

---

## **КАК СЕ ИЗПОЛЗВАТ МУЛТИГЕННИ СИГНАТУРИ В КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА**

---

**Милка Георгиева, дмб**

Лаборатория по молекулярна патология  
УМБАЛ *Света Марина* – Варна



# КАК СЕ ИЗПОЛЗВАТ МУЛТИГЕННИ СИГНАТУРИ В КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА

---

**Милка Георгиева, дмб**

Лаборатория по молекулярна патология, УМБАЛ *Света Марина* – Варна

## ОБЗОР

*Карциномът на гърда (КГ) е хетерогенна болест с различни морфологии, молекулярни характеристики и клинично поведение. Възходът на технологиите за молекулярно профилиране доведе до ново разбиране за природата на КГ и до създаването на прогностични/предиктивни генни сигнатури. Въвеждането им в клиничната практика обаче е бавен процес, лимитиран в някои аспекти. Двадесет и един-генният Oncotype Dx и 70-генният MammaPrint са тестове, най-широко използвани като мултигенни биомаркери за идентифициране на пациенти, които нямат нужда от адювантна химиотерапия. Те са валидирали като прогностични инструменти и подпомагат решенията за провеждане на адювантна терапия в ранен стадий при пациенти с естрогенрецептор-позитивен КГ. Други тестове, които са в процес на валидиране, са мултигенен тест PAM 50 и Breast Cancer Index (BCI); те подобряват диагностицата и увеличават възможностите за персонализирана терапия при КГ.*

## Увод

**К**арциномът на гърда (КГ) е хетерогенна болест, като големите разлики във фенотипното разнообразие и клиничното поведение се дължат на отделни генетични, епигенетични и транскриптомни промени.<sup>1</sup> Традиционните клиникопатологични параметри, въз основа на които се вземат терапевтични решения, са размер на тумор, нодален статус, степен на диференциация, TNM-стадиране и рецепторен статус. Тези параметри са комбинирани в прогностични модели като *Adjuvant! Online* и *Nottingham prognostic index (NPI)* за определяне на адювантна системна терапия на пациенти с ранен КГ. Въпреки използване-

то на тези индикатори, е очевиден фактът, че пациенти с много сходни тумори показват различно клинично поведение (отговор към терапия или клиничен изход). Това се дължи на разлики в молекулярните характеристики на туморите.<sup>2</sup>

## Молекулярен профил на карцином на гърда

Молекулярното профилиране е нова концепция в клиничното поведение, която включва систематизиране на туморни или други тъкани в групи, базирани на множество промени на геномно и транскриптомно ниво. Новите тестове използват методи за

измерване на генна експресия – микроарейс или количествена реакция на полимеразните вериги в реално време (qRT PCR). Големият брой прогностични и предиктивни мултигенни класификатори на КГ значително повлияват клиничната онкологична практика и правят възможна индивидуализирана терапия на пациентите. Първата генерация мултигенни класификатори като *Oncotype Dx* и *MammaPrint* са най-близо до клиничната практика. Втората генерация прогностични и предиктивни мултигенни тестове, включващи туморна микросреда или имунен отговор, са в процес на валидиране и стандартизиране за клинична употреба.<sup>3,4</sup> Изследване на генна експресия чрез микроарейс беше използвано в началото за

идентифициране на уникални субтипове КГ, които имат също и прогностична стойност. Например, пациенти с тумори тип луминален A имат по-добра прогноза от всички други типове, включително и луминален B, които са също естроген-рецептор (ER)-позитивни.<sup>5</sup>

Напоследък клиницистите използват няколко мултигенни теста за оценка на молекулярен профил на даден тумор, преди да препоръчат адювантна системна терапия: *Oncotype Dx*, *MammaPrint*, *PAM 50* (Tab. 1). Тези тестове са валидирани в много ретроспективни проучвания, а проспективните проучвания са в ход. Проучване TAILORx използва *Oncotype Dx* за изчисление на риск (RS), за да определи ER-по-

Таблица 1. Сравнение между мултигенни тестове *Oncotype Dx*, *PAM50* и *MammaPrint*.

