

REF 7900001

Kit da 16 determinazioni

The logo for CellSearch, featuring the word "Cell" in green with a vertical orange bar above the "l", followed by "Search" in green and a registered trademark symbol.

**Circulating Tumor Cell Kit
(Epiteliale)**

IVD



MENARINI
silicon biosystems



IMPIEGO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro*.

Circulating Tumor Cell Kit CELLSEARCH® è destinato al conteggio delle cellule tumorali circolanti (CTC) divorigine epiteliale (CD45-, EpCAM+ e citocheratine 8, 18+ e/o 19+) nel sangue intero.

La presenza di CTC nel sangue periferico, evidenziata da CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Kit, viene associata ad una diminuzione della sopravvivenza senza progressione della malattia e della sopravvivenza totale in pazienti sottoposti a trattamento per tumore metastatico al seno, colorettole o prostatico*. L'utilizzo del test è inoltre indicato come strumento per il monitoraggio di pazienti con tumore metastatico. Test successivi per CTC devono essere utilizzati insieme a tutti gli altri metodi clinici per il monitoraggio del tumore al seno, colorettole e alla prostata. La valutazione delle CTC in qualsiasi momento durante il corso della patologia consente la valutazione della prognosi del paziente e predice la sopravvivenza senza progressione della malattia e la sopravvivenza totale.

**I pazienti affetti da metastasi alla prostata in questo studio sono stati definiti come affetti da due aumenti consecutivi del marker PSA nel siero al di sopra di un livello di riferimento, nonostante la regolare somministrazione degli ormoni secondo le terapie standard. Questi pazienti vengono comunemente descritti come affetti da cancro alla prostata indipendente dagli androgeni, resistente agli ormoni o resistente alla castrazione.*

RIASSUNTO E NOTE INTRODUTTIVE

Le metastasi del cancro hanno origine nel momento in cui dal tumore primario o metastatico si staccano delle cellule che entrano in circolo ed iniziano a proliferare in localizzazioni distanti del corpo. Le cellule epiteliali normalmente non presenti nella circolazione¹ derivano dai carcinomi. CELLTRACKS® AUTOPREP® System ha lo scopo di standardizzare ed automatizzare il protocollo di preparazione dei campioni da usare con CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Kit (CELLSEARCH® CTC Kit). L'analisi e l'enumerazione delle CTC vengono eseguite utilizzando CELLTRACKS ANALYZER II®, un microscopio a fluorescenza semi-automatico. Il dosaggio conta solo le cellule che esprimono la molecola di adesione cellulare epiteliale (EpCAM) e le citocheratine (CK) 8, 18 e/o 19.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Circulating Tumor Cell Kit CELLSEARCH® contiene un reagente di cattura a base di ferrofluido e reagenti immunofluorescenti. Il reagente con ferrofluido è composto da particelle con nucleo magnetico circondate da uno strato polimerico rivestito con anticorpi diretti contro l'antigene EpCAM per la cattura delle CTC. Dopo la cattura immunomagnetica e l'arricchimento, vengono aggiunti dei reagenti fluorescenti per l'identificazione e l'enumerazione delle CTC. I reagenti fluorescenti contengono quanto segue: anti-CK-Ficoeritina (PE) specifico per la proteina intracellulare chiamata citocheratina (caratteristica delle cellule epiteliali), DAPI che colora il nucleo cellulare e anti-CD45-Allofocianina (APC) specifico per leucociti.

La miscela reagente/campione viene erogata tramite il CELLTRACKS® AUTOPREP® System in una cartuccia inserita in un supporto cartuccia MAGNEST. Il potente campo magnetico del supporto cartuccia MAGNEST attrae le cellule epiteliali marcate magneticamente sulla superficie della cartuccia. Il CELLTRACKS ANALYZER II® esegue automaticamente la scansione dell'intera superficie della cartuccia, acquisisce le immagini e mostra qualsiasi evento all'utente in cui sia presente contemporaneamente la fluorescenza CK-PE e DAPI. Le immagini vengono presentate all'utente sotto forma di galleria per la classificazione finale. Un evento viene classificato come cellula tumorale quando le sue caratteristiche morfologiche corrispondono a quelle di una cellula tumorale e presenta il fenotipo EpCAM+, CK+, DAPI+ e CD45-.

MATERIALI FORNITI

- Istruzioni per l'uso
- **Ferrofluido Anti-EpCAM 3,0 mL:** contiene una sospensione di 0,022% di particelle magnetiche coniugate con anticorpo monoclonale di topo specifico per il marcatore di superficie cellulare EpCAM presente sulle cellule epiteliali in un tampone contenente 0,03% di sieralbumina bovina (BSA) e 0,05% di conservante ProClin® 300 (tappo marrone)
- **3,0 mL di reagente di colorazione:** contiene 0,0006% di anticorpi monoclonali di topo specifici per citocheratine coniugate con ficoeritina (PE); 0,0012% di anticorpo monoclonale anti-CD45 di topo coniugato con allofocianina (APC) in un tampone contenente 0,5% di BSA e 0,1% di sodio azide (tappo bianco)
- **3,0 mL di colorante per acido nucleico:** contiene lo 0,005% di 4', 6-Diamidino-2-fenilindolo, diidrocloruro (DAPI) e lo 0,05% di ProClin® 300 (tappo blu)
- **3,0 mL di reagente potenziato:** contiene lo 0,02% di reagente brevettato per l'aggregazione controllata del ferrofluido e lo 0,5% di BSA e lo 0,1% di sodio azide in soluzione tampone (tappo trasparente)
- **3,0 mL di reagente di permeabilizzazione:** contiene lo 0,011% di reagente brevettato di permeabilizzazione e lo 0,1% di sodio azide in soluzione tampone (tappo verde)
- **Fissatore cellulare 3,0 mL:** contiene 25% di ingredienti fissatori brevettati 0,1% di BSA e 0,1% di sodio azide in tampone (tappo rosso)
- **2 flaconi da 110 mL di tampone di diluizione:** contiene una soluzione tampone con lo 0,1% di sodio azide.
- **16 provette coniche per centrifuga CELLSEARCH® (15 mL) e tappi per provette coniche**
- **16 cartucce e tappi per cartucce**

MATERIALI RICHIESTI, NON FORNITI

- CellSave Preservative Tubes (numero di catalogo 7900005)
- CELLTRACKS® AUTOPREP® System (numero di catalogo 9541)
- CELLTRACKS ANALYZER II® (numero di catalogo 9555)
- CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Control Kit (numero di catalogo 7900003)
- Di CELLTRACKS® AUTOPREP® Instrument Buffer (numero di catalogo 7901003)
- Centrifuga a rotore basculante orizzontale (ad es. a cestelli basculanti) per 800 x g
- Rack per provette
- Micro-pipette calibrate e puntali
- Miscelatore Vortex

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico *in vitro*.
2. Leggere attentamente l'intero contenuto delle istruzioni per l'uso prima di procedere all'analisi dei campioni.
3. Attenzione: il sangue deve essere raccolto esclusivamente in CellSave Preservative Tube. Le CTC sono fragili e necessitano di conservazione per consentire un'analisi accurata.
4. Attenzione: tutto il personale deve seguire precauzioni generali e utilizzare attrezzature di sicurezza da laboratorio (es. bicchieri di sicurezza, indumenti da laboratorio, guanti).
5. Attenzione: la contaminazione microbica dei reagenti può provocare risultati errati, pertanto deve essere evitata.
6. Attenzione: alcuni reagenti contengono sodio azide come conservante. In caso di ingestione, consultare immediatamente un medico. Conservare fuori dalla portata dei bambini. Conservare lontano da cibi e bevande. Usare indumenti protettivi adatti. A contatto con acidi libera gas molto tossici. Durante lo smaltimento, i composti di azide devono essere diluiti con grandi volumi di acqua per evitare la formazione di depositi nelle tubature in piombo o in rame con conseguente rischio di esplosione.
7. **Avvertenza:** tutti i campioni biologici, le cartucce ed i materiali che entrano in contatto con i campioni vengono considerati biologicamente pericolosi. Trattare questi materiali come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi. Trattare e smaltire i rifiuti adottando le precauzioni del caso, conformemente alle vigenti norme locali, statali e federali. Non pipettare con la bocca.
8. **Avvertenza:** alcuni reagenti contengono ProClin® 300 come conservante.
9. Per l'esecuzione della procedura di analisi, l'operatore deve acquisire un'adeguata formazione.

DI SEGUITO VENGONO RIPORTATE LE DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRECAUZIONE:

H317 Può provocare una reazione allergica cutanea.

Prevenzione:

P261 Evitare di respirare la polvere / i fumi / gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P272 Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.

P280 Indossare guanti protettivi.

Risposta:

P333 + P313 In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

P362 + P364 Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Smaltimento:

P501 Smaltire il prodotto / contenitore in un impianto approvato.

Per ulteriori informazioni consultare la scheda dati di sicurezza su www.cellsearchctc.com

CONSERVAZIONE E MANIPOLAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono forniti pronti per l'uso. Conservarli intatti a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.
- Dopo l'apertura, i reagenti contenuti nella confezione dei reagenti devono essere conservati non oltre 30 giorni ad una temperatura tra 2 e 8 °C. Per la conservazione, i reagenti aperti **devono** essere tappati con i loro tappi di colore univoco, usando come guida i colori indicati nelle etichette del vassoio dei reagenti, al fine di garantire l'assenza di contaminazione crociata tra i reagenti.
- NOTA: dopo l'apertura, il flacone di tampone di diluizione non contenuto nel pacchetto del reagente deve essere conservato a temperatura ambiente non oltre 30 giorni.
- Proteggere i reagenti da temperature superiori a 35 °C. Non congelare.
- Portare a temperatura ambiente (da 15 a 30 °C) prima dell'uso.
- Ispezionare visivamente la confezione dei reagenti per verificare il corretto posizionamento dei reagenti stessi. Controllare che ciascun reagente sia nella posizione adeguata, verificando la corrispondenza tra il colore univoco del suo tappo e i colori indicati sull'etichetta. Fare riferimento all'illustrazione per il posizionamento corretto. Se i reagenti non sono posizionati correttamente o se sono presenti flaconi doppi, non usare la confezione dei reagenti e avvisare il Centro Supporto Clienti per concordare una sostituzione.



- Evitare di esporre i reagenti alla luce solare diretta.
- Se conservati correttamente, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza stampata sul contenitore del reagente o sulla scatola del kit. Non usare reagenti scaduti.
- I componenti del kit vengono prodotti e testati come lotto master. **Non** miscelare i reagenti provenienti da kit differenti.

PROCEDURA PER L'ESECUZIONE DELL'ANALISI

Prelievo e preparazione del campione

Prelievo di sangue intero in provette CellSave Preservative Tubes

1. Prelevare i campioni iniziali prima di iniziare un regime terapeutico. I campioni successivi possono essere prelevati dopo l'inizio di un regime terapeutico, generalmente ad intervalli di 3-4 settimane, per seguire i livelli di CTC durante la terapia. Se un paziente è sottoposto a terapia con doxorubicina, eseguire il prelievo di sangue almeno 7 giorni dopo la somministrazione di una dose di doxorubicina.
2. Prelevare il sangue intero in modo asettico tramite venipuntura o porta venosa esclusivamente in provette CellSave Preservative Tube.
3. Riempire la provetta fino all'arresto del flusso sanguigno, per assicurare il corretto rapporto tra campione e miscela di anticoagulante e conservante. Miscelare immediatamente capovolgendo delicatamente la provetta otto volte. Il capovolgimento della provetta impedisce la formazione di coaguli. Una miscelazione effettuata in modo inadeguato o ritardato può portare a risultati errati.
4. I campioni di sangue possono essere conservati o trasportati nella CellSave Preservative Tube. Fare riferimento alle istruzioni per l'uso della CellSave Preservative Tube per le istruzioni per l'elaborazione, la conservazione e la gestione. Non refrigerare i campioni.

ATTENZIONE: controllare l'eventuale presenza di coaguli in ciascun campione prima dell'elaborazione su CELLTRACKS® AUTOPREP® System. I campioni coagulati devono essere eliminati.

Processazione con il sistema CELLTRACKS® AUTOPREP®

1. Miscelare il sangue nella CellSave Preservative Tube capovolgendo manualmente cinque volte. Quindi togliere il tappo in gomma.
2. Utilizzando una nuova pipetta, trasferire 7,5 mL di sangue dalla CellSave Preservative Tube a una provetta conica per centrifuga CELLSEARCH® da 15 mL adeguatamente etichettata fornita con il kit CTC CELLSEARCH®.
3. Utilizzando una nuova pipetta, aggiungere 6,5 mL di tampone di diluizione.
4. Chiudere la provetta conica per centrifuga CELLSEARCH® e miscelare capovolgendola cinque volte.
5. Centrifugare il campione a 800 x g per 10 minuti con il freno disattivato usando una centrifuga a cestelli basculanti. I 10 minuti di tempo calcolati per la centrifugazione non includono il tempo necessario per raggiungere 800 x g. Impostare il freno della centrifuga su "off" oppure, se la centrifuga in uso dispone di una funzione a freno variabile, impostare il freno nell'opzione minima. Centrifugare a temperatura ambiente usando una centrifuga con funzionalità temperatura ambiente. Dopo la centrifugazione del campione, controllare l'eventuale separazione di plasma e globuli rossi in ciascuna provetta.
6. Processare sul CELLTRACKS® AUTOPREP® System **entro 1 ora** dalla preparazione del campione. Per istruzioni dettagliate, fare riferimento al manuale dell'utente del CELLTRACKS® AUTOPREP® System.

Analisi tramite CELLTRACKS ANALYZER II®

Il sistema CELLTRACKS® AUTOPREP® eroga il campione processato in una cartuccia pronta per l'analisi con CELLTRACKS ANALYZER II®. La cartuccia posta all'interno del supporto cartuccia MAGNEST deve essere lasciata incubare al buio per almeno 20 minuti ed analizzata entro 24 ore. Consultare il Manuale dell'utente del CELLTRACKS ANALYZER II® per istruzioni sull'analisi del campione e la revisione dei dati.

CONTROLLO DI QUALITÀ

CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Control Kit (numero di catalogo 7900003) verifica le prestazioni complessive del sistema, tra cui gli strumenti, i reagenti e le tecniche dell'operatore. Occorre utilizzare un flacone di CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Control per ogni giorno di svolgimento dei test o quando si utilizza un nuovo lotto di kit CTC CELLSEARCH®. Fare riferimento alle istruzioni per l'uso relative al CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Control Kit e ai valori attesi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati vengono riportati come numero di CTC / 7,5 mL di sangue.

Tumore metastatico della mammella (MBC)

Un conteggio delle CTC corrispondente a **5** o ad un valore superiore per 7,5 mL di sangue, in qualunque momento del corso della malattia, viene associato a una diagnosi infausta ed è predittivo di una sopravvivenza senza progressione della malattia più breve e di una sopravvivenza totale più breve.

Tumore metastatico coloretta (MCRC)

Un conteggio delle CTC corrispondente a **3** o ad un valore superiore per 7,5 mL di sangue, in qualunque momento del corso della malattia, viene associato a una diagnosi infausta ed è predittivo di una sopravvivenza senza progressione della malattia più breve e di una sopravvivenza totale più breve.

Tumore metastatico della prostata (MPC)

Un conteggio delle CTC corrispondente a **5** o ad un valore superiore per 7,5 mL di sangue, in qualunque momento del corso della malattia, viene associato a una diagnosi infausta ed è predittivo di una sopravvivenza senza progressione della malattia più breve e di una sopravvivenza totale più breve.

Precauzione

Il carryover da un campione per la conta CTC con **5000 CTC o più** per 7,5 mL di sangue può alterare i campioni che vengono elaborati successivamente sul CELLTRACKS® AUTOPREP® System, incluso il lotto successivo. Se le cellule vengono trasportate in campioni successivi, la conta CTC di questi campioni può essere erroneamente più alta della conta CTC reale del paziente. **Per ulteriori istruzioni, fare riferimento al manuale dell'utente CELLTRACKS® AUTOPREP®.**

LIMITI

- Attenzione: la legge federale statunitense consente la vendita di questo dispositivo solo da parte o per ordinazione di un medico.
- I risultati del CELLSEARCH® devono essere utilizzati insieme a tutte le informazioni cliniche ottenute dai test diagnostici (quali acquisizione di immagini, test di laboratorio), esami fisici e anamnesi completa, conformemente alle procedure adeguate per la gestione dei pazienti.
- Questo studio *prognostico* non dimostra che *una* linea terapeutica corrente ha un effetto minore o maggiore rispetto ad un'altra o rispetto all'assenza di terapia.
- I risultati di CELLSEARCH® e i risultati dell'acquisizione di immagini non sono equivalenti nel valutare la transizione dei pazienti da malattia non progressiva a malattia progressiva.
- Se un paziente è sottoposto a terapia con doxorubicina, eseguire il prelievo di sangue almeno 7 giorni dopo la somministrazione di una dose di terapia. Nel caso in cui i campioni vengono prelevati entro 7 giorni dalla somministrazione di terapia a base di doxorubicina, i risultati di un test CELLSEARCH® devono essere interpretati attentamente.
- Le CTC che non esprimono EpCAM non saranno evidenziate dal test CELLSEARCH®.
- Le CTC che esprimono EpCAM ma non le citocheratine 8, 18 e 19 non saranno evidenziate dal test CELLSEARCH®.
- Sostanze interferenti:
Le cellule SK-BR-3 aggiunte ai campioni di sangue sono state esposte a sostanze potenzialmente interferenti e confrontate con i controlli non trattati. Sono stati testati i livelli tossici (5 volte l'indice terapeutico) dei seguenti farmaci antitumorali, di farmaci da banco e di altre sostanze esogene: ciclofosfamide, Mitomycin C®, Procrit®, biotina, 5-fluorouracile, metotressato, tamoxifen citrato, paclitaxel, Arimidex®, paracetamolo, acido acetilsalicilico, caffeina, destrometorfano, Aredia®, anticorpo umano anti-topo (HAMA) tipo 1, HAMA tipo 2, Herceptin® e ibuprofene. Non essendo stata evidenziata alcuna differenza significativa nei numeri di cellule SK-BR-3, se ne deduce che tali sostanze non interferiscono con il kit CTC CELLSEARCH®.

I campioni aggiunti con livelli tossici di doxorubicina hanno provocato una colorazione aberrante dei leucociti quali citocheratine e cellule doppie positive CD45, come conseguenza del fatto che la doxorubicina è un composto fluorescente incorporato in cellule nucleate. Se presente, il modello di colorazione di tutte le cellule positive per CD45 e citocheratina è evidente e facilmente identificabile dall'operatore come profilo di colorazione dell'interferenza. Se il sangue viene prelevato dopo il periodo di wash-out consigliato di 7 giorni, in seguito all'infusione di doxorubicina, è improbabile osservare tale interferenza nella pratica clinica dati i livelli terapeutici controllati e la rapida clearance dei farmaci.

Una potenziale interferenza da lipemia è stata studiata aggiungendo Intralipidi ai campioni ad una concentrazione di 2,6%, corrispondente ad un valore superiore a 1000 mg/dl di trigliceridi. I campioni sono stati sottoposti a lisi per simulare l'emolisi totale. Sono stati condotti studi su bilirubina a 7,4 mg/dl, HAMA 1/HAMA 2 ed ematocrito da 18 al 60%. Lipemia, emolisi, ittero ed un ampio range di valori di ematocrito non interferiscono con il test CELLSEARCH®. Poiché anche HAMA 1 e HAMA 2 non provocano interferenze, se ne deduce che gli individui che ricevono Ig di topo per vie parenterali possono essere successivamente sottoposti a test CELLSEARCH®.

VALORI ATTESI

Volontari sani, patologie non maligne della mammella, altre patologie non maligne

Su gruppi di controllo composti da 145 volontari sani, 101 donne affette da patologie non maligne della mammella e 99 donne affette da altre patologie non maligne sono state condotte delle analisi delle CTC a singolo punto. Non è prevista la presenza di cellule epiteliali nel sangue periferico di individui sani. Tra i 345 campioni totali provenienti da donatori sani e donne affette da patologie non maligne, solo un soggetto presentava un valore CTC superiore a 5 CTC/7,5 mL. I risultati sono elencati nella **Tabella 1**.

Tabella 1: Soggetti del controllo

Categoria	N.	Media Numero di CTC	SD	N. pazienti con CTC ≥ 5	Min.*	Max.*
Sani	145	0,1	0,2	0	0	1
Patologie non maligne della mammella	101	0,2	1,2	1	0	12
Altre patologie non maligne	99	0,1	0,4	0	0	3

* Direttiva della NCCLS C28-A2³

Volontari sani, patologia coloretale non maligna

Il sangue è stato raccolto da uomini e donne sani di 35 anni o più. Questi volontari sani sono stati iscritti in tre centri USA. Ai fini di questo studio, sono state prelevate due provette di sangue da ciascun soggetto e sono state valutate per i livelli di CTC. È risultato un totale di 150 soggetti valutabili con una o due aliquote separate da 7,5 mL di sangue analizzato per CTC. Non tutti i soggetti valutabili hanno avuto i risultati CTC disponibili da entrambe le provette. Il numero medio di cellule tumorali in circolazione era di 0,0 per entrambi i gruppi di soggetti, con deviazioni standard da 0,1 a 0,2. Tra i 284 campioni totali provenienti da donatori sani (uomini e donne) zero soggetti presentavano un valore superiore a 3 CTC/7,5 mL. I risultati sono mostrati nella **Tabella 2**.

Tabella 2: Risultati per CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell nei soggetti di controllo

Controlli sani	Tutti controlli			Solo maschio			Solo femmina		
	Provetta 1	Provetta 2	Totale	Provetta 1	Provetta 2	Totale	Provetta 1	Provetta 2	Totale
N	149	135	284	68	64	132	81	71	152
Intervallo CTC	0 - 1	0 - 1	0 - 1	0 - 1	0 - 1	0 - 1	0 - 1	0 - 1	0 - 1
CTC media	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DS CTC	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
N. CTC (%) ≥ 1	2 (1%)	4 (3%)	6 (2%)	1 (1%)	1 (2%)	2 (2%)	1 (1%)	3 (4%)	4 (3%)
N. CTC (%) ≥ 2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

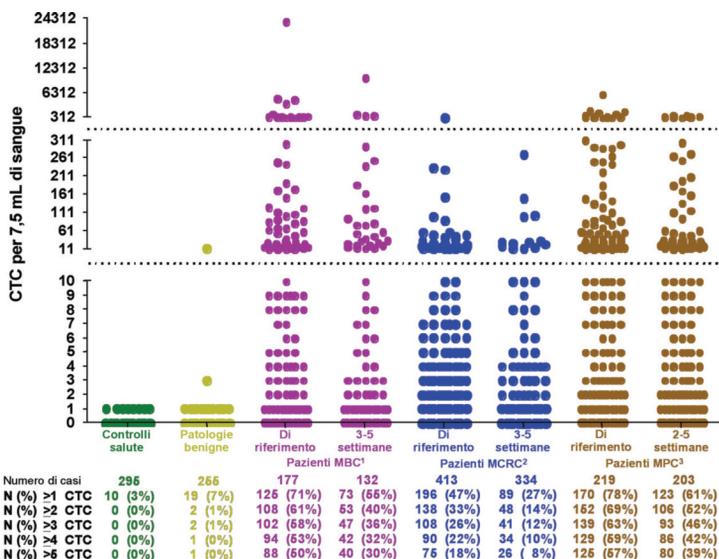
Approssimativamente trenta mL di sangue (per aumentare la probabilità di rilevare le cellule) sono stati raccolti in quattro provette CellSave separate (minimo di 7,5 mL per provetta) da pazienti sottoposti a colonoscopia o a intervento per patologia benigna. Per ciascun soggetto prima della procedura sono stati valutati fino a quattro campioni ematici da 7,5 mL. I risultati sono elencati di seguito nella **Tabella 3**. Non tutti i soggetti valutabili hanno avuto i risultati CTC disponibili da tutte e quattro le provette. Nessuno dei pazienti con patologia coloretale benigna ha avuto più di una singola cellula tumorale in circolazione per ogni campione da 7,5 mL di sangue.

Tabella 3: Risultati per CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell nei soggetti affetti da patologia coloretale benigna

Patologia benigna	Sangue prelevato prima della procedura				
	Provetta 1	Provetta 2	Provetta 3	Provetta 4	Totale
N	55	55	53	47	210
Intervallo	0 - 1	0 - 1	0 - 1	0 - 1	0 - 1
Media	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0
SD	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2
% CTC ≥ 1	3 (5%)	1 (2%)	2 (4%)	4 (9%)	10 (5%)
% CTC ≥ 2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

La **Figura 1** mostra la frequenza di CTC in una combinazione di soggetti sani e affetti da patologia benigna (controlli), e nei pazienti affetti da MBC, MCRC e MPC prima dell'inizio della terapia e dopo circa 1 mese dall'inizio della terapia.

Figura 1: Frequenza di CTC nei controlli (soggetti senza cancro) e pazienti affetti da metastasi alla mammella¹ (MBC), metastasi colorettrale² (MCR) o metastasi alla prostata³ (MPC) prima dell'avvio di una nuova linea di terapia (di riferimento) e ~2-5 settimane dopo l'avvio della terapia.



¹ Informazioni sulla popolazione di riferimento MBC – Tabella 1 delle IFU cliniche.

² Informazioni sulla popolazione di riferimento MCR – Tabella 12 delle IFU cliniche.

³ Informazioni sulla popolazione di riferimento MPC – Tabella 22 delle IFU cliniche.

CARATTERISTICHE DELLA PRESTAZIONE

Recupero

I campioni di sangue provenienti da un singolo donatore sano sono stati messi in pool e a cinque delle sei aliquote da 7,5 mL sono state aggiunte circa 1300, 325, 81, 20 e 5 cellule di cancro alla mammella in coltura (SK-BR-3). La sesta provetta conteneva sangue in pool senza aggiunte e fungeva da punto zero. Questi campioni sono stati elaborati nel sistema CELLTRACKS® AUTOPREP® con CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Kit e i conteggi di CTC sono stati determinati su CELLTRACKS ANALYZER II®. L'esperimento è stato ripetuto per altri quattro donatori. I conteggi di cellule osservati sono stati confrontati con i risultati del conteggio di cellule previsto. I risultati sono riassunti nella **Tabella 4**.

Tabella 4: Stime di evidenziazione percentuale.

Conteggio cellule tumorali previsto	Media osservata	Conteggio cellule tumorali	Range di recupero percentuale
1300		1215	dal 91 al 95%
325		308	dall'82 al 101%
81		85	dall'80 al 136%
20		22	dal 95 al 140%
5		7	dal 120 al 200%

Per determinare l'adattamento globale, o l'adattamento ai minimi quadrati, per il confronto dei conteggi cellulari osservati e previsti sulla base di tutti i dati, è stata eseguita un'analisi di regressione lineare. L'equazione di regressione per questi 30 campioni era $Y = 0,93x + 3,87$ con $R^2 = 0,999$ ($R = 0,999$). I risultati di questo studio indicano che in media, nel range di CTC analizzate, il recupero risultante dall'analisi di regressione corrisponde al 93%.

