hanno delineato le caratteristiche per valorizzare la tecnica, come l'importanza del timing del prelievo emersa con *Higgins et al.* (97) in cui l'analisi dello status di PIK3CA su una coorte retrospettiva, i cui prelievi plasmatici e tissutali erano stati effettuati nello stesso giorno, e su una coorte prospettica la quale disponeva di biopsie tissutali in archivio e svolgeva successivamente un prelievo plasmatico, ha evidenziato una concordanza del 100% nella coorte retrospettiva a fronte di un 72,5% nella coorte prospettica. Inoltre, lo studio di *Dawson et al.* evidenzia come lo status del ctDNA è maggiormente variabile e correlabile all'andamento clinico della malattia rispetto ad altri marcatori surrogati quali il dosaggio di CA 15-3 e delle cellule tumorali circolanti (98). Infine, uno studio del gruppo padovano *Urso et al.* (99) ha raggiunto una concordanza del 91% nelle mutazioni di ESR1 fra campione tissutale e campione plasmatico, osservando anche che in tre pazienti le mutazioni erano presenti solo su ctDNA e non sul campione tissutale; è stato osservato anche che tutte le pazienti con mutazione in ESR1 erano state esposte a terapia ormonale, associando il dato riportato in letteratura per cui la terapia ormonale esercita pressione selettiva sui cloni.

Alcuni gruppi di studio hanno condotto delle indagini prospettico-retrospettive sui dati di studi preesistenti, avvalendosi dall'analisi del ctDNA per rinforzarne il significato predittivo e prognostico clinico. Dallo studio SoFEA (100) emerge che lo status mutato di ESR1 comporta un miglior outcome nelle pazienti trattate con fulvestrant rispetto ad exemestane (5.7 vs 2.6 mesi (HR 0.52; 95% CI 0.30-0.92; P=0.02), e assenza di differenza significativa tra i due trattamenti per le pazienti ESR1 *wild-type* (5.4 vs 8 mesi (HR 1.07; 95% CI 0.68-1.67; P=0.77) (101). Da PALOMA-3 è emerso che il vantaggio in termini di PFS conferito da palbociclib è indipendente dallo status di ESR1 (PFS mediana 9.4 mesi nel sottogruppo di pazienti ESR1 mutate e 9.5 mesi per le pazienti ESR1 *wild-type*)

(101) e che le pazienti con progressione della patologia sviluppano il medesimo pattern di mutazioni sia nel braccio esposto a fulvestrant + palbociclib che nel braccio esposto al solo fulvestrant, suggerendo come sia quest'ultimo principio attivo a selezionare il *driver* responsabile dell'endocrinoresistenza (102); le mutazioni principalmente osservate si confermano essere a carico di ESR1 nel 9% delle pazienti (specialmente aminoacido 537) e di PIK3CA nel 6% delle pazienti (con prevalenza dell'aminoacido 542) (102). Un'analisi secondaria sullo studio SOLAR-1 ha dimostrato nei pazienti con PIK3CA mutato una riduzione del 45% del rischio di progressione (HR 0,55; 95% CI 0.39 – 0.79), mentre i pazienti con PIK3CA *wild-type* presentavano una riduzione del 20% (HR 0,8; 95% CI 0.60 – 1.06) (103).

1.5.3 Serialità delle biopsie liquide e follow-up

Come precedentemente affermato, le cellule tumorali vanno incontro a mutazioni sotto la pressione selettiva dei farmaci ed è noto il concetto di eterogeneità temporale, per cui monitorare lo status molecolare dei principali geni responsabili dello sviluppo della resistenza alla terapia endocrina è una pratica che si sta rendendo necessaria e che diventa possibile con la biopsia liquida, data la sua minima invasività ed elevata ripetibilità.

Lo studio multicentrico di fase III PADA-1 (104) ha arruolato oltre 1000 pazienti con mBC HR+/HER2- per eseguire una prima linea di trattamento con associazione di palbociclib + AI e monitorare nel tempo lo status ESR1 tramite biopsia liquida. Al follow-up mediano di 26 mesi è emersa una migliore PFS nelle pazienti che sono passate da AI a fulvestrant in seguito alla rilevazione di mutazione di ESR1 con biopsia liquida, rispetto a quelle che hanno continuato ad assumere AI nonostante l'insorgenza della mutazione (11.9 mesi vs 5.7 mesi; HR 0.61, 95% CI 0.43 – 0.86; p=0.005), con una riduzione del 39% del rischio di progressione o morte (105).

Lo studio BioItaLEE sta indagando lo status del ctDNA in pazienti con aBC HR+/HER2- trattate con ribociclib, per monitorare l'andamento dell'espressione genica e della resistenza alla terapia tramite biopsia liquida, con prelievi eseguiti al basale (D0) ed al 15° giorno dall'inizio della terapia (D15). Da risultati preliminari si evince il ruolo predittivo del ctDNA, che correla con un minor rischio di progressione nelle pazienti con

ctDNA *wild-type* al D0 e al D15 rispetto alle pazienti con mutazioni presenti (HR 0.37; 95% CI 0.23 – 0.60; $p < 0.0001$); inoltre la clearance al D15 delle mutazioni presenti al D0 correla con minor rischio di progressione rispetto alle pazienti con status mutato costante (HR 0.56; 95% CI 0.32 – 1.00; $p = 0.0506$). È stata indagata anche l'attività della timidina chinasi sierica 1 (TKa) e, analogamente, essa ha dimostrato ruolo predittivo indipendente e rinforza il valore predittivo della biopsia liquida con ctDNA (106).

2 SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio CHAMBER è il monitoraggio dinamico delle principali alterazioni genetiche con valore prognostico e predittivo di resistenza alla terapia, su una coorte di pazienti con carcinoma mammario HR+/HER2- localmente avanzato o metastatico, tramite analisi seriata del ctDNA.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Disegno dello studio

Lo studio CHAMBER è uno studio traslazionale prospettico.

L'obiettivo primario è: la raccolta di campioni di plasma da pazienti con carcinoma mammario HR+/HER2- localmente avanzato o metastatico candidate a terapia sistemica come da pratica clinica e la descrizione della prevalenza delle mutazioni di ESR1 e PIK3CA valutate su ctDNA nel suddetto gruppo di pazienti.

Gli obiettivi secondari sono: esplorare le alterazioni molecolari su ctDNA delle pazienti in ogni linea di trattamento; monitorare l'evoluzione dinamica delle alterazioni molecolari individuate su ctDNA in diversi *timepoints* nello stesso paziente durante la storia naturale della malattia; esplorare la correlazione tra mutazione di PIK3CA/ESR1 e variabili cliniche quali PFS, RR a qualsiasi linea di terapia, OS; esplorare il ruolo delle mutazioni di ESR1 e PIK3CA dopo la progressione a CDK4/6 inibitori; valutare l'impatto della clearance precoce del ctDNA in corso di trattamento di prima linea con CDK4/6 inibitori.

È prevista la raccolta di campioni ematici al basale, prima dell'inizio delle terapie sistemiche e al momento di progressione di malattia, prima di iniziare una nuova linea di terapia; inoltre, per le pazienti in trattamento con CDK4/6 inibitori, dopo un recente emendamento, è stato implementato un ulteriore prelievo ad un mese dall'inizio della terapia (giorno 1 del 2° ciclo). Il campione di sangue viene prelevato contestualmente agli altri prelievi routinari, senza alcuna ulteriore venipuntura.

3.2 Popolazione in studio

La popolazione dello studio è rappresentata da 71 pazienti con carcinoma della mammella HR+/HER2- metastatico, diagnosi confermata con immunisto chimica e FISH, trattate presso la divisione Oncologia 2 dell'Istituto Oncologico Veneto (IOV) IRCSS di

Padova. Le pazienti sono state selezionate dall'oncologo medico in occasione di visite ambulatoriali o previa consultazione con il team multidisciplinare della *Breast Unit*. Le pazienti in studio sono state sottoposte ad un prelievo ematico per ricerca del ctDNA ad ogni progressione di malattia, registrata tramite esami di imaging o tramite rilevamento dello scadimento delle condizioni cliniche, prima dell'inizio di una nuova linea di terapia sistemica.

Ogni paziente, dopo aver preso visione e firmato il consenso informato, è stata registrata in un database prospettico che riporta informazioni relative ai dati clinico-patologici alla diagnosi (caratteristiche del tumore primitivo, età, stato menopausale), alla diagnosi di malattia metastatica, ai trattamenti eseguiti, all'ultimo follow-up e stato in vita ed alla caratterizzazione molecolare delle analisi in studio.

Al momento della stesura della tesi è stata eseguita l'analisi completa dei campioni raccolti da 3 pazienti: CHAMBER20, CHAMBER34, CHAMBER45.