	<b>Oncotype DX</b>	<b>PAM50</b>	<b>MammaPrint</b>
<b>Number of genes</b>	21	50 (+5 control genes)	70
<b>Sample requirements</b>	Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue	Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue	Fresh-frozen tissue
<b>Technique</b>	Quantitative PCR	Quantitative PCR and nCounter technology	DNA microarray
<b>Study population used to develop the test</b>	Patients with ER+, node-negative, breast cancer	Patients with stage I-III breast cancer	Women <61 years, with T1-T2, N0 disease
<b>Features</b>	Recurrence score predicts likelihood of recurrence at 10 years  Identify low-risk patients who can be spared from adjuvant chemotherapy	Provides the intrinsic subtype classification  Predicts distant relapse-free survival and likelihood of recurrence at 10 years in the setting of ER+ breast cancer treated with tamoxifen  Identifies patients who would benefit from neoadjuvant endocrine therapy or chemotherapy	Stratifies patients into good or poor prognosis signatures
<b>Guidelines</b>	NCCN and ASCO  CLIA assay, no formal regulatory approval	FDA and European approvals pending	FDA approved
<b>Prospective clinical trials</b>	TAILORx and RxPONDER	RxPONDER trial will compare PAM50 and Oncotype DX scores	MINDACT

Abbreviations: CLIA, Clinical Laboratory Improvement Amendments; ER, estrogen receptor; PCR, polymerase chain reaction.

## КАК СЕ ИЗПОЛЗВАТ МУЛТИГЕННИ СИГНАТУРИ В КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА

зитивни, нодалнонегативни пациенти за химиотерапия и ендокринна терапия срещу самостоятелна ендокринна терапия. Проучване RxPonder (SWOG S1007) изследва *Oncotype Dx* по сходен начин, но с нодалнопозитивни пациенти и включва *PAM 50* като вторичен анализ. Проучване MINDACT включва *MammaPrint* и *Adjuvant!Online* като експериментално и контролно рамо. MINDACT има много обширни приемливи критерии и две вторични рандомизации за избор на химиотерапия или ендокринна терапия.

### *Oncotype Dx* (21 gene recurrence score–RS, оценка на рецидив)

Тестът *Oncotype Dx* (RS) се състои от 16 туморни гена и 5 референтни гена; дава оценка за рисък от рецидив при пациенти с ER-позитивен, нодално (N)-негативен КГ и полза от добавяне на химиотерапия към ендокринна терапия.Осъществява се с количествен RT PCR на РНК, изолирана от парафинови блокчета (Табл. 1). Резултатът се изразява като изчислена оценка на рисък – Recurrence Score (RS) с обхват от 0 до 100, като разделя пациентите на три рискови групи: нисък рисък (RS 0-18), където RS корелира с рисък за късен рецидив под 10%; среден рисък (RS 19-31), т.е. рисък от късен рецидив между 10% и 20%; висок рисък (RS >31), т.е. рисък за късен рецидив над 20%. Резултатът от RS отговаря на специфична възможност за рецидив на тумора за 10 години от началната диагноза с нисък, среден и висок рисък.

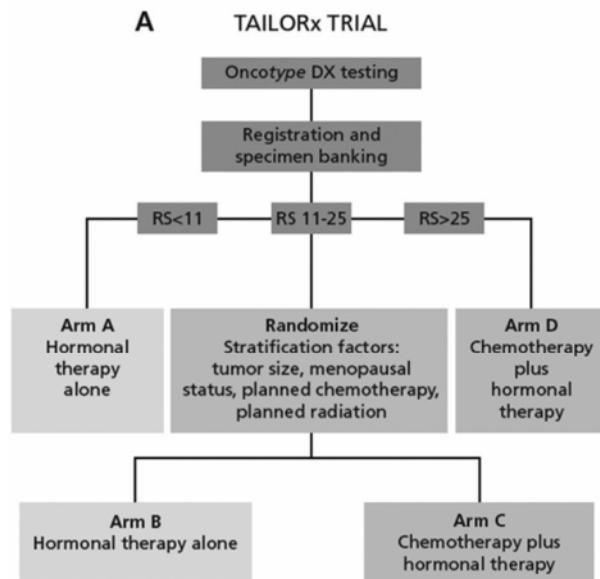
Този тест може да бъде използван при пациенти с КГ от всички възрасти, новодиагностиирани с ER-позитивен стадий I-II. В допълнение на прогностичната му информация тестът е и предиктивен за ползи от ендокринна терапия (*tamoxifen* и/или ароматазни инхибитори) и от химиотерапия.<sup>6</sup>

Основните клинични проучвания за разработка и валидиране на *Oncotype Dx* са: ретроспективни – (NSABP) B-14, (NSABP)

B-20, SWOG 8814 и проспективни – TAILORx и RxPONDER (SWOG S1007).