In base alla risposta lineare dei conteggi di cellule tumorali, si potrebbe presumere che la pendenza del grafico osservato rispetto a quello previsto fosse di 1,0. Tuttavia, la pendenza era di 0,93. Ciò è dovuto al fatto che il CELLTRACKS® AUTOPREP® System con CELLSEARCH® CTC Kit prevede la cattura e la marcatura fluorescente delle cellule, nonché la loro evidenziazione ed enumerazione tramite il CELLTRACKS ANALYZER II®. La perdita di cellule potrebbe quindi essere attribuita ad una delle seguenti cause: 1) recupero solo del 93% delle cellule tumorali aggiunte ai 7,5 mL di sangue dal CELLTRACKS® AUTOPREP® System, 2) evidenziazione solo del 93% delle cellule tumorali presenti nella camera del campione da parte del CELLTRACKS ANALYZER II® oppure 3) una combinazione di entrambe le cause di errore.

Range di linearità/lettura

Un altro metodo per esaminare i dati precedenti consiste nell'analizzare le serie di diluizioni per valutare la linearità del test. È stata rimossa la variabile di recupero percentuale che crea confusione utilizzando il valore osservato del campione iniziale nella serie di diluizione (cioè la prima provetta) diviso per i fattori di diluizione al fine di determinare i valori attesi per le serie di diluizioni relativamente a ciascun campione di paziente. La regressione di tutti questi numeri di cellule tumorali osservati rispetto ai numeri di cellule tumorali previsti ha prodotto una pendenza di 1,007, un'intercetta di 3,0 e $R^2 = 0,990$ ($R = 0,995$). Pertanto, dopo avere fattorizzato il recupero percentuale (perdita cellulare) dai valori della CTC per ciascuno dei campioni iniziali, questa analisi dei dati ha dimostrato che la rilevazione delle CTC risultava lineare rispetto al range di lettura compreso tra 0 e 1238 cellule tumorali.

Limiti della rilevazione

Una CTC per 7,5 mL può essere evidenziata dal CELLTRACKS ANALYZER II® con conseguente limite di rilevazione di 1 CTC in una cartuccia. La regressione lineare mostra che in media il 93% delle CTC presenti in un campione di sangue da 7,5 mL viene recuperato tramite il CELLTRACKS® AUTOPREP® System (vedere la sezione **Recupero**). La perdita approssimativa del 7% delle CTC nel campione non è sufficiente a ridurre il limite di rilevazione di 1 CTC.

Riproducibilità:

a. Riproducibilità del sistema con controllo per cellule tumorali circolanti CELLSEARCH®

Tre campioni separati di controllo per cellule tumorali circolanti CELLSEARCH® sono stati preparati ed elaborati quotidianamente per oltre 30 giorni, conformemente al metodo di lungo termine previsto dalla direttiva NCCLS EP5-A2. Ciascun flacone di campione monouso contiene una concentrazione bassa ed una elevata di cellule provenienti da una linea cellulare fissa che sono state precolorate con due diversi fluorocromi. Di seguito vengono riassunte le statistiche relative alle cellule per controllo elevato e basso.

Tabella 5: Riepilogo delle analisi sulla precisione

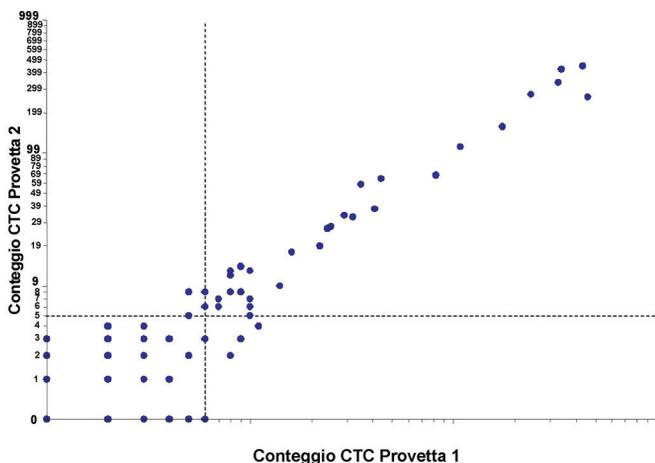
	Basso	Alto
N	99	99
Conteggio cellulare medio	48	969
CV in % della deviazione standard (Ds) della precisione totale	18%	5%

b. Riproducibilità del sistema con campioni delle pazienti con

Tumore metastatico della mammella (MBC)

Nel corso dello studio clinico sono stati raccolti 163 campioni di sangue in duplicato da 47 pazienti affette da metastasi della mammella. Questi campioni sono stati elaborati in più siti per determinare la riproducibilità delle misurazioni CTC. L'equazione di regressione per il confronto di questi 163 campioni duplicati era $Y = 0,98x + 0,67$, $R^2 = 0,99$. La **Figura 2** mostra un grafico a dispersione dei risultati CTC duplicati nel sangue dalle pazienti MBC con grafico su scala logaritmica, con la soglia di CTC 5 indicata dalle linee tratteggiate.

Figura 2: Riproducibilità dei conteggi delle CTC in campioni MBC in duplicato (n = 163) con una media di CTC <5 o ≥ 5 per 7,5 mL di sangue.

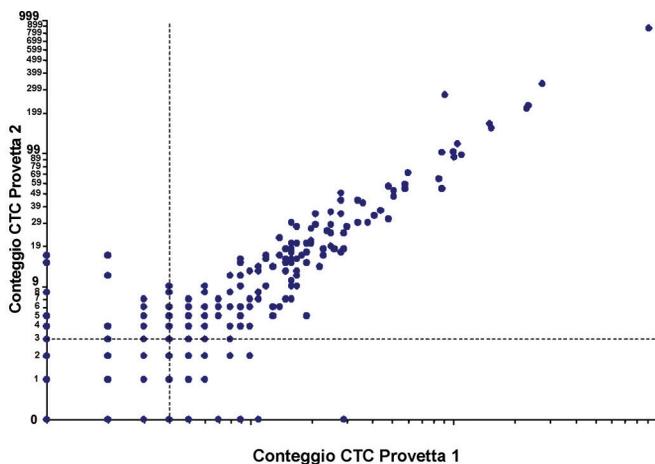


Nota Figura 2: potrebbe esserci più di un punto sovrapposto ad un altro. Ad esempio, in questo grafico, vi sono 50 casi (31%) in cui entrambe le provette presentavano CTC 0, 18 casi (11%) in cui la provetta 1 presentava CTC 0 e la provetta 2 presentava CTC 1 e altri 18 casi (11%) in cui la provetta 1 presentava CTC 1 e la provetta 2 presentava CTC 0.

Tumore metastatico colorettales (MCRC)

Nel corso dello studio clinico sono stati raccolti 1,627 campioni di sangue in duplicato da 430 pazienti MCRC. Questi campioni sono stati elaborati in più siti per determinare la riproducibilità delle misurazioni CTC. L'equazione di regressione per il confronto di questi 1,627 campioni duplicati era $Y = 0,98x + 0,18$, $R^2 = 0,96$. La Figura 3 mostra un grafico a dispersione dei risultati CTC duplicati nel sangue dai pazienti MCRC con grafico su scala logaritmica, con la soglia di CTC 3 indicata dalle linee tratteggiate.

Figura 3: Riproducibilità dei conteggi delle CTC in campioni MCRC in duplicato (n = 1627) con una media di CTC <3 o ≥ 3 per 7,5 mL di sangue.



Nota Figura 3: potrebbe esserci più di un punto sovrapposto ad un altro. Ad esempio, in questo grafico, vi sono 975 casi (60%) in cui entrambe le provette presentavano CTC 0, 116 casi (7%) in cui la provetta 1 presentava CTC 0 e la provetta 2 presentava CTC 1 e altri 109 casi (7%) in cui la provetta 1 presentava CTC 1 e la provetta 2 presentava CTC 0.

La variazione provetta per provetta dei conteggi CTC nei campioni di sangue delle pazienti affette da metastasi alla mammella e tumore colorettales è riportata nelle **Figura 2 e 3**. La distribuzione degli eventi infrequenti (come le cellule tumorali) all'interno di un dato volume è casuale e indipendente dal tipo di cellula o di patologia. Ciò è meglio caratterizzato dalla distribuzione di Poisson: un metodo matematico impiegato per i sistemi di modelli dove la probabilità che si verifichi un evento è molto bassa ma il numero di opportunità che si verifichi tale evento è grande⁵. Per le provette con poche CTC della prostata è ragionevole attendersi una variazione nei risultati simile a quella illustrata nelle **Figura 2 e 3**. Dal momento che i due studi precedenti nei pazienti affetti da MBC e MCRC ha mostrato risultati pressoché identici, un confronto provetta per provetta dei conteggi delle CTC nei campioni di sangue nei pazienti affetti da metastasi alla prostata non è stata eseguita durante le prove cliniche di CTC della prostata con CELLSEARCH®. Tuttavia, i risultati di uno studio indipendente che usa la tecnologia CELLSEARCH® condotto al Memorial Sloan-Kettering Cancer Center ha dimostrato che non vi è alcuna variazione sistematica da sito a sito o da provetta a provetta nei conteggi delle CTC in un intervallo compreso tra 0 e 1192 CTC per provetta nei pazienti affetti da metastasi alla prostata⁴.

BIBLIOGRAFIA

1. Cancer Biology, 3rd edition, Ray Ruddon 1995
2. NCCLS Approved Guideline EP5-A, "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices".
3. NCCLS Approved Guideline C28-A2, "How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory".
4. Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, Gu B, Anand A, Smith K, Maslak, P, Doyle GV, Terstappen LWMM, Lilja H, Heller G, Fleisher M and Scher H. "Circulating Tumor Cell Analysis in Patients with Progressive Castration-Resistant Prostate Cancer", Clinical Cancer Research, Vol 13 No.7: 2023-2029, (2007).
5. Tibbe A.G.J, Miller C.M and Terstappen LWMM "Statistical Considerations for Enumeration of Circulating Tumor Cells", Cytometry Part A 71a:154-162 (2007).

REF 7900001

Kit da 16 determinazioni



**Circulating Tumor Cell Kit
(Epiteliali)**

RISULTATI DEGLI STUDI CLINICI

Indice

1	Pazienti affette da tumore metastatico della mammella (MBC)	6
1.1	Frequenze CTC8	6
1.2	Analisi della sopravvivenza libera da progressione della malattia (PFS) nelle pazienti affette da MBC	7
1.2.1	PFS con i risultati delle CTC di riferimento	7
1.2.2	PFS utilizzando i risultati CTC di follow-up	7
1.2.3	La riduzione o l'aumento dei valori CTC sono predittivi di una PFS migliorata o diminuita	8
1.3	Analisi della sopravvivenza totale delle pazienti affette da MBC	9
1.3.1	Analisi OS con risultati CTC di riferimento	9
1.3.2	OS con risultati CTC di follow-up	10
1.3.3	La riduzione o l'aumento dei valori CTC sono predittivi di una OS migliorata o diminuita	11
1.3.4	Analisi univariata della regressione di Cox nelle pazienti affette da MBC	12
1.3.5	Analisi multivariata della regressione di Cox nelle pazienti affette da MBC	12
1.4	Uso di CTC per monitorare lo stato clinico del tumore metastatico della mammella	14
1.4.1	Relazione fra sopravvivenza, CTC e valutazione della patologia tramite acquisizione di immagini	14
1.4.2	CTC	14
1.4.3	Acquisizione di immagini	15
1.4.4	Relazione fra sopravvivenza all'acquisizione di immagini e CTC	15
1.4.5	Concordanze fra CTC e monitoraggio radiologico	17
1.4.6	CTC come complemento all'acquisizione di immagini	19
1.5	Variabilità della CTC e delle valutazioni radiologiche	19
1.5.1	CTC	19
1.5.2	Acquisizione di immagini	19
2	Pazienti con tumore metastatico coloretale (MCRC)	20
2.1	Frequenze CTC27	21
2.2	Analisi della sopravvivenza libera da progressione della malattia (PFS) dei pazienti affetti da MCRC	22
2.2.1	Analisi della PFS utilizzando i risultati delle CTC di riferimento	22
2.2.2	PFS con i risultati CTC del follow-up	22
2.2.3	La riduzione o l'aumento nei valori CTC sono predittivi di PFS migliorata o diminuita	23
2.3	Analisi della sopravvivenza totale dei pazienti affetti da MCRC	24
2.3.1	Analisi OS con risultati CTC di riferimento	24
2.3.2	Analisi della OS utilizzando i risultati CTC di follow-up	25
2.3.3	L'aumento o la riduzione dei valori CTC sono predittivi di una OS migliorata o diminuita	26
2.3.4	Analisi univariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MCRC	27
2.3.5	Analisi multivariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MCRC	27
2.4	Uso di CTC per monitorare lo stato clinico del tumore metastatico coloretale	28
2.4.1	Relazione fra sopravvivenza, CTC e valutazione della patologia tramite acquisizione di immagini	28
2.4.2	CTC	29
2.4.3	Acquisizione di immagini	29
2.4.4	Relazione fra sopravvivenza all'acquisizione di immagini e CTC	29
2.4.5	Concordanze fra CTC e monitoraggio radiologico nei pazienti MCRC	31
2.4.6	CTC come complemento all'acquisizione di immagini	32

3	Pazienti con tumore metastatico della prostata (MPC)	33
3.1	Frequenze CTC.....	34
3.2	Analisi della sopravvivenza libera da progressione della malattia (PFS) dei pazienti affetti da MPC.....	35
3.2.1	Analisi della PFS utilizzando i risultati delle CTC di riferimento.....	35
3.2.2	Analisi della PFS utilizzando i risultati CTC di follow-up.....	36
3.2.3	La riduzione o l'aumento dei valori CTC sono predittivi di PFS migliorate o diminuite.....	37
3.3	Analisi della sopravvivenza totale (OS) nei pazienti affetti da MPC.....	37
3.3.1	Analisi della OS utilizzando i risultati CTC di riferimento.....	37
3.3.2	OS con risultati CTC di follow-up.....	38
3.3.3	La riduzione o l'aumento delle CTC sono predittivi di una OS migliorata o diminuita.....	39
3.3.4	Analisi univariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MPC.....	40
3.3.5	Analisi multivariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MPC.....	41
3.4	Uso di CTC per monitorare lo stato clinico dei pazienti affetti da tumore metastatico alla prostata.....	43
3.4.1	Relazione fra sopravvivenza, CTC e valutazione della patologia tramite PSA.....	43
3.4.2	Concordanze tra CTC e le modifiche della PSA nei pazienti MPC.....	44
3.4.3	La combinazione dei livelli CTC e della riduzione PSA è predittiva della OS nei pazienti affetti da MPC.....	46

Elenco delle tabelle

Tabella 1:	Dati demografici delle pazienti MBC.....	6
Tabella 2:	Sopravvivenza senza progressione della malattia (PFS) per pazienti con MBC con CTC <5 o ≥ 5 in diverse fasi.....	8
Tabella 3:	Sopravvivenza globale (OS) per le pazienti affette da MBC con CTC <5 o ≥ 5 in diverse fasi temporali.....	11
Tabella 4:	Analisi univariata della regressione di Cox nelle pazienti affette da MBC.....	12
Tabella 5:	Analisi multivariata della regressione di Cox senza progressione della malattia nelle pazienti affette da MBC.....	13
Tabella 6:	Analisi multivariata della regressione di Cox per la sopravvivenza globale nelle pazienti affette da MBC.....	14
Tabella 7:	OS di pazienti affette da MBC con valutazione delle CTC circa un mese dopo l'inizio della terapia ed entro un mese dalla valutazione radiologica.....	16
Tabella 8:	Confronto in relazione alla paziente tra CTC e acquisizione di immagini.....	18
Tabella 9:	Confronto in relazione all'osservazione tra CTC e acquisizione di immagini.....	18
Tabella 10:	Confronto in relazione alla paziente tra CTC e acquisizione di immagini.....	18
Tabella 11:	Variabilità delle valutazioni radiologiche e CTC nelle pazienti con MBC.....	20
Tabella 12:	Dati demografici paziente MCRC.....	21
Tabella 13:	Esclusioni dalle analisi della sopravvivenza senza progressione della malattia e della sopravvivenza totale nei pazienti MCRC.....	21
Tabella 14:	Sopravvivenza senza progressione della malattia (PFS) per pazienti con MCRC con CTC <3 o ≥ 3 in diverse fasi.....	23
Tabella 15:	Sopravvivenza globale (OS) per i pazienti con MCRC con CTC <3 o ≥ 3 in diverse fasi.....	26
Tabella 16:	Analisi univariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MCRC.....	27
Tabella 17:	Analisi multivariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MCRC.....	28
Tabella 18:	OS di pazienti MCRC con valutazione CTC circa un mese dopo l'inizio della terapia ed entro un mese dalla valutazione radiologica.....	30
Tabella 19:	Confronto in relazione al paziente tra CTC e acquisizione di immagini.....	31
Tabella 20:	Confronto in relazione all'osservazione tra CTC e acquisizione di immagini in pazienti MCRC.....	32
Tabella 21:	Confronto in relazione al paziente tra CTC e acquisizione di immagini.....	32
Tabella 22:	Dati demografici del paziente MPC.....	34

Tabella 23: Esclusioni dalle analisi PFS e OS nei pazienti MPC	35
Tabella 24: La sopravvivenza senza progressione della malattia (PFS) per i pazienti MPC con CTC <5 o ≥ 5 in fasi diverse	36
Tabella 25: Sopravvivenza globale (OS) per i pazienti con MPC con CTC <5 o ≥ 5 in diverse fasi	39
Tabella 26: Analisi univariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MPC	41
Tabella 27: Analisi multivariata della regressione di Cox nelle pazienti affette da MPC	42
Tabella 28: Confronto della OS media tra gruppi CTC e riduzione PSA favorevoli e non favorevoli	44
Tabella 29: Confronto in relazione al paziente in pazienti MPC tra CTC e una riduzione della PSA del 30% a 2-5 settimane	45
Tabella 30: Confronto in relazione al paziente in pazienti MPC tra CTC e una riduzione PSA del 30% a 13-20 settimane	45
Tabella 31: Confronto in relazione all'osservazione in pazienti con MPC tra CTC e una riduzione della PSA del 30%	45

Elenco delle figure

Figura 1: PFS di pazienti affette da MBC con CTC di riferimento <5 o ≥ 5 (N = 177)	7
Figura 2: PFS di pazienti MBC con CTC <5 o ≥ 5 in momenti diversi del follow-up	8
Figura 3: Una riduzione di CTC ad un valore inferiore a 5 dopo l'inizio della terapia è predittiva di un aumento della PFS nei pazienti affetti da MBC	9
Figura 4: OS di pazienti affetti da MBC con CTC <5 o ≥ 5 al riferimento (N = 177)	10
Figura 5: OS di pazienti affette da MBC con CTC <5 o ≥ 5 in fasi diverse del follow-up	10
Figura 6: Una riduzione di CTC ad un valore inferiore a 5 dopo l'inizio della terapia è predittiva di un aumento della OS, mentre un aumento ad un valore di CTC uguale o maggiore di 5 è predittivo di una OS più breve nei pazienti con MBC	11
Figura 7: Correlazione fra valutazione radiologica e CTC con OS: OS di pazienti con MBC con NPD o PD al 1° studio di acquisizione immagini di follow-up (N = 138)	16
Figura 8: Correlazione fra valutazione radiologica e CTC con OS: OS di pazienti MBC con CTC <5 oppure ≥ 5 al 1° follow-up dopo l'inizio della terapia (N = 138)	17
Figura 9: Correlazione fra valutazione radiologica e CTC con OS: OS di pazienti MBC con CTC <5 o ≥ 5 entro ± 1 mese dal 1° studio di acquisizione immagini di follow-up (N = 134)	17
Figura 10: OS di pazienti MBC nei gruppi 1, 2, 3 e 4 utilizzando la valutazione CTC del 1° follow-up dall'inizio della terapia (n = 138) e lo stato della patologia determinato nello studio di immagini al 1° follow-up	19
Figura 11: PFS di pazienti MCRC con CTC <3 o ≥ 3 al riferimento (N = 413)	22
Figura 12: PFS di pazienti MCRC con CTC <3 o ≥ 3 in momenti diversi del follow-up	23
Figura 13: Una riduzione di CTC ad un valore inferiore a 3 dopo l'inizio della terapia è predittiva di un aumento della PFS nei pazienti affetti da MCRC	24
Figura 14: OS di pazienti affetti da MCRC con CTC <3 o ≥ 3 al riferimento (N = 413)	25
Figura 15: OS di pazienti MCRC con CTC <3 o ≥ 3 in momenti diversi del follow-up	25
Figura 16: Una riduzione di CTC ad un valore inferiore a 3 dopo l'inizio della terapia è predittiva di un aumento della OS, mentre un aumento ad un valore di CTC uguale o maggiore di 3 è predittivo di una OS più breve nei pazienti con MCRC	26
Figura 17: Correlazione fra valutazione radiologica e CTC con OS: OS di pazienti MCRC con NPD o PD al 1° studio di immagini di follow-up (N = 402)	30
Figura 18: Correlazione fra valutazione radiologica e CTC con OS: OS di pazienti MCRC con CTC <3 o ≥ 3 al 1° follow-up dopo l'inizio della terapia (N = 320)	30
Figura 19: Correlazione fra valutazione radiologica e CTC con OS: OS di pazienti MCRC con CTC <3 o ≥ 3 entro ± 1 mese al 1° studio di immagini di follow-up o decesso (N = 364)	31
Figura 20: OS di pazienti MBC nei gruppi 1, 2, 3 e 4 utilizzando la valutazione CTC a 3-5 settimane dall'inizio della terapia (n = 320) e lo stato della patologia determinato nello studio di immagini al 1° follow-up	33
Figura 21: PFS di pazienti affetti da MPC con CTC <5 o ≥ 5 al riferimento (N = 219)	35
Figura 22: PFS di pazienti con MPC con CTC <5 o ≥ 5 in momenti differenti del follow-up	36

Figura 23: Una riduzione di CTC ad un valore inferiore a 5 dopo l'inizio della terapia è predittiva di un aumento della PFS nei pazienti affetti da MPC.....	37
Figura 24: OS di pazienti affetti da MPC con CTC <5 o ≥ 5 al riferimento (N = 219).....	38
Figura 25: OS di pazienti con MPC con CTC <5 o ≥ 5 in fasi diverse del follow-up.....	38
Figura 26: Una riduzione di CTC ad un valore inferiore a 5 dopo l'inizio della terapia è predittiva di un aumento della OS, mentre un aumento ad un valore di CTC uguale o maggiore di 5 è predittivo di una OS più breve nei pazienti con MPC.....	39
Figura 27: OS dei pazienti MPC 2-5 settimane dopo l'inizio della terapia.....	43
Figura 28: OS dei pazienti MPC 6-8 settimane dopo l'inizio della terapia.....	43
Figura 29: OS dei pazienti MPC 9-12 settimane dopo l'inizio della terapia.....	43
Figura 30: OS dei pazienti MPC 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia.....	44
Figura 31: La combinazione dei livelli CTC e delle modifiche della PSA è predittiva della OS a 2-5 settimane (pannello A), 6-8 settimane (pannello B), 9-12 settimane (pannello C), e 13-20 settimane (pannello D) dopo l'inizio della terapia.....	46

1 Pazienti affette da tumore metastatico della mammella (MBC)

È stato condotto uno studio clinico prospettico multicentrico per determinare se il numero delle CTC è predittivo della progressione della malattia e della sopravvivenza. Sono state reclutate pazienti con tumore metastatico della mammella con patologia misurabile (N = 177) che stavano iniziando una nuova linea terapeutica. I dati clinici sono stati analizzati su base "intent-to-treat". Le informazioni demografiche sulle pazienti sono presentate nella **Tabella 1**.

Tabella 1: Dati demografici delle pazienti MBC

Categoria		Pazienti N=177
Età di riferimento	Deviazione Media ± Std. Mediana	58 ± 13 58
	Descrizione delle categorie	Numero di soggetti (% del totale)
Fase	1	26 (15%)
	2	92 (52%)
	3	26 (15%)
	4	20 (11%)
	Non nota	13 (7%)
Razza	Bianca	153 (86%)
	Nera	14 (8%)
	Ispanica	7 (4%)
	Non nota	3 (2%)
Punteggio ECOG di riferimento	0	82 (46%)
	1	72 (41%)
	2	18 (10%)
	Non nota	5 (3%)
Sito della patologia	Viscerale	152 (86%)
	Osso	153 (86%)
ER/PR	+	121 (68%)
	-	54 (31%)
	Non nota	2 (1%)
HER2	0	91 (51%)
	1+	12 (7%)
	2+	18 (10%)
	3+	27 (15%)
	Non nota	29 (17%)
Linea terapeutica	1ª riga	82 (46%)
	2ª riga	26 (15%)
	≥ 3ª riga	67 (38%)
	Non nota	2 (1%)
Tipo di terapia	Chemio (Ch)	74 (42%)
	Endocrina (En)	45 (25%)
	Mirata (Ta)	9 (5%)
	Ch/En	10 (6%)
	Ch/Ta	23 (13%)
	En/Ta	7 (4%)
	Ch/En/Ta	2 (1%)
	Varie	2 (1%)
	Non nota	5 (3%)

Il conteggio delle CTC di riferimento è stato determinato prima dell'inizio di una nuova linea terapeutica. Dopo l'inizio della terapia, sono stati determinati conteggi di CTC di follow-up ad intervalli di circa 3-4 settimane. Per le analisi di riferimento, la sopravvivenza senza progressione della malattia (PFS – Progression Free Survival) è stata misurata a partire dal momento del prelievo del sangue di riferimento fino alla diagnosi di progressione tramite scansioni delle CTC e/o dei sintomi e dei segni clinici, mentre la sopravvivenza totale (OS – Overall Survival) è stata misurata dal momento del prelievo del sangue di riferimento fino al momento del decesso. Per le analisi di follow-up, la PFS è stata misurata dal momento del prelievo di sangue di follow-up fino alla diagnosi di progressione o al decesso, mentre la OS è stata misurata dal momento del prelievo di sangue di follow-up fino al momento del decesso.

1.1 Frequenze CTC

I risultati CTC ottenuti dai prelievi di sangue di follow-up alle settimane 3-5, 6-8, 9-12 e 13-20 dopo l'inizio della terapia sono stati classificati come favorevoli (CTC <5) o non favorevoli (CTC ≥ 5). Se si era ottenuto più di un valore CTC entro i punti temporali di follow-up stabiliti, è stato usato il risultato CTC ottenuto nel prelievo più lontano dal prelievo di riferimento.

Su 177 pazienti con MBC, 23 non sono risultate valutabili al primo follow-up. Di queste 23 pazienti, dieci sono decedute prima di poter effettuare un prelievo di sangue di follow-up, nove hanno presentato progressione prima del prelievo di sangue di follow-up e quattro non si sono presentate al follow-up. In particolare, ciascuna delle dieci pazienti decedute presentava conteggi di CTC di riferimento da ≥ 5 a valori estremamente elevati (conteggi CTC 9, 11, 15, 24, 111, 126, 301, 1143, 4648 e 23618). Delle 154 pazienti disponibili per il follow-up, 132, 99, 129 e 85 pazienti sono state sottoposte a prelievo di sangue rispettivamente a 3-5, 6-8, 9-14 e 15-20 settimane dopo l'inizio della terapia.

