

В.В. Семиглазов, П.В. Криворотько, Е.К. Жильцова, Л.П. Гиголаева,
Р.В. Донских, А.В. Комяхов, А.И. Целуйко

ГЛАВА IX

Биологические подходы к поиску эффективного лечения трижды негативного рака молочной железы

Резюме

Трижды негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) клинически определяется как неэкспрессирующий рецепторы эстрогена (ER), прогестерона (PR) и HER2. Исторически сложилось так, что ТНРМЖ характеризуется природной агрессивностью и неблагоприятным исходом заболевания по сравнению с другими подтипами РМЖ. Молекулярно-генетический анализ позволяет разделить ТНРМЖ на молекулярные подтипы (такие как базально-подобный, низко-клаудиновый). Несколько подтипов ТНРМЖ обозначены как иммуноактивированные, впоследствии иллюстрирующие лучший исход заболевания. Кроме того, молекулярно-генетический анализ показал множество признаков, характерных для ТНРМЖ, в т. ч. высокие показатели TP53 мутаций, PI3K и MEK-сигнального пути, и генетическое сходство РМЖ с серозной овариальной карциномой, включая инактивацию BRCA-патогенетического пути. Выявленная генетическая «уязвимость» ТНРМЖ объясняет разработку разных терапевтических подходов, в т. ч. агентов, повреждающих ДНК (например, соли платины, PARP-ингибиторы), а также иммунотерапию. Соли платины уже рутинно применяются в лечении метастатического ТНРМЖ, однако лучшие результаты наблюдаются среди BRCA-мутированных. Хотя включение платины в неoadъювантную химиотерапию пациентов с ТНРМЖ повышает частоту патоморфологических регрессов, влияние на отдаленный результат неочевидно. Наличие иммунного инфильтрата при ТНРМЖ может рассматриваться как прогностический фактор. Checkpoint-ингибиторы, включая ингибиторы PD-1 и PD-L1, исследуются при метастатическом ТНРМЖ и показывают ответ на лечение

в первых клинических испытаниях. И, наконец, согласование новых терапевтических подходов для основных подтипов ТНРМЖ имеет первостепенное значение в разработке будущей стратегии исследований, направленных на улучшение результатов лечения заболевания.

ТНРМЖ является уникальным подтипом РМЖ, составляя примерно 15–20% от всех видов РМЖ [Peou, 2000]. Клинически определяемый как неэкспрессирующий ЭР/ПР и HER2, ТНРМЖ характеризуется высокой агрессивностью и худшим прогнозом по сравнению с другими подтипами РМЖ [Dent, 2007]. Несмотря на, казалось бы, благоприятные первоначальные ответы на химиотерапию, для ТНРМЖ характерна высокая частота возникновения ранних рецидивов и отдаленных метастазов, как правило, висцеральных [Carey, 2007]. Антрациклин- и таксан-содержащая химиотерапия была традиционно основой терапии ТНРМЖ. С появлением молекулярно-генетического анализа молекулярная классификация ТНРМЖ сейчас подвергается тщательному изучению с целью открытия новых мишеней [Lehman, 2011; Burstein, 2015].

Определение трижды негативного РМЖ

Термин «трижды негативный рак молочной железы» стал применяться для определения опухоли при отсутствии экспрессии белка трех наиболее частых целевых биомаркеров в лечении РМЖ: ER, PR и HER2. Определение ТНРМЖ варьировалось на протяжении десятилетий, а именно вокруг определения степени ER и/или PR-позитивности (т. е. 1–10% по сравнению с >1% при иммуногистохимическом исследовании). Совсем недавно, согласно руководству Американского общества клинической

онкологии (ASCO), ER/PR-позитивность определена $\geq 1\%$ [Hammond, 2010]. Эндокринотерапия, как правило, рассматривается, но обычно не рекомендуется для пациентов с экспрессией ER и/или PR 1–10%, или равной 1% для всех стадий РМЖ [В.Ф. Семиглазов и соавт., 2016]. HER2-экспрессия также считается позитивной при экспрессии белка 3+ и/или при амплификации гена HER2/Neu, большей или равной 2,0, с помощью флуоресценции *in situ* гибридизации (FISH) [Wolf, 2013]. Таким образом, патоморфологическое ИГХ-определение ТНРМЖ в настоящее время основывается на полном отсутствии экспрессии ER и/или PR (0) и HER2-негативности (0-1+) при иммуногистохимическом исследовании 0-1+ или отсутствии амплификации гена (FISH < 2,0). Этот универсальный критерий был включен в дизайн клинических испытаний ТНРМЖ. Такой подход поможет интерпретировать результаты отдельных клинических испытаний в контексте других, поскольку биология РМЖ, экспрессирующего рецепторы гормонов на уровне 1–10%, похоже, отличается от других без их экспрессии.

Особенности клинического течения трижды негативного РМЖ

В дополнение к особенностям патоморфологической классификации ТНРМЖ имеет уникальную природу по сравнению с другими подтипами РМЖ. Smid et al. (2008) сообщили о 344 пациентках с pN0 статусом лимфатических узлов, локализация отдаленных метастазов которых зависела от подтипа РМЖ [Smid, 2012]. В этом анализе висцеральные рецидивы, в т. ч. в легкие ($p = 0,01$), и метастазы в головной мозг ($p = 0,0035$) чаще наблюдались при базально-подобных опухолях РМЖ. В противоположность этому, метастазы в костях чаще встречались при люминальном подтипе ($p = 0,0031$), метастазы в печень – при HER2-позитивном РМЖ ($p = 0,17$).

Кроме того, Harrell et al. (2012) оценивали генную экспрессию опухоли с использованием набора данных приблизительно 1000 пациентов с РМЖ и подтвердили, что HER2-обогащенная (HER2-enriched) опухоль чаще метастазирует в печень, в то время как базально-подобный и низко-клаудинный РМЖ, как правило, трижды негативный

РМЖ, метастазирует в головной мозг и легкие [Harrell, 2012]. Среди пациентов с распространенным ТНРМЖ метастазирование в головной мозг наблюдается примерно у 50% больных [Lin, 2012].

Ответ на химиотерапию также отличается при разных подтипах высокой степени злокачественности РМЖ. Обычно ТНРМЖ лучше отвечает на неоадъювантную химиотерапию (т. е. чаще достигается полный патоморфологический ответ), но при этом и выше частота возникновения рецидива заболевания [Liedtke, 2008]. Этот феномен назван Carey (2007) «парадоксом трижды негативного рака». Высокая частота возникновения отдаленных метастазов у пациентов с ТНРМЖ после неоадъювантной химиотерапии, вероятно, объясняется резидуальной опухолью (т. е. неспособностью достичь полного патоморфологического ответа на лечение).

Несколько исследований показали более высокую выживаемость пациентов, которые достигали полного патоморфологического ответа (pCR), по сравнению с теми, кто не достиг pCR. У пациентов с резидуальным заболеванием удается добиться повышения частоты pCR с помощью новых комбинаций неоадъювантной химиотерапии (использование препаратов платины и новых таргетных видов терапии – ингибиторов PARP) [Sikov, 2015; von Minckwitz, 2014]. Остается, однако, неясным, действительно ли достижение полного патоморфологического регресса транслируется в увеличение безрецидивной выживаемости [Sikov, 2016; Cortazar, 2014].