Около 51% от пациентите, изследвани в проучване NSABP B-20, показват нисък RS. Пациенти с висок RS, дължащ се на тумори от тип луминален B, най-вероятно ще имат полза от адювантна химиотерапия поради по-ниска ER-експресия и по-висока експресия на пролиферативни гени.<sup>7</sup> Пациенти с нисък RS нямат подобреие след провеждане на химиотерапия. Потенциалната полза от адювантна химиотерапия за пациенти със среден рисък не е добре дефинирана и се оценява в проучване TAILORx (Фиг.1A). Пациенти със среден RS са рандомизирани за провеждане на химиотерапия, последвана от ендокринна терапия, или само за ендокринна терапия.

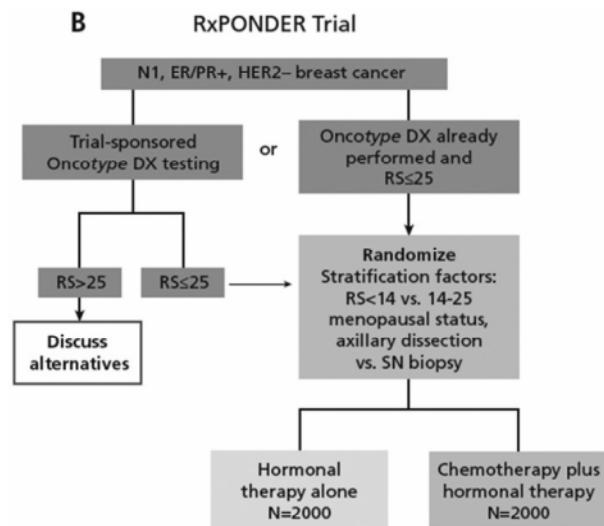
Фигура 1A. Схема на проспективно клинично проучване TAILORx.



Използването на 21-генен RS е по-добре изследван при N-негативни пациенти, отколкото при тези – с позитивни лимфни възли. Анализ на N-позитивни пациенти от фаза III клинично проучване (SWOG) 8814 при пациенти, рандомизирани между химиотерапия, последвана от *tamoxifen*, сре-

щу самостоятелен *tamoxifen*, показва, че RS е с прогностична стойност за тази популация от пациенти. Висок RS е предиктивен за полза от химиотерапия при N-позитивни пациенти.<sup>8</sup> Въпреки че N-позитивни пациенти с нисък риск имат по-малка полза от химиотерапия, сравнени с тези с висок риск, резултатите от клинично проучване RxPONDER (Rx за позитивни лимфни възли, ендокринно чувствителен КГ) ще са необходими преди да се препоръчва рутинно използване на *Oncotype Dx* при нодално позитивните популации (Фиг. 1B).

*Фигура 1B.* Схема на проспективно клинично проучване RxPONDER.



Цената на тест *Oncotype Dx* е около \$4000 на пациент, но в много изследвания е доказано, че е икономически изгоден.<sup>9</sup> Няколко изследвания показват също, че резултати от тест *Oncotype Dx* са променили препоръките за лечение на медицинския онколог в посока от адювантна химиотерапия, последвана от ендокринна терапия преди теста, само към ендокринна терапия.<sup>10, 11</sup> Освен че е икономически изгоден, мултигенният тест също намалява общата болестност, свързана с лечение на ранен стадий ER-позитивен КГ, тъй

като по-малко пациенти са подложени на краткосрочни и дългосрочни рискове от химиотерапия.