Tabella 3 La riepiloga il numero totale e la percentuale di pazienti con CTC non favorevole nella prova clinica per la sopravvivenza globale che differisce per numeri e percentuali di pazienti per sopravvivenza senza progressione della malattia mostrati in **Tabella 2**. La differenza nel numero di pazienti in ciascuna fase tra le due tabelle è dovuta alla progressione di alcuni pazienti prima del prelievo di sangue. La differenza nel numero di pazienti all'interno delle tabelle è dovuta al numero di pazienti con prelievi di sangue e ai risultati CTC valutabili in ciascuna fase.

1.2 Analisi della sopravvivenza libera da progressione della malattia (PFS) nelle pazienti affette da MBC

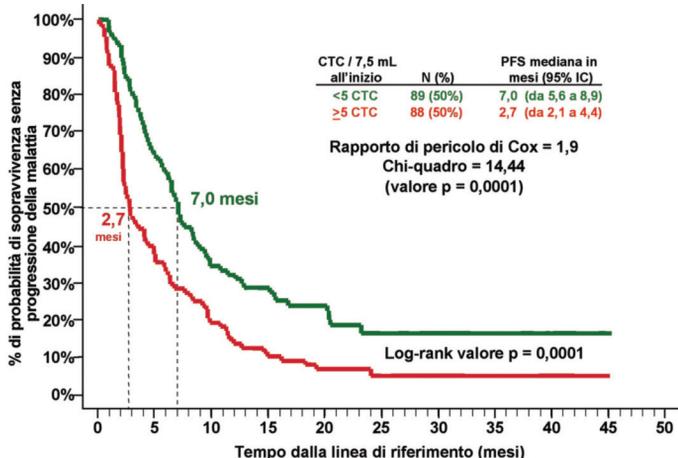
1.2.1 PFS con i risultati delle CTC di riferimento

Tutte le 177 pazienti affette da MBC sono state sottoposte ad analisi delle CTC di riferimento. Per l'analisi di Kaplan-Meier, le pazienti sono state segmentate in due gruppi a seconda del rispettivo conteggio CTC di riferimento:

- Il gruppo favorevole (N = 89), rappresentato in **verde**, era formato da pazienti con CTC <5.
- Il gruppo non favorevole (N = 88), rappresentato in **rosso**, era formato da pazienti con CTC ≥ 5.

La PFS mediana era sostanzialmente più lunga nel gruppo favorevole a confronto con il gruppo non favorevole (7,0 vs 2,7 mesi, rispettivamente). Questi risultati sono illustrati in **Figura 1**.

Figura 1: PFS di pazienti affette da MBC con CTC di riferimento <5 o ≥ 5 (N = 177).



1.2.2 PFS utilizzando i risultati CTC di follow-up

Per l'analisi di Kaplan-Meier, le pazienti affette da MBC sono state segmentate in due gruppi a seconda del rispettivo conteggio CTC in ciascuno dei vari prelievi di sangue di follow-up: entrambi i gruppi di pazienti in ciascuno dei diversi tempi del prelievo di follow-up dopo l'avvio della terapia per PFS sono illustrati in **Figura 2**. Le fasi PFS sono state calcolate dal momento del prelievo e tutte le pazienti che hanno mostrato evidenza di progressione a un particolare prelievo di sangue sono state escluse dall'analisi di quello e di tutti i successivi prelievi di sangue. La **Figura 2** illustra la capacità delle CTC, nei pazienti con CTC <5 e ≥ 5 a 3-5 settimane, 6-8 settimane, 9-14 settimane e 15-20 settimane dopo l'inizio della terapia, di predire le fasi della progressione clinica in 177 pazienti affette da metastasi alla mammella.

- Il gruppo favorevole, rappresentato in **verde oliva, blu, viola e ciano**, era composto da pazienti con CTC <5,
- Il gruppo non favorevole, rappresentato in **marrone, nero, grigio e arancione**, era composto da pazienti con CTC ≥ 5.

Figura 2: PFS di pazienti MBC con CTC <5 o ≥ 5 in momenti diversi del follow-up

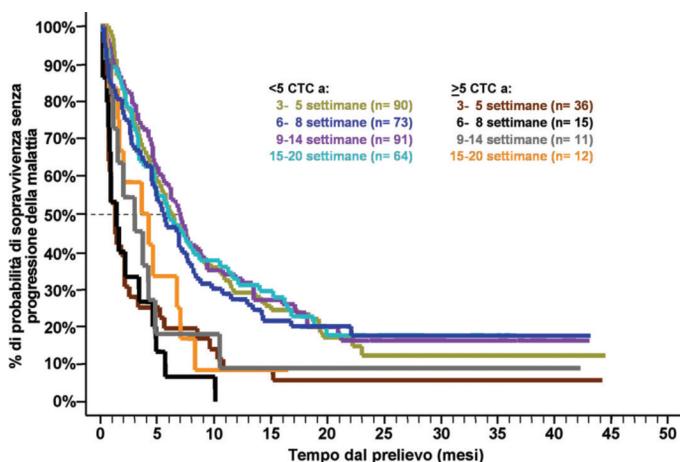


Tabella 2 La riepiloga i risultati dell'analisi PFS usando i livelli di CTC ed una soglia di CTC ≥ 5/7,5 mL a ciascuno dei vari prelievi di sangue.

Tabella 2: Sopravvivenza senza progressione della malattia (PFS) per pazienti con MBC con CTC <5 o ≥ 5 in diverse fasi

1	2	3	4	5	6
Tempo di campionam. dopo inizio Tx	N	CTC ≥ 5	PFS mediana in mesi (95% IC)		Log-rank valore p
			CTC <5	CTC ≥ 5	
Riferimento	177	88 (50%)	7,0 (da 5,6 a 8,9)	2,7 (da 2,1 a 4,4)	0,0001
3-5 settimane	126	36 (29%)	6,1 (da 4,7 a 8,6)	1,3 (da 0,7 a 2,1)	<0,0001
6-8 settimane	88	15 (17%)	5,6 (da 4,5 a 7,6)	1,4 (da 0,6 a 3,4)	0,0001
9-14 settimane	102	11 (11%)	7,0 (da 5,1 a 8,8)	3,0 (da 0,9 a 4,8)	0,0251
15-20 settimane	76	12 (16%)	5,9 (da 3,8 a 8,7)	3,6 (da 0,7 a 7,0)	0,0610

Come mostrato in **Figura 2** e **Tabella 2**, i pazienti con valore CTC elevato (CTC ≥ 5/7,5 mL di sangue intero) in qualunque momento presentavano una maggiore probabilità di progressione rapida rispetto a quelli con CTC <5. La **Tabella 2**, colonna 4 mostra che i tempi di PFS mediana per le pazienti con CTC <5 erano compresi tra 5,6 e 7,0 mesi ed erano sostanzialmente più lunghi rispetto ai tempi di PFS mediana per le pazienti con CTC ≥ 5, che erano compresi tra 1,3 e 3,6 mesi (colonna 5).

1.2.3 La riduzione o l'aumento dei valori CTC sono predittivi di una PFS migliorata o diminuita

Il tempo di PFS trascorso è stato calcolato dal prelievo di sangue di riferimento. Per l'analisi di Kaplan-Meier (**Figura 3**), le pazienti con MBC sono state segmentate in quattro gruppi in base ai conteggi di CTC di riferimento, a 3-5 settimane, a 6-8 settimane, a 9-14 settimane e a 15-20 settimane dopo l'inizio della terapia:

- Gruppo 1 (curva **verde**), 83 (47%) pazienti con CTC <5 in tutte le fasi di prelievo di sangue. Cinque (6%) di queste pazienti sono state sottoposte solo al prelievo di riferimento e due (2%) sono state sottoposte a un singolo prelievo tra il primo e l'ultimo prelievo con risultato CTC ≥ 5.
- Gruppo 2 (curva **blu**), 38 (21%) pazienti con CTC ≥ 5 prima dell'inizio della terapia con una diminuzione a CTC <5 al momento dell'ultimo prelievo;
- Gruppo 3 (curva **arancione**), 17 (10%) pazienti con CTC <5 al primo prelievo (riferimento, a 3-5 settimane e/o 6-8 settimane) con un aumento a ≥ CTC 5 al momento dell'ultimo prelievo;
- Gruppo 4 (curva **rossa**), 39 (22%) pazienti con CTC ≥ 5 in tutte le fasi di prelievo. Dieci (26%) di questi pazienti sono stati sottoposti solo a un prelievo di riferimento.

Figura 3: Una riduzione di CTC ad un valore inferiore a 5 dopo l'inizio della terapia è predittiva di un aumento della PFS nei pazienti affetti da MBC

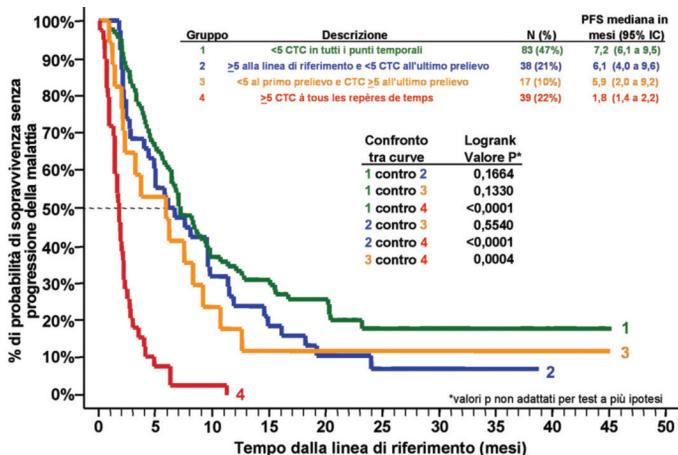


Figura 3 La mostra che le pazienti affette da MBC con CTC ≥ 5 in tutte le fasi (**Gruppo 4**) presentavano la PFS mediana più breve, che era sostanzialmente diversa a confronto con la PFS mediana del **Gruppo 3**, **Gruppo 2** e **Gruppo 1**. Le differenze tra le curve degli altri gruppi in questa figura non sono significative.

1.3 Analisi della sopravvivenza totale delle pazienti affette da MBC

1.3.1 Analisi OS con risultati CTC di riferimento

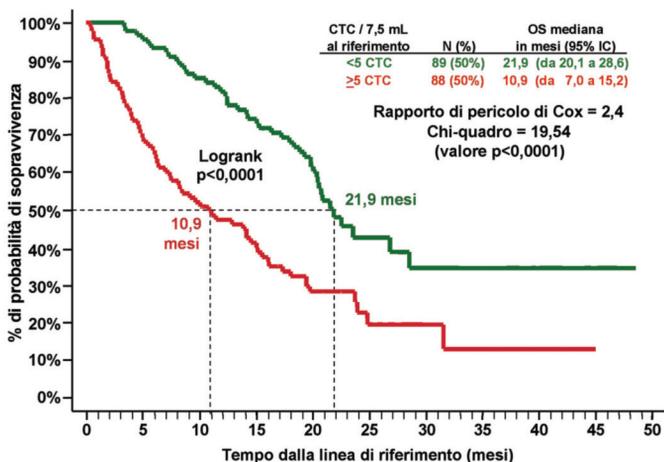
Decesso di 109 (62%) delle 177 pazienti con MBC, con una durata media di follow-up per le 68 (38%) pazienti ancora vive di $22,7 \pm 9,4$ mesi (mediana = 21,1, intervallo = 4,4 – 48,6). Al momento delle analisi, 44 (49%) delle 89 pazienti del gruppo favorevole (CTC di riferimento <5) rispetto a 65 (74%) delle 88 pazienti del gruppo non favorevole (CTC di riferimento >5) erano decedute.

Per l'analisi di Kaplan-Meier, le pazienti sono state segmentate in due gruppi a seconda del rispettivo conteggio CTC di riferimento:

- Il gruppo favorevole (N = 89), rappresentato in **verde**, era formato da pazienti con CTC <5.
- Il gruppo non favorevole (N = 88), rappresentato in **rosso**, era formato da pazienti con CTC ≥ 5 .

La OS mediana era sostanzialmente più lunga nel gruppo favorevole rispetto al gruppo non favorevole (21,9 vs 10,9 mesi, rispettivamente). Questi risultati sono illustrati in **Figura 4**.

Figura 4: OS di pazienti affetti da MBC con CTC <5 o ≥ 5 al riferimento (N = 177).



1.3.2 OS con risultati CTC di follow-up

Le analisi di Kaplan-Meier di entrambi i gruppi di pazienti affette da MBC in ogni diversa fase di prelievo dopo l'inizio della terapia sono illustrate nella **Figura 5**. Questa figura illustra la capacità delle CTC nelle pazienti affette da MBC con CTC <5 e ≥ 5 a 3-5 settimane, 6-8 settimane, 9-14 settimane e 15-20 settimane dopo l'inizio della terapia di predire il tempo rimanente in 177 pazienti affette da metastasi alla mammella. I tempi di OS sono stati calcolati dal momento di ciascun prelievo di sangue.

- Il gruppo favorevole, rappresentato in **verde oliva, blu, viola e ciano**, era composto da pazienti con CTC <5,
- Il gruppo non favorevole, rappresentato in **marrone, nero, grigio e arancione**, era composto da pazienti con CTC ≥ 5.

Figura 5: OS di pazienti affette da MBC con CTC <5 o ≥ 5 in fasi diverse del follow-up.

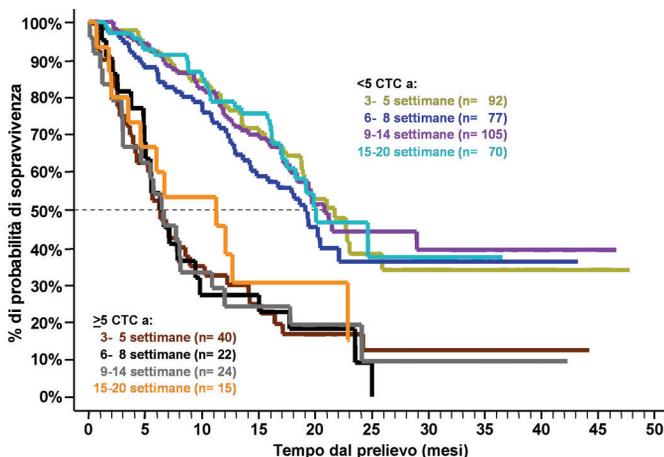


Tabella 3 riepiloga i risultati dell'analisi OS usando i livelli di CTC ed una soglia di CTC ≥ 5/7,5 mL in ciascuno dei vari prelievi di sangue nelle diverse fasi.

Tabella 3: Sopravvivenza globale (OS) per le pazienti affette da MBC con CTC <5 o ≥ 5 in diverse fasi temporali

Tempo di campionam. dopo inizio Tx	N	CTC ≥ 5	OS mediana in mesi (95% IC)		Log-rank valore p
			CTC <5	CTC ≥ 5	
			Riferimento	177	
3-5 settimane	132	40 (30%)	21,7 (da 18,8 a 25,9)	6,2 (da 4,1 a 8,9)	<0,0001
6-8 settimane	99	22 (22%)	19,1 (da 14,2 a 22,1)	6,3 (da 4,8 a 9,8)	0,0001
9-14 settimane	129	24 (19%)	20,8 (da 17,8 a ≥45)	6,4 (da 3,0 a 10,9)	<0,0001
15-20 settimane	85	15 (18%)	20,1 (da 17,1 a ≥35)	11,3 (da 2,0 a 22,9)	0,0021

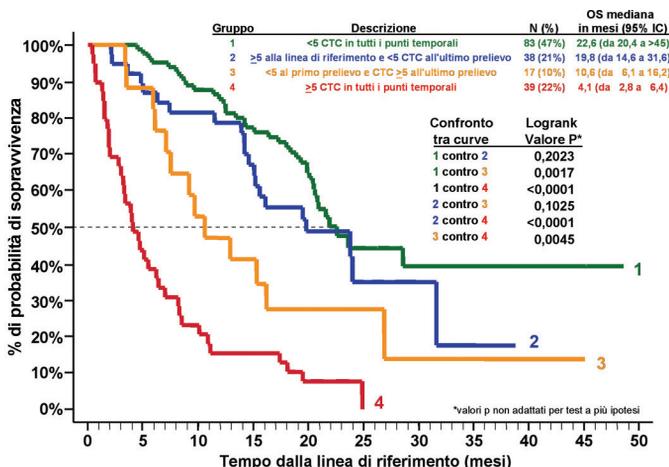
1.3.3 La riduzione o l'aumento dei valori CTC sono predittivi di una OS migliorata o diminuita

Il tempo di OS trascorso è stato calcolato a partire dal prelievo di sangue di riferimento. Per l'analisi di Kaplan-Meier (Figura 6), le pazienti affette da MBC sono state segmentate in quattro gruppi in base ai conteggi di CTC di riferimento, a 3-5 settimane, a 6-8 settimane, a 9-14 settimane e a 15-20 settimane dopo l'inizio della terapia:

- Gruppo 1 (curva verde), 83 (47%) pazienti con CTC <5 in tutte le fasi di prelievo di sangue. Cinque (6%) di queste pazienti sono state sottoposte solo al prelievo di riferimento e due (2%) sono state sottoposte a un singolo prelievo tra il primo e l'ultimo prelievo con risultato CTC ≥ 5.
- Gruppo 2 (curva blu), 38 (21%) pazienti con CTC ≥ 5 prima dell'inizio della terapia con una diminuzione a CTC <5 al momento dell'ultimo prelievo;
- Gruppo 3 (curva arancione), 17 (10%) pazienti con CTC <5 al primo prelievo (riferimento, a 3-5 settimane e/o 6-8 settimane) con un aumento a ≥ CTC 5 al momento dell'ultimo prelievo;
- Gruppo 4 (curva rossa), 39 (22%) pazienti con CTC ≥ 5 in tutte le fasi di prelievo. Dieci (26%) di questi pazienti sono state sottoposte solo a un prelievo di riferimento.

La Figura 6 indica che le pazienti con MBC che superano il valore di soglia CTC 5 in qualunque fase dall'inizio della terapia presentano una probabilità di sopravvivenza globale più breve. Le pazienti con CTC ≥ 5 in tutte le fasi temporali (Gruppo 4) presentavano la OS mediana più corta, che era diversa in modo significativo rispetto alla OS mediana del Gruppo 3, Gruppo 2 e Gruppo 1. Anche la differenza nella sopravvivenza mediana tra il Gruppo 3 e il Gruppo 1 era significativa e sebbene la OS media per il Gruppo 3 fosse più breve rispetto al Gruppo 2, la differenza non era statisticamente significativa. La Figura 6 mostra anche che le pazienti con CTC di riferimento ≥ 5 ma con diminuzione a CTC <5 dopo l'inizio della terapia presentavano approssimativamente lo stesso rischio di decesso delle pazienti che non avevano mai superato la soglia CTC di 5.

Figura 6: Una riduzione di CTC ad un valore inferiore a 5 dopo l'inizio della terapia è predittiva di un aumento della OS, mentre un aumento ad un valore di CTC uguale o maggiore di 5 è predittivo di una OS più breve nei pazienti con MBC.



Come illustrato in **Figura 6** e **Tabella 3**, colonne 4 e 5, le pazienti affette da MBC con CTC ≥ 5 in qualsiasi fase temporale presentavano una probabilità di decesso precoce rispetto a quelle con CTC <5 . I tempi OS mediani per quelle pazienti con CTC <5 andavano da 19,1 a 21,9 mesi e sono stati sostanzialmente più lunghi dei tempi OS mediani per quei pazienti con CTC ≥ 5 , che andavano da 6,2 a 11,3 mesi.

1.3.4 Analisi univariata della regressione di Cox nelle pazienti affette da MBC

I seguenti parametri sono stati analizzati utilizzando l'analisi univariata della regressione di Cox per valutare l'associazione con PFS e OS: età della paziente (in continuo), stadio della malattia al momento della diagnosi (1-4), tempo di formazione delle metastasi (in continuo), stato ECOG prima dell'inizio di una nuova linea terapeutica (0-2), stato ER/PR (+/-), stato HER2/neu (0-3+), linea terapeutica ($\geq 2^a$ o 1^a), tipo di terapia (solo chemio o ormonale/ combinazione), conteggio CTC di riferimento (CTC ≥ 5 o CTC $<5/7,5$ mL). La **Tabella 4** mostra i risultati di questa analisi e presenta il rapporto di pericolosità Cox (HR) e il valore p associato (test di Wald delle statistiche Z) oltre al numero di pazienti in ciascuna valutazione.

Tabella 4: Analisi univariata della regressione di Cox nelle pazienti affette da MBC

Parametro	Categorie		N. di pazienti MBC	Rischio PFS dal riferimento		Rischio OS dal riferimento	
	Positivo	Negativo		HR	valore p	HR	valore p
Età al prelievo di sangue di riferimento	Età in anni		175	0,99	0,173	0,99	0,375
Stadio alla diagnosi primaria	4 vs 3 vs 2 vs.1		164	0,97	0,723	1,00	0,969
ER/PR	Positivo	Negativo	175	0,84	0,327	0,53	0,002
Her-2/neu	3+ vs 2+ vs 1+ vs 0		148	0,91	0,207	0,93	0,422
Stato ECOG di riferimento	2 vs 1 vs 0		172	1,14	0,307	1,64	0,001
Tempo di formazione delle metastasi	Tempo in anni		175	0,97	0,048	0,95	0,018
Linea terapeutica	$\geq 2^a$	1a	175	1,55	0,007	1,91	0,001
Tipo di terapia	Solo chemio	H/C e/o I	172	1,97	<0,001	2,22	<0,001
Numero CTC di riferimento	≥ 5	<5	177	1,85	<0,001	2,36	<0,001
Numero CTC 3 - 5 settimane	≥ 5	<5	132	2,52	<0,001	3,30	<0,001
Numero CTC 6 - 8 settimane	≥ 5	<5	99	3,57	<0,001	2,87	<0,001
Numero CTC 9 - 14 settimane	≥ 5	<5	129	2,89	<0,001	3,64	<0,001
Numero CTC 15 -20 settimane	≥ 5	<5	85	1,86	0,041	2,85	0,004

H / C / e/o I – Solo terapia ormonale o immunoterapia oppure combinazione di terapia ormonale e/o chemio e/o immunoterapia

1.3.5 Analisi multivariata della regressione di Cox nelle pazienti affette da MBC

Le analisi multivariate della regressione di Cox sono state condotte nelle pazienti MBC per valutare la capacità predittiva indipendente del conteggio CTC rispetto agli effetti di importanti fattori clinici noti, statisticamente significativi nelle analisi univariate. Le CTC si sono rivelate importanti indicatori della PFS (**Tabella 5**) e della OS (**Tabella 6**).

Tabella 5: Analisi multivariata della regressione di Cox senza progressione della malattia nelle pazienti affette da MBC

Variabile	N	Rapporto di pericolo	Valore P
CTC di riferimento (<5 o ≥5)	172	1,69	0,001
Tempo di formazione delle metastasi (anno)		0,98	0,154
Linea terapeutica (1ª vs 2ª)		1,52	0,013
Tipo di terapia (ormonale/altro e solo chemio)		1,74	0,001
CTC di follow-up a 3-5 settimane (<5 o ≥5)	132	2,32	<0,001
Tempo di formazione delle metastasi (anno)		0,97	0,166
Linea terapeutica (1ª vs 2ª)		1,68	0,008
Tipo di terapia (ormonale/altro e solo chemio)		1,50	0,060
CTC di follow-up a 6-8 settimane (<5 o ≥5)	99	2,92	<0,001
Tempo di formazione delle metastasi (anno)		0,93	0,023
Linea terapeutica (1ª vs 2ª)		1,36	0,175
Tipo di terapia (ormonale/altro e solo chemio)		1,90	0,005
CTC di follow-up a 9-14 settimane (<5 o ≥5)	129	2,23	0,002
Tempo di formazione delle metastasi (anno)		0,97	0,170
Linea terapeutica (1ª vs 2ª)		1,48	0,061
Tipo di terapia (ormonale/altro e solo chemio)		1,73	0,007
CTC di follow-up a 15-20 settimane (<5 o ≥5)	85	1,58	0,140
Tempo di formazione delle metastasi (anno)		0,96	0,064
Linea terapeutica (1ª vs 2ª)		1,80	0,018
Tipo di terapia (ormonale/altro e solo chemio)		1,66	0,049

Tabella 6: Analisi multivariata della regressione di Cox per la sopravvivenza globale nelle pazienti affette da MBC

Variabile	N	Rapporto di pericolo	Valore P
CTC di riferimento (<5 o ≥5)	170	2,62	<0,001
ER/PR (negativo o positivo)		0,57	0,016
Stato ECOG di riferimento (2 vs 1 vs 0)		1,58	0,001
Tempo di formazione delle metastasi (anno)		0,97	0,078
Linea terapeutica (1ª vs 2ª)		2,33	<0,001
Tipo di terapia (ormonale/altro e solo chemio)		1,78	0,006
CTC di follow-up a 3-5 settimane (<5 o ≥5)	130	3,78	<0,001
ER/PR (negativo o positivo)		0,51	0,020
Stato ECOG di riferimento (2 vs 1 vs 0)		1,69	0,001
Tempo di formazione delle metastasi (anno)		0,96	0,142
Linea terapeutica (1ª vs 2ª)		2,30	0,001
Tipo di terapia (ormonale/altro e solo chemio)		1,72	0,026
CTC di follow-up a 6-8 settimane (<5 o ≥5)	99	2,88	0,001
ER/PR (negativo o positivo)		0,58	0,062
Stato ECOG di riferimento (2 vs 1 vs 0)		1,32	0,173
Tempo di formazione delle metastasi (anno)		0,94	0,135
Linea terapeutica (1ª vs 2ª)		2,51	0,001
Tipo di terapia (ormonale/altro e solo chemio)		2,33	0,003
CTC di follow-up a 9-14 settimane (<5 o ≥5)	129	4,14	<0,001
ER/PR (negativo o positivo)		0,39	0,002
Stato ECOG di riferimento (2 vs 1 vs 0)		1,57	0,016
Tempo di formazione delle metastasi (anno)		0,98	0,388
Linea terapeutica (1ª vs 2ª)		2,21	0,003
Tipo di terapia (ormonale/altro e solo chemio)		2,28	0,003
CTC di follow-up a 15-20 settimane (<5 o ≥5)	85	3,44	0,006
ER/PR (negativo o positivo)		0,38	0,024
Stato ECOG di riferimento (2 vs 1 vs 0)		1,33	0,321
Tempo di formazione delle metastasi (anno)		0,94	0,150
Linea terapeutica (1ª vs 2ª)		3,43	0,001
Tipo di terapia (ormonale/altro e solo chemio)		1,67	0,166

1.4 Uso di CTC per monitorare lo stato clinico del tumore metastatico della mammella

1.4.1 Relazione fra sopravvivenza, CTC e valutazione della patologia tramite acquisizione di immagini

L'acquisizione di immagini radiologiche è uno dei mezzi principali per determinare lo stato della patologia e la risposta alla terapia per pazienti con tumore metastatico della mammella. Per stabilire la relazione dello stato clinico determinato dall'acquisizione di immagini in CTC, le CTC misurate in due momenti diversi e i risultati delle immagini sono stati confrontati 1) con la reale sopravvivenza clinica finale e 2) reciprocamente.