ТНРМЖ характеризуется высокой частотой рецидивов и клиникой, которые отличаются от таковых у других подтипов РМЖ. Dent et al. (2007) сравнили клинику и течение ТНРМЖ и других подтипов у 1601 больного ранним РМЖ в Торонто в период между 1987 и 1997 гг. [Dent, 2007]. При медиане наблюдения 8 лет этот анализ показал, что женщины с ТНРМЖ были более склонны к возникновению отдаленных метастазов (отношение рисков [HR] 2,6; $p < 0,0001$); 5-летняя выживаемость пациентов с ТНРМЖ была хуже по сравнению с другими (HR 3,2; $p < 0,001$). Важно отметить, что, в отличие от пациентов с не-ТНРМЖ, пик риска рецидива достигает 3-летней отметки и затем снижается, в то время как при других подтипах РМЖ риск рецидива ниже в первый 3-летний период наблюдения, но остается постоянным с течением времени. Эти

важные различия между клиническим поведением ТНРМЖ по сравнению с другими подтипами РМЖ необходимо учитывать при разработке клинических мероприятий для предотвращения рецидива этой агрессивной формы заболевания.

Подтипы трижды негативного РМЖ

РМЖ является гетерогенным заболеванием, которое генетически делится на подтипы, традиционно определяющиеся как люминальный А и люминальный В (нормально-подобный), HER2-обогащенный (HER-enriched) и базально-подобный, каждый с соответствующей уникальной клиникой [Pejou, 2000; Sorlie, 2001; Sorlie, 2003]. В течение последних 10 лет ТНРМЖ также был признан гетерогенным заболеванием. На основании проведения нескольких исследований пытались классифицировать ТНРМЖ с использованием иммуногистохимического анализа, экспрессии генов и секвенирования. Пожалуй, наиболее изученным подтипом ТНРМЖ по экспрессии генов является базально-подобный подтип. Он составляет 15–20% от всех случаев РМЖ, его первоначально классифицировали по кластеру экспрессии гена базальных эпителиальных клеток, включая кератин 5, кератин 17, интегрин b4 и ламинин [Pejou, 2000]. Базально-подобный РМЖ составляет около 80% ТНРМЖ по иммуногистохимической классификации [Livasu, 2006]. Более редкий подтип рака молочной железы – низко-клаудиновый также обычно является трижды негативным [Prat, 2010]. Низко-клаудиновый подтип характеризуется низкой экспрессией маркеров или отсутствием люминальной дифференцировки, высокой насыщенностью маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (EMT), генами иммунного ответа и признаками стволово-подобных клеток. Этот подтип РМЖ с высокой частотой метапластической и медуллярной дифференцировки иллюстрирует ответ на терапию, который является промежуточным между ответами на терапию базально-подобного и люминального подтипов РМЖ.

Отличный, но комплементарный подход применялся другими исследователями, которые подтипы ТНРМЖ классифицировали с использованием только экспрессии генов и секвенирования [Lehman, 2011; Burstein, 2015].

Ключевые выводы

- ТНРМЖ по патоморфологической классификации определяется как опухоль с отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона (0% от ИHC) и как HER2-отрицательный (0-1 + по ИHC или отсутствие амплификации гена HER2 / neu).
- Хотя ТНРМЖ составляет только 15–20% РМЖ, он самый частый по раннему рецидивированию и, как правило, висцеральному (например, в легкие и головной мозг).
- Современное секвенирование и молекулярно-генетический анализ дали возможность разделить ТНРМЖ на отдельные подтипы и выявить новые терапевтические мишени в рамках клинических исследований.
- Ингибиторы checkpoint, включая PD-1 и PD-L1, способны вызывать ответы на лечение ТНРМЖ в первых клинических испытаниях. Несколько исследований ведутся для подтверждения активности биомаркеров ответа.
- Химиотерапия на основе платины с ДНК-повреждающим механизмом действия активна при ТНРМЖ и рутинно включается в неоадьювантную и метастатическую терапию. Исследование платины в адьювантном периоде продолжается.

Lehmann et al. (2011) проанализировали экспрессию гена более чем на 500 пациентах с ТНРМЖ и выделили шесть уникальных подтипов: базально-подобный (два подтипа: BL1 и BL2), иммуномодулирующий (ИМ), мезенхимальный (М), мезенхимальный, подобный стволовым клеткам (MSL), и люминесцирующий рецепторы андрогенов (LAR) [Lehmann, 2011]. Результаты показали, что клеточные линии из BL1- и BL2-подтипов с высокой частотой митоза и гена повреждения ДНК чувствительны к цисплатину. Мезенхимальный и мезенхимальный стволово-подобный подтипы с высокой насыщенностью маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) и фактором роста опухоли проиллюстрировали чувствительность к двойному PI3K/MTOR ингибированию. Наконец, LAR-подтип чувствителен к антагонистам рецепторов андрогена (AR). Эта стратегия была успешной в клиническом исследовании [Gucalp, 2013]. Параллельно Burnstein et al.

проводили ДНК- и РНК-секвенирование на приблизительно 200 пациентах с ТНPMЖ, у которых были определены четыре подтипа: люминесцирующий рецепторы андрогенов, мезенхимальный (MES), базально-подобный иммуносупрессивный (BLIS) и базально-подобный иммуноактивированный (BLIA) [Burststein, 2015]. Иммуносупрессивный подтип характеризует худший прогноз, иммуноактивированный – лучший прогноз в отношении общей и безрецидивной выживаемости.

Молекулярная классификация трижды негативного РМЖ

Биология ТНPMЖ, особенно базально-подобного РМЖ, была в центре внимания составителей Атласа генома рака (TCGA) [The Cancer Genome Atlas Network, 2012]. В этом масштабном анализе первичного РМЖ были оценены геномная ДНК, количество копий массивов, метилирование ДНК, секвенирование экзома, матричная РНК, микро-РНК последовательности. На основании анализа данных 81 пациента с базально-подобным РМЖ, из которых у 65 был ТНPMЖ, были сделаны следующие выводы:

1. Высокая частота мутаций TP53 (80%).
2. Потеря RB1 и BRCA1.
3. Высокая активация пути PI3K (либо через PIK3CA мутации гена (приблизительно 9%), либо потеря негативных регуляторов INPP4B и/или PTEN).
4. Улучшенный показатель пролиферации с гиперактивным FOXM1 как транскрипционный показатель.
5. Генетическое сходство между базально-подобным РМЖ и серозным раком яичников.

Это сходство включало высокую частоту ATM и TP53 мутаций, высокий уровень экспрессии AKT3 и MYC, инактивацию BRCA1 и BRCA2, потерю RB1 и циклин E1 амплификацию. Приблизительно 20% базально-подобного рака связаны с мутацией BRCA, которая может быть чувствительна к платине и/или ингибиторам PARP, рассмотренным ниже. И, наконец, анализ показал несколько амплификаций или делеций, которые могут быть использованы как направленность терапии в клинической практике. Амплификация включала PIK3CA (49%), Kras (32%), BRAF (30%) и EGFR (23%). Другая, менее распространенная амплификация была замечена в

FGFR1, FGFR2, IGFR1, KIT, MET и PDGFRA. Как уже отмечалось выше, делеции были замечены в PTEN и INPP4B, которые обуславливают активацию пути PI3K. Результаты этого ценного анализа обобщены в боковой панели и углубили наше понимание биологии ТНPMЖ и представление о методах борьбы с этой болезнью.