## Седемдесетгенна прогностична сигнатура (*MammaPrint*)

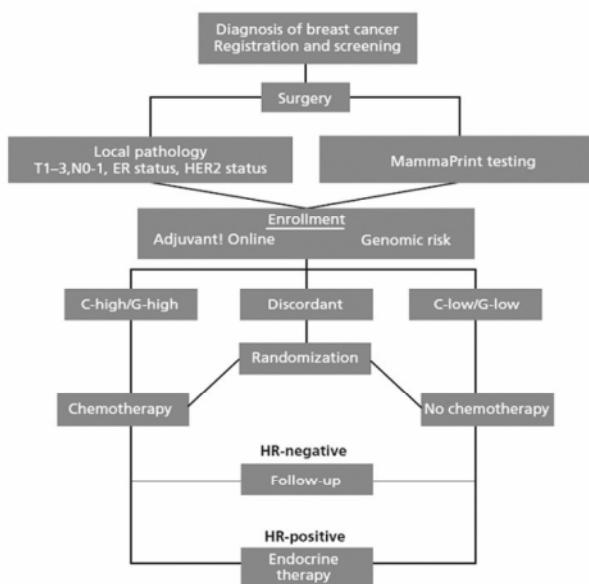
Платформата *MammaPrint* е микрарейс тест с изолиране на ДНК от замразена туморна тъкан (Табл. 1). За първи път *Vant Veer et al.*, 2002, изследват чрез ДНК-микрарейс анализ на профили на генна експресия на първични тумори на гърда и откриват 70-генна сигнатура, предиктивна за развитие на далечни метастази. Тестът идентифицира кои пациенти в ранен стадий на КГ са с риск за рецидив след оперативно лечение, независимо от ER-статуса. Пациентите се групират в две рискови групи – нисък и висок риск от далечен рецидив; няма междуинна рискова група. Лошата прогноза се дължи на експресия на гени, свързани с пролиферация, ангиогенеза и инвазия.<sup>12</sup> Прогностичната значимост на 70-гения тест *MammaPrint* е валидирана в отделна кохорт от пациенти. Жени с добра прогноза имат значително по-ниска честота на далечни метастази в сравнение с пациенти с лоша прогноза.<sup>13</sup> Допълнителен анализ показва, че почти всички базало-подобни (basal-like) HER-2-позитивни тумори и тип луминален B имат лоша прогноза.<sup>14</sup>

Тестът *MammaPrint* е валидиран в няколко независими проучвания на N-негативни пациенти, които не са получили адювантна химиотерапия.<sup>15-18</sup> Резултатите от провежданите клинични проучвания са необходими за проспективното валидиране на предиктивната полза от адювантна химиотерапия. В проучване MINDACT пациенти с ER-позитивен ранен стадий на КГ (N-негативни или с 1-3 позитив-

ни лимфни възли) получават препоръки за адювантна химиотерапия на базата на резултати от теста *MammaPrint* и на онлайн прогностичното средство, базирано на клиникопатологични характеристики, *Adjuvant! Online*; пациенти, определени с висок риск и по двата метода, получат адювантна химиотерапия; тези с нисък риск и по двата метода получат само ендокринна терапия; несъвпадащите случаи се рандомизират за адювантна терапия на базата на резултати или от 70-генната сигнатура *MammaPrint* или от *Adjuvant! Online*. Набирането на пациенти за това многоцентрово фаза III рандомизирано проучване е приключено (Фиг. 1C). След завършване на анализа на резултатите от проучване MINDACT ще може да се даде точна препоръка, която да залегне в стандарти за работа.

През 2012 г. се разработи qRT PCR версия на теста *MammaPrint* с PHK, изолирана от фиксирани в парафин тъкани, което много улеснява използването му в клиничната практика, но е необходимо стандартизиране и валидиране.