3.3 Estrazione e valutazione della qualità e quantità del cfDNA

I campioni ematici sono stati raccolti in specifici tubi *streck*, in numero di 3 per ogni prelievo, contenenti buffer che stabilizzano e preservano la parte corpuscolata del sangue, impedendo l'emolisi ed il rilascio del DNA genomico, preservando il ctDNA fino a 7 giorni a temperatura ambiente; da ciascun tubo *streck* è possibile ricavare fino a 4-5 mL di plasma. I campioni vengono processati entro 24-72h.

Brevemente, i campioni di sangue vengono centrifugati a 2000g per 10 minuti a 4°C, il plasma sovranatante viene successivamente centrifugato a 20000g per 10 minuti a 4°C per rimuovere i detriti cellulari. Le aliquote di plasma ottenute vengono quindi trasferite in tubi criogenetici *criovals* e conservate a -80°C fino al momento dell'analisi. Il cfDNA è stato estratto da 4-5 mL di plasma, usando il kit di estrazione AVENIO ctDNA Analysis Kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) secondo le istruzioni del produttore ed eluito in 60 µL di buffer. La quantificazione del cfDNA è stata saggiata usando il QuBit dsDNA HS Assay Kit con fluorimetro QuBit 3.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). La qualità dei campioni di cfDNA è stata determinata con la

TapeStation Agilent 4200 usando il saggio cCell-free DNA ScreenTape (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA): il saggio valuta i campioni di cfDNA contro una regione preimpostata compresa tra 50 e 700 bp, includendo i frammenti del cfDNA ed escludendo il DNA ad alto peso molecolare.

3.3.1 NGS (Next Generation Sequencing)

La NGS è una tecnologia di sequenziamento in parallelo massivo che permette un elevato output, elevata velocità e scalabilità. La metodica viene utilizzata per determinare l'ordine dei nucleotidi in interi genomi o regioni target di DNA o RNA; è una tecnologia leggermente modificata dalla predecessora metodica di Sanger in cui la polimerasi copia le molecole template incorporando nucleotidi, digitalizzata ed implementata su larga scala. I tre parametri cardinali da valutare durante il sequenziamento sono la *coverage*, l'accuratezza e la sensibilità: la *coverage*, anche definita profondità di lettura, si riferisce a quante volte è stata letta una specifica regione del genoma; l'accuratezza è la concordanza tra la sequenza ottenuta con NGS e la sequenza di riferimento; la sensibilità è l'abilità della metodica di individuare le varianti vere, perciò di stabilire anche il tasso di falsi positivi (93).

3.3.2 Sequenziamento cfDNA con KAPACustom HyperCap cfDNA kit (protocollo standard su pannello personalizzato)

Le *libraries* sono state preparate a partire da 10-50 ng di cfDNA, utilizzando un pannello customizzato di 47 geni, seguendo il protocollo del KAPA HyperCap cfDNA Kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) secondo le istruzioni del produttore. Brevemente, campioni di cfDNA sono stati *end-repaired*, addizionati di coda poli-A e ligati con adattatori che permettono di discriminare gli errori di PCR. Successivamente, sono stati amplificati mediante 8 cicli di PCR; hanno poi eseguito un ciclo di purificazione. A seguire, i campioni sono stati ibridizzati con le sonde per i geni target per 18-20h a 55°C. Quindi, le *target-enriched libraries* sono state amplificate tramite 16 cicli di PCR con gli identificativi specifici dei pazienti e sono stati infine selezionati i frammenti di 300 bp (107).

I campioni sono stati purificati mediante KAPA HyperPure Beads, secondo le istruzioni del produttore. Le libraries sono state quantificate mediante fluorimetro QuBit, secondo le istruzioni del produttore. Le libraries così prodotte sono state poi *pooled* e sequenziate in *pair-end* (2x151) su Illumina NextSeq550 (Illumina, San Diego, CA, USA), usando il kit HighOutput NextSeq per 300 cicli.

3.3.3 Analisi dei dati NGS

In seguito al sequenziamento, l'allineamento e la chiamata delle varianti vengono effettuate da un'azienda (GenomeUP) alla quale vengono inviati i file FASTQ. Il report che ci restituisce l'azienda presenta inizialmente 600-800 varianti: queste vengono poi filtrate, presso il laboratorio dell'UOC di Immunologia e Diagnostica Molecolare Oncologica (IOV, Padova), per:

- 1) Geni d'interesse;
- 2) Frequenza nella popolazione (<50%);
- 3) Trascritto canonico (quello maggiormente espresso, cioè escludendo isoforme/*splicing* alternativi);
- 4) Filtro PASS per il controllo della qualità delle letture;
- 5) Effetto sul prodotto proteico (escludendo quindi mutazioni sinonime o site presso regioni introniche).

Sono state prese in considerazione tutte le varianti definite come patogenetiche, verosimilmente patogenetiche e varianti di significato indefinito VUS (*variants of undefined significance*), mentre le varianti benigne, verosimilmente benigne o sinonime non state incluse nell'analisi statistica. Sono state considerate sono le alterazioni somatiche con frequenza allelica VAF (*variant allele fraction*) $\geq 0,001$ (0,01%).

3.4 Analisi statistica

Dato il numero limitato di pazienti con una profilazione completa del ctDNA, non è stato possibile applicare analisi statistiche di correlazione. Si procederà quindi alla rappresentazione dei dati in termini puramente descrittivi.

4 RISULTATI

4.1 Caratteristiche delle pazienti studiate

Al momento della stesura dell'elaborato 71 pazienti hanno firmato il consenso informato allo studio CHAMBER; la profilazione longitudinale è disponibile per 3 pazienti: CHAMBER20, CHAMBER34, CHAMBER45.

A seguire, vengono riportare la tabella 2, sulle caratteristiche del tumore primitivo, e la tabella 3 sulle caratteristiche della malattia metastatica.

Tabella 2 - Caratteristiche del tumore primitivo (nd = non determinato)

<i>VARIABILE</i>	<i>STATO</i>	<i>NUMEROSITÀ</i>
<i>Menopausa</i>	Pre	35 (49%)
	Post	34 (48%)
	nd	2 (3%)
<i>Istotipo</i>	Duttale	53 (75%)
	Lobulare	5 (7%)
	Altro/nd	13 (18%)
<i>Recettore Estrogeni</i>	Positivo	66 (93%)
	Negativo	0 (0%)
	nd	5 (7%)
<i>Recettore Progesterone</i>	Positivo	53 (75%)
	Negativo	13 (18%)
	nd	5 (7%)
<i>Amplificazione HER2</i>	Positivo	4 (6%)
	Negativo	59 (83%)
	nd	8 (11%)
<i>Stadio (AJCC)</i>	I	16 (23%)
	II	16 (23%)
	III	14 (20%)
	IV	18 (25%)
	0/nd	7 (10%)
<i>Terapia ricevuta</i>	Terapia ormonale	47 (66%)
	<i>Tamoxifene</i>	16 (23%)
	<i>AI</i>	23 (32%)
	<i>Misto</i>	8 (11%)
	Chemioterapia	35 (49%)
	<i>Solo adiuvante</i>	27 (38%)
	<i>Solo neoadiuvante</i>	8 (11%)
	<i>Neoadiuvante+adiuvante</i>	3 (4%)

Tabella 3 - Caratteristiche della patologia alla diagnosi di metastasi (nd=non determinato)

<i>VARIABILE</i>	<i>STATO</i>	<i>NUMEROSITÀ</i>
<i>Tempo allo sviluppo dal primitivo</i>	De novo	18 (25%)
	≤ 2 anni	8 (11%)
	2-5 anni	15 (21%)
	≥ 5 anni	21 (30%)
	≥ 10 anni	8 (11%)
<i>Sede metastasi</i>	Viscerale	33 (46%)
	Non viscerale	36 (51%)
	nd	2 (3%)
<i>N° sedi metastatiche</i>	< 3	59 (83%)
	≥ 3	10 (14%)
	nd	2 (3%)
<i>Linee di terapia ricevute (pre-biopsia liquida)</i>	0	14 (20%)
	1	29 (41%)
	≥ 2	26 (37%)
	nd	2 (3%)
<i>Tipo di trattamento (pre-biopsia liquida)</i>	Chemioterapia	27 (38%)
	CDKi	42 (59%)
	Everolimus	8 (11%)
	AI (monoterapia)	2 (3%)
	Fulvestrant (monoterapia)	1 (1%)

L'età mediana alla diagnosi è di 49 anni e circa metà delle pazienti erano in stato menopausale.