В дополнение к развитию понимания биологии ТНPMЖ на протяжении десятилетий меняется терапевтическая стратегия в отношении ТНPMЖ. В настоящем обзоре мы сосредоточимся на использовании платины и включении иммунотерапии в лечение ТНPMЖ.

Оптимальное использование платины в терапии ТНPMЖ

Было высказано предположение, что ТНPMЖ фенотипически и генетически похож на семейный BRCA1-ассоциированный РМЖ – так называемый BRCAness [Turner, 2004]. По статистике, более чем 75% опухолей, возникающих у BRCA1-мутированных носителей, являются трижды негативными и/или имеют базально-подобный фенотип [Foulkes, 2010]. Эти опухоли характеризуются повышенной чувствительностью к повреждению ДНК [Bhattacharyya, 2000; Moynahan, 2001; Hastak, 2010]. Разрывы двухцепочечной ДНК, вызванные агентами, такими как соли платины, считаются наиболее уязвимой формой повреждения ДНК, восстанавливающегося путем гомологичной рекомбинации – безошибочного процесса, и негомологичного конечного присоединения, что склонно к ошибкам. BRCA1 и BRCA2 участвуют непосредственно в гомологичных рекомбинациях двухцепочечной ДНК [Roy, 2011]. У людей мутации в одной копии любого из этих генов в зародышевом состоянии приводят к синдрому наследственного РМЖ и рака яичников – опухоли, которые впоследствии развиваются при неполноценной гомологичной рекомбинации ДНК [Roy, 2011]. Последние отчеты расширили спектр генов, участвующих в возникновении семейного РМЖ, многие из которых участвуют в гомологичной рекомбинации [Foulkes, 2010; Kurian, 2001–2009; Castera, 2014; Couch, 2015]. Кроме того, дефектную гомологичную рекомбинацию также можно найти в спорадических случаях

РМЖ, как это показано с помощью сравнительной гибридизации генома [Stefansson, 2009]. Наконец, нарушение гомологичной рекомбинации может происходить через эпигенетические механизмы, такие как метилирование BRCA1/2, которые также является частью BRCAness.

Включение платины в неoadъювантное лечение трижды негативного РМЖ

В течение нескольких последних десятилетий наблюдается значительный интерес к использованию солей платины в лечении ТНРМЖ на основании того, что дисфункция гомологичной рекомбинации репарации ДНК сенсibiliзирует опухолевые клетки этих агентов и индуцирует гибель клеток. Как доказательство концепции, небольшое исследование по неoadъювантному лечению показало высокий результат – полный патоморфологический ответ (90%) на проведение четырех циклов неoadъювантной химиотерапии с цисплатином в группе, включавшей 10 пациентов из Польши с мутацией BRCA1, большинство из которых были с ТНРМЖ [Byrski, 2009]. Большое исследование фазы II с участием пациентов с преимущественно спорадическим ТНРМЖ дало противоречивый результат. Alba et al. сообщили о результатах рандомизированного исследования фазы II стандартного неoadъювантного лечения эпирубицином и циклофосфамидом с последующей химиотерапией доцетакселом с или без карбоплатина AUC 6 каждые 21 день [Alba, 2012]. В отличие от них, немецкая группа по изучению РМЖ исследует неoadъювантный паклитаксел, липосомальный доксорубицин и бевацизумаб с или без еженедельного карбоплатина AUC 1,5–2 в исследовании GeparSixto. Из 315 пациентов с ТНРМЖ у 53,2% пациентов, получавших химиотерапию с добавлением еженедельного карбоплатина, по сравнению с 36,9% пациентов без карбоплатина достигнут полный патоморфологический ответ ($p = 0,005$) [von Minckwitz, 2014]. Во II фазе двойного рандомизированного исследования CALGB 40603 по оценке еженедельного приема паклитаксела с или без карбоплатина AUC 6 и/или бевацизумаба с последующей терапией доксорубицином плюс циклофосфамид показано увеличение частоты полного патоморфологического регресса

(определяется как $ypT0/is$) от 46% до 60% (1,76; $p = 0,0018$) [Sikov, 2015].

Кроме того, эти данные вызывают вопрос: улучшает ли высокая частота полного патоморфологического регресса показатель общей выживаемости? Ранние результаты анализа GeparSixto и CALGB 40603 одновременно были доложены на Симпозиуме по РМЖ в Сан-Антонио в декабре 2015 г. В исследовании GeparSixto полный патоморфологический ответ привел к значительному увеличению 3-летней безрецидивной выживаемости, которая составила от 76,1% до 85,8% (HR 0,56; 95% CI, 0,33–0,96; $p = 0,035$) [von Minckwitz, 2015]. Это противоречит данным исследования CALGB 40603, в котором сообщается о численном улучшении, но нет статистически значимых различий ни в 3-летней безрецидивной выживаемости, ни в общей выживаемости [Sikov, 2015]. Необходимо отметить, что GeparSixto использовал нестандартный, более интенсивный режим конкурентного использования антрациклин-таксан-содержащей химиотерапии с включением бевацизумаба во всех группах. Фармакологическое взаимодействие, а также еженедельное введение карбоплатина, возможно, способствовали лучшему прогнозу в исследовании GeparSixto.

Атлас генома рака. Генетическая характеристика базально-подобного РМЖ

Характеристики:

- высокая конкордантность с ТНРМЖ (примерно 80%);
- высокие показатели TP53 патогенетических изменений (TP53 мутации в 84% случаев; прирост MDM2 – 14%);
- высокие темпы пути PI3K изменений (PIK3CA мутации – 7%; PTEN мутации – 35%; INPP4B – 30%);
- высокие показатели RB патогенетических изменений (мутации RB1) – 20%; циклин E1 усиление – 9%; высокая экспрессия CDKN2A; низкая экспрессия RB1);
- высокая нестабильность генома;
- понижение уровня метилирования по сравнению с таковым при других подтипах РМЖ;
- сходство с серозной карциномой яичников, в т. ч. около 20% зародышевой или соматической BRCA мутации.

