

Afsnit indsættes i Patologiretningslinjekapitlet efter høring i relevante videnskabelige udvalg, retningslinjeudvalg og bestyrelse.

Er udarbejdet af tværfaglig DBCG arbejdsgruppe (patologiudvalg/medicinsk udvalg)

### **Rekommandationer**

Udvælgelse til Multigen test

- PAM50 udføres på alle postmenopausale ER+/HER2- patienter med  $\leq 3$  positive lymfeknuder og PSI score: Q2.

## **3.2 PROCEDURER**

### **3.2.6 Multigen tests**

Standard klinisk-patologiske risikofaktorer herunder biomarkøranalyse for ER og HER2 indgår i de nationale DBCG anbefalinger som grundlag for behandlingsallokering af de danske brystkræftpatienter [1-4]. Det fremgår af den danske kvalitetsindikatorrapport for brystkræft 2015, at 93% af primært operable brystkræftpatienter bliver allokeret til systemisk behandling og 56% får kemoterapi alene eller efterfulgt af Trastuzumab og/eller i kombination med endokrin terapi [5].

Ved St. Gallen konsensuskonference i 2015 [6] blev multigen tests anført som et betydningsfuldt prognostisk supplement til risikostratificering af postmenopausale ER+/HER2- brystkræftpatienter. Formålet hermed er ønsket om at kunne optimere selektionen af patienter med forventet positiv effekt af kemoterapi overfor de patienter der, grundet tumorbiologiske karaktertræk og molekylær subtype (Luminal A), som udgangspunkt har ringe effekt af kemoterapi eller alternativt har en så lav risiko for tilbagefald efter 10 år at bivirkningerne som følge af behandlingen vejer tungere end den skønnede effekt af kemoterapi som iht. EBCTCG metaanalyse reducerer risiko for tilbagefald med 30% [7].

En forudsætning for implementering af specifikke biomarkøranalyser herunder multigen tests i en klinisk rutinemæssig sammenhæng er at beslutning herom træffes ud fra et evidensbaseret grundlag med udgangspunkt i biomarkørens/testens opfyldelse af følgende tre kriterier: analytisk validitet, klinisk validitet og klinisk anvendelighed svarende til evidensniveau I(A/B) for risiko for tilbagefald efter 10 år [8, 9].

Flere studier med et prospektivt-retrospektivt design har dokumenteret den prognostiske betydning svarende til evidensniveau IB for de i Tabel 1 anførte multigen tests [10-17]. For MammaPrint gælder at de publicerede studier indtil publiceringen af 5 års opfølgning på det randomiserede fase 3 studie MINDACT overvejende har været af retrospektiv observationel karakter [18, 19]. I fase 3 studiet MINDACT (N=6693) blev 1550 kvinder, primært klassificeret som kandidater til kemoterapi ud fra en modificeret version af Adjuvant! Online men med lav risikoscore ved MammaPrint, randomiseret til +/- kemoterapi. Studiet viste at gruppen randomiseret til ingen kemoterapi havde en 5 års risiko for fjernrecidiv (DR) på 5.6% mens gruppen randomiseret til kemoterapi havde en 5 års DR på 4.1% [20].

En undersøgelse af PAM50 (Prosigna) på DBCG99C kohorten omfattende ER+, Her2- (N0-N1) postmenopausale kvinder (N=2558) allokeret til 5 års endokrin behandling, viste at man kunne

identificere en gruppe af patienter med meget lav risiko for tilbagefald svarende til 10 års DR på 4.3% (95% CI 2.8-6.1)  $p < 0.0001$  uafhængig af lymfeknudestatus (N0-N1) [16, 21]. Tilsvarende resultater er opnået ved undersøgelse af PAM50 i både ATAC (N=1071) og ABCSG-8 (N=1478), begge randomiserede studier med prospektivt-retrospektivt design og med inklusion af postmenopausale ER+ kvinder [11, 12, 14, 15].

I studier med sammenligning af forskellige genprofiler har PAM50 (Prosigna) og EndoPredict suppleret med væsentlig mere prognostisk information end de øvrige tests i forhold til at identificere patienter med meget lav risiko for 10 års DR [10, 11]. Inklusion af dels et genbaseret proliferationsindex, samt kliniske risikofaktorer som tumorstørrelse og lymfeknudestatus i de specifikke beregningsalgoritmer har bidraget væsentligt hertil [22].