La maggior parte delle pazienti aveva un carcinoma con istotipo duttale, più del 90% aveva un tumore a recettori ormonali positivi, complessivamente lo stato di HER2 era disponibile per 63 pazienti, per la quasi totalità negativo. Per quanto riguarda lo stadio alla diagnosi, un quarto delle pazienti esordiva già metastatica.

Quasi metà della popolazione era stata sottoposta a chemioterapia (CT), adiuvante o neoadiuvante. Il 66% della popolazione aveva ricevuto una terapia ormonale che nella maggior parte dei casi includeva AI, la durata media del trattamento nelle donne sottoposte ad ormonoterapia è stata di 46 mesi.

Per le pazienti con metastasi metacrone, la recidiva è avvenuta entro i 2 anni dalla diagnosi del tumore primitivo in 8 casi (11%), tra 2 e 5 anni in 15 casi (21%), oltre i 5 anni in 21 casi (30%) e, di quest'ultime, oltre i 10 anni in 8 casi (11%).

Al momento dell'arruolamento in studio, più dell'80% delle pazienti aveva un basso carico di malattia, con meno di 3 siti metastatici, con una lieve prevalenza di coinvolgimento non viscerale (51% rispetto a 46%). Il 20% delle pazienti era naïve per trattamento nel setting metastatico, mentre il 41% ed il 37% avevano ricevuto rispettivamente 1 o ≥ 2 linee.

Globalmente, il 38% delle pazienti era stata esposta a chemioterapia, il 59% a CDK4/6 inibitori, l'11% a everolimus; 3 pazienti (4%) hanno eseguito almeno una linea di trattamento endocrino in monoterapia nel setting metastatico, di cui due con AI e una con fulvestrant.

4.2 Analisi seriale del ctDNA con NGS

La tabella 4 illustra il numero di biopsie liquide eseguite per ogni paziente. Quasi tutte le pazienti arruolate (57 pazienti, 80%) hanno eseguito almeno il primo prelievo; meno di metà il secondo prelievo (31 pazienti, 44%); terzo e quarto prelievo sono stati

eseguiti nel 20% e 15% delle pazienti; pochi casi hanno superato i 5 prelievi seriati (2 pazienti, 3%).

Tabella 4 - numero di prelievi per paziente

<i>Numero di prelievi</i>	<i>Numero di pazienti</i>
1	57 (80%)
2	31 (44%)
3	14 (20%)
4	11 (15%)
5	6 (8%)
6	2 (3%)

Ad oggi, sono state eseguite le analisi NGS su 3 delle pazienti che hanno effettuato n.°4 prelievi consecutivi. Data la numerosità, non è stato possibile applicare analisi statistiche.

4.2.1. Overview

La concentrazione mediana di cfDNA nei prelievi è stata di 33,61 ng/μL; in due casi (C20 e C45) sono stati riscontrati livelli particolarmente elevati, pari a 380,22 ng/μL e 614,67 ng/μL, con una quantità di ctDNA rilevato nel plasma estremamente variabile. Il tempo intercorso tra un prelievo ed il successivo è mediamente di 4 mesi, con un minimo di 2 e massimo di 8.

Le mutazioni di ESR1 osservate interessavano i principali loci riportati in letteratura, ovvero D538G e Y537S. Sebbene non sia possibile identificare l'andamento

esatto di questo parametro, si osserva che la VAF è tendenzialmente più alta al primo prelievo.

Sono state individuate anche mutazioni a carico di altri geni potenzialmente coinvolti nella tumorigenesi e farmacoresistenza: TP53, ERBB2, BRCA1, EGFR, Akt1, FGFR1, FGFR2, ATM, GATA3, Myc, PTEN, Rb1, CDKN2A, con VAF variabile e significato clinico noto o incerto. Nella tabella 5 sono riportati geni e i tipi di mutazioni rilevati con significato patologico certo o probabile.

Tabella 5 - Geni e relative mutazioni, con significato patologico noto o probabile rilevate nei campioni di questo studio

<i>GENE</i>	<i>Locus; effetto sul trascritto</i>	<i>Significato clinico</i>
<i>ESR1</i>	538; missenso (D→G)	Patogenetico
	537; missenso (Y→S)	Patogenetico
	545; frameshift	Ignoto
	421; missenso (M→I)	Ignoto
<i>PIK3CA</i>	545 missenso (E→K)	Verosimile patogenetico
	345 missenso (N→K)	Patogenetico
	126; frameshift	Ignoto
<i>Rb1</i>	550 (nonsenso)	Patogenetico
<i>ATM</i>	858 (missenso) (F→L)	Incerto
	707 (missenso) (S→P)	Evidenze contrastanti
<i>TP53</i>	248 (missenso) (R→Q)	Patogenetico
	331 (nonsenso)	Patogenetico
	257 (missenso) (L→Q)	Incerto
	191 (delezione)	Incerto
<i>ERBB2</i>	489 (missenso) (P→L)	Incerto
<i>Akt1</i>	117 (delezione)	Incerto

4.2.2 Focus sulle pazienti

La tabella 6 sintetizza i risultati dell'analisi NGS delle biopsie liquide e dei trattamenti ricevuti dalla paziente C34.

Tabella 6 - Analisi NGS per la paziente C34; viene riportata la VAF rilevata per ciascuna mutazione. Fra parentesi è indicato l'effetto sul prodotto proteico delle mutazioni a significato ignoto.

	1P	2P	3P	4P
<i>Tempo</i>	0	+4 mesi	+6 mesi	+13 mesi
<i>Trattamento precedente</i>	CT (capecitabina)	Everolimus + exemestane	CT (doxorubicina liposomiale)	CT (nab-paclitaxel)
<i>Concentrazione ctDNA (ng/μL)</i>	16,45	13,52	45,47	121,71
<i>ESR1 pos. 538</i>	/	0,04	0,009	0,008
<i>PIK3CA pos. 345</i>	0,04	0,04	0,02	0,02
<i>ATM pos. 858</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Akt1 pos. 117</i>	0,006	/	/	/
<i>TP53 pos. 257</i>	0,001	/	/	/
<i>pos. 191</i>	/	/	0,002	/
<i>ESR1 pos. 421 (missenso)</i>	0,003	/	/	/
<i>ARID1A pos. 191 (delezione)</i>	0,006	/	/	/
<i>GATA3 pos. 329 (frameshift)</i>	0,003	0,003	0,003	0,003
<i>FGFR1 pos. 656 (frameshift)</i>	/	/	0,003	/

La tabella 7 sintetizza i risultati dell'analisi NGS delle biopsie liquide e dei trattamenti ricevuti dalla paziente C45.

Tabella 7 - Analisi NGS per la paziente C45; viene riportata la VAF rilevata per ciascuna mutazione. Fra parentesi è indicato l'effetto sul prodotto proteico delle mutazioni a significato ignoto.

	1P	2P	3P	4P
<i>Tempo</i>	0	+5 mesi	+13 mesi	+15 mesi
<i>Trattamento precedente</i>	Fulvestrant + abemaciclib	Everolimus + exemestane	CT (paclitaxel)	CT (eribulina → doxorubicina liposomiale)
<i>Concentrazione ctDNA (ng/μL)</i>	614,67	23,22	44,00	22,38
<i>ESR1 pos. 537</i>	0,203	0,014	0,095	0,095
<i>PIK3CA pos. 545</i>	0,524	0,065	0,300	0,248
<i>Akt1 pos. 117</i>	0,005	/	/	/
<i>ATM pos. 707</i>	0,469	0,467	0,470	0,435
<i>PTEN pos. 68</i>	/	0,002	/	/
<i>Rb1 pos. 580</i>	/	0,002	/	/
<i>CDKN2A pos. 148 (benigna)</i>	0,580	0,498	0,556	0,506
<i>ARID1A pos.21(delezione)</i>	0,025	/	/	/
<i>Pos. 87 (delezione)</i>	/	/	0,015	/
<i>Pos. 191 (delezione)</i>	/	/	0,009	/
<i>EGFR pos. 331 (frameshift)</i>	/	0,002	/	/
<i>Myc pos. 59 (missenso)</i>	/	0,002	/	/
<i>CCDN1 pos. 39 (inserzione)</i>	/	0,002	/	/
<i>Pos. 39 (nonsenso)</i>	/	0,002	/	/

<i>MET pos. 111 (missenso)</i>	/	/	0,003	/
<i>TP53 pos 328 (missenso)</i>	/	/	0,002	/
<i>Pos. 105 (missenso)</i>	/	/	0,001	/
<i>Pos. 242 (frameshift)</i>	/	/	0,001	/
<i>GATA4 pos. 281 (delezione)</i>	/	/	0,006	/
<i>TSC2 pos. 1653 (missenso)</i>	/	/	/	0,001
<i>AURKA pos. 360 (missenso)</i>	/	/	/	0,003

La tabella 8 sintetizza i risultati dell'analisi NGS delle biopsie liquide e dei trattamenti ricevuti dalla paziente C20.