1.4.2 CTC

I dati precedenti hanno mostrato che le pazienti affette da MBC con CTC $\geq 5/7,5$ mL di sangue in una delle successive visite di follow-up dall'inizio della terapia presentavano una maggiore probabilità di malattia progressiva associata ad una diminuzione della sopravvivenza totale rispetto a pazienti con CTC $<5/7,5$ mL di sangue. I risultati CTC ottenuti al 1° follow-up dopo l'inizio della terapia e i risultati CTC ottenuti entro \pm un mese dallo studio delle immagini sono stati classificati come CTC <5 e CTC ≥ 5 . Se si era ottenuto più di un valore CTC entro \pm un mese dallo studio delle immagini, è stato utilizzato il risultato CTC ottenuto nel momento più vicino alla data in cui è stata eseguita l'analisi

1.4.3 Acquisizione di immagini

Tutti i siti di acquisizione di immagini erano in conformità con gli standard Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM). Utilizzando immagini digitali standardizzate, due esperti radiologi (lettori), lavorando singolarmente e ignorando le informazioni cliniche, hanno classificato ogni valutazione di follow-up della patologia (complessivamente 231 studi di immagini) da 138 pazienti con patologia misurabile come indeterminata (I), patologia stabile (S), risposta parziale (PR) o patologia progressiva (PD) conformemente ai criteri bidimensionali della World Health Organization (WHO). La patologia misurabile è stata definita come la presenza di almeno una lesione ≥ 2 cm nella dimensione più lunga. I lettori hanno identificato un numero massimo di otto lesioni per paziente per analisi, descrivendo la dimensione più lunga della lesione e la dimensione perpendicolare più lunga. Queste due dimensioni sono state moltiplicate ottenendo il "cross product". È stata calcolata la somma delle misurazioni relative ai "cross product" ed è stata determinata la variazione percentuale rispetto all'analisi precedente. Anche se tutte le pazienti avevano una patologia misurabile, sono state incluse lesioni non misurabili (rilevabili tramite raggi-x) nella determinazione dello stato della paziente, come descritto nelle linee guida della WHO. La patologia progressiva è stata definita come un incremento $>25\%$ nella somma di tutte le lesioni o nell'aspetto di una nuova lesione misurabile o non misurabile. La risposta parziale è stata definita come una riduzione nella somma di tutte le lesioni pari a $\geq 50\%$ e nessuna nuova lesione.

Le interpretazioni radiologiche da parte dei due esperti radiologi sono state classificate come segue:

- S e PR sono state entrambe considerate come indicative di una patologia non progressiva (NPD)
- PD è stata considerata indicativa di una patologia progressiva
- nei casi in cui uno dei radiologi esprimesse una classificazione indeterminata (I) e l'altro una classificazione S, PR o PD, la classificazione di quest'ultimo radiologo è stata utilizzata nel confronto con CTC (n = 11)
- quando entrambi i radiologi hanno espresso una classificazione indeterminata (I), i dati non sono stati utilizzati nel confronto con CTC (n = 3)
- un terzo radiologo indipendente ha giudicato i risultati divergenti fra i due lettori principali relativi a PD e NPD (n = 27)
- nei casi in cui il terzo radiologo indipendente esprimesse una classificazione indeterminata (I), i dati non sono stati utilizzati nel confronto con CTC (n = 2)
- negli studi di immagini seriali non sono stati utilizzati risultati radiologici a meno di un mese da un'osservazione catalogata precedentemente (n = 1)

1.4.4 Relazione fra l'acquisizione di immagini e CTC ed il parametro sopravvivenza

Sono state eseguite analisi Kaplan-Meier separate per confrontare la sopravvivenza totale di pazienti MBC nei gruppi favorevoli (CTC <5) e non favorevoli (CTC ≥ 5) utilizzando risultati CTC in due diverse fasi e lo studio delle immagini al primo follow-up. Utilizzando i risultati ottenuti dagli studi delle immagini al primo follow-up eseguiti a $10,1 \pm 5,1$ settimane (mediana = 9,0 settimane) dall'inizio della terapia (cioè dal prelievo di sangue di riferimento), la sopravvivenza mediana delle 96 (70%) pazienti, per le quali l'acquisizione di immagini indicava una NPD, era di 23,8 mesi (95% IC da 20,4 a 28,6) (**Figura 7, Tabella 7**). Per le 42 (30%) pazienti per le quali l'acquisizione di immagini ha indicato una PD, la sopravvivenza mediana era di 12,9 mesi (95% IC da 7,1 a 19,3).

Per le CTC al prelievo di sangue del primo follow-up, eseguito a $4,3 \pm 2,5$ settimane (mediana = 4,0 settimane) dall'inizio della terapia, la sopravvivenza mediana di 104 (75%) pazienti con risultati CTC favorevoli (CTC <5) era di 21,9 mesi (95% IC da 20,4 a 26,9) (**Figura 8, Tabella 7**). Trentaquattro (34) pazienti (25%) con risultati CTC non favorevoli (CTC ≥ 5) avevano una sopravvivenza mediana di 8,3 mesi (95% IC da 5,9 a 15,1).

Per stabilire se le valutazioni CTC eseguite vicino al momento dell'acquisizione di immagini generavano revisioni di sopravvivenza simili rispetto alle valutazioni CTC eseguite circa 4 settimane dopo l'inizio della terapia, sono stati analizzati solo quei pazienti con valutazioni CTC eseguite entro \pm un mese dall'analisi radiologica al primo follow-up ($9,9 \pm 5,1$ settimane, mediana = 8,8 settimane, dall'inizio della terapia) (**Figura 9, Tabella 7**). Centotrentaquattro (134) pazienti su 138 (97%) avevano avuto delle valutazioni CTC entro un mese dallo studio delle immagini del primo follow-up. La sopravvivenza mediana di 105 (78%) pazienti con risultati CTC favorevoli era di 21,9 mesi (95% IC da 19,9 a 31,6). Per 29 (22%) pazienti con risultati CTC non favorevoli, la sopravvivenza mediana era di 8,5 mesi (95% IC da 5,5 a 15,1). Questi dati indicano che le valutazioni CTC in entrambe le fasi forniscono risultati simili all'acquisizione di immagini condotte circa 9 settimane dopo l'inizio della terapia (*Clin Cancer Res*. Vol 12: 6403-6409, novembre 2006).

Tabella 7: OS di pazienti affette da MBC con valutazione delle CTC circa un mese dopo l'inizio della terapia ed entro un mese dalla valutazione radiologica

	N	Sopravvivenza media e (95% IC) mesi
Acquisizione di immagini	138	
favorevole (NPD)	96 (70%)	23,8 (20,4 – 28,6)
non favorevole (PD)	42 (30%)	12,9 (7,1 – 19,3)
CTC 1° follow-up	138	
favorevole (<5)	104 (75%)	21,9 (20,4 – 26,9)
non favorevole (≥5)	34 (25%)	8,3 (5,9 – 15,1)
CTC (±1 mese dall'acquisizione di immagini)	134*	
favorevole (<5)	105 (78%)	21,9 (19,9 – 31,6)
non favorevole (≥5)	29 (22%)	8,5 (5,5 – 15,1)

*134/138 pazienti avevano avuto delle valutazioni CTC entro (±) 1 mese dall'acquisizione di immagini.

Figura 7: Correlazione fra valutazione radiologica e CTC con OS: OS di pazienti con MBC con NPD o PD al 1° studio di acquisizione immagini di follow-up (N = 138)

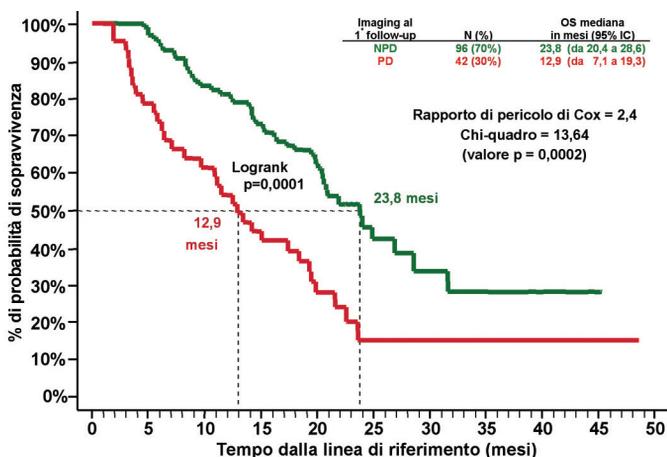


Figura 8: Correlazione fra valutazione radiologica e CTC con OS: OS di pazienti MBC con CTC <5 oppure ≥ 5 al 1° follow-up dopo l'inizio della terapia (N = 138)

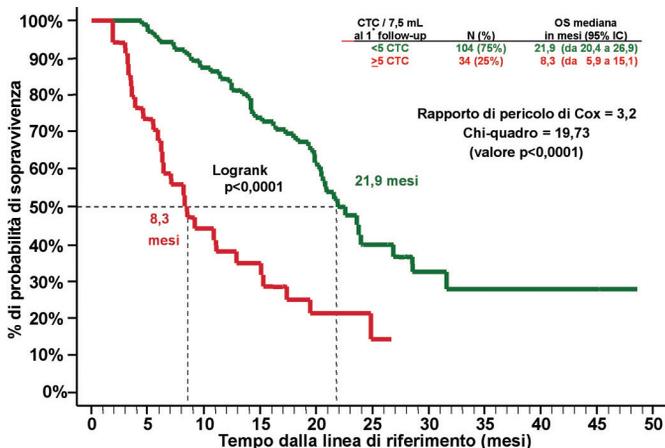
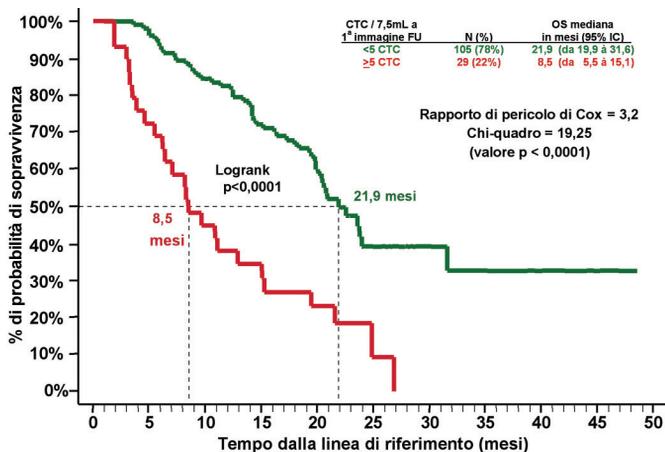


Figura 9: Correlazione fra valutazione radiologica e CTC con OS: OS di pazienti MBC con CTC <5 or ≥ 5 entro ± 1 mese dal 1° studio di acquisizione immagini di follow-up (N = 134)



1.4.5 Concordanze fra CTC e monitoraggio radiologico

Come indicato in precedenza, gli studi delle immagini rappresentano un componente principale dell'attuale standard di cura per determinare la progressione della patologia e la risposta al trattamento per il tumore metastatico del seno. Per supportare ulteriormente l'efficacia della CTC nel fare delle valutazioni cliniche (*Clin. Cancer Res.* Vol 12: 6403-6409, novembre 2006), sono state predisposte delle tabelle a due colonne con osservazioni concordanti e discordanti fra le CTC e l'acquisizione di immagini radiologiche utilizzando i criteri descritti in precedenza.

Utilizzando solo lo studio delle immagini al 1° follow-up, la risposta radiologica in questa visita veniva confrontata con i risultati CTC ottenuti entro ± un mese da questo studio. Un totale di 134 su 138 pazienti MBC (97%) avevano ottenuto risultati CTC che soddisfacevano tali criteri. Il risultato di questo confronto "in relazione alla paziente" fra le CTC e l'acquisizione di immagini è indicato in **Tabella 8**.

Tabella 8: Confronto in relazione alla paziente tra CTC e acquisizione di immagini

Risposta al 1° studio di immagini di follow-up	CTC entro ± 1 mese dall'acquisizione di immagini		Totale
	CTC <5/7,5 mL	CTC ≥ 5/ 7,5 mL	
Patologia non progressiva	85	9	94
Patologia progressiva	20	20	40
Totale	105	29	134

Misurazione	Stima	Inferiore 95% IC	Superiore 95% IC
Concordanza % positiva	50%	34%	66%
Concordanza % negativa	90%	83%	96%
Valore predittivo positivo	69%	49%	85%
Valore predittivo negativo	81%	72%	88%
Concordanza totale	78%	70%	85%
Rapporto di disuguaglianza	9,4	3,4	26,8

Utilizzando tutti gli studi delle immagini di follow-up eseguiti dopo l'inizio della terapia sulle 138 pazienti che mostravano risultati di risposta radiologica utilizzabili (n = 225), tali risultati sono stati successivamente confrontati con i risultati CTC ottenuti entro ± un mese dall'analisi radiologica. Un totale di 219 su 225 (97%) studi delle immagini hanno ottenuto risultati CTC che soddisfacevano tale criterio. Il risultato di questo confronto "in relazione all'osservazione" fra le CTC e l'acquisizione di immagini è indicato in **Tabella 9**.

Tabella 9: Confronto in relazione all'osservazione tra CTC e acquisizione di immagini

Risposta in tutti gli studi delle immagini di follow-up	CTC entro ± 1 mese dall'acquisizione di immagini		Totale
	CTC <5/7,5 mL	CTC ≥ 5/ 7,5 mL	
Patologia non progressiva	151	16	167
Patologia progressiva	30	22	52
Totale	181	38	219

Misurazione	Stima	Inferiore 95% IC	Superiore 95% IC
Concordanza % positiva	42%	29%	57%
Concordanza % negativa	90%	85%	94%
Valore predittivo positivo	58%	41%	74%
Valore predittivo negativo	83%	77%	89%
Concordanza totale	79%	73%	84%
Rapporto di disuguaglianza	6,9	3,0	15,8

Nelle osservazioni seriali, solo una minoranza delle transizioni relative ai risultati delle immagini fra patologia non progressiva e patologia progressiva coincideva con una transizione corrispondente di conteggi CTC fra <5 e ≥ 5/7,5 mL.

Poiché il valore prognostico dei risultati CTC in una fase precedente era equivalente a quello dei risultati CTC al momento dell'acquisizione delle immagini (**Figura 8** e **Figura 9**), è stato predisposto un confronto in relazione alla paziente utilizzando solo i risultati derivanti dallo studio di immagini del 1° follow-up, eseguito circa 9 settimane dall'inizio della terapia e i risultati CTC ottenuti al 1° follow-up, eseguito circa 4 settimane dall'inizio della terapia. Tutte le 138 pazienti affette da MBC avevano ottenuto risultati CTC che soddisfacevano tale criterio. Il risultato di questo confronto "in relazione al paziente" fra le CTC in una fase precedente e l'acquisizione di immagini è indicato in **Tabella 10**.

Tabella 10: Confronto in relazione alla paziente tra CTC e acquisizione di immagini

Risposta al 1° studio di immagini di follow-up	CTC a 1° follow-up		Totale
	CTC <5/7,5 mL	CTC ≥ 5/ 7,5 mL	
Patologia non progressiva	84	12	96
Patologia progressiva	20	22	42
Totale	104	34	138

Misurazione	Stima	Inferiore 95% IC	Superiore 95% IC
Concordanza % positiva	52%	36%	68%
Concordanza % negativa	88%	79%	93%
Valore predittivo positivo	65%	46%	80%
Valore predittivo negativo	81%	72%	88%
Concordanza totale	77%	69%	84%

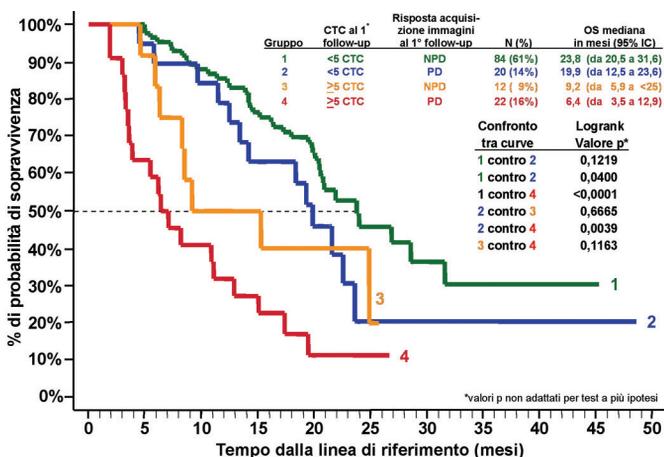
1.4.6 CTC come complemento all'acquisizione di immagini

Mentre la concordanza totale fra CTC e acquisizione di immagini era buona (circa 78%), vi era una discordanza per circa il 22% delle pazienti MBC. Poiché le informazioni derivanti dalle valutazioni CTC devono essere utilizzate unitamente ad altre modalità diagnostiche per prendere decisioni sul trattamento, la valutazione CTC al 1° follow-up (circa 4 settimane dall'inizio della terapia) e l'acquisizione di immagini nei seguenti gruppi sono state confrontate con OS per determinare quale dei risultati discordanti rispecchiava al meglio la prognosi della paziente (**Figura 10**):

- Gruppo 1 (curva **verde**), 84 (61%) pazienti con CTC <5 al 1° follow-up e NPD;
- Gruppo 2 (curva **blu**), 20 (14%) pazienti con CTC <5 al 1° follow-up e PD;
- Gruppo 3 (curva **arancione**), 12 (9%) pazienti con CTC ≥ 5 al 1° follow-up e NPD;
- Gruppo 4 (curva **rossa**), 22 (16%) pazienti con CTC ≥ 5 al 1° follow-up e PD.

In questo studio, la determinazione CTC è un importante indicatore indipendente della sopravvivenza globale. I risultati dello studio hanno indicato che la combinazione di valutazioni CTC e radiologiche fornisce la più esatta valutazione della prognosi.

Figura 10: OS di pazienti MBC nei gruppi 1, 2, 3 e 4 utilizzando la valutazione CTC del 1° follow-up dall'inizio della terapia (n = 138) e lo stato della patologia determinato nello studio di immagini al 1° follow-up

**1.5 Variabilità delle CTC e delle valutazioni radiologiche****1.5.1 CTC**

La variabilità da una enumerazione all'altra per i conteggi delle CTC nel prelievo di sangue del primo follow-up era determinata dal numero di volte in cui l'operatore nel sito del test non era in accordo con il laboratorio centrale nel classificare un campione come CTC ≥ 5 oppure CTC <5. In un sottogruppo di 71 pazienti sono state prelevate ed analizzate due provette di sangue ed è stata confrontata la rispettiva classificazione di CTC ≥ 5 oppure CTC <5 di entrambe le provette stabilita dal sito e dal laboratorio centrale.

1.5.2 Acquisizione di immagini

La variabilità da un risultato all'altro è stata determinata confrontando le interpretazioni radiologiche dei due radiologi, classificate come NPD o PD. La variabilità del singolo operatore è stata calcolata confrontando le due interpretazioni radiologiche in un sottogruppo di pazienti in cui ciascun radiologo determinava la risposta in tre sedute separate, a distanza di almeno una settimana una dall'altra. Inoltre, sono stati studiati i segmenti di acquisizioni di immagini di valutazioni successive nelle 138 pazienti affette da MBC in questione e le valutazioni CTC prima dell'inizio della terapia e nei successivi follow-up.

Tabella 11: Variabilità delle valutazioni radiologiche e CTC nelle pazienti con MBC

	n	Radiologia NPD vs PD discordanza	n	CTC / 7,5 mL <5 vs ≥5 discordanza
<i>Da un operatore all'altro</i>				
1° follow-up	132	11,4%	138	0,7%
Qualsiasi follow-up	217	13,4%	695	1,0%
<i>Singolo operatore</i>				
1° follow-up				
Letto 1 (Radiologia)	24	25,0%	—	—
Letto 2 (Radiologia)	22	9,1%	—	—
Qualsiasi follow-up				
Letto 1 (Radiologia)	30	20,0%	—	—
Letto 2 (Radiologia)	28	10,7%	—	—
<i>CTC da provetta a provetta</i>				
1° follow-up	—	—	71	5,6%
Qualsiasi follow-up	—	—	403	5,5%

La **Tabella 11** mostra che la variabilità da un lettore all'altro delle valutazioni radiologiche era notevolmente maggiore sia nella valutazione della patologia al 1° follow-up sia nelle valutazioni dei successivi follow-up rispetto alla variabilità dei conteggi CTC da un lettore all'altro negli stessi gruppi (P di Fisher <0,001).

Nei casi in cui le valutazioni CTC e radiologiche erano discordanti, le CTC hanno fornito una valutazione delle prognosi più accurata.

2 Pazienti con tumore metastatico coloretale (MCRC)

È stato condotto uno studio clinico prospettico multicentrico per determinare se il numero delle CTC è predittivo della progressione della malattia e della sopravvivenza. Sono stati reclutati pazienti con tumore metastatico coloretale con patologia misurabile (N = 430) all'inizio di una nuova linea terapeutica. I dati clinici sono stati analizzati su base "intent-to-treat". Le informazioni demografiche sui pazienti si trovano in **Tabella 12**.

Il conteggio delle CTC di riferimento è stato determinato prima dell'inizio di una nuova linea terapeutica. Dopo l'inizio della terapia, sono stati determinati conteggi di CTC di follow-up ad intervalli di circa 3-4 settimane. Per le analisi di riferimento, la sopravvivenza senza progressione della malattia (PFS – Progression Free Survival) è stata misurata a partire dal momento del prelievo di sangue di riferimento fino alla diagnosi di progressione tramite scansioni delle CTC e/o dei sintomi e dei segni clinici, mentre la sopravvivenza totale (OS – Overall Survival) è stata misurata dal momento del prelievo di sangue di riferimento fino al momento del decesso. Per le analisi di follow-up, la PFS è stata misurata dal momento del prelievo di sangue di follow-up fino alla diagnosi di progressione o al decesso, mentre la OS è stata misurata dal momento del prelievo di sangue di follow-up fino al momento del decesso.

Tabella 12: Dati demografici paziente MCRC

Categoria		N=430 pazienti
Età al riferimento (in anni)	Deviazione Media \pm Std. (mediana)	63,0 \pm 12,6 (64)
Anni alla formazione delle metastasi	Deviazione Media \pm Std. (mediana)	0,9 \pm 1,4 (0,1)
	Descrizione delle categorie	Numero di soggetti (% del totale)
Sesso	Femmine	192 (45%)
	Maschi	238 (55%)
Razza	Bianca	305 (71%)
	Nera	44 (10%)
	Altri	12 (3%)
	Non nota	69 (16%)
Punteggio ECOG di riferimento	0	196 (46%)
	1	187 (43%)
	2	31 (7%)
	Non nota	16 (4%)
Tipo di tumore alla diagnosi primaria	Colon	292 (68%)
	Retto	71 (17%)
	Colorettale	66 (15%)
	Non nota	1 (0%)
Fase alla diagnosi primaria	1	12 (3%)
	2	45 (11%)
	3	118 (27%)
	4	232 (54%)
	Non nota	23 (5%)
Metastasi al fegato	No	117 (27%)
	Sì	313 (73%)
Linea terapeutica	1 ^a riga	309 (72%)
	2 ^a riga	95 (22%)
	3 ^a riga	26 (6%)
Tipo di terapia	Bevacizumab	243 (56%)
	Irinotecan	103 (24%)
	Oxaliplatin	253 (59%)
	Non nota	25 (6%)

2.1 Frequenze CTC

Su un numero totale di 430 pazienti affetti da MCRC, 9 sono stati sottoposti a un prelievo di sangue iniziale e nessun prelievo di sangue di follow-up. Di questi 9 pazienti, 4 sono deceduti prima di poter ottenere un prelievo di sangue di follow-up, due sono stati rimossi dalla terapia per la tossicità legata al trattamento, un paziente ha subito un intervento chirurgico per rimuovere la patologia misurabile, un paziente ha rifiutato ulteriori cure, e un paziente ha rifiutato di sottoporsi a ulteriori prelievi di sangue. Dei restanti pazienti, 362, 342, 321 e 211 sono stati sottoposti a prelievo di sangue di follow-up, rispettivamente a 1-2, 3-5, 6-12 e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia. La differenza nel numero di pazienti valutabili per PFS e OS in ciascuna fase è dovuta alla progressione di alcuni pazienti prima del prelievo di sangue mentre la differenza nel numero di pazienti in ciascuna fase è dovuta al numero di pazienti con prelievi di sangue e risultati CTC valutabili.

La **Tabella 13** mostra il numero di pazienti in ciascuna fase esclusi dalle analisi della PFS, della OS, oppure di PFS e OS e i motivi della loro esclusione.

Tabella 13: Esclusioni dalle analisi della sopravvivenza senza progressione della malattia e della sopravvivenza totale nei pazienti MCRC

Ora prelievo	Motivi dell'esclusione dei pazienti MCRC dalle analisi:						N. totale di pazienti MCRC valutabili:	
	PFS e OS				Solo PFS	Solo OS	PFS	OS
	Sangue non prelevato	Prelievo di sangue da 1 a 7 giorni dopo la somministrazione di terapia	Nessun follow-up oltre la data del prelievo	Risultati CTC non valutabili	Prelievo dopo la data della progressione della patologia	Nessun follow-up oltre la data del prelievo		
Riferimento	1	11	0	5	0	0	413	413
1-2 settimane	68	0	0	5	1	0	356	357
3-5 settimane	88	0	1	8	4	0	329	333
6-12 settimane	109	0	4	7	26	0	284	310
13-20 settimane	219	0	9	8	14	1	180	193

I risultati CTC ottenuti dai prelievi ematici di follow-up a 1-2, 3-5, 6-12 e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia sono stati classificati come favorevoli (CTC <3) o non favorevoli (CTC \geq 3). Se si era ottenuto più di un valore CTC entro gli intervalli di follow-up stabili, è stato usato il risultato CTC ottenuto nel prelievo più lontano dal prelievo di riferimento.

Tabella 15 La riepiloga il numero totale di pazienti MCRC e la percentuale di pazienti con CTC non favorevole nella prova clinica che differisce per numeri e percentuali di pazienti per sopravvivenza senza progressione della malattia mostrati in **Tabella 14**.

2.2 Analisi della sopravvivenza libera da progressione della malattia (PFS) dei pazienti affetti da MCRC

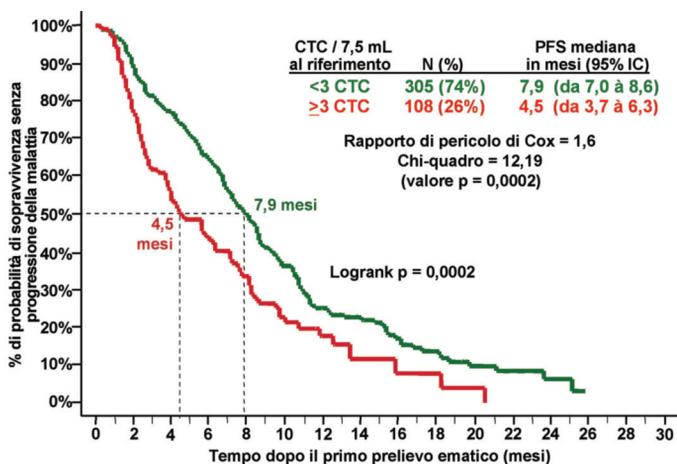
2.2.1 Analisi della PFS utilizzando i risultati delle CTC di riferimento

Quattrocentotredici (413) su 430 pazienti MCRC hanno ottenuto i risultati CTC di riferimento disponibili. Per l'analisi di Kaplan-Meier, i pazienti sono stati segmentati in due gruppi a seconda del rispettivo conteggio CTC di riferimento:

- Il gruppo favorevole (N = 305), rappresentato in **verde**, era formato da pazienti con CTC <3.
- Il gruppo non favorevole (N = 108), rappresentato in **rosso**, era formato da pazienti con CTC ≥ 3.