Som eneste validerede tests kan PAM50 og EndoPredict udføres decentralt i standard patologilaboratorier på formalinfikseret væv med høj reproducerbarhed efter forudgående verifikation af tilstedeværelse af invasivt karcinom i prøvematerialet som forudsætning for et validt prøvesvar [23, 24].

Applikation af forskellige gensignaturer på samme datasæt har demonstreret varierende korrelation på individuelt niveau hvilket betyder at der bør udvises forsigtighed i tilfælde af ønske om applikation af forskellige tests regionalt såvel som nationalt [25-27].

	MammaPrint	Oncotype DX	EndoPredict	Prosigna	Breast Cancer Index
Test	Agendia 70-gen test	Genomic Health 21-gen recurrence score	Sividon 12-gen test	Nanostring 50-gen test ROR score	Biotheranostics 11-gen test
Platform	DNA microarray	RT-PCR	RT-PCR	NanoString nCounter	RT-PCR
Materiale	Frisk frosset væv eller FFPE	FFPE	FFPE	FFPE	FFPE
Central analyse	Ja	Ja	Nej	Nej	Ja
Population	N0-1	N0-1, ER+	N0-1, ER+/HER2-	Molekylær subtype N0-1, ER+/HER2-	N0-1, ER+/HER2-
Analytisk validitet	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Klinisk validitet	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Klinisk anvendelighed	(Ja)	Ja	Ja	Ja	Ja
Evidens niveau	3C	IB	IB (bedre end oncotypeDX)	IB (bedre end oncotypeDX)	IB
Prospektive protokoller	MINDACT <sup>20</sup>	TAILORx RxPONDER ADAPT	ADENDOM	OPTIMA <sup>27</sup> PRECISION NEOPAL ECOG-ACRIN EA1131	UDVIDET ENDOKRIN BEHANDLING <sup>17</sup>

Tabel 1. Kommercielt tilgængelige multigen tests [28, 29]

Forekomsten og den prognostiske betydning af de molekulære subtyper (Luminal A, Luminal B, HER2 enriched og Basallike) har været kendt gennem de seneste 16 år [30]. Kendskab til den molekulære subtype har i stigende grad vist betydning for valg af behandling dels med henblik på

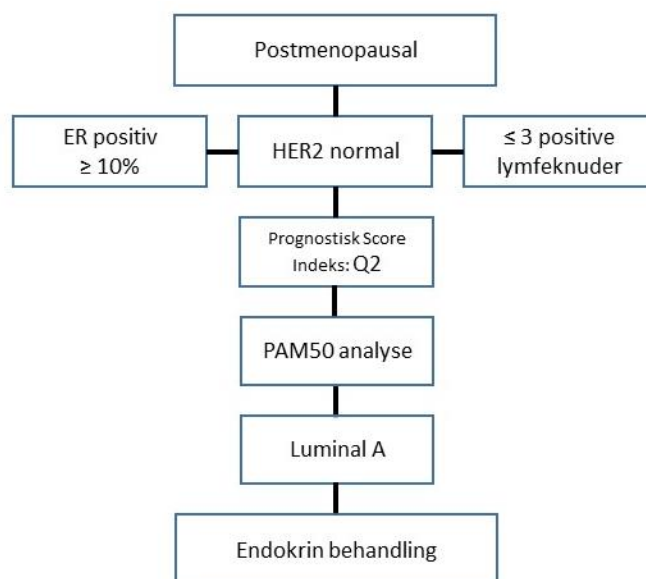
at skåne patienter for unødige kemoterapi (Luminal A versus Luminal B) og dels med henblik på at kunne tilbyde målrettet individualiseret behandling og genetisk udredning (Basallike) [31]. Blandt de klinisk validerede tests med evidens niveau 1B er det aktuelt kun PAM50 der angiver de molekulære subtyper.

De fem multigen tests i Tabel 1 er alle klinisk anvendelige. Indtil videre er det PAM50 der umiddelbart kan kombineres med Prognostisk Score Indeks, PSI, som anvendes i DBCG baseret på resultater fra DBCG 99C kohorten [16, 21]. Retningslinjerne for kemoterapi er baseret på viden om patientens forventede overlevning i forhold til baggrundsbefolkningen. Overlevningen grupperes i kvartiler og angives som lav risiko (Q1), intermedie lav (Q2), intermedie høj (Q3) og høj (Q4). Hos patienter der på baggrund af PAM50 har en Luminal A subtype kan antallet der skal tilbydes adjuverende kemoterapi reduceres ud over det der allerede sker vha. PSI (se kapitel 6.1 medicinsk behandling).