Tabella 8- Analisi NGS per la paziente C20; viene riportata la VAF rilevata per ciascuna mutazione. Fra parentesi è indicato l'effetto sul prodotto proteico delle mutazioni a significato ignoto.

	1P	2P	3P	4P
<i>Tempo</i>	0	+3 mesi	+6 mesi	+8 mesi
<i>Trattamento precedente</i>	CT → Everolimus + exemestane	Fulvestrant + palbociclib	CT (Nab-paclitaxel)	CT (eribulina)
<i>Concentrazione ctDNA (ng/μL)</i>	6,75	10,56	97,91	380,22
<i>ESR1 pos. 545</i>	0,002	/	/	/
<i>PIK3CA pos. 126</i>	/	/	0,001	/
<i>TP53 pos. 248</i>	0,004	0,005	/	/
<i>pos. 331</i>	0,208	0,145	0,464	0,692
<i>ERBB2 pos. 489</i>	0,590	0,551	0,708	0,852
<i>Akt1 pos.117</i>	/	/	0,004	/
<i>FGFR2 pos. 381</i>	/	/	/	0,005
<i>BRCAl pos. 1040 (variante benigna)</i>	0,636	0,562	0,706	0,852
<i>ERBB3 pos. 243 (framshift)</i>	/	0,003	/	/
<i>EGFR pos. 297 (missenso)</i>	/	/	0,001	/
<i>PTEN pos.21 (delezione)</i>	/	/	/	0,001
<i>ARID1A pos.21 (delezione; benigna)</i>	/	/	/	0,042

5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il tumore della mammella è la neoplasia più frequente nelle donne nel mondo ed il sottotipo HR+/HER2- è a sua volta quello più rappresentato: è caratterizzato complessivamente da miglior prognosi e la manipolazione endocrina è alla base del trattamento. Tuttavia, il 20-30% delle pazienti è destinato a sviluppare resistenza alla terapia ormonale ed andare incontro a recidiva di malattia. Il riconoscimento dei potenziali meccanismi di resistenza ai trattamenti è di fondamentale importanza ai fini di definire la sequenza terapeutica più efficace. In questo contesto, la biopsia liquida offre uno strumento ripetibile e microinvasivo per caratterizzare dal punto di vista molecolare una patologia complessa quale è la malattia metastatica, che per definizione risente dell'eterogeneità delle sedi e dell'evoluzione nel tempo. Tale tecnica consente non solo di valutare alterazioni molecolari con potenziale significato prognostico e predittivo, ma anche di monitorarne l'andamento longitudinale nel tempo.

Su queste premesse abbiamo messo a punto lo studio CHAMBER, traslazionale prospettico, volto ad esplorare l'andamento delle mutazioni genetiche più frequentemente coinvolte nei meccanismi di resistenza e di risposta alla terapia ormonale. Le pazienti sono state arruolate presso l'Istituto Oncologico Veneto IOV IRCCS di Padova da parte dell'oncologo medico in sede di visita ambulatoriale o previa discussione con il team multidisciplinare della *Breast Unit*. Per ogni paziente, in sede di prelievo per esami ematochimici routinari, in concomitanza di PD (*Progressive Disease*) e prima dell'inizio di una nuova linea di terapia, abbiamo previsto un prelievo di sangue aggiuntivo per estrazione del plasma. Complessivamente, l'aderenza delle pazienti è stata buona: nessuna paziente ha rifiutato la partecipazione allo studio o ritirato il consenso. L'80% delle pazienti ha eseguito almeno un prelievo (57 pazienti). Le pazienti avevano un'età mediana di 49 anni alla diagnosi, il dato sulla menopausa è distribuito uniformemente come anche quello sullo stadio alla diagnosi (49% pre- e 48% post menopausa; circa 23% ciascuno stadio I-IV). In linea con la popolazione target dello studio, la maggioranza delle pazienti aveva una neoplasia primitiva a recettori ormonali positivi, mentre in 4 casi (6%), il tumore primitivo era HER2 positivo. I $\frac{2}{3}$ di loro ha assunto ormonoterapia adiuvante, prevalentemente AI, per un tempo medio di 46 mesi. Circa metà delle pazienti ha anche eseguito chemioterapia, prevalentemente nel setting adiuvante. Il 25% delle pazienti era

metastatica già alla diagnosi mentre il 30% ha recidivato a distanza dopo 5 anni dalla diagnosi iniziale: l'interessamento delle sedi viscerali e non viscerali è distribuito uniformemente nella popolazione e il carico di malattia basso (inteso come meno di tre sedi colpite) è nettamente prevalente (83%). Il nostro studio è volto ad investigare la reazione della malattia ai trattamenti ricevuti, per cui abbiamo analizzato il numero di linee di terapia già ricevute prima di entrare nel monitoraggio con biopsia liquida ed abbiamo rilevato che 14 pazienti erano naïve (20%), 29 pazienti avevano già ricevuto una linea di terapia (40%) e 26 pazienti ne avevano ricevute 2 o più (37%). Tre pazienti (4%) avevano ricevuto solo AI/fulvestrant in monoterapia, mentre, in conformità con le principali linee guida, la maggior parte era stata esposta a CDKi (59%). Meno della metà delle pazienti arruolate aveva eseguito una chemioterapia (38%).

Abbiamo potuto analizzare lo status mutazionale di tre pazienti, C20, C34 e C45, nel corso di un anno circa, nel quale hanno eseguito 4 prelievi ciascuna. Tutte le pazienti erano in età fertile al tempo della diagnosi del primitivo ed avevano eseguito terapia ormonale adiuvante: due di loro con AI (C20 e C34) ed una con tamoxifene (C45). Due pazienti avevano assunto ormonoterapia per un periodo di poco superiore a due anni: C34 aveva assunto AI per 27 mesi e C45 aveva assunto tamoxifene per 26 mesi, al termine dei quali ricevevano la diagnosi di recidiva a distanza. Si osservi che 24 mesi è il *cut-off* temporale stabilito dalla Società Europea di Oncologia Medica per definire la resistenza secondaria alla terapia e non primitiva. La paziente C20 aveva assunto AI per 5 anni e anche 8 cicli di chemioterapia adiuvante, mentre la diagnosi di malattia metastatica era stata posta dopo 9 anni dal primitivo. Le pazienti sono state arruolate nello studio dopo una (C20) o due (C34 e C45) linee di terapia per malattia avanzata eseguite nel corso di 3 anni (C20 e C45) o 1,5 anni (C34). Alla diagnosi di malattia metastatica, le pazienti non presentavano un alto carico di malattia, ossia erano coinvolte meno di 3 sedi; per due di esse venivano riportate metastasi viscerali (a livello epatico, C20 e C34), mentre altre sedi non viscerali coinvolte erano i linfonodi (C34 e C45) e lo scheletro (C20). Le pazienti C34 e C45 avevano ricevuto due linee terapeutiche prima dell'arruolamento nello studio ed un totale di 6 linee di terapia; la paziente C20 eseguiva una prima linea di chemioterapia in regime metastatico seguita da mantenimento con exemestane+everolimus, prima dell'arruolamento, e 4 linee di terapia durante il monitoraggio con biopsia liquida, per un totale di 5 linee di terapia. La sopravvivenza

media dalla diagnosi di malattia metastatica è stata di 46,7 mesi, rispettivamente 44 mesi (C20), 46 mesi (C34) e 50 mesi (C45) di sopravvivenza. Con riguardo alla specifica terapia, precedentemente al primo prelievo per questo studio (1P), C34 e C45 erano state trattate con fulvestrant+CDKi e C20 con la combinazione di everolimus+AI. Per tutte le pazienti, la terapia seguente a 1P aveva consistito in una combinazione di ormonoterapia e farmaci a target molecolare, cioè fulvestrant+CDKi per C20 e everolimus+AI per C34 e C45 per una durata del trattamento 3-5 mesi circa; alla progressione, tutte le pazienti avevano ricevuto chemioterapia.