La PFS mediana era sostanzialmente più lunga nel gruppo favorevole rispetto al gruppo non favorevole (7,9 vs 4,5 mesi, rispettivamente). Questi risultati sono mostrati in **Figura 11** e **Tabella 14**.

Figura 11: PFS di pazienti MCRC con CTC <3 o ≥ 3 al riferimento (N = 413).



2.2.2 PFS con i risultati CTC del follow-up

Per l'analisi di Kaplan-Meier, i pazienti affetti da MCRC sono stati segmentati in due gruppi a seconda del rispettivo conteggio CTC in ciascuno dei vari prelievi ematici di follow-up: entrambi i gruppi di pazienti in ciascuno dei diversi tempi del prelievo di follow-up dopo l'avvio della terapia per PFS sono illustrati in **Figura 12**. Le fasi PFS sono state calcolate dal momento del prelievo e tutti i pazienti che hanno mostrato evidenza di progressione a un particolare prelievo di sangue sono stati esclusi dall'analisi di quello e di tutti i successivi prelievi ematici. La **Figura 12** illustra la capacità delle CTC nei pazienti MCRC con CTC <3 e ≥ 3 a 1-2 settimane, 3-5 settimane, 6-12 settimane e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia di predire le fasi PFS.

- Il gruppo favorevole, rappresentato in **verde oliva, blu, viola e ciano**, era composto da pazienti con CTC <3.
- Il gruppo non favorevole, rappresentato in **marrone, nero, grigio e arancione**, era composto da pazienti con CTC ≥ 3.

Figura 12: PFS di pazienti MCRC con CTC <3 o ≥ 3 in momenti diversi del follow-up

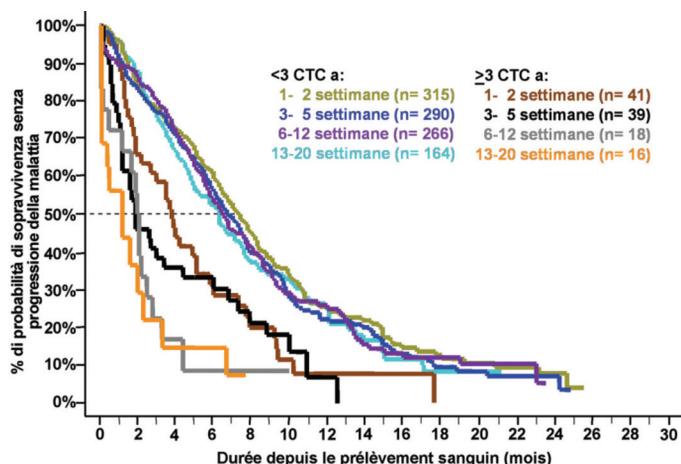


Tabella 14 La riepiloga i risultati dell'analisi PFS usando i livelli di CTC ed una soglia di CTC ≥ 3/7,5 mL in ciascuno dei vari prelievi ematici.

Tabella 14: Sopravvivenza senza progressione della malattia (PFS) per pazienti con MCRC con CTC <3 o ≥ 3 in diverse fasi

Tempo di campionam. dopo inizio Tx	N	CTC ≥ 3	PFS mediana in mesi (95% IC)		Log-rank valore p
			CTC <3	CTC ≥ 3	
Riferimento	413	108 (26%)	7,9 (7,0 – 8,6)	4,5 (3,7 – 6,3)	0,0002
1-2 settimane	356	41 (12%)	7,3 (6,5 – 8,1)	3,8 (1,9 – 5,1)	<0,0001
3-5 settimane	329	39 (12%)	6,8 (6,1 – 7,6)	1,9 (1,2 – 4,4)	<0,0001
6-12 settimane	284	18 (6%)	6,5 (5,8 – 7,7)	2,0 (0,5 – 2,5)	<0,0001
13-20 settimane	180	16 (9%)	6,3 (4,9 – 7,4)	1,2 (0,1 – 2,3)	<0,0001

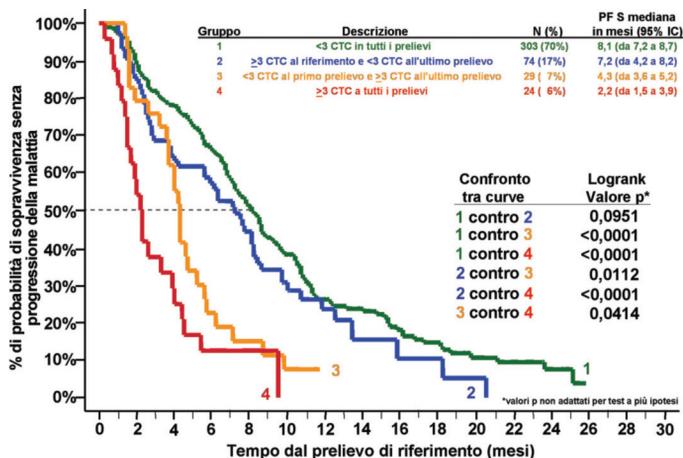
Come mostrato nella **Figura 12** e **Tabella 14**, i pazienti MCRC con valore CTC elevato (CTC ≥ 3/7,5 mL di sangue intero) in qualunque momento presentavano una maggiore probabilità di progressione rapida rispetto a quelli con CTC <3. La **Tabella 14** colonna 4 mostra che i tempi di PFS mediana per i pazienti con CTC <3 erano compresi tra 6,3 e 7,9 mesi ed erano sostanzialmente più lunghi rispetto ai tempi di PFS mediana per i pazienti con CTC ≥ 3, compresi tra 1,2 e 4,5 mesi (colonna 5).

2.2.3 La riduzione o l'aumento nei valori CTC sono predittivi di PFS migliorata o diminuita

Il tempo di PFS trascorso è stato calcolato dal prelievo di sangue di riferimento. Per l'analisi di Kaplan-Meier (**Figura 13**), i pazienti con MCRC sono stati segmentati in quattro gruppi in base ai conteggi di CTC di riferimento, a 1-2 settimane, 3-5 settimane, a 6-12 settimane e a 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia:

- Gruppo 1 (curva **verde**), 303 (70%) pazienti con CTC <3 in tutte le fasi. Sette (2%) di questi pazienti sono stati sottoposti solo al prelievo di riferimento mentre otto (3%) sono stati sottoposti a un singolo prelievo tra il primo e l'ultimo prelievo con risultato CTC ≥ 3;
- Gruppo 2 (curva **blu**), 74 (17%) pazienti con CTC ≥ 3 prima dell'inizio della terapia con una diminuzione a CTC <3 al momento dell'ultimo prelievo;
- Gruppo 3 (curva **arancione**), 29 (7%) pazienti con CTC <3 al primo prelievo (riferimento, a 3-5 settimane e/o 6-8 settimane) con un aumento a CTC ≥ 3 al momento dell'ultimo prelievo;
- Gruppo 4 (curva **rossa**), 24 (6%) pazienti con CTC ≥ 3 in tutte le fasi. Tre (13%) di questi pazienti sono stati sottoposti solo al prelievo di riferimento, uno (4%) è stato sottoposto a un prelievo a 3-5 settimane e uno (4%) è stato sottoposto a un singolo prelievo tra il primo e l'ultimo prelievo con risultato CTC <3.

Figura 13: Una riduzione di CTC ad un valore inferiore a 3 dopo l'inizio della terapia è predittiva di un aumento della PFS nei pazienti affetti da MCRC



La **Figura 13** mostra che i pazienti affetti da MCRC con CTC ≥ 3 in tutte le fasi (**Gruppo 4**) presentavano la PFS mediana più breve, che era sostanzialmente diversa rispetto alla PFS mediana del **Gruppo 3**, **Gruppo 2** e **Gruppo 1**. La differenza nel valore PFS mediano tra quei pazienti che hanno mostrato una riduzione della CTC dopo l'inizio della terapia (**Gruppo 2**) era sostanzialmente più lunga a confronto con quei pazienti che mostravano un aumento della CTC (**Gruppo 3**).

2.3 Analisi della sopravvivenza totale dei pazienti affetti da MCRC

2.3.1 Analisi OS con risultati CTC di riferimento

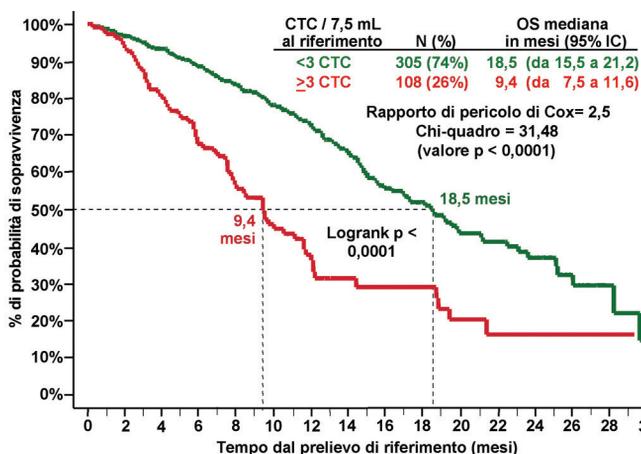
Decesso di 202 (47%) dei 430 pazienti affetti da MCRC, con una durata media di follow-up per i 228 (53%) pazienti ancora vivi di $12,6 \pm 6,5$ mesi (mediana = 11,0, intervallo = 0,8 – 30,0). Al momento delle analisi, 124 (41%) dei 305 pazienti del gruppo favorevole (CTC di riferimento <3) rispetto a 68 (63%) dei 108 pazienti del gruppo non favorevole (CTC di riferimento ≥ 3) erano deceduti.

Per l'analisi di Kaplan-Meier, i pazienti sono stati segmentati in due gruppi a seconda del rispettivo conteggio CTC di riferimento:

- Il gruppo favorevole (N = 305), rappresentato in **verde**, era formato da pazienti con CTC <3.
- Il gruppo non favorevole (N = 108), rappresentato in **rosso**, era formato da pazienti con CTC ≥ 3 .

La OS mediana era sostanzialmente più lunga nel gruppo favorevole rispetto al gruppo non favorevole (18,5 vs 9,4 mesi, rispettivamente). Questi risultati sono illustrati in **Figura 14**.

Figura 14: OS di pazienti affetti da MCRC con CTC <3 o ≥ 3 al riferimento (N = 413).

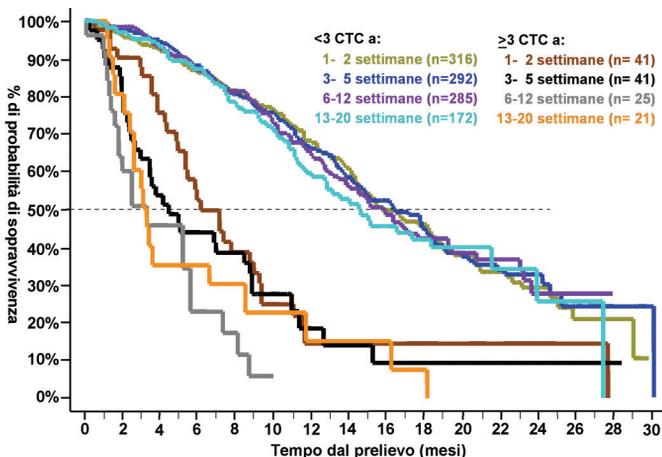


2.3.2 Analisi della OS utilizzando i risultati CTC di follow-up

Le analisi di Kaplan-Meier di entrambi i gruppi di pazienti con MCRC in ogni diversa fase di prelievo di follow-up dopo l'inizio della terapia sono illustrate nella Figura 15. Questa figura illustra la capacità della CTC nei pazienti affetti da MCRC con CTC <3 e ≥ 3 a 1-2 settimane, 3-5 settimane, 6-12 settimane e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia di predire il tempo rimanente in 421 pazienti con tumore metastatico colorettales. I tempi di OS sono stati calcolati dal momento di ciascun prelievo di sangue.

- Il gruppo favorevole, rappresentato in verde oliva, blu, viola e ciano, era composto da pazienti con CTC <3,
- Il gruppo non favorevole, rappresentato in marrone, nero, grigio e arancione, era composto da pazienti con CTC ≥ 3.

Figura 15: OS di pazienti MCRC con CTC <3 o ≥ 3 in momenti diversi del follow-up.



La Tabella 15 riassume i risultati dell'analisi OS usando i livelli di CTC ed una soglia di CTC ≥ 3/7,5 mL in ciascuno dei vari prelievi ematici nelle diverse fasi.

Tabella 15: Sopravvivenza globale (OS) per i pazienti con MCRC con CTC <3 o ≥ 3 in diverse fasi

Tempo di campionam. dopo inizio Tx	2	3	4		6
			OS mediana in mesi (95% IC)		
			CTC <3	CTC ≥ 3	
Riferimento	413	108 (26%)	18,5 (15,5 – 21,2)	9,4 (7,5 – 11,6)	<0,0001
1-2 settimane	357	41 (11%)	15,7 (14,3 – 18,4)	6,1 (4,9 – 8,9)	<0,0001
3-5 settimane	333	41 (12%)	16,4 (14,1 – 18,3)	4,4 (2,6 – 8,7)	<0,0001
6-12 settimane	310	25 (8%)	15,8 (13,8 – 19,2)	3,3 (1,8 – 5,6)	<0,0001
13-20 settimane	193	21 (11%)	14,6 (12,0 – 21,5)	3,3 (2,4 – 8,5)	<0,0001

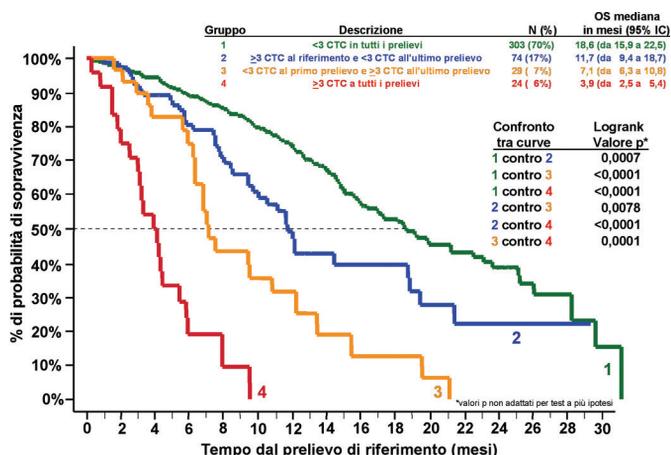
Come illustrato in **Figura 15** e **Tabella 15**, colonne 4 e 5, i pazienti affetti da MCRC con CTC ≥ 3 in qualsiasi fase presentavano una probabilità molto più alta di decesso precoce rispetto a quelli con CTC <3. I tempi OS mediani per quei pazienti con CTC <3 andavano da 14,6 a 18,5 mesi ed erano sostanzialmente più lunghi rispetto ai tempi di OS mediana per quei pazienti con CTC ≥ 3, che andavano da 3,3 a 9,4 mesi.

2.3.3 L'aumento o la riduzione dei valori CTC sono predittivi di una OS migliorata o diminuita

Il tempo di OS trascorso è stato calcolato dal prelievo di sangue di riferimento. Per l'analisi di Kaplan-Meier (**Figura 16**), i pazienti con MCRC sono stati segmentati in quattro gruppi in base ai conteggi di CTC di riferimento, a 1-2 settimane, 3-5 settimane, 6-12 settimane e 13-20 settimane:

- Gruppo 1 (curva **verde**), 303 (70%) pazienti con CTC <3 in tutte le fasi. Sette (2%) di questi pazienti sono stati sottoposti solo al prelievo di riferimento mentre otto (3%) sono stati sottoposti a un singolo prelievo tra il primo e l'ultimo prelievo con risultato CTC ≥ 3;
- Gruppo 2 (curva **blu**), 74 (17%) pazienti con CTC ≥ 3 prima dell'inizio della terapia con una diminuzione a CTC <3 al momento dell'ultimo prelievo;
- Gruppo 3 (curva **arancione**), 29 (7%) pazienti con CTC <3 al primo prelievo (riferimento, a 1-2 settimane e/o 3-5 settimane) con un aumento a CTC ≥ 3 al momento dell'ultimo prelievo di sangue;
- Gruppo 4 (curva **rossa**), 24 (6%) pazienti con CTC ≥ 3 in tutte le fasi di prelievo. Tre (13%) di questi pazienti sono stati sottoposti solo al prelievo di riferimento, uno (4%) è stato sottoposto a un prelievo a 3-5 settimane e uno (4%) è stato sottoposto a un singolo prelievo tra il primo e l'ultimo prelievo con risultato CTC <3.

Figura 16: Una riduzione di CTC ad un valore inferiore a 3 dopo l'inizio della terapia è predittiva di un aumento della OS, mentre un aumento ad un valore di CTC uguale o maggiore di 3 è predittivo di una OS più breve nei pazienti con MCRC



La **Figura 16** indica che i pazienti con MCRC che superano il valore soglia di CTC 3 in qualunque fase dall'inizio della terapia presentano una probabilità di decesso precoce molto più alta. I pazienti con CTC ≥ 3 in tutte le fasi (**Gruppo 4**) presentavano la OS mediana più breve, che era diversa in modo significativo rispetto alla OS mediana del **Gruppo 3**, del **Gruppo 2** e del **Gruppo 1**. I pazienti con CTC <3 in tutte le fasi (**Gruppo 1**) presentavano la OS mediana più lunga, che era diversa in modo significativo rispetto alla OS mediana del **Gruppo 4**, del **Gruppo 3** e del

Gruppo 2. La **Figura 16** mostra inoltre che i pazienti che hanno mostrato una riduzione delle CTC (**Gruppo 2**) presentavano un rischio di decesso molto più basso rispetto ai pazienti che mostravano un aumento della CTC (**Gruppo 3**).

2.3.4 Analisi univariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MCRC

I seguenti parametri sono stati analizzati utilizzando l'analisi univariata della regressione di Cox per valutare l'associazione con PFS e OS: sesso del paziente, stadio della malattia al momento della diagnosi (1-4), tempo di formazione delle metastasi (in continuo), età del paziente (≥ 65 o <65), sito della patologia primaria (colorettale, rettale o del colon), stato ECOG prima dell'inizio di una nuova linea terapeutica (0-2), linea terapeutica (1a o 2a o 3a), presenza di metastasi al fegato (sì o no), tipo di terapia (bevacizumab, irinotecan, e/o oxaliplatino inclusi o meno), conteggio CTC di riferimento (CTC ≥ 3 o $<3/7,5$ mL) e conteggio CTC di follow-up a 1-2 settimane, 3-5 settimane, 6-12 settimane e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia (CTC ≥ 3 o $<3/7,5$ mL). La **Tabella 16** mostra i risultati di questa analisi e presenta il rapporto di pericolo Cox (HR) e il valore p associato (test di Wald delle statistiche Z) nonché il numero di pazienti in ciascuna valutazione.

Tabella 16: Analisi univariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MCRC

Parametro	Categorie		N. pazienti MCRC	Rischio PFS dal riferimento		Rischio OS dal riferimento	
	Positivo	Negativo		HR	valore p	HR	valore p
Sesso	Maschi (1)	Femmine (0)	430	1,01	0,944	1,23	0,156
Stadio alla diagnosi primaria	4 vs 3 vs 2 vs 1		407	0,98	0,734	1,09	0,330
Tempo di formazione delle metastasi	Tempo in anni		428	1,00	0,901	0,92	0,121
Età al prelievo di sangue di riferimento	≥ 65 anni	<65 anni	430	1,65	$<0,001$	1,82	$<0,001$
Sito della patologia primaria	Colorettale (2), rettale (1), del colon (0)		429	1,03	0,733	1,02	0,866
Stato ECOG di riferimento	2 vs 1 vs 0		414	1,32	0,002	1,65	$<0,001$
Linea terapeutica	3 vs 2 vs 1		430	2,04	$<0,001$	1,63	$<0,001$
Metastasi al fegato	Sì	No	430	0,86	0,225	1,23	0,198
Bevacizumab	Sì	No	405	0,54	$<0,001$	0,62	0,001
Irinotecan	Sì	No	405	1,51	0,001	1,39	0,029
Oxaliplatino	Sì	No	405	0,53	$<0,001$	0,69	0,008
Numero CTC di riferimento	≥ 3	<3	413	1,59	$<0,001$	2,48	$<0,001$
Numero CTC 1 - 2 settimane	≥ 3	<3	357	2,02	$<0,001$	3,23	$<0,001$
Numero CTC 3 - 5 settimane	≥ 3	<3	334	2,19	$<0,001$	4,23	$<0,001$
Numero CTC 6 - 12 settimane	≥ 3	<3	314	4,59	$<0,001$	10,88	$<0,001$
Numero CTC 13 - 20 settimane	≥ 3	<3	203	5,07	$<0,001$	4,88	$<0,001$

2.3.5 Analisi multivariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MCRC

Le analisi multivariate della regressione di Cox sono state condotte per valutare la capacità predittiva indipendente del conteggio CTC rispetto agli effetti di importanti fattori clinici noti, statisticamente significativi nelle analisi univariate. Le CTC si sono rivelate importanti indicatori di PFS e OS (**Tabella 17**).

Tabella 17: Analisi multivariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MCRC

Variabile	N	Rischio PFS dal riferimento		Rischio OS dal riferimento	
		Rapporto di pericolo	valore p	Rapporto di pericolo	valore p
CTC di riferimento (<3 o ≥3)	373	1,76	<0,001	2,46	<0,001
Età al riferimento (<65 o ≥65)		1,47	0,002	1,84	<0,001
Statut ECOG de départ (0 vs 1 vs 2)		1,16	0,107	1,48	0,001
Linea terapeutica (1° vs 2° vs 3°)		1,59	<0,001	1,41	0,009
Bevacizumab (No vs Si)		0,65	0,001	0,68	0,021
Irinotecan (No vs Si)		0,76	0,156	1,25	0,363
Oxaliplatino (No vs Si)		0,57	0,002	1,00	0,984
CTC a 1 - 2 settimane (<3 vs ≥3)	321	1,76	0,003	2,77	<0,001
Età al riferimento (<65 o ≥65)		1,53	0,001	1,85	<0,001
Stato ECOG di riferimento (0 vs 1 vs 2)		1,26	0,025	1,54	0,001
Linea terapeutica (1° vs 2° vs 3°)		1,76	<0,001	1,62	0,001
Bevacizumab (No vs Si)		0,66	0,003	0,77	0,156
Irinotecan (No vs Si)		0,67	0,066	1,25	0,402
Oxaliplatino (No vs Si)		0,53	0,002	0,97	0,904
CTC a 3 - 5 settimane (<3 o ≥3)	302	2,35	<0,001	4,54	<0,001
Età al riferimento (<65 o ≥65)		1,58	0,001	2,06	<0,001
Stato ECOG di riferimento (0 vs 1 vs 2)		1,16	0,149	1,33	0,032
Linea terapeutica (1° vs 2° vs 3°)		1,74	<0,001	1,65	0,001
Bevacizumab (No vs Si)		0,68	0,007	0,86	0,410
Irinotecan (No vs Si)		0,58	0,012	0,99	0,966
Oxaliplatino (No vs Si)		0,47	<0,001	0,88	0,594
CTC a 6 - 12 settimane (<3 vs ≥3)	279	3,04	<0,001	9,43	<0,001
Età al riferimento (<65 o ≥65)		1,43	0,013	1,73	0,005
Stato ECOG di riferimento (0 vs 1 vs 2)		1,30	0,027	1,53	0,004
Linea terapeutica (1° vs 2° vs 3°)		1,73	<0,001	1,20	0,282
Bevacizumab (No vs Si)		0,61	0,001	0,82	0,337
Irinotecan (No vs Si)		0,78	0,258	1,47	0,181
Oxaliplatino (No vs Si)		0,62	0,020	1,35	0,278
CTC a 13 - 20 settimane (<3 vs ≥3)	186	4,50	<0,001	4,97	<0,001
Età al riferimento (<65 o ≥65)		1,26	0,218	1,55	0,061
Stato ECOG di riferimento (0 vs 1 vs 2)		1,13	0,417	1,13	0,526
Linea terapeutica (1° vs 2° vs 3°)		1,68	0,004	1,12	0,628
Bevacizumab (No vs Si)		0,68	0,058	0,89	0,655
Irinotecan (No vs Si)		0,73	0,311	1,20	0,636
Oxaliplatino (No vs Si)		0,65	0,135	1,31	0,477

2.4 Uso di CTC per monitorare lo stato clinico del tumore metastatico coloretale

2.4.1 Relazione fra sopravvivenza, CTC e valutazione della patologia tramite acquisizione di immagini

L'acquisizione di immagini radiologiche è uno dei mezzi principali per determinare lo stato della patologia e la risposta alla terapia per pazienti con tumore metastatico coloretale. Per stabilire la relazione dello stato clinico determinato dall'acquisizione di immagini in CTC, le CTC misurate in due momenti diversi e i risultati delle immagini sono stati confrontati 1) con la reale sopravvivenza clinica finale e 2) reciprocamente.

2.4.2 CTC

I dati precedenti hanno mostrato che i pazienti affetti da tumore metastatico coloretto con CTC $\geq 3/7,5$ mL di sangue in una delle successive visite di follow-up dall'inizio della terapia presentavano una maggiore probabilità di malattia progressiva associata ad una diminuzione della sopravvivenza totale rispetto a pazienti con CTC $<3/7,5$ mL di sangue. I risultati CTC ottenuti a 3-5 settimane dopo l'inizio della terapia e i risultati CTC ottenuti entro \pm un mese dallo studio di immagini sono stati classificati come favorevoli (CTC <3) e non favorevoli (CTC ≥ 3). Se era risultato più di un valore CTC entro \pm un mese dallo studio di immagini, è stato utilizzato il risultato CTC ottenuto nel momento più vicino alla data in cui è stato eseguito lo studio di immagini.

2.4.3 Acquisizione di immagini

Ciascun paziente MCRC doveva presentare una patologia misurabile, ovvero una lesione minima di 2 cm fino ad un massimo di 10 lesioni di questo tipo. Il metodo di acquisizione delle immagini per ciascun paziente veniva determinato dall'oncologo incaricato del trattamento per attenersi all'attuale standard di cur. Sia CT che MRI del torace, dell'addome e pelvisi sono stati eseguiti con il requisito che tutte le lesioni visibili al riferimento venissero seguite con lo stesso metodo in tutti gli studi di immagine successivi. L'interpretazione delle immagini è stata eseguita da un radiologo qualificato presso la sede partecipante utilizzando i criteri unidimensionali RECIST per classificare la valutazione della patologia ad ogni follow-up come risposta completa (CR), risposta parziale (PR), patologia stabile (SD) o patologia progressiva (PD).