Det skal understreges at de prognostiske multigen tests ikke kan erstatte den prædiktive information der opnås ved de standardiserede IHC analyser for henholdsvis ER og HER2.

Flere studier har vist at subtypeklassifikation med anvendelse af IHC surrogatmarkører (ER, PR, HER2 og Ki67) bidrager med prognostisk og prædiktiv information [32-34]. Der er dog begrænsninger forbundet hermed specielt i forhold til anvendelsen af Ki67 hvilket blandt andet skyldes mangelfuld reproducerbarhed og uenighed om cutoff værdi [35, 36]. Digitaliseret aflæsning forventes at kunne bidrage til en forbedret reproducerbarhed men der foreligger på nuværende tidspunkt ikke tilstrækkelig evidens herfor [37, 38]. Prat et al. viste i en mini metaanalyse med inklusion af 5994 cases med subtypeklassifikation bestemt ved både PAM50 og IHC en diskrepans på gennemsnitligt 30% (kappa 0.564) på tværs af de fire subtyper med størst diskrepans svarende til klassifikation af Luminal A (37.8%) og Luminal B (48.9%) [25]. En mulig forklaring herpå er, udover de førnævnte for Ki67, at 3 eller 4 IHC surrogatmarkører ikke er tilstrækkelige til at kunne gengive de molekulære subtyper. IHC surrogatmarkører kan således for nuværende ikke erstatte den genbaserede molekulære subtypebestemmelse [28, 29].

Algoritme til allokering af patienter til PAM50 analyse:



PAM50 analysen foretages på formalinfikseret paraffinindstøbt tumurvæv. Den invasive tumorkomponent afmærkes på HE snit (Figur 1).

Afhængig af den invasive tumorkomponents udbredning/areal (Tabel 2) foretages skæring af snit med snittykkelse på 10 µm til makrodissektion med henblik på RNA oprensning og PAM50 analyse.



Figur 1

Tumor areal	Antal snit til makrodissektion
4 – 19 mm <sup>2</sup>	6
20 – 99 mm <sup>2</sup>	3
≥ 100 mm <sup>2</sup>	1

Tabel 2

Da resultatet af PAM50 analysen har direkte betydning for behandlingsallokering anbefales det integreret i patologibesvarelsen under ansvar af en patolog (jvnf. UEMS dekret 2013) [39].

Den molekylær subtype - indtastes i DBCG patologiskema.

En af følgende SNOMED Koder anvendes:

FEXXXX: Luminal A, molekylær subtype

FEXXXX: Luminal B, molekylær subtype

FEXXXX: HER2 enriched, molekylær subtype

FEXXXX: Basallike, molekylær subtype

Referencer:

1. [www.dbcg.dk](http://www.dbcg.dk).
2. Hammond, M.E., et al., American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). Arch Pathol Lab Med, 2010. 134(7): p. e48-72.
3. Wolff, A.C., et al., Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. J Clin Oncol, 2013. 31(31): p. 3997-4013.
4. Christiansen, P., et al., Mortality rates among early-stage hormone receptor-positive breast cancer patients: a population-based cohort study in Denmark. J Natl Cancer Inst, 2011. 103(18): p. 1363-72.
5. Kvalitetsindikatorrapport for Brystkræft. 2015.
6. Coates, A.S., et al., Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. Ann Oncol, 2015. 26(8): p. 1533-46.
7. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., et al., Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. Lancet, 2012. 379(9814): p. 432-44.