Da tutti i prelievi eseguiti, anche grazie all'elevato output della metodica NGS, è emersa la presenza di mutazioni con significato potenzialmente patologico e in tutte le pazienti sono state riscontrate le mutazioni a carico dei geni attualmente di maggiore interesse nell'ambito dell'endocrinoresistenza, ossia ESR1 e PIK3CA. In particolare, coerentemente con quanto già descritto in altre casistiche, i loci più frequentemente interessati per ESR1 sono stati Y537S e D538G (77) (75) (95). Tali alterazioni, già riportate in letteratura sia su tessuto che su plasma, coinvolgono il locus che trascrive il *ligand binding domain*, ossia un sito di primaria importanza dal punto di vista farmacodinamico (74). Da studi preclinici emerge, infatti, che uno dei meccanismi della resistenza alla terapia endocrina è proprio l'attività di ESR1 slegata dal dialogo col ligando (79). Nelle nostre pazienti (C34 e C45) abbiamo osservato un trend in diminuzione della VAF di ESR1 dal primo prelievo ai successivi, in particolare in corso di chemioterapia. Anche a carico del gene PIK3CA sono state rinvenute mutazioni in tutte le pazienti, ma solo una la presentava nella posizione E545K già descritta in altri studi, peraltro con una VAF dall'andamento di difficile interpretazione, poiché caratterizzata da valori simili, con trend in calo, fra 1P e 3P-4P, però con un picco in discesa al 2P, di un ordine di grandezza. La letteratura ha prodotto evidenze discordanti circa lo status di PIK3CA, sia in relazione alla sua concordanza fra biopsia liquida e tissutale, sia in relazione alla concordanza fra lesione primitiva e a distanza (108), sia riguardo un ruolo specifico nel monitoraggio della terapia con inibitori delle CDK4/6 che ha dimostrato di portare allo sviluppo di mutazioni in questo gene rilevate proprio su ctDNA (102).

Sono state rilevate altre mutazioni meritevoli di approfondimento, costantemente in tutti e 4 i prelievi: ATM con significato patogenetico incerto (presso due loci distinti

nelle due pazienti ma con VAF di 0,5 costante in entrambe); GATA3 responsabile di un frameshift; due distinte mutazioni in TP53 nella stessa paziente, di cui una certamente patogenetica con VAF in aumento (0,2 – 0,1 – 0,5 – 0,7); ERBB2 – che codifica HER2 – con significato patogenetico incerto e VAF in leggero aumento (0,6 – 0,6 – 0,7 – 0,8). Sono state evidenziate numerose mutazioni spot, ossia rilevate ad un singolo prelievo, sia di carattere francamente maligno, come nel caso di Rb1 mutato al 2P di C45, o di carattere benigno od incerto, come mutazioni in EGFR (al 3P di C20 ed al 2P di C45), AKT (1P di tutte e tre le pazienti) e FGFR2 (3P di C20), FGFR1 (3P di C34) e Myc e PTEN (2P in C45). Sono state riscontrate anche mutazioni dal significato benigno a carico di geni altrimenti noti per essere coinvolti nella patogenesi di diverse malattie, anche mammarie, come le mutazioni in BRCA1 dei prelievi 1-3 di C20, oppure CDKN2A in C45 nei prelievi 3 e 4.

Le pazienti C34 e C45 hanno un andamento nel tempo della malattia e risultati dell'analisi del ctDNA con alcune somiglianze: caratteristiche del tumore primitivo, tempo dalla diagnosi del primitivo a malattia metastatica, TTP medio da un prelievo al successivo, presenza della mutazione in ESR1 con significato patogenetico noto. In particolare, C34 ha avuto un tumore primitivo di istotipo duttale Luminal B-like in stadio II. All'esordio era in fase peri-menopausale. La recidiva di malattia è avvenuta in corso di OT con AI, dopo i primi 2 anni, con riscontro di metastasi epatiche e linfonodali. Nel gennaio 2020 eseguiva quindi il primo prelievo da cui emergevano mutazioni a carico di PIK3CA in una posizione (345) meritevole di approfondimento, ATM in una posizione (858) dal significato patogenetico incerto, GATA3 con frameshift del trascritto genico. La terapia immediatamente successiva alla biopsia liquida è stata l'associazione everolimus+exemestane con una PFS di 6 mesi. Al secondo prelievo si confermava la presenza delle mutazioni già descritte e si aggiungeva il riscontro della mutazione in ESR1 in posizione D538G. Successivamente, la paziente eseguiva due linee di chemioterapia e due prelievi, nei quali le mutazioni finora descritte restano presenti, con VAF in diminuzione per PIK3CA ed ESR1 e VAF costante per ATM (0,5); si osservava aumento della concentrazione del ctDNA da 1P a 4P.

C45 esordiva a 50 anni, in premenopausa, con un carcinoma duttale Luminal B-like. Anche in questo caso si è verificava una recidiva in corso di terapia ormonale

(tamoxifene), a 2 anni dalla diagnosi, con metastasi in meno di 3 sedi. In regime metastatico aveva eseguito una prima linea di terapia con AI in monoterapia (associati agli LHRH analoghi) ed a seguire la combinazione di fulvestrant+abemaciclib. Al primo prelievo era presente una notevole concentrazione di ctDNA ed erano state riscontrate mutazioni a carico di ESR1 in posizione Y537S, PIK3CA in posizione E545K, ATM in posizione 707 con significato patologico incerto; si osservava anche una delezione spot a carico di AKT1 dal significato clinico incerto. Alla progressione, la paziente proseguiva un trattamento endocrino a base di everolimus+AI. Alla biopsia liquida successiva si riconfermavano le mutazioni ESR1, PIK3CA ed ATM e si aggiungevano delle rilevazioni non mantenute nei prelievi successivi a carico di EGFR, Myc, PTEN e Rb1: quest'ultima in particolare con significato patogenetico noto. Una volta esaurite le opzioni di terapia endocrina, la paziente veniva trattata con chemioterapia. Al 3P, eseguito a distanza di 7 mesi da 2P, si osservavano l'aumento delle VAF della mutazione di PIK3CA e di ESR1, mentre rimaneva costante lo status di ATM; emergevano sporadicamente a questo prelievo anche mutazioni in 3 loci distinti a carico di TP53; compariva una mutazione a carico di CDKN2A con VAF e significato benigno, mantenuta nel 4P eseguito dopo 3 mesi.

Entrambe le pazienti avevano assunto ormonoterapia in regime adiuvante e CDKi prima di 1P e everolimus+exemestane fra 1P e 2P. In C34 si osserva che la VAF di PIK3CA mutato resta costante mentre viene persa la mutazione di ESR1 in posizione 421 ed anzi compare presso D538G (noto in letteratura), al 2P dopo esposizione a everolimus+exemestane. In C45, che aveva assunto tamoxifene, AI e fulvestrant+CDKi prima della biopsia liquida, rileviamo mutazioni sia in ESR1 che PIK3CA già al 1P; a seguire, dopo ulteriore tentativo di terapia endocrina a base di everolimus+exemestane, si osservava una decrescente quantità di ctDNA nel plasma con una VAF ridotta di entrambe le mutazioni. In particolare, attualmente sono in corso studi per indagare le modificazioni dello status mutazionale conseguente al trattamento con CDKi, tematica rispetto alla quale i dati sono ancora emergenti: *O'Leary et al.* (109) hanno rilevato che modifiche a carico di PIK3CA mutato al 15° giorno di terapia con palbociclib correlano con migliore outcome clinico, successivamente *Darrigues et al.* (110) correlano significativamente l'andamento della concentrazione di ctDNA con la PFS, in particolare tanto migliore quanto più ridotta, o indosabile, la quantità di DNA tumorale presente in

circolo. Recentemente, è stato osservato un ruolo nella resistenza farmacologica anche da parte di mutazioni di Rb1, molecola a valle delle CDK (102): al momento si tratta di ipotesi da approfondire, tuttavia è suggestivo che anche nella nostra casistica abbiamo rilevato una mutazione in Rb1 in una paziente precedentemente esposta a CDKi.

Il caso di C20 si distingue sia per le differenze macroscopiche a livello di analisi del ctDNA rispetto alle altre due pazienti (benché non sia possibile inferire alcunché sulla base di questo esiguo campione), sia per motivi clinici. È stata una paziente con diagnosi estremamente precoce, a 20 anni, con tumore iniziale a linfonodi positivi (stadio III). La paziente aveva eseguito terapia ormonale adiuvante per 5 anni e il MFS (*Metastasis Free Survival*) è stato di 9 anni. Il fenotipo del tumore primitivo era sovrapponibile a quanto osservato nella fase metastatica. In regime metastatico, prima dell'arruolamento in studio, era stata esposta a chemioterapia, everolimus ed AI. Al 1P veniva riscontrata una mutazione in ESR1 poco frequente (posizione D545T), che dopo 3 mesi di terapia con CDKi+fulvestrant, al 2P, non veniva più rilevata.