Включение платины в лечение метастатического ТНРМЖ

При изучении метастатического рака ретроспективные исследования были противоречивыми, в основном были сосредоточены на сравнении ТНРМЖ с другими подтипами [Staudacher, 2011; Villarreal-Garza, 2014]. В самом крупном рандомизированном испытании III фазы – исследовании ТНРМЖ у 376 пациентов Центра Великобритании и Северной Ирландии они были случайным образом рандомизированы на получение либо карбоплатина, либо доцетаксела в качестве монотерапии первой линии [Tutt, 2014]. В случайной популяции пациентов с ТНРМЖ не было никакой разницы в частоте объективного ответа на лечение в обеих группах исследуемых (31,4% против 35,6%; $p = 0,44$) или перекрестном лечении (22,8% против 25,6%, $p = 0,73$) [Tutt, 2014]. Аналогичным образом результаты по безрецидивной выживаемости также существенно не отличались в обеих группах исследований. Изучению роли химиотерапии на основе платины были посвящены два исследования, проведенные в Китае: (1) II фаза рандомизированного исследования сравнения комбинации доцетаксела и цисплатина и комбинации доцетаксела и капецитабина и (2) III фаза многоцентрового рандомизированного испытания гемцитабина и цисплатина по сравнению с гемцитабином и паклитакселом [Fan, 2013; Hu, 2015]. В исследовании II фазы 53 пациента с метастатическим ТНРМЖ были рандомизированы случайным образом на лечение доцетакселом с цисплатином или капецитабином в качестве первой линии химиотерапии. Показатели общего ответа (63,0% против 15,4%; $p = 0,001$) и безрецидивной выживаемости (10,9 против 4,8 мес.; $p = 0,001$) были значительно лучше в группе с цисплатином [Fan, 2013]. В III фазе CBCSG006 были случайным образом распределены 240 пациентов для получения максимум восьми циклов гемцитабина в комбинации с цисплатином или паклитакселом, вводимых каждые 21 день [Hu, 2015]. Гемцитабин плюс цисплатин не были хуже и даже превосходили по результатам схему гемцитабин плюс паклитаксел (безрецидивная выживаемость: HR 0,692; 95% CI, 0,523–0,915; $p = 0,0001$ (не хуже) и $p = 0,009$ (превосходство)) [Hu, 2015]. Таким образом, в обоих исследованиях режим с цисплатином превзошел сравниваемый с ним режим.

Проблемы в работе по включению в стандарт лечения платины.

Практика: токсичность и схемы дозирования

С учетом обнадеживающих клинических исследований относительно роли платины при ТНРМЖ важный клинический вопрос все еще остается: как лучше выбрать дозу и/или схему назначения платины. Нет на сегодняшний день исследования, которое бы продемонстрировало улучшение показателей безрецидивного выживания. Добавление карбоплатина усиливает токсичность, как результат этого – частое прекращение химиотерапии, редуцирование дозы, а также более высокого класса (3/4) побочные действия, что потенциально могло бы поставить под угрозу выполнение требований стандартов медицинской помощи пациентам высокого риска. Может быть, разумно рассматривать вне исследования использование карбоплатина при местно-распространенном ТНРМЖ для контроля местного рецидива и у молодых пациентов с высоким риском рецидива. Мы ожидаем окончательных результатов текущей III фазы испытания для показателей выживаемости PEARLY (NCT02441933), Gerpar – Octo (NCT021253144), NRGBR003 (NCT02488967) и TPPC (NCT02455141).

Исследование биомаркеров при ТНРМЖ

ТНРМЖ является гетерогенным заболеванием. Учитывая сочетание высокой токсичности в начале лечения и неоднозначные результаты при наличии метастазов, было бы идеально уметь идентифицировать пациентов, для которых будет наиболее полезной та или иная схема лечения. В исследовании TBCRC009, исследовании II фазы биомаркера отмечали хороший ответ у пациентов с BRCA-мутацией без устойчивого ответа показателей общей и безрецидивной выживаемости. В исследовании TNT продемонстрирована возможность использования BRCA-генотипирования и профилирования экспрессии генов для улучшения выбора терапии при метастатическом ТНРМЖ. У больных с BRCA1- или BRCA2-мутацией, получавших карбоплатин, результат ответа на лечение (68% против 33,3%; $p = 0,03$) в отношении безрецидивной выживаемости был лучше (6,8 мес. против 3,1 мес.;

$p = 0,03$) по сравнению с таковым при применении доцетаксела, в то время как небазально-подобный РМЖ дал ответ лучше на терапию с использованием доцетаксела (73,7% против 16,7%; $p \geq 0,01$). Наконец, анализы, основанные на ДНК, были разработаны на основе оценки потери генома гетерозиготности, оценки теломерного аллельного дисбаланса и крупномасштабных переходов состояний. Эти анализы измеряют образцы геномной нестабильности, полученные путем сравнения BRCA1/2 мутированной и немутированной опухоли. Невзвешенная сумма LOH, TAI и LST приводит к дефициту гомологичной рекомбинации. Это было оценено в транскрипционном компоненте TBCRC009 и TNT испытаний. Результаты противоречивы: в TBCRC009 опухоли у пациентов с эффективным лечением платиной имели более высокие значения при анализе LST и LOH, в то время как в TNT оценка дефицита гомологичной рекомбинации не превосходила по чувствительности к карбоплатину над доцетакселом [Isakoff, 2015]. Таким образом, требуется дальнейшее развитие анализа идентификации гомологичной рекомбинации дефекта в не-BRCA1/2 опухоли. И, наконец, группа из MSKCC проводила сравнение дефицита гомологичных рекомбинаций методологически и пришла к выводу, что гомологичная рекомбинация генов репарации ДНК продемонстрировала хорошую чувствительность и специфичность [Powell, 2015].

Что можно сказать о текущем стандарте медицинской помощи в отношении использования солей платины? Платина является оправданным выбором для пациентов с BRCA-мутацией. Нет никаких данных, подтверждающих эффективность платины в адьювантной терапии; клинические испытания продолжаются. Для пациентов с метастазами платина является одной из стандартных схем химиотерапии, которую онкологи включают в свой арсенал, но с оговоркой, что наиболее убедительны эти данные для носителей BRCA-мутаций.

Роль AR в ТНРМЖ

Андрогенный рецептор (AR) – член семейства стероидных гормональных рецепторов, который функционирует как классический лиганд-активированный интрацеллюлярный фактор транскрипции [Гао, 2010]. Являясь ядерным

рецептором, AR состоит из четырех отдельных доменов, определяющих его активность. AR преобладает при карциномах ранних стадий и метастатических карциномах [Tsang 2014], но его уровень и активность отличаются у разных пациентов в зависимости от содержания рецепторов эстрогена [Lim, 2014]. Несмотря на то, что AR обнаруживается в сравнительно небольшом числе случаев ТНРМЖ, последняя классификация подтипов ТНРМЖ выдвигает AR в качестве нового биомаркера наряду с традиционными [Lehmann, 2011; Hickey, 2012]. Интересно отметить, что инфильтративно-протоковая карцинома характеризуется большей активностью AR по сравнению с лобулярной, что можно объяснить менее частотным фенотипом ТНРМЖ в последней [McNamara, 2013]. Прогностическая ценность AR была оценена в нескольких исследованиях, давших противоречивые результаты [Park, 2014; Santagata, 2014]. Например, Hu et al., анализируя экспрессию AR в 211 случаях ТНРМЖ, отметили, что общая смертность была выше в AR-негативной группе [Androgen, 2011]. В некоторых исследованиях AR-позитивные ТНРМЖ характеризовались уменьшением частоты наличия метастазов в лимфоузлах [Rakha, 2007; He, 2012], меньшими размерами опухоли, более высокой дифференцировкой [Park, 2010]. Возможно, эти различия связаны с разными подходами к оценке позитивности AR-экспрессии (>0 или $\geq 10\%$) [McGhan, 2014].