Per ciascun paziente sono state acquisite immagini da un minimo di due fasi fino a un massimo di 8 fasi differenti. Questi studi includono un'immagine di riferimento, l'acquisizione di immagini a intervalli successivi di 2-3 mesi (6-12 settimane) e uno studio di immagine finale al termine dello studio del paziente. Copie di tutti gli studi di acquisizione immagine dei pazienti sono state inoltrate al coordinatore dello studio in ciascun sito clinico per l'archiviazione con i dati clinici del paziente.

Su un totale di 430 pazienti con MCRC valutabili, inclusi in questo studio, per 28 (7%) non è stata eseguita una valutazione radiologica di follow-up, 18 (4%) sono deceduti prima di poter effettuare uno studio di follow-up e per 384 (89%) sono stati eseguiti uno o più studi di acquisizione immagini di follow-up, valutati usando i criteri RECIST. Al momento del 1° follow-up di analisi radiologica nei 384 pazienti, 4 (1%) hanno mostrato una risposta completa, 117 (31%) hanno mostrato una risposta parziale, 186 (48%) soffrivano di una patologia stabile e 77 (20%) mostravano una patologia progressiva. Per la finalità di queste analisi, i pazienti che sono deceduti prima dello studio di immagini di follow-up sono stati considerati affetti da patologia progressiva.

Per la risposta alla terapia alla prima valutazione della patologia al first follow-up, il gruppo favorevole è stato definito come affetto da patologia stabile (S), risposta parziale (PR) o risposta completa (CR) in base ai criteri RECIST (patologia non progressiva, NPD) e il gruppo non favorevole come quello affetto da patologia progressiva o decesso (PD).

2.4.4 Relazione fra sopravvivenza all'acquisizione di immagini e CTC

Sono state eseguite analisi Kaplan-Meier separate per confrontare la sopravvivenza totale di pazienti MCRC nei gruppi favorevoli (CTC <3) e non favorevoli (CTC ≥ 3) utilizzando risultati CTC in due diverse fasi e lo studio di immagini al primo follow-up. Utilizzando i risultati ottenuti dai primi studi di acquisizione immagini di follow-up eseguiti a $9,1 \pm 2,9$ settimane (media = 8,6 settimane) dopo l'inizio della terapia (ovvero il prelievo di riferimento), la sopravvivenza media dei 307 (76%) pazienti per i quali l'acquisizione delle immagini indicava una NPD era di 19,1 mesi (95% IC = da 17,0 a 23,1) (**Figura 17, Tabella 18**). Per i 95 (24%) pazienti per i quali l'acquisizione di immagini ha indicato una PD, la sopravvivenza mediana era di 5,8 mesi (95% IC = da 4,4 a 7,7).

Sono stati eseguiti studi di immagini prima e dopo l'inizio della terapia su un totale di 320 pazienti affetti da MCRC o su pazienti che sono morti prima di poter eseguire uno studio di acquisizione immagini di follow-up e con CTC valutata 3-5 settimane dopo l'inizio della terapia (media = $3,8 \pm 0,7$ settimane dal prelievo di riferimento, mediana = 4,0 settimane). La sopravvivenza mediana di 282 (88%) pazienti con risultati CTC favorevoli (CTC <3) è risultata di 17,3 mesi (95% IC = da 15,0 a 19,5 mesi) (**Figura 18, Tabella 18**). I 38 pazienti (12%) con risultati CTC non favorevoli (CTC ≥ 3) presentavano una sopravvivenza media di 5,4 mesi (95% IC = da 3,6 a 9,4 mesi).

Per stabilire se le valutazioni CTC eseguite vicino al momento dell'acquisizione di immagini generavano prospettive di sopravvivenza simili a confronto con le valutazioni CTC eseguite circa 4 settimane dopo l'avvio della terapia, sono stati analizzati solo quei pazienti con valutazioni CTC eseguite entro \pm un mese dal primo studio di immagini al primo follow up (**Figura 19, Tabella 18**). Trecentosessantaquattro (364) pazienti su 402 (91%) avevano avuto delle valutazioni CTC entro un mese dallo studio di immagini del primo follow-up che era stato eseguito a $9,0 \pm 2,9$ settimane (mediana = 8,5 settimana) dopo l'inizio della terapia. La sopravvivenza mediana di 335 (92%) pazienti con risultati CTC favorevoli era di 17,2 mesi (95% IC = da 15,0 a 19,2 mesi). Per 29 (8%) pazienti con risultati CTC non favorevoli, la sopravvivenza mediana era di 5,4 mesi (95% IC = da 3,2 a 7,5 mesi). Questi dati indicano che le valutazioni CTC in entrambe le fasi fornivano risultati simili all'acquisizione di immagini condotta circa 9 settimane dopo l'inizio della terapia.

In questo studio, l'applicazione dell'analisi multivariata della regressione di Cox per la regolazione dell'acquisizione di immagini indicava che sia i valori CTC che l'acquisizione di immagini a 6-12 settimane sono indipendentemente associate con la sopravvivenza totale ma le CTC [rapporto di pericolo regolato: 7,9 (4,6-13,6)] sono indicatori più importanti rispetto all'acquisizione di immagini [rapporto di pericolo regolato: 3,1 (2,1-4,6)].

Tableau 18 : 18: OS di pazienti MCRC con valutazione CTC circa un mese dopo l'inizio della terapia ed entro un mese dalla valutazione radiologica

	N	Sopravvivenza mediana e (95% IC) in mesi
A. Acquisizione di immagini	402	
favorevole (NPD)	307 (76%)	19,1 (17,0 – 23,1)
Défavorable (ME)	95 (24%)	5,8 (4,4 – 7,7)
B. CTC 3-5 settimane	320	
favorevole (CTC <3)	282 (88%)	17,3 (15,0 – 19,5)
non favorevole (CTC ≥3)	38 (12%)	5,4 (3,6 – 9,4)
C. CTC (±1 mese dell'acquisizione di immagini)	364	
favorevole (CTC <3)	335 (92%)	17,2 (15,0 – 19,2)
non favorevole (CTC ≥3)	29 (8%)	5,4 (3,2 – 7,5)

Figura 17 : Correlazione fra valutazione radiologica e CTC con OS: OS di pazienti MCRC con NPD o PD al 1° studio di immagini di follow-up (N = 402)

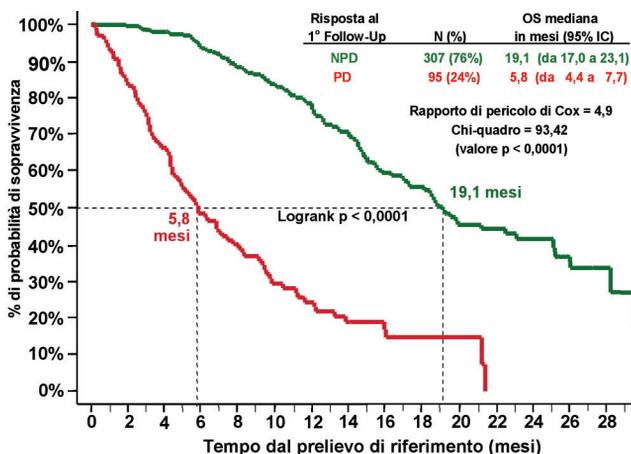


Figura 18 : Correlazione fra valutazione radiologica e CTC con OS: OS di pazienti MCRC con CTC <3 o ≥3 al 1° follow-up dopo l'inizio della terapia (N = 320)

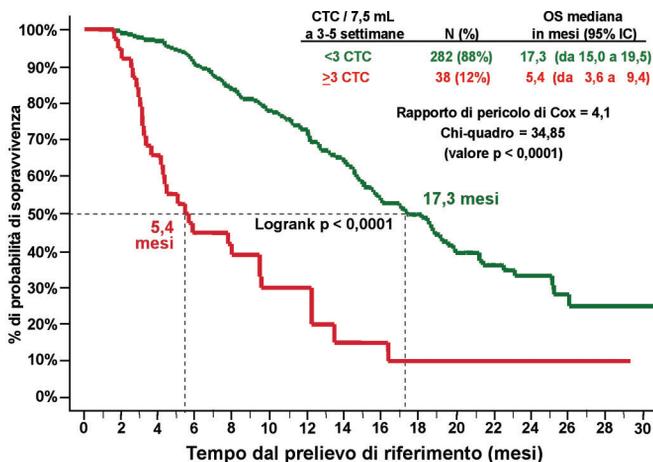
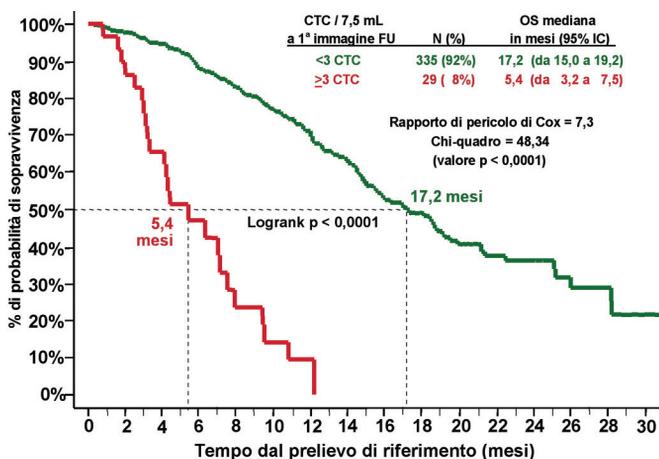


Figura 19: Correlazione fra valutazione radiologica e CTC con OS: OS di pazienti MCRC con CTC <3 o ≥3 entro ±1 mese al 1° studio di immagini di follow-up o decesso (N = 364)



2.4.5 Concordanze fra CTC e monitoraggio radiologico nei pazienti MCRC

Come indicato in precedenza, gli studi delle immagini rappresentano un fattore principale dell'attuale standard di cure per determinare la progressione della patologia e la risposta al trattamento per il tumore metastatico colorettale. Per supportare ulteriormente l'efficacia delle CTC nell'espletamento di tali valutazioni cliniche, sono state predisposte delle tabelle a due colonne con osservazioni concordanti e discordanti fra le CTC e l'acquisizione di immagini radiologiche.

Per la risposta alla terapia, il gruppo favorevole è stato definito come quello affetto da patologia stabile (S), risposta parziale (PR) o risposta completa (CR) in base ai criteri RECIST (patologia non progressiva, NPD) e il gruppo non favorevole come quello affetto da patologia progressiva (PD). Dei 18 pazienti che sono deceduti prima dello studio di immagini di follow-up, 10 sono stati sottoposti a prelievo di sangue di follow-up entro 30 giorni dal decesso; questi 10 pazienti sono stati classificati come affetti da patologia progressiva (PD) ai fini di tali confronti.

I risultati CTC ottenuti entro ± un mese dallo studio di immagini sono stati classificati come favorevoli (CTC <3) e non favorevoli (CTC ≥3). Se era risultato più di un valore CTC entro ± un mese dallo studio di immagini, è stato utilizzato il risultato CTC ottenuto nel momento più vicino alla data in cui è stato eseguito lo studio di immagini. Questa analisi ha impiegato tutti i prelievi ematici valutabili al fine di far corrispondere le CTC con gli studi di immagine e non solo quelli che erano stati selezionati per le fasi specificate come descritto in precedenza nel paragrafo 2.1.

Un totale di 366 pazienti MCRC ha avuto i risultati delle CTC entro un mese dallo studio di immagini o dal decesso. Il risultato di questo confronto "in relazione al paziente" fra le CTC e l'acquisizione di immagini (o il decesso) è indicato in **Tabella 19**.

Tabella 19: Confronto in relazione al paziente tra CTC e acquisizione di immagini

Risposta al 1° studio di immagini di follow-up	CTC entro ± 1 mese dall'acquisizione di immagini o decesso		Totale
	CTC <3/7,5 mL	CTC ≥3/7,5 mL	
Patologia non progressiva	272	13	285
Patologia progressiva	65	16	81
Totale	337	29	366

Misurazione	Stima	Inferiore 95% IC	Superiore 95% IC
Concordanza % positiva	20%	12%	30%
Concordanza % negativa	95%	92%	98%
Valore predittivo positivo	55%	36%	74%
Valore predittivo negativo	81%	76%	85%
Concordanza totale	79%	74%	83%
Rapporto di disuguaglianza	5,2	2,4	11,2

Dei 384 pazienti affetti da MCRC con uno o più studi di immagini di follow-up, è stato eseguito un totale di 911 studi di immagine che hanno fornito risultati di risposta radiologica utilizzabili. Un totale di 805 su 911 (88%) studi di immagini ha dato risultati CTC entro \pm un mese dallo studio di immagini. Dei 18 pazienti che sono deceduti prima dello studio di immagini di follow-up, 10 sono stati sottoposti a prelievo di sangue di follow-up entro 30 giorni precedenti il decesso; questi 10 pazienti sono stati classificati come affetti da patologia progressiva (PD) ai fini di tali confronti. Il risultato di questo confronto "in relazione all'osservazione" fra le CTC e l'acquisizione di immagini (o il decesso) nelle 815 osservazioni è indicato in **Tabella 20**.

Tabella 20: Confronto in relazione all'osservazione tra CTC e acquisizione di immagini in pazienti MCRC

Risposta in tutti gli studi delle immagini di follow-up	CTC entro \pm 1 mese dall'acquisizione di immagini o decesso		Totale
	CTC <3/7,5 mL	CTC \geq 3/7,5 mL	
Patologia non progressiva	597	33	630
Patologia progressiva	147	38	185
Totale	744	71	815

Misurazione	Stima	Inferiore 95% IC	Superiore 95% IC
Concordanza % positiva	21%	15%	27%
Concordanza % negativa	95%	93%	96%
Valore predittivo positivo	54%	41%	65%
Valore predittivo negativo	80%	77%	83%
Concordanza totale	78%	75%	81%
Rapporto di disuguaglianza	4,7	2,8	7,7

Nelle osservazioni seriali, solo una minoranza delle transizioni relative ai risultati delle immagini fra patologia non progressiva e patologia progressiva coincideva con una transizione corrispondente di conteggi CTC fra CTC <3 e \geq 3/7,5 mL.

Poiché il valore prognostico dei risultati CTC in una fase precedente era equivalente a quello dei risultati CTC al momento dell'acquisizione delle immagini (**Figura 18** e **Figura 19**), è stato predisposto un confronto in relazione al paziente utilizzando solo i risultati derivanti dallo studio di immagini del 1° follow-up, eseguito circa 9 settimane dall'inizio della terapia e i risultati CTC ottenuti a circa 4 settimane dall'inizio della terapia. Un totale di 320 (80%) su 402 pazienti ha ottenuto risultati CTC 3-5 settimane dopo l'inizio della terapia. Il risultato di questo confronto "in relazione al paziente" fra le CTC in una fase precedente e l'acquisizione di immagini (o decesso) è indicato in **Tabella 21**.

Tabella 21: Confronto in relazione al paziente tra CTC e acquisizione di immagini

Risposta al 1° studio di immagini di follow-up	CTC a 3-5 settimane Dopo l'inizio della terapia		Totale
	CTC <3/7,5 mL	CTC \geq 3/7,5 mL	
Patologia non progressiva	228	18	246
Patologia progressiva	54	20	74
Totale	282	38	320

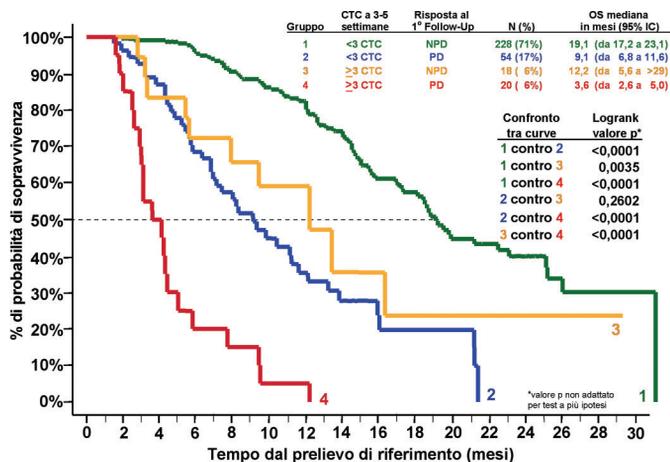
Misurazione	Stima	Inferiore 95% IC	Superiore 95% IC
Concordanza % positiva	27%	17%	39%
Concordanza % negativa	93%	89%	96%
Valore predittivo positivo	53%	36%	69%
Valore predittivo negativo	81%	76%	85%
Concordanza totale	78%	73%	82%
Rapporto di disuguaglianza	4,7	2,3	9,5

2.4.6 CTC come complemento all'acquisizione di immagini

Mentre la concordanza totale fra CTC e acquisizione di immagini era buona (circa 78%), vi era una discordanza per circa il 22% dei pazienti MCRC. Poiché le informazioni derivanti dalle valutazioni CTC devono essere utilizzate unitamente ad altre modalità diagnostiche per prendere decisioni sul trattamento, la valutazione CTC a 3-5 settimane dall'inizio della terapia e l'acquisizione di immagini nei seguenti gruppi sono state confrontate con la OS per determinare quale dei risultati discordanti rispecchiava al meglio la prognosi del paziente (**Figura 20**):

- Gruppo 1 (curva **verde**), 228 (71%) pazienti con CTC <3 a 3-5 settimane e NPD;
- Gruppo 2 (curva **blu**), 54 (17%) pazienti con CTC <3 a 3-5 settimane e PD;
- Gruppo 3 (curva **arancione**), 18 (6%) pazienti con CTC \geq 3 a 3-5 settimane e NPD;
- Gruppo 4 (curva **rossa**), 20 (6%) pazienti con CTC \geq 3 a 3-5 settimane e PD.

Figura 20: OS di pazienti MBC nei gruppi 1, 2, 3 e 4 utilizzando la valutazione CTC a 3-5 settimane dall'inizio della terapia (n = 320) e lo stato della patologia determinato nello studio di immagini al 1° follow-up



In questo studio, la determinazione CTC è un importante indicatore indipendente della sopravvivenza globale. I risultati dello studio hanno indicato che la combinazione di valutazioni CTC e radiologiche fornisce la più esatta valutazione della prognosi.

3 Pazienti con tumore metastatico della prostata (MPC)

È stato condotto uno studio clinico prospettico multicentrico per determinare se il numero delle CTC è predittivo della progressione della malattia e della sopravvivenza. I pazienti affetti da metastasi alla prostata in questo studio sono stati definiti come affetti da due aumenti consecutivi del marker dell'antigene specifico prostatico (PSA) nel siero al di sopra di un livello di riferimento, nonostante la gestione standard degli ormoni. Questi pazienti vengono comunemente descritti come affetti da cancro alla prostata indipendente dagli androgeni, resistente agli ormoni o resistente alla castrazione. È stato reclutato un totale di 231 pazienti con tumore metastatico alla prostata che hanno mostrato evidenza di progressione della PSA nonostante la terapia standard ormonale e all'inizio di una nuova linea o tipo di chemioterapia. I dati clinici sono stati analizzati su base "intent-to-treat". Le informazioni demografiche sul paziente sono presentate in **Tabella 22**.

Tabella 22: Dati demografici del paziente MPC

Categoria	Media \pm Std. Deviazione (mediana)	Numero di soggetti
Età al riferimento (in anni)	70 \pm 9 (70)	231
Pretrattamento:		
PSA (ng/mL)	547 \pm 1616 (144)	231
Emoglobina (g/dl)	12,3 \pm 1,6 (12,4)	221
Fosfatasi alcalina (AlkPhos) (IU/mL)	235 \pm 271 (144)	223
Lattato deidrogenasi (LDH) (IU/mL)	293 \pm 228 (224)	219
Albumina (g/dl)	3,9 \pm 2,6 (3,8)	214
	Descrizione delle categorie	Numero di soggetti (% del totale)
Razza	Bianca Nera Altri	209 (90%) 17 (7%) 5 (3%)
Punteggio ECOG di riferimento	0 1 2 Non nota	101 (44%) 100 (43%) 21 (9%) 9 (4%)
Punteggio Gleason	\geq 5 6 7 8 \geq 9 Non nota	18 (8%) 28 (12%) 63 (27%) 45 (20%) 54 (23%) 23 (10%)
Stadio alla diagnosi primaria	1 2 3 4 Non nota	14 (6%) 30 (13%) 58 (25%) 19 (8%) 110 (48%)
Linea terapeutica	1a 2° \geq 3°	154 (67%) 38 (16%) 39 (17%)
Taxotere nella linea terapeutica corrente	No Sì Non nota	67 (29%) 162 (70%) 2 (1%)
Metastasi ossea	Negativo Positivo Non nota	20 (8%) 207 (90%) 4 (2%)
Patologia misurabile	No Sì Non nota	142 (62%) 88 (38%) 1 (0%)
Metastasi viscerale	No Sì Non nota	141 (61%) 89 (39%) 1 (0%)

Il conteggio CTC di riferimento è stato determinato prima dell'inizio di una nuova linea chemioterapeutica. I seguenti intervalli di tempo sono stati scelti per la valutazione: riferimento (prima dell'inizio della terapia), 2-5 settimane (14-41 giorni dal riferimento), 6-8 settimane (42-62 giorni dal riferimento), 9-12 settimane (63-90 giorni dal riferimento), e 13-20 settimane (91-146 giorni dal riferimento) dopo l'inizio della terapia. Se più di un prelievo di sangue capitava all'interno degli intervalli di tempo prestabiliti, il prelievo di sangue più lontano dal prelievo di riferimento veniva utilizzato come risultato di ciascun intervallo di tempo.

3.1 Frequenze CTC

Tutti i 231 pazienti MPC valutabili sono stati sottoposti a un prelievo di sangue di riferimento. Duecentoventuno (221) di questi pazienti MPC hanno avuto più di un prelievo di sangue di follow-up dopo l'inizio della terapia. Dei dieci pazienti MPC con il solo prelievo di sangue di riferimento, tre sono deceduti prima di poter ottenere un prelievo di sangue di follow-up, uno ha presentato progressione ed è stato ricoverato in casa di riposo, uno ha dovuto interrompere la chemioterapia per una frattura all'anca, un paziente si è trasferito, tre hanno scelto di non sottoporsi a ulteriori prelievi e uno ha ritirato il proprio consenso a partecipare allo studio. Un totale di 214, 171, 158, e 149 pazienti MPC è stato sottoposto a prelievi ematici di follow-up rispettivamente a 2-5 settimane, 6-8 settimane, 9-12 settimane, and 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia.

Nel tumore metastatico della prostata, la progressione della patologia è determinata tramite la modifica della concentrazione della PSA. Per questo studio, la progressione della patologia è stata determinata dai siti utilizzando la PSA, l'acquisizione di immagini e/o sintomi e segni clinici. Per le analisi di riferimento, la sopravvivenza senza progressione della malattia (PFS – Progression Free Survival) è stata misurata a partire dal momento del prelievo del sangue di riferimento fino alla diagnosi di progressione o decesso, mentre la sopravvivenza totale (OS – Overall Survival) è stata misurata dal momento del prelievo di sangue di riferimento fino al momento del decesso o

dell'ultimo contatto con il paziente. Per le analisi di follow-up, la PFS è stata misurata dal momento del prelievo di sangue di follow-up fino alla diagnosi di progressione o al decesso, mentre la OS è stata misurata dal momento del prelievo di sangue di follow-up fino al momento del decesso o alla data dell'ultimo contatto con il paziente. I pazienti con progressione precedente alla data del prelievo di sangue in fase di valutazione sono stati esclusi dall'analisi PFS di quella fase e da tutti i prelievi ematici di follow-up successivi. I pazienti con follow-up di sopravvivenza aggiuntivi oltre la data del prelievo di sangue in fase di valutazione sono stati esclusi dalle analisi PFS e OS di quella fase. **Tabella 23.** La mostra i numeri di pazienti in ciascuna fase esclusi dalle analisi PFS o PFS e OS e i motivi dell'esclusione.

Tabella 23: Esclusioni dalle analisi PFS e OS nei pazienti MPC

Ora prelievo	Pazienti MPC non valutabili:					N. totale di pazienti MPC Valutabili	
	PFS e OS				Solo PFS	PFS	OS
	Sangue non prelevato	Prelievo di sangue da 1 a 7 giorni dopo la somministrazione di terapia	Nessun follow-up oltre la data del prelievo	Risultati CTC non valutabili o nessun risultato CTC	Prelievo dopo la data della progressione della patologia		
Riferimento	0	6	0	6	0	219	219
2-5 settimane	17	0	0	11	4	199	203
6-8 settimane	60	0	0	8	22	141	163
9-12 settimane	73	1	0	8	15	134	149
13-20 settimane	82	0	1	5	27	116	143

I risultati CTC ottenuti dai prelievi ematici di riferimento o di follow-up 2-5, 6-8, 9-12 e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia sono stati classificati come favorevoli (CTC <5) o non favorevoli (CTC ≥ 5). I livelli di PSA, di fosfatasi alcalina e di LDH riassunti nella tabella demografica e utilizzati nell'analisi sono stati tutti misurati in un laboratorio centrale in campioni di siero raccolti insieme ai campioni di sangue utilizzati per la valutazione CTC. I livelli di emoglobina e di albumina riassunti nelle tabelle e utilizzati nelle analisi erano i valori forniti dai siti e verificati dalle cartelle cliniche del paziente determinate entro ± 30 giorni dalla valutazione CTC di riferimento.

3.2 Analisi della sopravvivenza libera da progressione della malattia (PFS) dei pazienti affetti da MPC

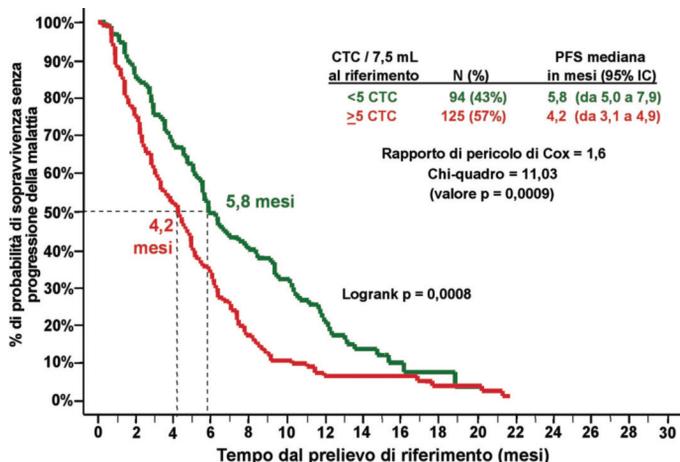
3.2.1 Analisi della PFS utilizzando i risultati delle CTC di riferimento

Duecentodiciannove (219) pazienti su 231 valutabili hanno ottenuto i risultati CTC di riferimento disponibili. Per l'analisi di Kaplan-Meier, i pazienti sono stati segmentati in due gruppi a seconda del rispettivo conteggio CTC di riferimento:

- Il gruppo favorevole (N = 94), rappresentato in **verde**, era formato da pazienti con CTC <5.
- Il gruppo non favorevole (N = 125), rappresentato in **rosso**, era composto da pazienti con CTC ≥ 5.