**Фигура 1C.** Схема на проспективно клинично проучване на MINDACT.



### Допълнителни прогностични панели

#### Петдесетгенна сигнатура PAM 50.

Освен *Oncotype DX* и *MammaPrint*, са създадени и налични в търговската мрежа още няколко прогностични предиктора. *PAM 50* е мултигенен тест (Predictor Analysis of Microarray), разработен за класификаре на КГ в отделни субтипове. Резултатите от него дават оценка на рисък от рецидив.<sup>19</sup> Повечето изследвания на *PAM 50* са направени с количествен RT PCR, но е създадена нова версия на теста – нанотехнологична *nCounter*-платформа за дигитална генна експресия, което позволява да бъде изпълнен във всяка патологична лаборатория<sup>20</sup> (Табл. 1). *PAM 50* измерва експресията на 50 класифициращи гени и 5 контролни гена, категоризира туморите в четири уникални субтипа (луминален A, луминален B, HER-2-обогатен и базалоиден) и дава ROR-точкуване (Risk of Relapse) за изчисляване на вероятност от рецидив за пет години.<sup>21</sup> *PAM 50* дава информация, независима от стандартните критерии (стадий, диференциация, HER-2, ER и *Adjuvant! Online*), а при мултивариантни модели на лечение с *tamoxifen* на ранен стадий на ER-позитивен КГ остават значими само резултатът от *PAM 50* и стадия. Публикувани са и резултати от сравнения между *Oncotype Dx* и *PAM 50*: *Dowsett et al.* представят анализ TransATAC, който показва, че *nCounter-PAM 50 ROR* резултатът дава повече прогностична информация за десетгодишен далечен рецидив, отколкото *Oncotype Dx*, като по-малко пациенти са категоризирани в група със среден рисък. Тези резултати са потвърдени и в публикация на *Kelly et al.*, 2012, които използват RT PCR-версия на *PAM 50* с панел от 304 последователно третирани пациенти и установяват, че въпреки доброто съответствие между *PAM 50 ROR* и *Oncotype Dx*, повече пациенти са

категоризирани от *PAM 50* в група с нисък риск.<sup>22</sup> Необходими са проспективни сравнения на клиничната *nCounter*-версия на *PAM 50 ROR* и *Oncotype Dx* и това е предмет на проучване RxPONDER.<sup>23</sup>

Разработен е и геномен индекс за чувствителност към ендокринна терапия (SET), който измерва ниво на транскрипционна активност, свързана с ER. Висок SET-индекс е предиктивен за нисък риск от късен рецидив на фона на лечение с *tamoxifen*.<sup>24</sup>

**The Breast Cancer Index (BCI).** Това е 7-генен тест, състоящ се от два независимо открити биомаркера: панел от 5 гена, свързани с клетъчния цикъл, наречени *molecular grade index*, и отношение от експресията на два гена *HOXB13:IL17BR* (Хомеобокс B13 ген и ген за интерлевкин-В рецептор). Платформата е количествен RT PCR и се използва тъкан, включена в парафин. Тестът е предиктор за рецидив и преживяемост при жени, лекувани с адювантен *tamoxifen*.<sup>25</sup> *BCI* разделя пациентите на три рискови групи, които предсказват рисък от късен рецидив. В един скорошен анализ на кохортата пациенти в проучване ATAC, прогностичните характеристики на *BCI*, *Oncotype Dx* и *IHC-4* са сравнени с оценка, базирана на туморен размер, N-статус,

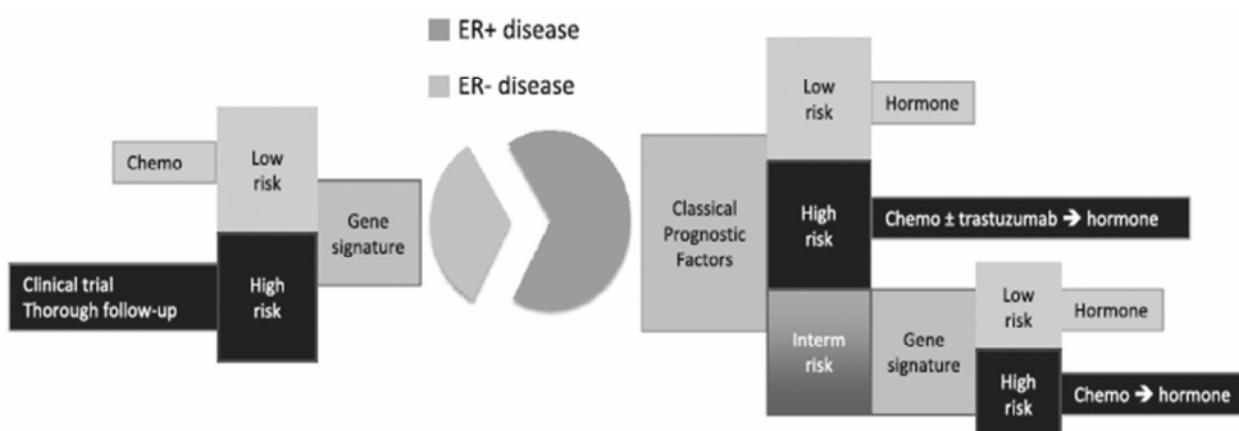
диференциация, възраст и терапия; и трите теста функционират добре при предсказване на рецидив от 1 до 5 години; единствено *BCI* се оказа прогностичен за късен рецидив за период от 5 до 10 години след диагноза.<sup>26</sup>