Напротив, McGhan et al. показали, что экспрессия AR коррелирует с более высокой клинической стадией и с увеличением частоты метастазов в подмышечных лимфоузлах [McGhan, 2014]. В проспективном исследовании, выполненном Y. Asano, сравнивались подгруппы с учетом экспрессии AR при проведении 4 циклов неоадьювантной химиотерапии по схеме AC. В результате было показано, что у пациентов с ТНРМЖ полный патоморфологический регресс был достигнут достоверно чаще в группе с отрицательными AR – в 63,2% случаев, а в группе AR+ – всего в 17,4%. В группе не-ТНРМЖ при AR-негативных опухолях pCR был равен 0% в сравнении с AR-позитивными новообразованиями, где pCR равнялся 78,9%. Авторы предположили, что наличие AR в ТНРМЖ является маркером химиорезистентности. При оценке

общей и безрецидивной выживаемости показатели были хуже в группе AR-позитивных ТНPMЖ. При не-ТНPMЖ различий в группах в зависимости от содержания AR выявлено не было.

Антиандрогенные стратегии лечения при ТНPMЖ

ТНPMЖ является уникальным подтипом, который не поддается лечению применяемой в наши дни таргетной терапией (терапия направленного действия). Фармакологическое блокирование андрогенных рецепторов при лечении AP-позитивного ТНPMЖ в настоящее время находится в стадии исследования. Ссылаясь на недавно полученные положительные результаты новых антиандрогенных стратегий лечения рака простаты, многие доклинические исследования берут за основу ту же методику для лечения ТНPMЖ. Традиционные антиандрогены являются антагонистами эндогенных андрогенов. Связываясь с AR, они стабилизируют связи рецептора с комплексами цитозольных белков теплового шока. Результаты этих исследований дали основу для клинической оценки эффективности бикалутамида при лечении пациентов с ER α /PR-отрицательным и AR-положительным метастатическим ТНPMЖ (**табл. 1**). Недавно опубликованные результаты показали, что доля пациентов с положительным уровнем клинической эффективности составила 20% [Guscar, 2013]. Во второй фазе данного исследования был проанализирован эффект применения бикалутамида при лечении пациентов с AR-положительным,

ER α /PR-отрицательным метастатическим PMЖ, составляющих 12% от общего числа участников. В результате у 19% пациентов длительность клинической ремиссии составила 6 мес., тогда как медиана безпрогрессивной выживаемости – 12 нед. Кроме того, отмечена хорошая переносимость бикалутамида при минимальном уровне токсичности [Guscar, 2013]. В доклинических исследованиях оценена также эффективность антиандрогенного препарата нового поколения – энзалутамида [Lehmann, 2014]. Энзалутамид оказывает воздействие на нескольких уровнях сигнальных путей AR, обладая в то же время более высокой по сравнению с бикалутамидом эффективностью связывания AR [Lehmann, 2014]. В настоящее время энзалутамид проходит тестирование (без рандомизации) в клинических условиях при участии случайных пациентов с AR-положительным ТНPMЖ (**табл. 1**); в 42% случаев частота клинической пользы составила 16 нед. [Cochrane, 2014]. Другой антиандроген нового поколения – абиратерон ацетат, способствующий продуцированию энзимов андрогенов, проходит клинические испытания при участии пациентов с ER α -отрицательным, AR-положительным метастатическим PMЖ (**табл. 1**).

Дальнейшие исследования направлены на изучение эффективности блокировки процессов, запускаемых лиганд-зависимой активацией AP, а также совокупной блокировки обоих AP-индуцируемых механизмов. Доклинические исследования показали, что клетки AP-положительного ТНPMЖ чувствительны к двойному ингибитору P13K/mTOR

Таблица 1. Стратегии блокировки AP при лечении ТНPMЖ

Фаза исследования	Клинические испытания	Тип агента	clinicaltrial.gov
II	AEZS-108 в химиотерапии при рефрактерном ТНPMЖ, LHRH-положительным метастатическом PMЖ	LHRH агонист	NCT01698281
II	Бикалутамид при AP-положительном, ER(-)/PR(-) метастатическом PMЖ	Андрогенный ингибитор	NCT00468715
II	Энзалутамид при лечении пациентов с прогрессирующим AR-положительным ТНPMЖ	AR-ингибитор	NCT01889238
I/II	Абиратерон ацетат при лечении пациентов с ER- или AR-положительной прогрессирующей или метастатической карциномой	Ингибиторы андрогенового биосинтеза	NCT00755885
II	Абиратерон ацетат совместно с преднизолоном при лечении пациентов с молекулярным апокринным HER2-отрицательным локально прогрессирующим или метастатическим PMЖ	Ингибиторы андрогенового биосинтеза	NCT01842321

BEZ235 [Lehmann, 2011]. Кроме того, применение ингибитора ERK1/2 в сочетании с бикалутамидом дало более значительный антипролиферативный эффект при лечении по сравнению с использованием каждого препарата по отдельности [Cuenca-Lopez, 2014]. Схожие результаты были достигнуты применением ингибиторов EGFR или PDGFR β совместно с бикалутамидом [Cuenca-Lopez, 2014]. Другие исследования оценивают эффективность комбинаций LHRH-агонистов с ингибиторами процессов, участвующих в лиганд-независимой активации AR. На доклиническом уровне клетки ТНПГ подвергались воздействию ингибиторов P13K/АКТ, ингибиторов ERK и LHRH агонистов, которое оказало синергический эффект на пролиферацию ТНПМЖ. Для использования в клинических условиях требуются дальнейшее изучение AR-индуцируемых механизмов при ТНПМЖ и верификация молекулярных суррогатных биомаркеров для идентификации подгрупп пациентов, для которых данные виды терапии могут оказаться эффективными, т. к. сама по себе экспрессия AP не является достаточной.

На основании отмечаемых на сегодняшний день генетических, клеточных и функциональных характеристик AP при ТНПГ можно утверждать, что никакая монотерапия, применяемая у случайных пациентов, не способна превзойти положительные результаты, достигнутые химиотерапией. Более того, различные сигнальные пути, затрагивающие AP, играют ключевую роль в зарождении и прогрессировании опухоли. Например, подтип ЛАР ТНПГ оказался чувствительным и к антиандрогенной терапии, и к ингибиторам PI3K [Lehmann, 2011]. Чувствительность к ингибиторам объясняется мутациями PIK3CA. Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что одновременное блокирование AR и PI3K/АКТ может оказаться важным элементом в терапии при лечении пациентов с AR-положительным ТНПМЖ. Более того, результаты исследований позволяют предположить наличие взаимосвязи AR с каскадами Wnt/ β -катенина при ТНПМЖ. Частые мутации, наблюдаемые в сигнальных путях Wnt/ β -катенина, могут оказаться терапевтической мишенью, и ряд ингибиторов, в настоящее время апробируемых в доклинических исследованиях, могут стать

эффективным способом лечения [Lehmann, 2011]. Метод лечения ТНПМЖ путем блокирования нескольких сигнальных каскадов, участвующих в возникновении и прогрессировании опухолей, находится на начальной стадии развития, однако обещает быть эффективным – при условии, что будут правильно определены мишени и использованы наиболее действенные и наименее токсичные комбинации препаратов.