La PFS mediana era sostanzialmente più lunga nel gruppo favorevole rispetto al gruppo non favorevole (5,8 vs 4,2 mesi, rispettivamente). Questi risultati sono illustrati in **Figura 21** e **Tabella 24**.

Figura 21: PFS di pazienti affetti da MPC con CTC <5 o ≥5 al riferimento (N = 219).

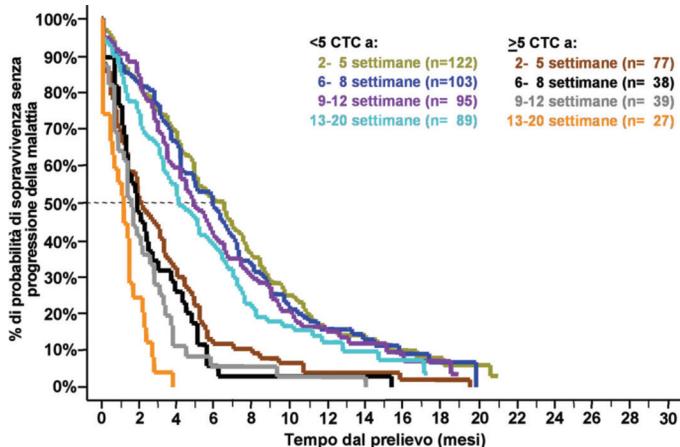


3.2.2 Analisi della PFS utilizzando i risultati CTC di follow-up

Per l'analisi di Kaplan-Meier, i pazienti affetti da MPC sono stati segmentati in due gruppi a seconda del rispettivo conteggio CTC in ciascuno dei vari prelievi ematici di follow-up. Entrambi i gruppi di pazienti in ciascuno dei diversi prelievi di follow-up dopo l'avvio della terapia per PFS sono illustrati in **Figura 22**. Questa figura illustra la capacità della CTC nei pazienti affetti da MPC con CTC <5 e ≥ 5 di predire le fasi della progressione clinica o il decesso a 2-5 settimane (n = 199), 6-8 settimane (n = 141), 9-12 settimane (n = 134) e 13-20 settimane (n = 116) dopo l'inizio della terapia.

- Il gruppo favorevole, rappresentato in **verde oliva, blu, viola e ciano** era composto da pazienti con CTC <5 rispettivamente a 2-5, 6-8, 9-12, e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia.
- Il gruppo non favorevole rappresentato in **marrone, nero, grigio, e arancione** era composto da pazienti con CTC ≥ 5 rispettivamente a 2-5, 6-8, 9-12, e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia.

Figura 22: PFS di pazienti con MPC con CTC <5 o ≥ 5 in momenti differenti del follow-up



La **Tabella 24** riassume i risultati dell'analisi PFS usando i livelli di CTC ed una soglia di CTC $\geq 5/7,5$ mL in ciascuno dei vari prelievi ematici.

Tabella 24: La sopravvivenza senza progressione della malattia (PFS) per i pazienti MPC con CTC <5 o ≥ 5 in fasi diverse

1 Tempo di campionam. dopo inizio Tx	2 N	3 CTC ≥ 5	4 PFS mediana in mesi (95% IC)		6 Log-rank valore p
			5		
			CTC <5	CTC ≥ 5	
Riferimento	219	125 (57%)	5,8 (5,0 – 7,9)	4,2 (3,1 – 4,9)	0,0008
2-5 settimane	199	77 (39%)	6,5 (4,9 – 7,4)	2,1 (1,4 – 3,3)	<0,0001
6-8 settimane	141	38 (27%)	5,9 (4,2 – 7,0)	1,9 (1,3 – 2,7)	<0,0001
9-12 settimane	134	39 (24%)	4,9 (3,8 – 6,2)	1,6 (0,9 – 2,6)	<0,0001
13-20 settimane	116	27 (23%)	4,1 (3,3 – 5,8)	1,2 (0,5 – 1,5)	<0,0001

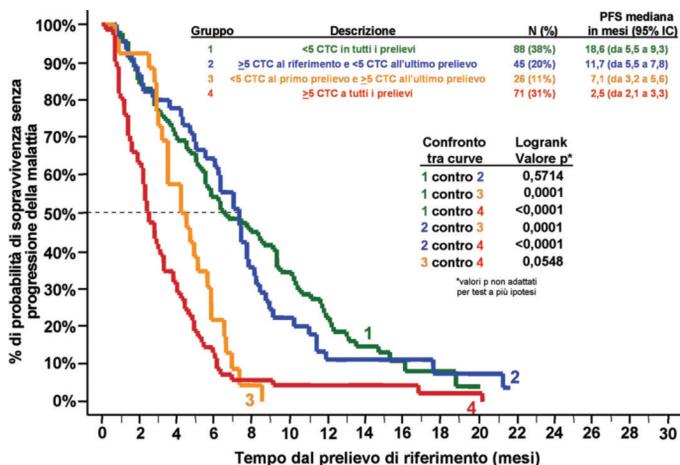
Come mostrato in **Figura 22** e **Tabella 24**, i pazienti MPC con valore CTC elevato (CTC $\geq 5/7,5$ mL di sangue intero) in qualsiasi fase presentavano una maggiore probabilità di progressione rapida rispetto a quelli con CTC <5. La **Tabella 24**, colonna 4 mostra che i tempi di PFS mediana per i pazienti con CTC <5 erano compresi tra 4,1 e 6,5 mesi ed erano sostanzialmente più lunghi rispetto ai tempi di PFS mediana per i pazienti con CTC ≥ 5 , compresi tra 1,2 e 4,2 mesi (colonna 5).

3.2.3 La riduzione o l'aumento dei valori CTC sono predittivi di PFS migliorate o diminuite

Il tempo di PFS trascorso è stato calcolato dal prelievo di sangue di riferimento. Per l'analisi di Kaplan-Meier mostrata in (Figura 23), i pazienti con MPC sono stati segmentati in quattro gruppi in base ai conteggi di CTC di riferimento, a 2-5 settimane, 6-8 settimane, 9-12 settimane e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia:

- Gruppo 1 (curva verde), 88 (38%) pazienti con CTC <5 in tutte le fasi. Cinque (6%) di questi pazienti sono stati sottoposti solo al prelievo di riferimento mentre sette (8%) sono stati sottoposti a un singolo prelievo tra il primo e l'ultimo prelievo con risultato CTC ≥ 5 ;
- Gruppo 2 (curva blu), 45 (20%) pazienti con CTC ≥ 5 prima dell'inizio della terapia con una diminuzione a CTC <5 al momento dell'ultimo prelievo;
- Gruppo 3 (curva arancione), 26 (11%) pazienti con CTC <5 al primo prelievo (riferimento, a 2-5 settimane e/o 6-8 settimane) con un aumento a ≥ 5 CTC al momento dell'ultimo prelievo;
- Gruppo 4 (curva rosso), 71 (31%) pazienti con CTC ≥ 5 in tutte le fasi di prelievo. Otto (11%) di questi pazienti sono stati sottoposti solo al prelievo di riferimento e due (3%) sono stati sottoposti a un singolo prelievo tra il primo e l'ultimo prelievo con risultato CTC <5.

Figura 23: Una riduzione di CTC ad un valore inferiore a 5 dopo l'inizio della terapia è predittiva di un aumento della PFS nei pazienti affetti da MPC



La Figura 23 mostra che i pazienti affetti da MPC con CTC ≥ 5 in tutte le fasi (Gruppo 4) presentavano la PFS mediana più breve, che era sostanzialmente diversa rispetto alla PFS mediana del Gruppo 3, del Gruppo 2 e del Gruppo 1. La differenza nel valore PFS mediano tra quei pazienti che hanno mostrato una riduzione della CTC dopo l'inizio della terapia (Gruppo 2) era sostanzialmente più lunga a confronto con quei pazienti che mostravano un aumento della CTC (Gruppo 3).

3.3 Analisi della sopravvivenza totale (OS) nei pazienti affetti da MPC

3.3.1 Analisi della OS utilizzando i risultati CTC di riferimento

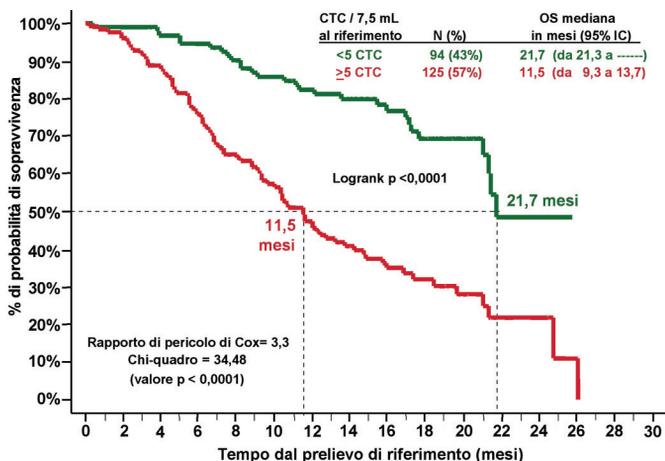
Decesso di 119 (52%) su 231 pazienti affetti da MPC, con una durata media di follow-up per i 112 (48%) pazienti ancora vivi di $16,1 \pm 4,9$ mesi (mediana = 16,5 mesi, intervallo = 1,9 – 25,7 mesi). Al momento delle analisi, 28 (30%) pazienti 94 del gruppo favorevole (CTC di riferimento <5) rispetto a 83 (66%) dei 125 pazienti del gruppo non favorevole (CTC di riferimento ≥ 5) sono deceduti.

Per l'analisi di Kaplan-Meier, 219 pazienti su 231 valutabili che avevano risultati di riferimento sono stati segmentati in due gruppi a seconda del rispettivo conteggio CTC di riferimento:

- Il gruppo favorevole (N = 94), rappresentato in verde, era formato da pazienti con <5 CTC.
- Il gruppo non favorevole (N = 125), rappresentato in rosso, era formato da pazienti con CTC ≥ 5 .

La OS mediana era sostanzialmente più lunga nel gruppo favorevole rispetto al gruppo non favorevole (21,7 vs 11,5 mesi, rispettivamente). Questi risultati sono illustrati in Figura 24.

Figura 24: OS di pazienti affetti da MPC con CTC <5 o >5 al riferimento (N = 219).

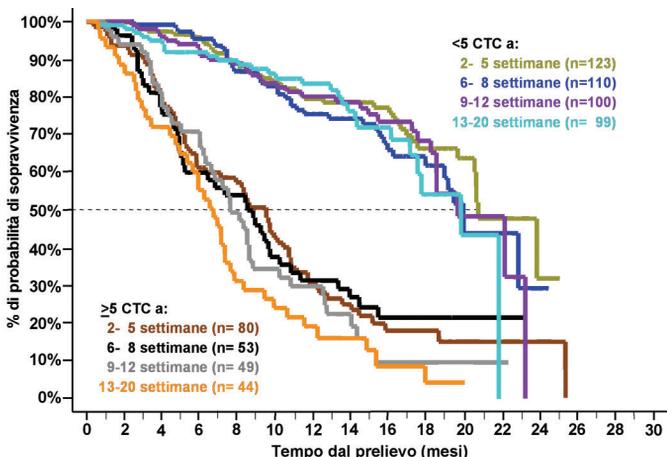


3.3.2 OS con risultati CTC di follow-up

Le analisi di Kaplan-Meier di entrambi i gruppi di pazienti affetti da MPC in ogni diversa fase di prelievo dopo l'inizio della terapia sono illustrate nella Figura 25. Questa figura illustra la capacità delle CTC nei pazienti affetti da MPC con CTC <5 e ≥ 5 a 2-5 settimane (n = 203), 6-8 settimane (n = 163), 9-12 settimane (n = 149) e 13-20 settimane (n = 143) dopo l'inizio della terapia di predire le fasi della progressione clinica o il decesso. I tempi di OS sono stati calcolati dal momento di ciascun prelievo di sangue.

- Il gruppo favorevole, rappresentato in verde oliva, blu, viola e ciano, era composto da pazienti con CTC <5.
- Il gruppo non favorevole, rappresentato in marrone, nero, grigio e arancione, era composto da pazienti con CTC ≥ 5 .

Figura 25: OS di pazienti con MPC con CTC <5 o ≥ 5 in fasi diverse del follow-up.



La Tabella 25 riassume i risultati dell'analisi OS usando i livelli di CTC ed una soglia di CTC $\geq 5/7,5$ mL in ciascuno dei vari prelievi ematici nelle diverse fasi.

Tabella 25: Sopravvivenza globale (OS) per i pazienti con MPC con CTC <5 o ≥ 5 in diverse fasi

Tempo di campionam. dopo inizio Tx	2	3	5		6
			OS mediana in mesi (95% IC)		
			CTC <5	CTC ≥ 5	
Riferimento	219	125 (57%)	21,7 (21,3 – NR)	11,5 (9,3 – 13,7)	<0,0001
2-5 settimane	203	80 (39%)	20,7 (20,5 – NR)	9,5 (5,8 – 10,7)	<0,0001
6-8 settimane	163	53 (33%)	19,9 (17,9 – NR)	8,5 (5,0 – 10,2)	<0,0001
9-12 settimane	149	49 (33%)	19,6 (18,5 – NR)	7,6 (6,2 – 8,6)	<0,0001
13-20 settimane	143	44 (31%)	19,8 (17,1 – NR)	6,7 (4,9 – 7,6)	<0,0001

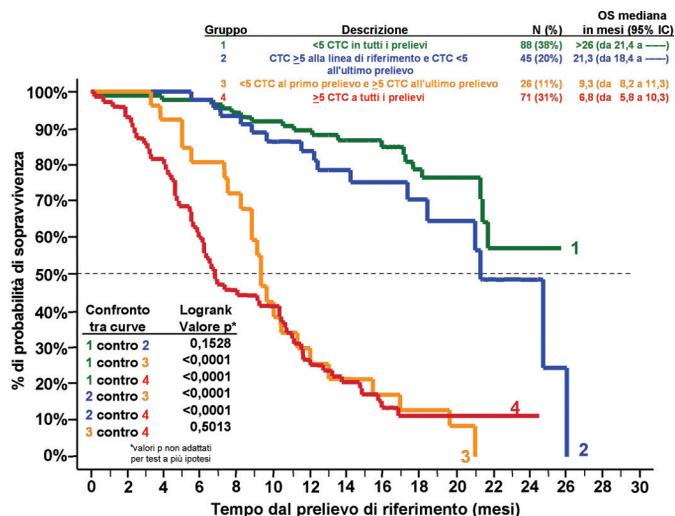
Come illustrato in **Figura 25** e **Tabella 25**, colonne 4 e 5, i pazienti affetti da MPC con CTC ≥ 5 in qualsiasi fase temporale presentavano una probabilità molto più alta di decesso precoce rispetto a quelli con CTC <5. I tempi OS mediani per quei pazienti con CTC <5 andavano da 9,6 a 21,7 mesi e sono stati sostanzialmente più lunghi dei tempi OS mediani per quei pazienti con CTC ≥ 5, che andavano da 6,7 a 11,5 mesi.

3.3.3 La riduzione o l'aumento delle CTC sono predittivi di una OS migliorata o diminuita

Il tempo di OS trascorso è stato calcolato dal prelievo di sangue di riferimento. Per l'analisi di Kaplan-Meier (**Figura 26**), i pazienti sono stati segmentati in quattro gruppi in base ai conteggi di CTC di riferimento, a 2-5 settimane, a 6-8 settimane, a 9-12 settimane e a 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia:

- Gruppo 1 (curva **verde**), 88 (38%) pazienti con CTC <5 in tutte le fasi. Cinque (6%) di questi pazienti sono stati sottoposti solo al prelievo di riferimento mentre sette (8%) sono stati sottoposti a un singolo prelievo tra il primo e l'ultimo prelievo con risultato CTC ≥ 5;
- Gruppo 2 (curva **blu**), 45 (20%) pazienti con CTC ≥ 5 prima dell'inizio della terapia con una diminuzione a CTC <5 al momento dell'ultimo prelievo;
- Gruppo 3 (curva **arancione**), 26 (11%) pazienti con CTC <5 al primo prelievo con un aumento a ≥ CTC 5 al momento dell'ultimo prelievo;
- Gruppo 4 (curva **rosso**), 71 (31%) pazienti con CTC ≥ 5 in tutte le fasi di prelievo. Otto (11%) di questi pazienti sono stati sottoposti solo al prelievo di riferimento e due (3%) sono stati sottoposti a un singolo prelievo tra il primo e l'ultimo prelievo con risultato CTC <5.

Figura 26: Una riduzione di CTC ad un valore inferiore a 5 dopo l'inizio della terapia è predittiva di un aumento della OS, mentre un aumento ad un valore di CTC uguale o maggiore di 5 è predittivo di una OS più breve nei pazienti con MPC.



La **Figura 26** indica che i pazienti con CTC ≥ 5 in qualunque fase dall'inizio della terapia presentavano una probabilità di decesso precoce molto più alta. I pazienti con CTC ≥ 5 in tutte le fasi (**Gruppo 4**) presentavano la OS mediana più breve, che era diversa in modo significativo rispetto alla OS mediana del **Gruppo 2** e del **Gruppo 1** ma non del **Gruppo 3**. I pazienti con CTC <5 in tutte le fasi (**Gruppo 1**) presentavano la OS mediana più lunga, che era diversa in modo significativo rispetto alla OS mediana del **Gruppo 4** e del Gruppo 3 ma non del **Gruppo 2**. La **Figura 26** mostra

inoltre che i pazienti che hanno mostrato una riduzione della CTC (**Gruppo 2**) presentavano un aumento della possibilità di sopravvivenza e una OS mediana simile ai pazienti con CTC favorevole in tutti i prelievi (**Gruppo 1**). La figura mostra inoltre che livelli CTC non favorevoli dopo l'inizio della terapia provocavano una riduzione significativa della sopravvivenza totale (**Gruppo 3** e **Gruppo 4**).

3.3.4 Analisi univariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MPC

L'analisi univariata della regressione proporzionale dei rischi di Cox è stata utilizzata per valutare l'associazione dei seguenti parametri di pretrattamento con PFS e OS: stadio della patologia alla diagnosi (1-4), età del paziente (≥ 70 o <70 anni), stato ECOG prima dell'inizio di una nuova linea di terapia (0-2), Punteggio Gleason (2-10), livello di emoglobina entro ± 30 dal prelievo di riferimento (g/dl, in continuo), livello di albumina entro ± 30 giorni dal prelievo di riferimento (g/dl, in continuo), livello di testosterone al momento del prelievo di riferimento (ng/mL, in continuo), livello di LDH al momento del prelievo di riferimento (IU/mL, in continuo), livello di fosfatasi alcalina al momento del prelievo di riferimento (IU/mL, in continuo), livello PSA al momento del prelievo di riferimento (ng/mL, in continuo), tempi raddoppiati di PSA di pretrattamento (mesi, in continuo), velocità di PSA di pretrattamento (ng/mL/mese, in continuo), linea terapeutica (1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a, or 6^a), tipo di terapia (taxotere incluso o meno), presenza di patologia misurabile (sì o no), presenza di metastasi ossea (sì o no), presenza di metastasi viscerale (sì o no), livello CTC di riferimento (CTC $\geq 5/7,5$ mL o CTC $<5/7,5$ mL) e conteggi CTC di follow-up a 2-5, 6-8, 9-12 e 13-20 settimane.

Per queste analisi, i tempi di PFS e OS trascorsi sono stati calcolati dal momento del prelievo di sangue di riferimento. I risultati della regressione di Cox (ovvero il rapporto di pericolo e l'intervallo di confidenza associato al 95%, il valore chi-square e i valori p associati) per la capacità dei parametri di predire indipendentemente PFS e OS sono forniti nella **Tabella 26** insieme al numero di pazienti in ciascuna valutazione.

Tabella 26: Analisi univariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MPC

Parametro	Categorie		N. di pazienti MPC	Rischio PFS dal riferimento		Rischio OS dal riferimento	
	Positivo	Negativo		HR	valore p ²	HR	valore p ²
Stadio alla diagnosi primaria	4 vs. 3 vs. 2 vs. 1		121	0,88	0,206	0,83	0,174
Età al prelievo di sangue di riferiment	≥ 70	<70	231	0,96	0,764	1,28	0,178
Stato ECOG al momento dell'entrata dello studio	2 vs 1 vs 0		222	1,34	0,011	2,36	<0,001
Punteggio Gleason	da 3 400 a 2		208	1,01	0,919	1,02	0,717
Tempi raddoppiati di PSA di pretrattamento (mesi)	In continuo		230	0,97	0,542	0,97	0,664
Velocità PSA di pretrattamento (ng/mL/mese)	In continuo		230	1,00	0,200	1,00	0,544
Emoglobina di riferimento (g/dl)	In continuo		221	0,87	0,002	0,71	<0,001
Albumina di riferimento (g/dl)	In continuo		214	0,99	0,748	1,02	0,557
Testosterone di riferimento (ng/mL) ¹	In continuo		223	1,07	0,900	2,71	0,060
LDH di riferimento (IU/mL) ¹	In continuo		219	1,001	<0,001	1,002	<0,001
Fosfatasi alcalina di riferimento (IU/mL) ¹	In continuo		223	1,00	0,158	1,0008	0,001
Linea terapeutica	Continuo (1 - 6)		231	1,23	0,003	1,28	0,003
Tipo di terapia (Taxotere: Si/No)	Si	No	229	0,57	<0,001	0,59	0,006
Patologia misurabile	Si	No	230	1,00	0,993	1,28	0,181
Metastasi ossea	Si	No	227	1,02	0,933	2,22	0,057
Metastasi viscerale	Si	No	230	1,01	0,918	1,26	0,216
PSA di riferimento (ng/mL) ¹	In continuo		231	1,00	0,746	1,00	0,907
PSA a 2 - 5 settimane (ng/mL) ¹	In continuo		207	1,00	0,819	1,00	0,794
PSA a 6 - 8 settimane (ng/mL) ¹	In continuo		167	1,00	0,426	1,00	0,654
PSA a 9 - 12 settimane (ng/mL) ¹	In continuo		155	1,00	0,684	1,00	0,324
PSA a 13 - 20 settimane (ng/mL) ¹	In continuo		143	1,00	0,639	1,00	0,205
Riduzione PSA a 2 - 5 settimane dal rif. (%) ¹	<30%	≥ 30%	207	1,56	0,006	1,24	0,318
Riduzione PSA a 6 - 8 settimane dal rif. (%) ¹	<30%	≥ 30%	167	2,21	<0,001	2,27	0,001
Riduzione PSA a 9 - 12 settimane dal rif. (%) ¹	<30%	≥ 30%	155	2,76	<0,001	2,30	<0,001
Riduzione PSA a 13 - 20 settimane dal rif. (%) ¹	<30%	≥ 30%	143	2,69	<0,001	3,19	<0,001
Numero CTC di riferimento	≥ 5	<5	219	1,62	0,001	3,33	<0,001
Numero CTC 2 - 5 settimane	≥ 5	<5	203	2,34	<0,001	4,46	<0,001
Numero CTC 6 - 8 settimane	≥ 5	<5	163	3,29	<0,001	3,66	<0,001
Numero CTC 9 - 12 settimane	≥ 5	<5	149	3,23	<0,001	5,82	<0,001
Numero CTC 13 - 20 settimane	≥ 5	<5	144	4,82	<0,001	7,18	<0,001

¹ Determinato dal prelievo di siero alla stessa data del prelievo di sangue per la CTC

² valore p dal test di Wald della statistica Z

3.3.5 Analisi multivariata della regressione di Cox nei pazienti affetti da MPC

Le analisi multivariate della regressione di Cox sono state condotte per valutare la capacità predittiva indipendente del conteggio CTC rispetto agli effetti di importanti fattori clinici noti, statisticamente significativi nelle analisi univariate. Le CTC si sono rivelate importanti indicatori di PFS e OS nella maggior parte delle fasi temporali (Tabella 27).

Tabella 27: Analisi multivariata della regressione di Cox nelle pazienti affette da MPC

Parametro	N. di pazienti	Rischio PFS dal riferimento		Rischio OS dal riferimento	
		HR	valore p ²	HR	valore p ²
CTC di riferimento (<5 o ≥5)	188	1,14	0,455	1,92	0,009
Stato ECOG di riferimento (0 vs 1 vs 2)		1,00	0,982	1,46	0,032
Emoglobina di riferimento (g/dl) ³		0,88	0,027	0,81	0,007
LDH di riferimento (IU/mL) ^{1,3}		1,0007	0,018	1,002	<0,001
Fosfatasi alcalina di riferimento (IU/mL) ^{1,3}		---	---	1,00	0,410
Linea terapeutica (1 ^a fino a 6 ^a)		1,14	0,145	1,07	0,547
Tipo di terapia (Taxotere: Sì/No)		0,63	0,009	0,70	0,139
CTC a 2 - 5 settimane (<5 o ≥5)	173	1,48	0,041	2,91	<0,001
Riduzione della PSA a 2 - 5 settimane dal riferimento (≥30% vs <30%) ¹		1,40	0,077	1,13	0,637
Stato ECOG di riferimento (0 vs 1 vs 2)		0,97	0,836	1,46	0,054
Emoglobina di riferimento (g/dl) ³		0,93	0,246	0,89	0,141
LDH di riferimento (IU/mL) ^{1,3}		1,002	0,002	1,003	<0,001
Fosfatasi alcalina di riferimento (IU/mL) ^{1,3}		---	---	1,00	0,622
Linea terapeutica (1 ^a fino a 6 ^a)		1,11	0,274	1,11	0,399
Tipo di terapia (Taxotere: Sì/No)		0,75	0,133	0,80	0,397
CTC a 6 - 8 settimane (<5 o ≥5)	139	2,14	<0,001	2,13	0,009
Riduzione della PSA a 6 - 8 settimane dal riferimento (≥30% vs <30%) ¹		1,88	0,002	2,38	0,007
Stato ECOG di riferimento (0 vs 1 vs 2)		1,04	0,810	1,52	0,088
Emoglobina di riferimento (g/dl) ³		0,97	0,695	0,79	0,013
LDH di riferimento (IU/mL) ^{1,3}		1,002	0,003	1,004	<0,001
Fosfatasi alcalina di riferimento (IU/mL) ^{1,3}		---	---	1,00	0,780
Linea terapeutica (1 ^a fino a 6 ^a)		1,37	0,001	1,35	0,035
Tipo di terapia (Taxotere: Sì/No)		0,80	0,278	1,45	0,276
CTC a 9 - 12 settimane (<5 o ≥5)	125	1,74	0,015	3,94	<0,001
Riduzione della PSA a 9 - 12 settimane dal riferimento (≥30% vs <30%) ¹		2,23	<0,001	1,46	0,221
Stato ECOG di riferimento (0 vs 1 vs 2)		1,21	0,307	1,89	0,004
Emoglobina di riferimento (g/dl) ³		0,93	0,322	0,97	0,758
LDH di riferimento (IU/mL) ^{1,3}		1,00	0,190	1,003	<0,001
Fosfatasi alcalina di riferimento (IU/mL) ^{1,3}		---	---	1,00	0,989
Linea terapeutica (1 ^a fino a 6 ^a)		1,25	0,052	1,11	0,499
Tipo di terapia (Taxotere: Sì/No)		0,97	0,903	1,26	0,486
CTC a 13 - 20 settimane (<5 o ≥5)	123	2,95	<0,001	3,75	0,001
Riduzione della PSA a 13 - 20 settimane dal riferimento (≥30% vs <30%) ¹		1,97	0,002	1,52	0,275
Stato ECOG di riferimento (0 vs 1 vs 2)		0,98	0,919	1,98	0,002
Emoglobina di riferimento (g/dl) ³		1,03	0,723	0,87	0,232
LDH di riferimento (IU/mL) ^{1,3}		1,00	0,380	1,003	<0,001
Fosfatasi alcalina di riferimento (IU/mL) ^{1,3}		---	---	1,00	0,078
Linea terapeutica (1 ^a fino a 6 ^a)		1,25	0,050	1,06	0,751
Tipo di terapia (Taxotere: Sì/No)		1,04	0,882	0,90	0,770

¹ Determinato dal prelievo di siero alla stessa data del prelievo di sangue per la CTC

² valore p dal test di Wald della statistica Z

³ Valutato come parametro continuo

3.4 Uso di CTC per monitorare lo stato clinico dei pazienti affetti da umore metastatico alla prostata

3.4.1 Relazione fra sopravvivenza, CTC e valutazione della patologia tramite PSA

A oggi, una riduzione del valore PSA è uno dei mezzi principali per determinare la risposta alla terapia nei pazienti affetti da MPC. Per stabilire la relazione dello stato clinico come determinato da PSA a CTC, sono state misurate delle riduzioni del $\geq 30\%$ o $\geq 50\%$ di PSA e CTC 2-5 settimane, 6-8 settimane, 9-12 settimane e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia e confrontate con la sopravvivenza globale.