## Клинична употреба на генни сигнатури

Поради липса на единичен предиктор за полза от адювантна химиотерапия, генните сигнатури се включват в клиничната практика, ако спомагат за вземане на клинични решения. За момента тестовете *Oncotype Dx* и *MammaPrint* се използват при селектирани пациенти с ранен стадий на ER-позитивен КГ, за да се реши дали да се спести адювантна химиотерапия. Предимството на генните сигнатури е, че могат да идентифицират пациенти, които ще имат полза от ХТ. Те са допълнение към класическите прогностични фактори за по-точна прогностична информация. Тези сигнатури са сериозно изследвани и са широко използвани в Европа и САЩ.<sup>8,17,27</sup>

Съществуват някои ограничения на 21-генната и 70-генната сигнатури:

(i) липсват достатъчно публикувани доказателства, които да показват, че тези



Фигура 2. Схема на клинично използване на генни сигнатури при ER-позитивен КГ. Класическите прогностични фактори включват размер на тумор, въвличане на лимфни възли, степен на диференциация и възраст.

## КАК СЕ ИЗПОЛЗВАТ МУЛТИГЕННИ СИГНАТУРИ В КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА

геномни биомаркери работят по-добре от туморната морфология и основната имунохистохимия за класифициране на пациенти за поява на рецидив или за предсказване на полза от химиотерапия; едно ново изследване показва, че оценка с четворна имунохистохимия (IHC 4), получена от четири стандартни маркера (ER, PgR, HER-2 и Ki-67), има сходна прогностична точност с *Oncotype Dx*<sup>28</sup>;

(ii) мета-анализ на големи кохорти от КГ показва, че генните сигнатури са съставени предимно от пролиферативни гени и до-принасят най-много за прогнозата<sup>29</sup>; те работят само при ER-позитивни, но не и при ER-негативни тумори; при ER-негативни тумори пролиферативните гени обикновено имат висока експресия; гените, свързани с други туморни механизми като инвазивност, метастазиране и имунен отговор, могат да бъдат по-специфичен геномен биомаркер, особено за ER-негативни КГ;

(iii) наличие на група със среден рисков, за която ползата от адювантна химиотерапия не е ясна;

(iv) тези сигнатури са предиктори за полза от обичайни химиотерапевтични режими, но имат трудности с оптимизиране на „персонализирана“ терапия, като предиктори на отговор към специфични химиотерапевтични агенти<sup>30</sup>;

(v) изискване за изпращане на пробы в референтен център;

(vi) цената и на *Oncotype Dx*, и на *MammaPrint* е над \$4000 за тест; въпреки че са от полза за отдиференциране на тумори с добра и лоша прогноза, високата цена все още е голяма финансова бариера за много пациенти.

Има някои нерешени проблеми и при ER-позитивни тумори: генните сигнатури са създадени за дуктален инвазивен, но не и за лобуларен карцином. Известно е, че въпреки наличие на общи геномни проме-

ни при ER-позитивен дуктален и лобуларен карцином, последният има и специфични молекулярни характеристики.<sup>31, 32</sup>