До сих пор для участия в клинических испытаниях AR-ингибиторов отбирались пациенты только с AR-положительным ТНПМЖ, однако не учитывалось наличие мутаций BRCA. Последние исследования открыли важную взаимосвязь AR и ER- β , механизмов, ответственных за модуляции роста опухоли [Kwok, 2014]. ER- β выражен в трети всех ER α -негативных карцином, включая ТНПМЖ, при котором его присутствие связывают с более точным прогнозом и с возможным повышением общей выживаемости. Было выдвинуто предположение, что ER- β могут блокироваться избранными лигандами (агонистами), такими как ERB-041, который, как оказалось, не вызывает побочных эффектов и может стимулировать собственный рост-ингибиторный эффект [Rizza, 2014]. Тем не менее пока только в одном исследовании прослежена взаимосвязь ингибиторного эффекта ER- β с экспрессией AR в линиях клеток ER α -негативных карцином, при которых активация AR стимулирует увеличение прогрессии ER- β [Kwok, 2014]. В антипролиферативном эффекте, осуществляемом через ER- β и AR, общим являются супрессия циклина D1 и экспрессия рост-ингибиторного протеина p21. Обобщая все имеющиеся данные, можно выдвинуть убедительное предположение, что эффект взаимодействия AR и ER- β , обладающего высокой прогностической ценностью, может иметь первостепенное значение при лечении ТНПМЖ. При лечении пациентов с AR-положительным ТНПМЖ и с экспрессией ER- β может оказаться эффективным применение ингибиторов внутриклеточных путей передачи сигналов наряду с ER- β -агонистами, тогда как пациентам с недостатком ER- β следует получать таргетную терапию, блокирующую активацию и функционирование AR. Соответственно, клинические исследования

антиандрогенных препаратов должны проводиться при участии в первую очередь пациентов с BRCA дикого типа, AR-положительным и ER-β-негативным ТНРМЖ.

Среди задач первостепенной важности в исследованиях AR-позитивного ТНРГ остаются изучение функционирования мембранных AR в патогенезе опухоли, а также их роли в механизме ускользания при антиандрогенных воздействиях, развитие селективных AR-модуляторов (SARMs) и поиски биомаркеров, обладающих предиктивными свойствами.

Иммунотерапия и иммуноконъюгаты для ТНРМЖ: перспективы и потенциал

Современная иммунотерапия в виде моноклональных антител, которые действуют как ингибиторы checkpoint, революционировала относительно возможностей лечения метастатической меланомы в относительно короткий период времени. Все антитела к цитотоксическим Т-антигенам 4 (CTLA-4), PD-1 и PD-L1 увеличивают иммунный ответ против опухоли путем блокирования регулирующих иммунных белков, которые подавляют иммунную систему, тем самым повышают качество ответа и общую выживаемость. Другие солидные образования, такие как рак легких, которые традиционно не считаются иммуногенными, показали клиническое преимущество checkpoint-ингибиторов [Garon, 2015]. Роль иммунотерапии при РМЖ до сих пор не определена, но увеличение количества данных указывает на ТНРМЖ как на имеющий, возможно, уникальные характеристики, которые могут сделать его реагирующим на checkpoint-ингибирование. С учетом отсутствия рецепторов для лечения ТНРМЖ иммунотерапия предоставляет значимые возможности для терапии этого агрессивного заболевания.

Обзор иммунного контроля опухоли в исследовании РМЖ

В процессе иммунного контроля опухоли ее иммунные клетки, включающие CD8+ Т-клетки, распознают опухоль-ассоциированные антигены, т. е. опухолевые клетки, и атакуют их. Патогенетический путь через рецептор PD-1 играет важную роль в

модуляции иммунной реакции и обеспечивает механизм реализации иммунного контроля опухоли. PD-1 является ингибиторным иммунным checkpoint-рецептором, экспрессирующимся на активированных Т-клетках, В-клетках, натуральных клетках-киллерах и других лимфоцитах, которые могут оставаться реактивными при «воспалительных состояниях», подобных раку [Blank, 2005; Keir, 2007]. PD-L1 является лигандом PD-1 и подавляет противоопухолевый иммунитет путем связывания PD-1. Лигирование PD-L1 с PD-1 ингибирует пролиферацию Т-клеток, продукцию цитокинов и цитолитическую деятельность, что ведет к функциональной инактивации или истощению Т-клеток. Путем регуляции PD-L1 и других механизмов адаптивной иммунной устойчивости опухоли могут использовать этот путь, чтобы уклоняться от иммунного противоопухолевого ответа.

Баланс клеток в опухолевом микроокружении, которое включает опухолевые клетки, стромальные клетки (т. е. фибробласты) и клетки иммунной системы (т. е. лимфоциты), влияет на исход РМЖ [Dunn, 2002]. Связь между увеличением опухолевой инфильтрации лимфоцитами (TILs) и лучшим прогнозом при РМЖ была признана в свое время, последние исследования показали особую актуальность этого при ТНРМЖ, когда наблюдается значительная инфильтрация опухоли лимфоцитами. Более высокий уровень опухолевой инфильтрации лимфоцитами, как правило, связан формально с худшими прогностическими клинико-патоморфологическими характеристиками, такими как ER-негативность, высокая степень злокачественности, высокая пролиферативная активность и метастатические лимфоузлы [Loi, 2013; Ono, 2012; Issa-Nummer, 2013; Ladoire, 2013; Loi, 2014]. Однако несмотря на эти худшие клинические признаки, более высокие уровни опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) связаны с улучшением общей и безрецидивной выживаемости независимо от системной терапии [Ono, 2012; Mahmoud, 2011; Denkert, 2010]. Этот очевидный парадокс указывает на роль иммунной системы в подгруппе ТНРМЖ и свидетельствует о том, что опухоль-инфильтрирующий лимфоцит (TIL) может быть суррогатным маркером адаптивного иммунного ответа при этих видах рака.

Связь опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) и ответа ТНРМЖ на химиотерапию

Как правило, опухолевые инфильтративные клетки делятся на внутриопухолевые, имеющие прямой контакт с опухолевыми клетками, и стромальные, которые находятся между опухолевыми клетками в строме опухоли, но они не имеют прямого контакта с опухолевыми клетками. Изучение пациентов с РМЖ, получающих неоадьювантную химиотерапию антрациклинами или таксанами, показало отсутствие связи между процентным содержанием опухолевых инфильтративных лимфоцитов и pCR [Denkert, 2010]. Среди пациентов с РМЖ с наличием опухолевых инфильтративных клеток более чем 60% имели особенно высокий уровень полного патоморфологического ответа (41,7%) по сравнению с 2% полного патоморфологического ответа опухолей без опухолевых инфильтративных лимфоцитов. В исследовании GeparSixto оценивали добавление карбоплатина к химиотерапии при ТНРМЖ или HER2-положительном РМЖ, наличие стромальных опухолевых инфильтративных клеток было предиктором ответа на добавление карбоплатина, хотя это соотношение достигло статистической значимости только при HER2-положительном раке [Denkert, 2015]. Независимо от этого, такая связь между ответом на химиотерапию, основанную на наличии опухолевых инфильтративных лимфоцитов, предполагает, что они не только являются прогнозирующими маркерами ответа при ТНРМЖ, но и что гибель клеток, индуцированная платиной, может приводить к созданию неоантигенов для стимулирования близлежащих лимфоцитов.