Per l'analisi di Kaplan-Meier, i tempi di OS trascorsi sono stati calcolati dal momento del prelievo di sangue. I pazienti sono stati divisi in segmenti nei gruppi favorevoli in base a valori CTC <5 a momento della valutazione e di una riduzione $\geq 30\%$ della PSA dal riferimento al momento della valutazione. I pazienti sono stati divisi in segmenti nei gruppi non favorevoli in base a valori CTC ≥ 5 e a una riduzione $<30\%$ della PSA dal riferimento al momento della valutazione.

La **Figura 27** mostra i risultati dell'analisi 2-5 settimane dopo l'inizio della terapia, la **Figura 28** l'analisi 6-8 settimane dopo l'inizio della terapia, la **Figura 29** l'analisi 9-12 settimane dopo l'inizio della terapia e la **Figura 30** l'analisi 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia.

Figura 27: OS dei pazienti MPC 2-5 settimane dopo l'inizio della terapia

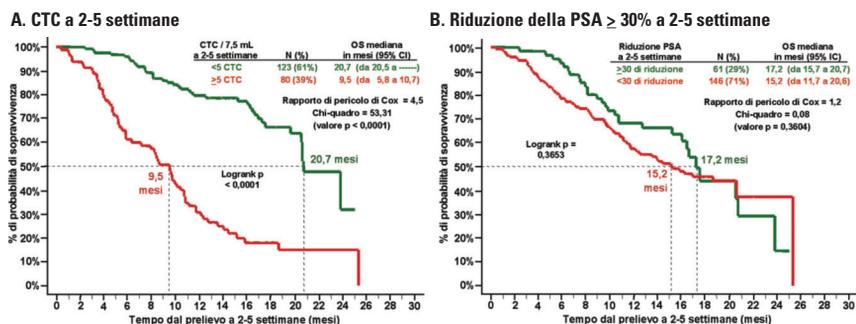


Figura 28: OS dei pazienti MPC 6-8 settimane dopo l'inizio della terapia

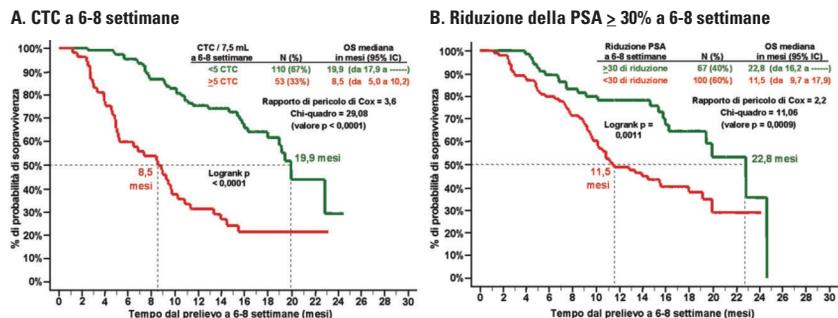


Figura 29: OS dei pazienti MPC 9-12 settimane dopo l'inizio della terapia

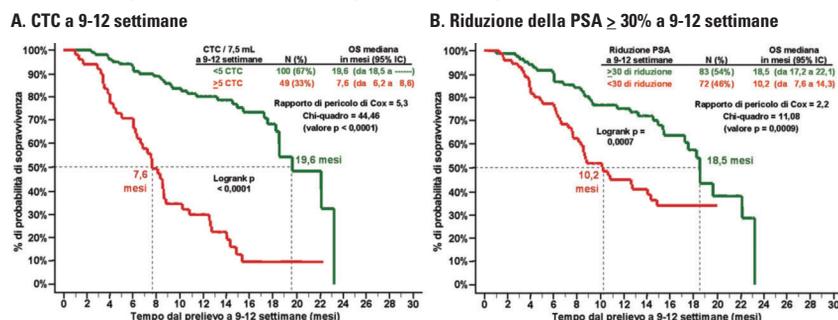
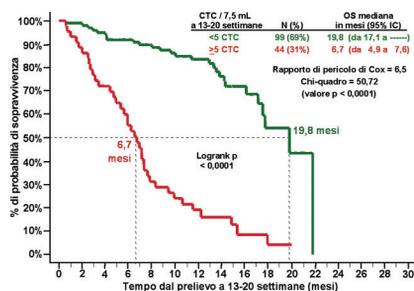
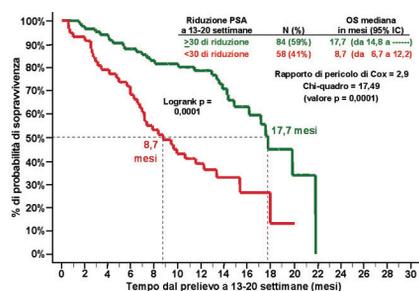


Figura 30: OS dei pazienti MPC 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia

A. CTC a 13-20 settimane



B. Riduzione della PSA $\geq 30\%$ a 13-20 settimane



La **Tabella 28** illustra il confronto della sopravvivenza globale mediana in diversi momenti dopo la terapia con CTC, una riduzione del 30% della PSA e una riduzione del 50% della PSA.

Tabella 28: Confronto della OS media tra gruppi CTC e riduzione PSA favorevoli e non favorevoli.

Fase temporale	CTC / 7,5mL					Riduzione della PSA del 30% rispetto al riferimento				Riduzione della PSA del 50% rispetto al riferimento								
	N	≥5 (%)	OS mediana <5	OS mediana ≥5	logrank Valore p	HR	N	<30 (%)	OS mediana ≥30%	OS mediana <30%	logrank Valore p	HR	N	<50 (%)	OS mediana ≥50%	OS mediana <50%	logrank Valore p	HR
2-5 settimane	203	39%	20,7	9,5	<0,0001	4,5	207	71%	17,2	15,2	0,3653	1,2	207	83%	17,5	16,2	0,5599	1,2
6-8 settimane	163	33%	19,9	8,5	<0,0001	3,6	167	60%	22,8	11,5	0,0011	2,2	167	75%	22,8	14,4	0,0117	2,1
9-12 settimane	149	33%	19,6	7,6	<0,0001	5,3	155	46%	18,5	10,2	0,0007	2,2	155	59%	19,6	10,8	0,0006	2,3
13-20 settimane	143	31%	19,8	6,7	<0,0001	6,5	142	41%	17,7	8,7	<0,0001	2,9	142	46%	9,9	9,9	0,0001	2,6

I dati dalla **Figura 27** fino alla **Figura 30** e in **Tabella 28**, illustrano una differenza altamente significativa nella sopravvivenza globale tra i pazienti con CTC non favorevole e CTC favorevole in tutte le fasi temporali testate, laddove le valutazioni PSA non erano significative fino a 6-8 settimane dopo l'inizio della terapia. Sebbene le differenze nei valori OS medi tra i gruppi di riduzione favorevoli (riduzione della PSA $\geq 30\%$ o $\geq 50\%$ dal riferimento) e non favorevoli (riduzione PSA $<30\%$ o $<50\%$ dal riferimento) i gruppi di riduzione del PSA erano significativi, la separazione tra i gruppi CTC favorevoli (CTC <5) e non favorevoli (CTC ≥ 5) sembrava superiore ed era significativa in tutte le fasi dopo l'avvio della terapia.

3.4.2 Concordanze tra CTC e le modifiche della PSA nei pazienti MPC

Ad oggi, una riduzione $\geq 30\%$ o $\geq 50\%$ della PSA viene comunemente utilizzata per valutare la progressione della malattia nei pazienti affetti da cancro metastatico alla prostata. Quindi, per stabilire la relazione tra la CTC e le modifiche nella PSA sono state costruite tabulazioni accoppiate di osservazioni concordanti e discordanti tra CTC e le modifiche della PSA per ogni fase temporale dopo l'inizio della terapia. Sebbene siano stati calcolati i confronti tra CTC e le modifiche della PSA in entrambe le grandezze, sono stati riportati solo i dati CTC vs una modifica della PSA $\geq 30\%$. Questa decisione si basa su una recente pubblicazione (*J Nat Ca Inst* 98 (8): p. 516-521, 2006) che dimostra che una diminuzione della PSA in 3 mesi del 30% indica una più forte associazione con la diminuzione del rischio di morte rispetto a una diminuzione della PSA del 50%. Inoltre un confronto dei risultati in relazione all'osservazione e in relazione al paziente della riduzione della PSA del 30% e del 50% rispetto alle analisi CTC non ha mostrato sostanziali differenze nella percentuale di concordanza positiva, nella percentuale di concordanza negativa e nella concordanza globale ciascuna delle fasi temporali osservate.

Sono stati analizzati campioni di siero dal laboratorio centrale e valutati i risultati CTC di un totale di 197, 159, 146, e 138 pazienti rispettivamente a 2-5 settimane, 6-8 settimane, 9-12 settimane, e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia. Per determinare la risposta di un paziente alla terapia, la percentuale di modifica della PSA rispetto al valore di riferimento è stata calcolata per ciascuna fase dopo l'inizio della terapia. Per le modifiche della PSA in ciascuna fase temporale, il gruppo favorevole è stato definito come formato da pazienti con una riduzione della PSA del 30% e il gruppo non favorevole formato da pazienti con una riduzione della PSA $<30\%$. Per le CTC in ciascuna fase temporale, il gruppo favorevole è stato definito come formato da pazienti con CTC <5 per 7,5 mL e il gruppo non favorevole formato da pazienti con una riduzione CTC ≥ 5 .

Poiché i risultati CTC rispetto a quelli PSA nei confronti in relazione al paziente tra CTC e una riduzione PSA $\geq 30\%$ a 2-5 settimane e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia mostravano una più significativa discordanza e concordanza rispettivamente, tali dati sono mostrati rispettivamente in **Tabella 29** e **Tabella 30**.

Tabella 29: Confronto in relazione al paziente in pazienti MPC tra CTC e una riduzione della PSA del 30% a 2-5 settimane

% Riduzione della PSA dal riferimento 2-5 settimane dopo l'inizio della terapia	CTC 2-5 settimane dopo l'inizio della terapia		Totale
	CTC <5/7,5 mL	CTC ≥ 5 /7,5 mL	
riduzione della PSA ≥30%	50	11	61
riduzione della PSA <30%	69	67	136
Totale	119	78	197

Misurazione	Stima	Inferiore 95% IC	Superiore 95% IC
Concordanza % positiva	49%	41%	58%
Concordanza % negativa	82%	70%	91%
Valore predittivo positivo	86%	76%	93%
Valore predittivo negativo	42%	33%	51%
Concordanza totale	59%	52%	66%
Rapporto di disuguaglianza	4,4	2,1	9,2

Tabella 30: Confronto in relazione al paziente in pazienti MPC tra CTC e una riduzione PSA del 30% a 13-20 settimane.

% Riduzione della PSA dal riferimento 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia	CTC 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia		Totale
	<5 CTC	≥ 5 CTC	
riduzione della PSA ≥ 30%	72	9	81
riduzione della PSA < 30%	23	34	57
Totale	95	43	138

Misurazione	Stima	Inferiore 95% IC	Superiore 95% IC
Concordanza % positiva	60%	46%	72%
Concordanza % negativa	89%	80%	95%
Valore predittivo positivo	79%	64%	90%
Valore predittivo negativo	76%	66%	84%
Concordanza totale	77%	69%	84%
Rapporto di disuguaglianza	11,8	4,9	28,3

I risultati combinati di un confronto "in relazione all'osservazione" delle CTC e delle modifiche della PSA utilizzando una soglia di riduzione ≥ 30% a 2-5 settimane, 6-8 settimane, 9-12 settimane, and 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia sono mostrati nella **Tabella 31**.

Tabella 31: Confronto in relazione all'osservazione in pazienti con MPC tra CTC e una riduzione della PSA del 30%.

% Riduzione PSA dal riferimento dopo l'inizio della terapia	CTC dopo l'inizio della terapia		Totale
	CTC <5	CTC ≥ 5	
riduzione della PSA ≥ 30%	243	41	284
riduzione della PSA < 30%	175	181	356
Totale	418	222	640

Misurazione	Stima	Inferiore 95% IC	Superiore 95% IC
Concordanza % positiva	51%	46%	56%
Concordanza % negativa	86%	81%	89%
Valore predittivo positivo	82%	76%	86%
Valore predittivo negativo	58%	53%	63%
Concordanza totale	66%	62%	70%
Rapporto di disuguaglianza	6,1	4,1	9,1

La concordanza globale tra CTC e le modifiche PSA in varie fasi temporali dopo l'inizio della terapia variava in un intervallo compreso tra 59% e 77% nel confronto con una riduzione PSA ≥ 30% e in un intervallo compreso tra 52% e 75% nel confronto con una riduzione della PSA ≥ 50%, mostrando una discordanza tra CTC e le modifiche della PSA in circa il ~25%-40% dei pazienti.

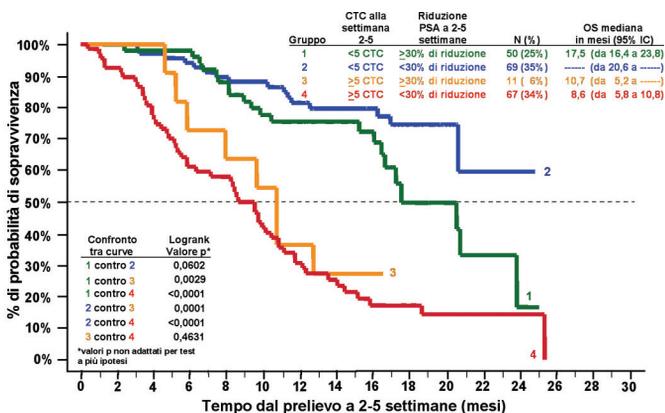
3.4.3 La combinazione dei livelli CTC e della riduzione PSA è predittiva della OS nei pazienti affetti da MPC

Per stabilire quale dei risultati discordanti rifletteva meglio la prognosi del paziente, le valutazioni CTC e le modifiche PSA a 2-5 settimane, 6-8 settimane, 9-12 settimane e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia sono state confrontate con la sopravvivenza globale. Il tempo di OS trascorso è stato calcolato dal prelievo di sangue in fase di valutazione. Per l'analisi di Kaplan-Meier mostrata in **Figura 31 (pannelli A, B, C e D)**, i pazienti sono stati segmentati in quattro gruppi in base ai conteggi di CTC e alla riduzione PSA rispettivamente a 2-5 settimane, 6-8 settimane, 9-12 settimane e 13-20 settimane dopo l'inizio della terapia:

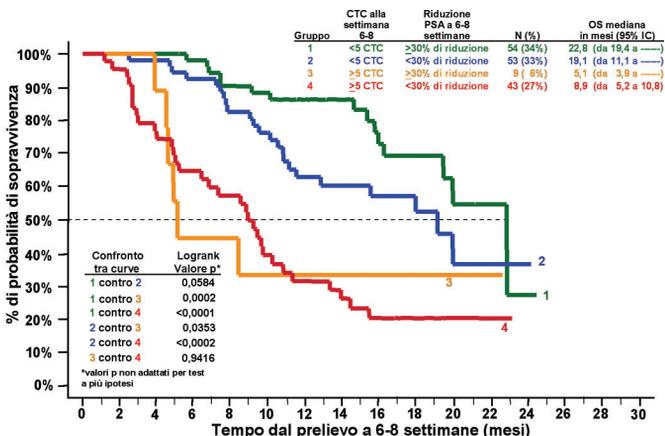
- Gruppo 1 (curva **verde**), pazienti con CTC <5 al momento della valutazione e riduzione della PSA \geq 30% dal riferimento al momento della valutazione;
- Gruppo 2 (curva **blu**), pazienti con CTC <5 al momento della valutazione e riduzione della PSA <30% dal riferimento al momento della valutazione;
- Gruppo 3 (curva **arancione**), pazienti con CTC \geq 5 al momento della valutazione e riduzione della PSA \geq 30% dal riferimento al momento della valutazione;
- Gruppo 4 (curva **rossa**), pazienti con CTC \geq 5 al momento della valutazione e riduzione della PSA <30% dal riferimento al momento della valutazione.

Figura 31: La combinazione dei livelli CTC e delle modifiche della PSA è predittiva della OS a 2-5 settimane (pannello A), 6-8 settimane (pannello B), 9-12 settimane (pannello C), e 13-20 settimane (pannello D) dopo l'inizio della terapia.

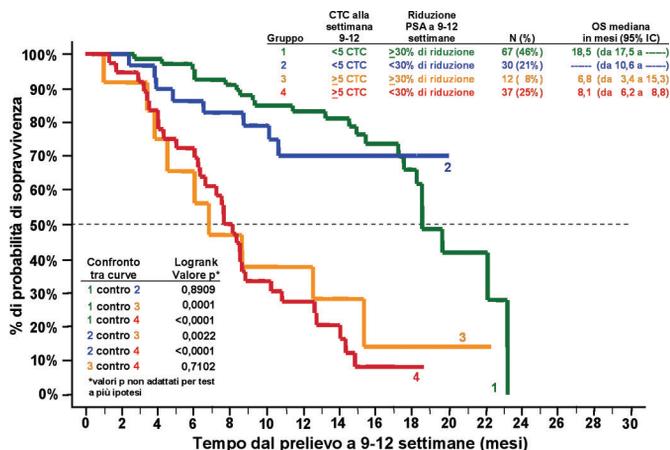
A. 2-5 settimane



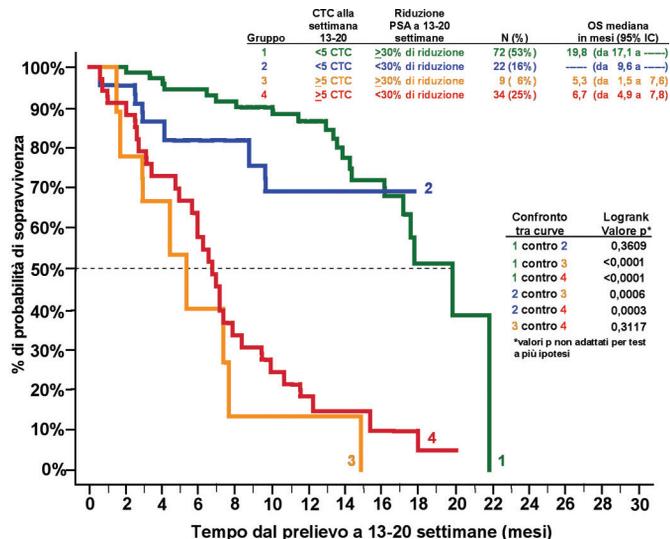
B. 6-8 settimane



C. 9-12 settimane



D. 13-20 settimane



La **Figura 31** indica che i pazienti con CTC ≥ 5 in qualunque fase dall'inizio della terapia presentavano una probabilità di decesso precoce molto più alta senza tenere conto delle modifiche nei livelli di PSA rispetto al riferimento. I pazienti con CTC ≥ 5 in tutte le fasi (**Gruppo 3** e **Gruppo 4**) presentavano una sopravvivenza totale mediana più breve che non era differente in modo significativo. Tuttavia, la OS mediana di questi due gruppi era diversa in modo significativo rispetto alla OS mediana dei pazienti con CTC <5 in tutte le fasi temporali (**Gruppo 1** e **Gruppo 2**). Questi due gruppi (**Gruppo 1** e **Gruppo 2**) presentavano una sopravvivenza totale mediana più lunga che non era differente in modo significativo. L'importanza del risultato illustrato nella **Figura 31** sta nel fatto che, sebbene una riduzione della PSA in alcune fasi dopo l'inizio della terapia potrebbe raggiungere livelli apprezzabili per la previsione della sopravvivenza, CTC favorevoli in qualsiasi fase risultano più accurati rispetto alla valutazione della PSA. L'implicazione pratica è rappresentata dall'uso dell'analisi CTC per la valutazione della probabilità di sopravvivenza dei pazienti affetti da MPC. Nei casi in cui le valutazioni CTC e le modifiche PSA erano discordanti, le CTC hanno fornito una valutazione delle prognosi più accurata.

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Data di revisione	Codice componente	Descrizione delle modifiche tecniche
2017-07-06	e631600005_IT	<ul style="list-style-type: none"> • Aggiunto LBL-0018 sotto il numero parte • Codice posteriore aggiornato a e6316000005_IT • Nome dell'azienda aggiornato in "JANSSEN DIAGNOSTICS" una divisione di JANSSEN PHARMACEUTICA NV aggiornato in "Menarini Silicon Biosystems Inc." • Aggiornato agli attributi aziendali Menarini Silicon Biosystems, compresi: <ul style="list-style-type: none"> – logo Menarini Silicon Biosystems – indirizzo EC/REP – indirizzo di produzione • Aggiornata data revisione
2017-04-01	e631600004_IT	<ul style="list-style-type: none"> • Codice posteriore aggiornato a e631600004_IT • Sono state aggiornate le informazioni sul brevetto • Aggiornata data di revisione
2016-04-20	e631600003_IT	<ul style="list-style-type: none"> • Codice posteriore aggiornato a e631600003_IT • Sono stati rimossi tutti i casi di registrazione del marchio di fabbrica MAGNEST • Aggiornamenti alla sezione "LIMITAZIONI": <ul style="list-style-type: none"> – è stato aggiunto l'avviso che riguarda la legge federale statunitense che regola la vendita • Aggiornamenti alla sezione "LEGENDA DEI SIMBOLI": <ul style="list-style-type: none"> – sono state eliminate le lingue diverse dall'inglese • Il nome dell'azienda BVBA è stato aggiornato in "JANSSEN DIAGNOSTICS una divisione di JANSSEN PHARMACEUTICA NV"
2015-05-22	e631600002_IT	<ul style="list-style-type: none"> • Aggiunto LBL-0018 sotto il numero parte • Codice posteriore aggiornato a e631600002_IT • Sezione AVVERTENZE e PRECAUZIONI aggiornata: <ul style="list-style-type: none"> – Aggiornato passo 7 sodio azide da "Avvertenza" a "Attenzione" – Rimosse frasi Rischio e sicurezza R22 e S28 • Aggiunta sezione e dichiarazioni "PERICOLI e PRECAUZIONI": <ul style="list-style-type: none"> • Rimossi sintomi ProClin® 300 della dichiarazione sovraesposizione • Sezione "LEGENDA DEI SIMBOLI": <ul style="list-style-type: none"> – Sostituito pittogramma Nocivo con pittogramma Avviso di pericolo – Aggiornato pittogramma Rischio biologico • Aggiornato indirizzo
2013-08-29	e631600001_IT	<p>Tecnicamente equivalente a e631500023_IT, con le seguenti modifiche:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Assegnato un nuovo numero di parte • Aggiornato agli attributi aziendali Janssen, compresi: <ul style="list-style-type: none"> – logo Janssen – indirizzo di produzione – indirizzo EC/REP – recapiti telefonici – sito Web • Eliminate tutte le occorrenze di CELLSPOTTER® Analyzer • Aggiornate tutte le occorrenze di Provetta conica CELLSEARCH® e sostituite con Provette coniche per centrifuga CELLSEARCH® (15 mL) • Aggiornate tutte le occorrenze di Kit CELLSEARCH® e sostituite con Kit CTC CELLSEARCH® • Nella sezione INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI: <ul style="list-style-type: none"> – Aggiornate le informazioni sul carryover cellulare a "5000 o superiori" • Nella sezione Janssen Technical & Customer Support: <ul style="list-style-type: none"> – Aggiornate tutte le occorrenze di Veridex, LLC e sostituite con Janssen Diagnostics, LLC – Dichiarazione brevetto USA aggiornata • Nella sezione LEGENDA DEI SIMBOLI: <ul style="list-style-type: none"> – Aggiunto il simbolo Data di produzione e il testo 'Data di produzione' • Aggiornata data di revisione



Menarini Silicon Biosystems Inc.
10355 Science Center Drive, Suite 210
San Diego, CA 92121
documents.cellsearchctc.com
Tel.: 1-877-837-4339
00 8000 8374339

CELLSEARCH®, CELLTRACKS®, CELLTRACKS ANALYZER II®
e AUTOPREP® sono marchi registrati di Menarini Silicon
Biosystems Inc.

Questa tecnologia, che comprende prodotti e/o i componenti
ad essa associati, nonché le procedure ed i sistemi qui
descritti, è protetta da brevetti statunitensi, da brevetti inter-
nazionali corrispondenti e da richieste di brevetti in corso, e
comprendono quanto segue: Numeri di brevetto USA
6,136,182; 6,551,843; 6,623,982; 6,790,366; 7,011,794 e 7,332,288.

LEGENDA DEI SIMBOLI

Di seguito sono indicati i simboli che appaiono nelle istruzioni per l'uso o nelle etichette associate.



Utilizzare entro la data di scadenza
AAAA-MM-GG o AAAA-MM



Codice lotto



Numero di serie



Attenzione, consultare documenti allegati



Data di produzione



Produttore



Quantità sufficiente per $n > \text{test}$



Avvertenza



Numero di catalogo



Rappresentante autorizzato per la Comunità Europea



Limiti di temperatura



Rischi biologici



Consultare le istruzioni per l'uso



Prodotto medico per la diagnostica *in vitro*

Menarini Silicon Biosystems SpA
Via Giuseppe Di Vittorio 21B/3
40013 Castel Maggiore (Bologna)
Italia



Menarini Silicon Biosystems Inc.
10355 Science Center Drive, Suite 210
San Diego, CA 92121
USA
documents.cellsearchctc.com
Tel.: 1-877-837-4339
00 8000 8374339 (EU)



MENARINI
silicon biosystems