На база на резултати от проспективни валидиращи проучвания на пациенти, участващи в NSABP B-20, 21-генният тест *Oncotype Dx* е включен в препоръките на NCCN, ASCO и St. Gallen за лечение на ранен стадий, ER-позитивни, N-негативни тумори с ниво на доказателственост и степен на препоръчителност 2B. Ръководството на NCCN препоръчва обсъждане на теста *Oncotype Dx* за жени с тумори, по-малки от 0.5 см, HER-2-негативни и N0 или N1mi (микрометастази).<sup>33</sup> Препоръките на NCCN нямат предвид изследване на всички тумори с тези характеристики; лекарите трябва да изберат случаи от тези групи, ако се съмняват за необходимостта от химиотерапия. И двата теста имат предиктивна и прогностична стойност; това значи, че при жени, попаднали в групи с висок рисков, адювантна химиотерапия значително ще подобри преживяемостта без болест, за разлика от тези – в групи с нисък рисков.<sup>7, 34</sup> Лесното използване и по-общирното валидиране са причини за много по-широко приемане на *Oncotype Dx* в клиничната практика.

Седемдесетгенната сигнатура *MammaPrint* е единственият микроарейс-тест, одобрен от FDA. Тази сигнатурата е създадена като предиктор за преживяемост без болест и обща преживяемост при N-негативни и за оценка на рисков от рецидив при ER-позитивни и N-негативни пациенти. Изследвана е само в ретроспективни проучвания и затова нивото на доказателственост е III. Това показва, че в случаи на несъответствие между *MammaPrint* и клиникопатологични критерии, мултигенният тест е по-точен предиктор на изход.

Използването на тези мултигенни тестове води до подобряване на диагностиката, увеличаване на възможностите за пер-

сонализирана терапия и до спестяване на химиотерапия на пациенти с нисък риск, което резултира в по-високо качество на живот и по-ниски разходи за лечение.

## Нови технологии

Създаването на массивно паралелно секвениране (NGS, next generation sequencing), включително екзомно и транскриптомно, предоставя много по-обширна информация за геномните промени при КГ. Поради бързо развитие на тези технологии и снижение на цената на секвениране туморите ще могат да бъдат анализирани в реално време в болниците, когато информацията е от клинична полза. Поради огромно количество информация, която се анализира с много сложна статистика и биоинформатика, тези технологии все още не се използват в диагностичните лаборатории. Също така е необходимо събиране и анализиране на големи колекции от пробы от много мултидисциплинарни колективи и консорциуми за получаване на валидни изводи. Последните резултати, публикувани от консорциуми като METABRIC (Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium) и TCGA (The Cancer Genome Atlas), са добър пример в тази насока. С нови методи на геномика и транскриптомика те са анализирали повече от 2000 пробы от КГ.<sup>1</sup> Необходимостта от тяхното усъвършенстване и стандартизиране показва, че засега е по-подходящо да се използват за изследователски цели, отколкото за рутинна клинична практика и вероятно в близко бъдеще ще имат огромно приложение в патологията, медицината и биологията.<sup>35</sup>

## Заключение

Анализите на генна експресия доведоха до сериозни постижения в класификацията на туморите, както и до няколко практи-

чески полезни клинични теста. Огромните възможности на съвременните молекулярни технологии са солидна основа за създаване на нови генерации молекулярни класификатори и идентифициране на нови таргети, но това води и до нови предизвикателства. Обучението на трансляционни и клинични специалисти, които да се справят със сложната интерпретация на резултатите от массивното паралелно секвениране, заедно с техните функционални последствия, е жизнено важно, както и създаването на специалисти по биоинформатика за анализи на огромното количество данни. Няма самостоятелен изследовател, който може да се справи и да контролира всяка от множеството аналитични стъпки. Ключово е осъзнаването, че трансляционната медицина е мултидисциплинарно усилие, при което обединените групи от умения са много повече, отколкото сумата от приноса на всеки индивид.