Прогностическое значение иммуногенных сигнатур при ТНРМЖ

Ряд других исследований направлены на изучение PD-1 пути и иммунотерапии при ТНРМЖ. Данные из TCGA [The Cancer Genome Atlas Network, 2010] подтвердили более высокую экспрессию PD-L1 мРНК при ТНРМЖ по сравнению с другими подтипами РМЖ [Mittendorf, 2014]. Это и другие исследования показали, что PD-L1 не определяется в нормальной ткани молочной железы, но определяется примерно в половине всех случаев РМЖ, в т. ч. приблизительно от 20% до 30% – при ТНРМЖ [Ghebeh,

2006; Emens, 2014]. PD-L1 связан с опухолевыми инфильтративными клетками и коррелирует с более высокой степенью дифференцировки, большим размером опухоли и высоким показателем скорости пролиферации Ki-67 [Muenst, 2014].

Дальнейшей поддержкой связи между иммунотерапией и ТНРМЖ является изучение экспрессии генов, которые демонстрируют связь между экспрессией ИМ-генов и лучшим прогнозом ТНРМЖ. Desmedt et al. были среди тех, кто создал модули генов и сравнил их с исходом различных подтипов РМЖ. Из экспрессии 7 модулей генов, которые они описали (инвазия опухоли, иммунный ответ, ангиогенез, апоптоз, пролиферация и ER и HER2-экспрессия), только иммунный ответ коррелировал с прогнозом в ER-/HER2-подтипе. С тех пор несколько групп исследователей описали прогностическое значение иммуногенных сигнатур и ТНРМЖ [Nagalla, 2013; Calabro, 2009; Rody, 2009]. В последнее время анализ экспрессии генов 587 образцов ТНРМЖ идентифицировал шесть различных подтипов, в т. ч. ИМ подтип, характеризующийся высокой экспрессией иммуно-ассоциированных генов [Lehmann, 2011]. Этот подтип состоит из иммуноактивных компонентов, возникающих из опухоли и опухолевых инфильтративных лимфоцитов, и характеризуется улучшением безрецидивной выживаемости по сравнению с другими подтипами [Lehmann, 2011]. РНК-секвенирование показало, что этот подтип имеет существенно более высокую экспрессию PD-L1, PD-1 и CTLA-4. Эти и другие данные свидетельствуют о том, что это может быть подтип ТНРМЖ, в котором checkpoint-ингибиторы будут особо эффективны.

Клинический опыт и результаты иммунотерапии при ТНРМЖ

Первым должным образом исследованным ингибитором checkpoint при ТНРМЖ было моноцетровое фаза Ib исследование одного агента пембролизумаба, PD-1-антител (KEYNOTE-012) [Nanda, 2014]. Это исследование показало, что пембролизумаб, вводимый каждые 2 нед. в дозировке 10 мг/кг, не только хорошо переносим; он также показал активность в значительной степени у пациентов с метастатическим PD-L1-положительным ТНРМЖ. Интересно, что из всех исследованных пациентов с ТНРМЖ

58% дали положительный результат на PD-L1. Около 45% пациентов получили лечение после 3–4 проведенных линий терапии при метастатическом РМЖ, а 21,9% – после пяти и более линий терапии. Из 27 участников с подтвержденным заболеванием (32 пациента – общее число) один из участников (3,7%) имел полный патоморфологический ответ (CR), четыре участника (14,8%) – частичный ответ (PR), 25,9% – стабилизацию, 44,4% – прогрессирование заболевания. Медиана ответа составила 18 нед. (диапазон – 7–32 нед.), средняя продолжительность ответа не была определена (диапазон – от 15 до более чем 40 нед.).

Антагонист PD-L1 – атезолизумаб (MPDL3280A) также оценивался при ТНРМЖ. Продолжающаяся фаза I изучения атезолизумаба включает расширенную когорту пролеченных пациентов с PD-L1-положительным и отрицательным ТНРМЖ [Emens, 2015]. Исходные данные показывают общий уровень ответа для исследуемых пациентов с метастатическим ТНРМЖ, равный 19%, в т. ч. 9,5% клинических и 9,5% патоморфологических ответов, при этом у 75% пациентов ответ сохраняется (диапазон – от 18 до более чем 56 нед.).

Будущие направления иммунотерапии при ТНРМЖ

Десять лет назад о ТНРМЖ было известно немного, и внедрение цитотоксической химиотерапии было только в перспективе. В настоящее время, с улучшением понимания неоднородности ТНРМЖ и того, что при этом актуальна иммунная направленность лечения, исследуются checkpoint-ингибиторы, вакцины и иммунные антагонисты. Две фазы III рандомизированного исследования атезолизумаба и пембролизумаба продолжают проводиться при метастатическом ТНРМЖ: первое – паклитаксел с или без атезолизумаба и второе – пембролизумаб против одной химиотерапии. Исследования с использованием обоих агентов также запланированы в неоадьювантной терапии. И, наконец, в два исследования по оценке карбоплатина с атезолизумабом должны начать набор в ближайшие месяцы. Образцы тканей из этих исследований будут изучаться с оценкой ответа или резистентности к PD-1 и PD-L1 экспрессии и зависимости ответа от наличия инфильтрирующих опухоль лимфоцитов

(TILs). Имеющиеся на сегодняшний день исследования, которые демонстрируют ответы пролеченных пациентов с ТНРМЖ, примечательны, но более впечатляющей является длительность ответа, при которой безрецидивная выживаемость составила от 2 до 3 мес. после первой или второй линии лечения метастатического заболевания. Иммунотерапия быстро стала большим соперником в лечении ТНРМЖ. Следующей задачей будет определение того, как использовать это наилучшим образом: иммунотерапия вместе с химиотерапией или в сочетании с другими иммунными модуляторами, а также выявление биомаркеров ответа.

Заключение

ТНРМЖ является признанным подтипом РМЖ с характерной клиникой. До недавнего времени основным методом терапии ТНРМЖ была химиотерапия. Появление генетического секвенирования открыло возможности таргетной терапии ТНРМЖ (с неактивными классическими биомаркерами (ER, PR и HER2)). Наблюдается значительное повышение активности в проведении основных, дополнительных и клинических исследований, включая изучение эффективности платины, новые подходы к иммунотерапии и др.