A questo proposito, recenti studi si sono concentrati sull'impatto clinico dell'andamento della mutazione di ESR1 in pazienti trattate con CDK 4/6i. In particolare, nello studio ALCINA, la precoce clearance del ctDNA in corso di terapia con palbociclib è risultata un fattore prognostico positivo: misurando il rapporto fra la concentrazione di ctDNA nel plasma al giorno 0 ed al giorno 30 dall'inizio della terapia, è emerso che le pazienti con una quantità di ctDNA inferiore alla mediana dello studio avevano una PFS più lunga delle pazienti con quantità di ctDNA superiore alla mediana dello studio (HR = 4.1; 95% CI 1.4 – 12; p=0.01), e che le pazienti il cui ctDNA era non più rilevabile avevano una PFS nettamente superiore rispetto a quelle con ctDNA ancora dosabile (25 mesi vs 3 mesi; HR = 7.2; 95% CI 1.5 – 32.6, p=0,004). Inoltre, nel 100% delle pazienti che dimostravano una quantità di ctDNA espressa come rapporto baseline/D30 superiore a 1, veniva registrata entro 3 mesi la progressione radiologica e, d'altro canto, di tutte le pazienti che registravano progressione radiologica, il 79% aveva quantità di ctDNA aumentate al D30 rispetto al baseline (110).

Nella paziente C20, la mutazione a carico di PIK3CA compariva al 3P, in corso di chemioterapia, ma anch'essa non veniva più rilevata al prelievo successivo. Ai prelievi

successivi è stata una mutazione a carico di TP53 nota patogena, una mutazione in ERBB2 dal significato clinico incerto e notabilmente, una variante benigna nella mutazione in BRCA1, che viene persa al 4P. Nel corso degli 8 mesi di monitoraggio, fino al decesso, la quantità di ctDNA è stata crescente.

Il nostro gruppo aveva precedentemente condotto un piccolo studio pilota monocentrico volto a valutare la concordanza tra biopsia liquida e tissutale relativamente alla mutazione di ESR1 (su singolo prelievo), ricercata tramite rt-PCR e dd-PCR. Abbiamo validato quindi, con la coorte precedente, gli esiti dello studio CHAMBER, ottenendo risultati sovrapponibili in termini di profilo mutazionale e di VAF, a conferma della riproducibilità delle analisi (99).

Concludendo, i primi risultati dello studio evidenziano la fattibilità della metodica, con un alto tasso di accettazione da parte delle pazienti. Un limite della presente analisi è sicuramente la numerosità campionaria, che ci ha precluso conclusioni statistiche. Lo studio CHAMBER è attualmente *ongoing*, con l'implementazione di più di dieci centri italiani, e consentirà di costituire un ampio dataset che sarà oggetto di lavori successivi, forti della raccolta di tipo prospettico di plasma da parte di pazienti *real-world*. Nell'ambito di una patologia a buona prognosi come il carcinoma mammario a recettori ormonali positivi, la conoscenza approfondita della resistenza alla terapia ormonale rappresenta un'esigenza clinica, non ancora soddisfatta, che la ricerca traslazionale si propone di incontrare: essa è una piattaforma ideale, oggi più che mai, per esplorare le basi biologiche di questo fenomeno, con immediata applicazione alla pratica clinica. In questo scenario, è di fondamentale importanza acquisire *expertise* nelle tecniche di analisi del ctDNA, ai fini di consentire la caratterizzazione dinamica della biologia della malattia, sia in fase avanzata che precoce.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021 Aug 15;149(4):778–89.
2. Ferlay J, Ervik M, Colombet M, Mery L, Pineros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. Global Cancer Observatory: Cancer Today [Internet]. International Agency for Research on Cancer; 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
3. I numeri del cancro in Italia [Internet]. AIOM. [cited 2022 Jun 16]. Available from: <https://www.aiom.it/i-numeri-del-cancro-in-italia/>
4. American College of Surgeons. AJCC Cancer Staging Form Supplement. In: American Joint Committee on Cancer, editor. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. AJCC; 2021. p. 256–77.
5. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*. 2020 Jan;27(1):27–35.
6. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2011 Aug;22(8):1736–47.
7. Prat A, Cheang MCU, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic Significance of Progesterone Receptor–Positive Tumor Cells Within Immunohistochemically Defined Luminal A Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Jan 10;31(2):203–9.
8. Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH. Prognosis of Women With Metastatic Breast Cancer by HER2 Status and Trastuzumab Treatment: An Institutional-Based Review. *J Clin Oncol*. 2010 Jan;28(1):92–8.
9. Pan H, Gray R, Braybrooke J, Davies C, Taylor C, McGale P, et al. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. *N Engl J Med*. 2017 Nov 9;377(19):1836–46.
10. Pan H, Ph D, Gray R, Sc M, Braybrooke J, Ph D, et al. Europe PMC Funders Group 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. 2018;377(19):1836–46.
11. O’Shaughnessy J. Extending Survival with Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer. *The Oncologist*. 2005 Oct 1;10(S3):20–9.
12. AIOM. NEOPLASIE DELLA MAMMELLA. Linee Guida 2021. 2021;663.

13. Crocetti E, Gori S, Falcini F. Metastatic breast cancers: Estimates for Italy. *Tumori J*. 2018 Mar 1;104(2):116–20.
14. Kobayashi K, Ito Y, Matsuura M, Fukada I, Horii R, Takahashi S, et al. Impact of immunohistological subtypes on the long-term prognosis of patients with metastatic breast cancer. *Surg Today*. 2016 Jul 1;46(7):821–6.
15. Wilcken N, Hornbuckle J, Ghersi D. Chemotherapy alone versus endocrine therapy alone for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2003 [cited 2022 Jun 18];(2). Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD002747/full>
16. Cardoso F, Paluch-Shimon S, Senkus E, Curigliano G, Aapro MS, André F, et al. 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). *Ann Oncol*. 2020 Dec 1;31(12):1623–49.
17. Jonat W, Kaufmann M, Blamey RW, Howell A, Collins JP, Coates A, et al. A randomised study to compare the effect of the luteinising hormone releasing hormone (LHRH) analogue goserelin with or without tamoxifen in pre- and perimenopausal patients with advanced breast cancer. *Eur J Cancer*. 1995 Jan 1;31(2):137–42.
18. Bui KT, Willson ML, Goel S, Beith J, Goodwin A. Ovarian suppression for adjuvant treatment of hormone receptor-positive early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 22];(3). Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD013538/full>
19. Reinbolt RE, Mangini N, Hill JL, Levine LB, Dempsey JL, Singaravelu J, et al. Endocrine Therapy in Breast Cancer: The Neoadjuvant, Adjuvant, and Metastatic Approach. *Semin Oncol Nurs*. 2015 May 1;31(2):146–55.
20. Effects of Adjuvant Tamoxifen and of Cytotoxic Therapy on Mortality in Early Breast Cancer. *N Engl J Med*. 1988 Dec 29;319(26):1681–92.
21. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *The Lancet*. 1998 May 16;351(9114):1451–67.
22. Bernard-Marty C, Cardoso F, Piccart MJ. Facts and Controversies in Systemic Treatment of Metastatic Breast Cancer. *The Oncologist*. 2004 Nov 1;9(6):617–32.
23. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet*. 2005 May 14;365(9472):1687–717.
24. Mauri D, Pavlidis N, Polyzos NP, Ioannidis JPA. Survival With Aromatase Inhibitors and Inactivators Versus Standard Hormonal Therapy in Advanced Breast Cancer: Meta-analysis. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2006 Sep 20;98(18):1285–91.
25. Carlson RW. The History and Mechanism of Action of Fulvestrant. *Clin Breast Cancer*. 2005 Apr 1;6:S5–8.