## ЛИТЕРАТУРА

1. The Cancer Genome Atlas Network, Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2012; 490: 61-70
2. Xi Zhao, Ole Christian Lingjærde and Anne-Lise Børresen-Dale (2012). Breast Cancer Prognostication and Risk Prediction in the Post-Genomic Era, The Continuum of Health Risk Assessments, Dr. Michael G.Tyshenko (Ed.), ISBN: 980-953-307-582-7, InTech
3. Reis-Filho JS, et al. Molecular profiling: moving away from tumor philately. *Sci Transl Med* 2010; 2:47ps 43
4. Borst P, Wessels L. Do predictive signatures really predict response to cancer chemotherapy? *Cell Cycle* 2010; 9: 4836-4840
5. Parker JS, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1160-1167
6. Paik S, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 2817-2826
7. Paik S, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3726-3734

## КАК СЕ ИЗПОЛЗВАТ МУЛИГЕННИ СИГНАТУРИ В КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА

8. Albain KS, et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 55-65
9. Tsoi DT, et al. Cost-effectiveness analysis of recurrence score-guided treatment using a 21-gene assay in early breast cancer. *Oncol* 2010; 15: 457-465
10. Lo SS, et al. Prospective multicenter study of the impact of the 21-gene recurrence score assay on medical oncologist and patient adjuvant breast cancer treatment selection. *J Clin Oncol* 2010; 28:1671-1676
11. Eiermann W, et al. The 21-gene recurrence score assay impacts adjuvant therapy recommendations for ER-positive, node-negative and node-positive early breast cancer resulting in a risk-adapted change in chemotherapy use. *Ann Oncol* 2012. [Epub ahead of print]
12. van't Veer LJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-536
13. van de Vijver MJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1999-2009
14. Fan C, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 560-569
15. Bueno-de-Mesquita JM, et al. Use of 70-gene signature to predict prognosis of patients with node-negative breast cancer: a prospective community-based feasibility study (RASTER). *Lancet Oncol* 2007; 8: 1079-1087
16. Bueno-de-Mesquita JM, et al. Validation of 70-gene prognosis signature in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 117: 483-495
17. Mook S, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 116: 295-302
18. Drukker CA, et al. A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study. *Int J Cancer* 2013; ahead of print
19. Bastien RR, et al. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics* 2012; 5: 44
20. Geiss GK, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* 2008; 26: P317-325
21. Parker JS, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1160-1167
22. Kelly CM, et al. Agreement in risk prediction between the 21 gene recurrence score assay (Oncotype Dx) and the PAM 50 Breast cancer intrinsic classifier in early stage estrogen receptor positive breast cancer. *Oncol* 2012; 17: 492-498
23. Gonzalez-Angulo AM, et al. A randomised phase III clinical trial of standard adjuvant endocrine therapy +/- chemotherapy in patients with 1-3 positive nodes, ER+ and Her2-negative breast cancer with recurrence score (RS) of 25 or less: SWOG S1007 (abstract). *Cancer Res* 2011; 24 (Suppl 3): abstract OT1-03-01
24. Symmans WF, et al. Genomic index of sensitivity to endocrine therapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4111-4119
25. Goetz MP, et al. A two-gene expression ratio of homeobox 13 and interleukin-17B receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2006; 12(7 Pt 1): 2080-2087
26. Sgroi D, et al. Comparative performance of Breast Cancer Index (BCI) vs. Oncotype Dx and IHC4 in the prediction of late recurrence in HR-positive, LN-negative breast cancer patients: a TransATAC study. San Antonio Breast Cancer Symposium 2012: Abstr S1-9
27. Mittempergher L, et al. Gene expression profiles from formalin fixed paraffin embedded breast cancer tissue are largely comparable to fresh frozen matched tissue. *PLoS One* 2011; 6: e17163.
28. Cuzick J, et al. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(32): 4273-4278
29. Wirapati P, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res* 2008; 10 (4): R65
30. Borst P, Wessels L. Do predictive signatures really predict response to cancer chemotherapy? *Cell Cycle* 2010; 9 (24): 4836-4840
31. Gruel N, et al. Lobular invasive carcinoma of the breast is a molecular entity distinct from luminal invasive ductal carcinoma. *Eur J Cancer* 2010; 46: 2399-2407
32. Bertucci F, et al. Lobular and ductal carcinomas of the breast have distinct genomic and expression profiles. *Oncogene* 2008; 27: 5359-5372
33. National Cancer Comprehensive Network. Breast Cancer. [www.nccn.org](http://www.nccn.org).
34. Knauer M, et al. The predictive value of the 70-gene signature for adjuvant chemotherapy in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120: 655-661
35. Weigelt B, et al. Challenges translating breast cancer gene signatures into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9: 58-64