8. Simon, R.M., S. Paik, and D.F. Hayes, Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst*, 2009. 101(21): p. 1446-52.
9. Teutsch, S.M., et al., The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genet Med*, 2009. 11(1): p. 3-14.
10. Buus, R., et al., Comparison of EndoPredict and EPclin With Oncotype DX Recurrence Score for Prediction of Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. *J Natl Cancer Inst*, 2016. 108(11).
11. Dowsett, M., et al., Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *J Clin Oncol*, 2013. 31(22): p. 2783-90.
12. Gnant, M., et al., Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol*, 2014. 25(2): p. 339-45.
13. Sgroi, D.C., et al., Prediction of late distant recurrence in patients with oestrogen-receptor-positive breast cancer: a prospective comparison of the breast-cancer index (BCI) assay, 21-gene recurrence score, and IHC4 in the TransATAC study population. *Lancet Oncol*, 2013. 14(11): p. 1067-76.
14. Sestak, I., et al., Prediction of late distant recurrence after 5 years of endocrine treatment: a combined analysis of patients from the Austrian breast and colorectal cancer study group 8 and arimidex, tamoxifen alone or in combination randomized trials using the PAM50 risk of recurrence score. *J Clin Oncol*, 2015. 33(8): p. 916-22.
15. Gnant, M., et al., Identifying clinically relevant prognostic subgroups of postmenopausal women with node-positive hormone receptor-positive early-stage breast cancer treated with endocrine therapy: a combined analysis of ABCSG-8 and ATAC using the PAM50 risk of recurrence score and intrinsic subtype. *Ann Oncol*, 2015. 26(8): p. 1685-91.
16. Laenkholm, A.V., et al., Prediction of 10yr distant recurrence (DR) using the Prosigna (PAM50) assay in a Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG) cohort of postmenopausal Danish women with hormone receptor-positive (HR+) early breast cancer (EBC) allocated to 5yr of endocrine therapy (ET) alone. *J Clin Oncol* 2015. 33 (suppl; abstr 546).
17. Sanft, T., et al., Prospective assessment of the decision-making impact of the Breast Cancer Index in recommending extended adjuvant endocrine therapy for patients with early-stage ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2015. 154(3): p. 533-41.
18. Buyse, M., et al., Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2006. 98(17): p. 1183-92.
19. Drukker, C.A., et al., Long-term impact of the 70-gene signature on breast cancer outcome. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. 143(3): p. 587-92.
20. Cardoso, F., et al., 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med*, 2016. 375(8): p. 717-29.
21. Ejlertsen, B., et al., Excess mortality in postmenopausal high-risk women who only receive adjuvant endocrine therapy for estrogen receptor positive breast cancer. *Acta Oncol*, 2014. 53(2): p. 174-85.
22. Martin, M., et al., Prognostic ability of EndoPredict compared to research-based versions of the PAM50 risk of recurrence (ROR) scores in node-positive, estrogen receptor-positive,

- and HER2-negative breast cancer. A GEICAM/9906 sub-study. *Breast Cancer Res Treat*, 2016. 156(1): p. 81-9.
23. Nielsen, T., et al., Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer*, 2014. 14: p. 177.
  24. Kronenwett, R., et al., Decentral gene expression analysis: analytical validation of the Endopredict genomic multianalyte breast cancer prognosis test. *BMC Cancer*, 2012. 12: p. 456.
  25. Prat, A., et al., Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen. *Ann Oncol*, 2012. 23(11): p. 2866-73.
  26. Zhao, X., et al., Systematic assessment of prognostic gene signatures for breast cancer shows distinct influence of time and ER status. *BMC Cancer*, 2014. 14: p. 211.
  27. Bartlett, J.M., et al., Comparing Breast Cancer Multiparameter Tests in the OPTIMA Prelim Trial: No Test Is More Equal Than the Others. *J Natl Cancer Inst*, 2016. 108(9).
  28. Harris, L.N., et al., Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*, 2016. 34(10): p. 1134-50.
  29. Schmidt, M., C. Thomssen, and M. Untch, Intrinsic Subtypes of Primary Breast Cancer-- Gene Expression Analysis. *Oncol Res Treat*, 2016. 39(3): p. 102-10.
  30. Perou, C.M., et al., Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000. 406(6797): p. 747-52.
  31. Prat, A., et al., Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*, 2015. 24 Suppl 2: p. S26-35.
  32. Knoop, A.S., et al., Estrogen receptor, Progesterone receptor, HER2 status and Ki67 index and responsiveness to adjuvant tamoxifen in postmenopausal high-risk breast cancer patients enrolled in the DBCG 77C trial. *Eur J Cancer*, 2014. 50(8): p. 1412-21.
  33. Nielsen, T.O., et al., High risk premenopausal Luminal A breast cancer patients derive no benefit from adjuvant cyclophosphamide-based chemotherapy: results from the DBCG77B clinical trial. *Clin Cancer Res*, 2016.
  34. Cheang, M.C., et al., Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2009. 101(10): p. 736-50.
  35. Polley, M.Y., et al., An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Mod Pathol*, 2015. 28(6): p. 778-86.
  36. Dowsett, M., et al., Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*, 2011. 103(22): p. 1656-64.
  37. Roge, R., et al., Proliferation assessment in breast carcinomas using digital image analysis based on virtual Ki67/cytokeratin double staining. *Breast Cancer Res Treat*, 2016. 158(1): p. 11-9.
  38. Stalhammar, G., et al., Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. *Mod Pathol*, 2016. 29(4): p. 318-29.
  39. UEMS Specialists, S.o.P., Declaration on Molecular Pathology. 2013.