26. Wakeling AE. Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens. *Endocr Relat Cancer*. 2000 Mar 1;7(1):17–28.
27. DeFriend DJ, Howell A, Nicholson RI, Anderson E, Dowsett M, Mansel RE, et al. Investigation of a new pure antiestrogen (ICI 182780) in women with primary breast cancer. *Cancer Res*. 1994 Jan 15;54(2):408–14.
28. Robertson JF, Nicholson RI, Bundred NJ, Anderson E, Rayter Z, Dowsett M, et al. Comparison of the short-term biological effects of 7 α -[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylsulfinyl)-nonyl]estra-1,3,5, (10)-triene-3,17 β -diol (Faslodex) versus tamoxifen in postmenopausal women with primary breast cancer. *Cancer Res*. 2001 Sep 15;61(18):6739–46.
29. Leo AD, Jerusalem G, Petruzella L, Torres R, Bondarenko IN, Khasanov R, et al. Final Overall Survival: Fulvestrant 500mg vs 250mg in the Randomized CONFIRM Trial. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2014 Jan 1;106(1):djt337.
30. Robertson JFR, Bondarenko IM, Trishkina E, Dvorkin M, Panasci L, Manikhas A, et al. Fulvestrant 500 mg versus anastrozole 1 mg for hormone receptor-positive advanced breast cancer (FALCON): an international, randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet*. 2016 Dec 17;388(10063):2997–3005.
31. Cardoso F, Costa A, Norton L, Senkus E, Aapro M, André F, et al. ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2). *The Breast*. 2014 Oct 1;23(5):489–502.
32. Cardoso F, Costa A, Senkus E, Aapro M, André F, Barrios CH, et al. 3rd ESO–ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 3). *Ann Oncol*. 2017 Jan 1;28(1):16–33.
33. Finn RS, Aleshin A, Slamon DJ. Targeting the cyclin-dependent kinases (CDK) 4/6 in estrogen receptor-positive breast cancers. *Breast Cancer Res*. 2016 Feb 9;18(1):17.
34. Abraham J, Coleman R, Elias A, Holmes FA, Kalinsky K, Kittaneh M, et al. Use of cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 inhibitors for hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative, metastatic breast cancer: a roundtable discussion by The Breast Cancer Therapy Expert Group (BCTEG). *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Aug 1;171(1):11–20.
35. Barroso-Sousa R, Shapiro GI, Tolaney SM. Clinical Development of the CDK4/6 Inhibitors Ribociclib and Abemaciclib in Breast Cancer. *Breast Care*. 2016;11(3):167–73.
36. Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im SA, Gelmon K, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Nov 17;375(20):1925–36.
37. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Shimon S, 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):1541–7.
38. Goetz MP, Toi M, Campone M, Sohn J, Paluch-Shimon S, Huober J, et al. MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2017 Nov 10;35(32):3638–46.
 39. Sledge GW, Toi M, Neven P, Sohn J, Inoue K, Pivot X, 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;35(25):2875–84.
 40. Slamon DJ, Neven P, Chia S, Jerusalem G, De Laurentiis M, Im S, et al. Ribociclib plus fulvestrant for postmenopausal women with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer in the phase III randomized MONALEESA-3 trial: updated overall survival. *Ann Oncol.* 2021 Aug 1;32(8):1015–24.
 41. Foukakis T. Ribociclib in premenopausal women with advanced breast cancer. *Lancet Oncol.* 2018 Jul 1;19(7):850–2.
 42. Tripathy D, Im SA, Colleoni M, Franke F, Bardia A, Harbeck N, et al. Ribociclib plus endocrine therapy for premenopausal women with hormone-receptor-positive, advanced breast cancer (MONALEESA-7): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018 Jul;19(7):904–15.
 43. Munzone E, Pagan E, Bagnardi V, Montagna E, Canello G, Dellapasqua S, et al. Systematic review and meta-analysis of post-progression outcomes in ER+/HER2– metastatic breast cancer after CDK4/6 inhibitors within randomized clinical trials. *ESMO Open.* 2021 Dec 1;6(6):100332.
 44. Ribnikar D, Volovat SR, Cardoso F. Targeting CDK4/6 pathways and beyond in breast cancer. *The Breast.* 2019 Feb 1;43:8–17.
 45. Bjornsti MA, Houghton PJ. The tor pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004 May;4(5):335–48.
 46. Boulay A, Rudloff J, Ye J, Zumstein-Mecker S, O’Reilly T, Evans DB, et al. Dual Inhibition of mTOR and Estrogen Receptor Signaling In vitro Induces Cell Death in Models of Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Jul 20;11(14):5319–28.
 47. Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris HA, Rugo HS, Sahmoud T, et al. Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2012 Feb 9;366(6):520–9.
 48. Piccart M, Hortobagyi GN, Campone M, Pritchard KI, Lebrun F, Ito Y, et al. Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: overall survival results from BOLERO-2†. *Ann Oncol.* 2014 Dec 1;25(12):2357–62.

49. Johnston S. Combinations of Endocrine and Biological Agents: Present Status of Therapeutic and Presurgical Investigations. :11.
50. Bidard FC, Kaklamani VG, Neven P, Streich G, Montero AJ, Forget F, et al. Elacestrant (oral selective estrogen receptor degrader) Versus Standard Endocrine Therapy for Estrogen Receptor–Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Advanced Breast Cancer: Results From the Randomized Phase III EMERALD Trial. *J Clin Oncol*. 2022 May 18;JCO.22.00338.
51. Novel SERD Has PFS Edge against Breast Cancer. *Cancer Discov*. 2022 Feb 9;12(2):281.
52. Liang J, Zbieg JR, Blake RA, Chang JH, Daly S, DiPasquale AG, et al. GDC-9545 (Giredestrant): A Potent and Orally Bioavailable Selective Estrogen Receptor Antagonist and Degradar with an Exceptional Preclinical Profile for ER+ Breast Cancer. *J Med Chem*. 2021 Aug 26;64(16):11841–56.
53. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 4];4. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2014.00064>
54. Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan;22(1):173.
55. Li H, Prever L, Hirsch E, Gulluni F. Targeting PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer. *Cancers*. 2021 Jan;13(14):3517.
56. Anderson EJ, Mollon LE, Dean JL, Warholak TL, Aizer A, Platt EA, et al. A Systematic Review of the Prevalence and Diagnostic Workup of PIK3CA Mutations in HR+/HER2– Metastatic Breast Cancer. *Int J Breast Cancer*. 2020 Jun 20;2020:e3759179.
57. Samuels Y, Diaz LA, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell*. 2005 Jun 1;7(6):561–73.
58. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science*. 2004 Apr 23;304(5670):554–554.
59. Karakas B, Bachman KE, Park BH. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer*. 2006 Feb;94(4):455–9.
60. Hanker AB, Sudhan DR, Arteaga CL. Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell*. 2020 Apr 13;37(4):496–513.
61. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, et al. An Integrative Genomic and Proteomic Analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT Mutations in Breast Cancer. *Cancer Res*. 2008 Aug 1;68(15):6084–91.

62. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, et al. PIK3CA Mutations Correlate with Hormone Receptors, Node Metastasis, and ERBB2, and Are Mutually Exclusive with PTEN Loss in Human Breast Carcinoma. *Cancer Res.* 2005 Apr 1;65(7):2554–9.
63. Li SY, Rong M, Grieu F, Iacopetta B. PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Mar 25;96(1):91–5.
64. Miller TW, Hennessy BT, González-Angulo AM, Fox EM, Mills GB, Chen H, et al. Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor–positive human breast cancer. *J Clin Invest.* 2010 Jul 1;120(7):2406–13.
65. Miller TW, Balko JM, Fox EM, Ghazoui Z, Dunbier A, Anderson H, et al. ER α -Dependent E2F Transcription Can Mediate Resistance to Estrogen Deprivation in Human Breast Cancer. *Cancer Discov.* 2011 Sep 14;1(4):338–51.
66. Nunnery SE, Mayer IA. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Hormone-Positive Breast Cancer. *Drugs.* 2020 Nov 1;80(16):1685–97.
67. Baselga J, Im SA, Iwata H, Cortés J, De Laurentiis M, Jiang Z, et al. Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017 Jul;18(7):904–16.
68. Di Leo A, Johnston S, Lee KS, Ciruelos E, Lønning PE, Janni W, et al. Buparlisib plus fulvestrant in postmenopausal women with hormone-receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer progressing on or after mTOR inhibition (BELLE-3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018 Jan;19(1):87–100.
69. Baselga J, Dent SF, Cortés J, Im YH, Diéras V, Harbeck N, et al. Phase III study of taselisib (GDC-0032) + fulvestrant (FULV) v FULV in patients (pts) with estrogen receptor (ER)-positive, PIK3CA-mutant (MUT), locally advanced or metastatic breast cancer (MBC): Primary analysis from SANDPIPER. *J Clin Oncol.* 2018 Jun 20;36(18_suppl):LBA1006–LBA1006.
70. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2019 May 16;380(20):1929–40.
71. Research C for DE and. FDA approves alpelisib for metastatic breast cancer. FDA [Internet]. 2019 Dec 20 [cited 2022 Aug 28]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-alpelisib-metastatic-breast-cancer>
72. Bedard PL, Freedman OC, Howell A, Clemons M. Overcoming endocrine resistance in breast cancer—are signal transduction inhibitors the answer? *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Apr 1;108(3):307–17.

73. Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neeffjes J, Mancini MA, Michalides R. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J Cell Sci.* 2010 Apr 15;123(8):1253–61.
74. Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet.* 2013 Dec;45(12):1439–45.
75. Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, Frampton G, Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM, et al. Emergence of Constitutively Active Estrogen Receptor- α Mutations in Pretreated Advanced Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 Apr 1;20(7):1757–67.
76. Robinson DR, Wu YM, Vats P, Su F, Lonigro RJ, Cao X, et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet.* 2013 Dec;45(12):1446–51.
77. Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, Dvir A, Soussan-Gutman L, Jeselsohn R, et al. D538G Mutation in Estrogen Receptor- α : A Novel Mechanism for Acquired Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer Res.* 2013 Dec 1;73(23):6856–64.
78. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Sueta A, Tomiguchi M, Murakami K, et al. Prevalence of ESR1 E380Q mutation in tumor tissue and plasma from Japanese breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2017 Nov 22;17(1):786.
79. Angus L, Beije N, Jager A, Martens JWM, Sleijfer S. ESR1 mutations: Moving towards guiding treatment decision-making in metastatic breast cancer patients. *Cancer Treat Rev.* 2017 Jan 1;52:33–40.
80. Zhang K, Hong R, Xu F, Xia W, Kaping L, Qin G, et al. Clinical value of circulating *ESR1* mutations for patients with metastatic breast cancer: a meta-analysis. *Cancer Manag Res.* 2018 Aug 14;10:2573–80.
81. Burguin A, Diorio C, Durocher F. Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *J Pers Med.* 2021 Aug;11(8):808.
82. Lindström LS, Karlsson E, Wilking UM, Johansson U, Hartman J, Lidbrink EK, et al. Clinically Used Breast Cancer Markers Such As Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Are Unstable Throughout Tumor Progression. *J Clin Oncol.* 2012 Jul 20;30(21):2601–8.
83. Yang Z, Li N, Li X, Lei L, Wang X. *The Prognostic Impact of Hormonal Receptor and HER-2 Expression Discordance in Metastatic Breast Cancer Patients*. *OncoTargets Ther.* 2020 Jan 28;13:853–63.
84. Dieci MV, Barbieri E, Piacentini F, Ficarra G, Bettelli S, Dominici M, et al. Discordance in receptor status between primary and recurrent breast cancer has a prognostic impact: a single-Institution analysis. *Ann Oncol.* 2013 Jan 1;24(1):101–8.

85. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001 Feb 15;61(4):1659–65.
86. Bubnoff N von. Liquid Biopsy: Approaches to Dynamic Genotyping in Cancer. *Oncol Res Treat.* 2017;40(7–8):409–16.
87. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008 Sep;14(9):985–90.
88. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med.* 2014 Apr;20(4):430–5.
89. Schaffner F, Merlin JL, von Bubnoff N, editors. Tumor Liquid Biopsies [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [cited 2022 Feb 18]. (Recent Results in Cancer Research; vol. 215). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-26439-0>
90. Pereira B, Chen CT, Goyal L, Walmsley C, Pinto CJ, Baiev I, et al. Cell-free DNA captures tumor heterogeneity and driver alterations in rapid autopsies with pre-treated metastatic cancer. *Nat Commun.* 2021 May 27;12(1):3199.
91. Malapelle U, Sirera R, Jantus-Lewintre E, Reclusa P, Calabuig-Fariñas S, Blasco A, et al. Profile of the Roche cobas® EGFR mutation test v2 for non-small cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017 Mar;17(3):209–15.
92. Indraccolo S. Evolving use of liquid biopsy in non-small-cell-lung cancer patients. *Int J Biol Markers.* 2020 Feb 1;35(1_suppl):23–5.
93. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn JMD.* 2017 May;19(3):341–65.
94. Guttery DS, Page K, Hills A, Woodley L, Marchese SD, Rghebi B, et al. Noninvasive Detection of Activating Estrogen Receptor 1 (ESR1) Mutations in Estrogen Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer. *Clin Chem.* 2015 Jul 1;61(7):974–82.
95. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Cutts RJ, Pearson A, Tarazona N, et al. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Sci Transl Med.* 2015 Nov 11;7(313):313ra182-313ra182.
96. Chae YK, Davis AA, Carneiro BA, Chandra S, Mohindra N, Kalyan A, et al. Concordance between genomic alterations assessed by next-generation sequencing in tumor tissue or circulating cell-free DNA. *Oncotarget.* 2016 Aug 30;7(40):65364–73.

97. Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E, Blair B, Slater S, Powers P, et al. Detection of Tumor *PIK3CA* Status in Metastatic Breast Cancer Using Peripheral Blood. *Clin Cancer Res*. 2012 Jun 15;18(12):3462–9.
98. Dawson SJ, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2013 Mar 28;368(13):1199–209.
99. Urso L, Vernaci G, Carlet J, Lo Mele M, Fassan M, Zulato E, et al. ESR1 Gene Mutation in Hormone Receptor-Positive HER2-Negative Metastatic Breast Cancer Patients: Concordance Between Tumor Tissue and Circulating Tumor DNA Analysis. *Front Oncol* [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 3];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.625636>
100. Johnston SR, Kilburn LS, Ellis P, Dodwell D, Cameron D, Hayward L, et al. Fulvestrant plus anastrozole or placebo versus exemestane alone after progression on non-steroidal aromatase inhibitors in postmenopausal patients with hormone-receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer (SoFEA): a composite, multicentre, phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol*. 2013 Sep 1;14(10):989–98.
101. Fribbens C, O’Leary B, Kilburn L, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Beaney M, et al. Plasma *ESR1* Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2016 Sep 1;34(25):2961–8.
102. O’Leary B, Cutts RJ, Liu Y, Hrebien S, Huang X, Fenwick K, et al. The Genetic Landscape and Clonal Evolution of Breast Cancer Resistance to Palbociclib plus Fulvestrant in the PALOMA-3 Trial. *Cancer Discov*. 2018 Nov;8(11):1390–403.
103. Juric D, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo H, et al. Abstract GS3-08: Alpelisib + fulvestrant for advanced breast cancer: Subgroup analyses from the phase III SOLAR-1 trial. *Cancer Res*. 2019 Feb 15;79(4_Supplement):GS3-08.
104. Berger F, Marce M, Delaloge S, Hardy-Bessard AC, Bachelot T, Bièche I, et al. Randomised, open-label, multicentric phase III trial to evaluate the safety and efficacy of palbociclib in combination with endocrine therapy, guided by ESR1 mutation monitoring in oestrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer patients: study design of PADA-1. *BMJ Open*. 2022 Mar 3;12(3):e055821.
105. Jacobson A. Early Switch to Fulvestrant Plus Palbociclib Improves Outcomes in ESR1-Mutated, Estrogen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *The Oncologist*. 2022 Mar 1;27(Supplement_1):S9–10.
106. Arpino G, Bianchini G, Malorni L, Zambelli A, Puglisi F, Del Mastro L, et al. Circulating tumor DNA (ctDNA) and serum thymidine kinase 1 activity (TKa) matched dynamics in patients (pts) with hormone receptor–positive (HR+), human epidermal growth factor 2–negative (HER2-) advanced breast cancer (ABC) treated in first-line (1L) with ribociclib (RIB) and letrozole (LET) in the BioItaLEE trial. *J Clin Oncol*. 2022 Jun;40(16_suppl):1012–1012.

107. Rose Brannon A, Jayakumaran G, Diosdado M, Patel J, Razumova A, Hu Y, et al. Enhanced specificity of clinical high-sensitivity tumor mutation profiling in cell-free DNA via paired normal sequencing using MSK-ACCESS. *Nat Commun.* 2021 Dec;12(1):3770.
108. Dupont Jensen J, Laenkholm AV, Knoop A, Ewertz M, Bandaru R, Liu W, et al. PIK3CA Mutations May Be Discordant between Primary and Corresponding Metastatic Disease in Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2011 Feb 15;17(4):667–77.
109. O’Leary B, Hrebien S, Morden JP, Beaney M, Fribbens C, Huang X, et al. Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nat Commun.* 2018 Dec;9(1):896.
110. Darrigues L, Pierga JY, Bernard-Tessier A, Bièche I, Silveira AB, Michel M, et al. Circulating tumor DNA as a dynamic biomarker of response to palbociclib and fulvestrant in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2021 Dec;23(1):31.

RINGRAZIAMENTI

Alla mia mamma ed ai miei amici, per primo Giovanni. A loro devo moltissimo, sono intrecciati alla mia esistenza e sono essi stessi la mia esistenza, per cui qualsiasi parola di ringraziamento stampata su questa pagina sarebbe una gocciolina in mezzo al mare; perciò, questo è quanto.

Un ringraziamento particolare all'ente regionale per il diritto allo studio universitario (ESU), perché ha contribuito materialmente alla realizzazione di questo percorso e perché mi ha fornito un posto e un pasto, ogni giorno, con cui nutrirmi, nella pancia e nello spirito: grazie alla presenza dei miei amici, di altri studenti, grazie ad un cardine – il momento ed il luogo del pranzo - attorno al quale costruire una routine altrimenti difficile da reggere, in tempi di «studio matto e disperatissimo».