Литература

1. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000, 406: 747-752.
2. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 4429-4434.
3. Carey LA, Dees EC, Sawyer L et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 2329-2334.
4. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2012, 490: 61-70.
5. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X et al. Identification of human triplenegative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin Invest.*, 2011, 121: 2750-2767.
6. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel

- subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 1688-1698.
- 7.** Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J. Clin Oncol.*, 2010, 28: 2784-2795.
- 8.** Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG et al. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J. Clin Oncol.*, 2013, 31: 3997-4013.
- 9.** Smid M, Wang Y, Zhang Y et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*, 2008, 68: 3108-3114.
- 10.** Harrell JC, Prat A, Parker JS et al. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 132: 523-535.
- 11.** Lin NU, Claus E, Sohl J et al. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases. *Cancer*, 2008, 113: 2638-2645.
- 12.** Liedtke C, Mazouni C, Hess KR et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J. Clin Oncol.*, 2008, 26: 1275-1281.
- 13.** Sikov WM, Berry DA, Peou CM et al. Event-free and overall survival following neoadjuvant weekly paclitaxel and dose-dense AC +/- carboplatin and/or bevacizumab in triple-negative breast cancer: outcomes from CALGB 40603 (Alliance). San Antonio. 2015. TX: San Antonio Breast Cancer Symposium. 2016.
- 14.** Von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 2014, 15: 747-756.
- 15.** Sikov WM, Berry DA, Perou CM et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol*, 2015, 33: 13-21.
- 16.** Cortazar P, Zhang L, Untch M et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*, 2014, 384: 164-172.
- 17.** Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10869-10874.
- 18.** Sørlie T, Tibshirani R, Parker J et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 8418-8423.
- 19.** Livasy CA, Karaca G, Nanda R et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*, 2006, 19: 264-271.
- 20.** Prat A, Parker JS, Karginova O et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2010, 12: 68.
- 21.** Gucalp A, Tolane S, Isakoff SJ et al. Translational Breast Cancer Research Consortium (TBCRC 011). Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 5505-5512.
- 22.** Turner N, Tutt A, Ashworth A, Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic Cancers. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 814-819.
- 23.** Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2010, 363: 1938-1948.
- 24.** Bhattacharyya A, Ear US, Koller BH et al. The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. *J Biol Chem*, 2000, 275: 23899-23903.
- 25.** Moynahan ME, Cui TY, Jasin M. Homology-directed DNA repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Cancer Res*, 2001, 61: 4842-4850.
- 26.** Hastak K, Alli E, Ford JM. Synergistic chemosensitivity of triple-negative breast cancer cell lines to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition, gemcitabine, and cisplatin. *Cancer Res*, 2010, 70: 7970-7980.

- 27.** Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*, 2011, 12: 68-78.
- 28.** Kurian AW, Hare EE, Mills MA et al. Clinical evaluation of a multiplegenesequencing panel for hereditary cancer risk assessment. *J. Clin Oncol*, 2014, 32: 2001-2009.
- 29.** Castéra L, Krieger S, Rousselin A et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur J Hum Genet*, 2014, 22: 1305-1313.
- 30.** Couch FJ, Hart SN, Sharma P et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol*, 2015, 33: 304-311.
- 31.** Stefansson OA, Jonasson JG, Johannsson OT et al. Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. *Breast Cancer Res*, 2009, 11: 47.
- 32.** Byrski T, Huzarski T, Dent R et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 115: 359-363.
- 33.** Alba E, Chacon JI, Lluch A et al. A randomized phase II trial of platinum salts in basal-like breast cancer patients in the neoadjuvant setting. Results from the GEICAM/2006-03, multicenter study. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 136: 487-493.
- 34.** Von Minckwitz G, Loibl S, Schneeweiss A et al. Early survival analysis of the randomized phase II trial investigating the addition of carboplatin to neoadjuvant therapy for triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto). San Antonio. 2015, TX: San Antonio Breast Cancer Symposium. 2015.
- 35.** Staudacher L, Cottu PH, Diéras V et al. Platinum-based chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer: the Institut Curie experience. *Ann Oncol*, 2011, 22: 848-856.
- 36.** Khalaf D, Hilton JF, Clemons M et al. Investigating the discernible and distinct effects of platinum-based chemotherapy regimens for metastatic triple-negative breast cancer on time to progression. *Oncol Lett*, 2014, 7: 866-870.
- 37.** Uhm JE, Park YH, Yi SY et al. Treatment outcomes and clinicopathologic characteristics of triple-negative breast cancer patients who received platinum-containing chemotherapy. *Int J Cancer*, 2009, 124: 1457-1462.
- 38.** Villarreal-Garza C, Khalaf D, Bouganim N et al. Platinum-based chemotherapy in triple-negative advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 146: 567-572.
- 39.** Tutt A, Ellis P, Kilburn L et al. The TNT trial: A randomized phase III trial of carboplatin (C) compared with docetaxel (D) for patients with metastatic or recurrent locally advanced triple negative or BRCA1/2 breast cancer (CRUK/07/012). San Antonio. 2014, TX: San Antonio Breast Cancer Symposium. 2014.
- 40.** Fan Y, Xu BH, Yuan P et al. Docetaxel-cisplatin might be superior to docetaxel-capecitabine in the first-line treatment of metastatic triplenegative breast cancer. *Ann Oncol*, 2013, 24: 1219-1225.
- 41.** Hu XC, Zhang J, Xu BH et al. Cisplatin plus gemcitabine versus paclitaxel plus gemcitabine as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (CBCSG006): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2015, 16: 436-446.
- 42.** Isakoff SJ, Mayer EL, He L et al. TBCRC009: a multicenter phase II clinical trial of platinum monotherapy with biomarker assessment in metastatic triple-negative breast cancer. *J. Clin Oncol*, 2015, 33: 1902-1909.
- 43.** Abkevich V, Timms KM, Hennessy BT et al. Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer.*, 2012, 107: 1776-1782.
- 44.** Birkbak NJ, Wang ZC, Kim JY et al. Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents. *Cancer Discov*, 2012, 2: 366-375.
- 45.** Popova T, Manié E, Rieunier G et al. Ploidy and large-scale genomic instability consistently identify basal-like breast carcinomas with BRCA1/2 inactivation. *Cancer Res*, 2012, 72: 5454-5462.
- 46.** Powell SN, Riaz N, Mutter RW et al. A functional assay for homologous recombination (HR) DNA repair and whole exome sequencing reveal that HR-defective sporadic breast cancers are enriched for genetic alterations in DNA repair genes. San Antonio. 2015, TX: San Antonio Breast Cancer Symposium. 2015.
- 47.** Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumabin patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 2010, 363: 711-723.

- 48.** Robert C, Long GV, Brady B et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N. Engl J. Med.*, 2015, 372: 320-330.
- 49.** Hamid O, Robert C, Daud A et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N. Engl J. Med.*, 2013, 369: 134-144.
- 50.** Garon EB, Rizvi NA, Hui R et al. KEYNOTE-001 Investigators. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl J. Med.*, 2015, 372: 2018-2028.
- 51.** Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54: 307-314.
- 52.** Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 677-704.
- 53.** Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*, 2007, 27: 111-122.
- 54.** Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 2002, 3: 991-998.
- 55.** Loi S, Sirtaine N, Piette F et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J. Clin Oncol*, 2013, 31: 860-867.
- 56.** Liu S, Lachapelle J, Leung S et al. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2012, 14: 48.
- 57.** Liyanage UK, Moore TT, Joo HG et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor micro environment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J. Immunol.*, 2002, 169: 2756-2761.
- 58.** Bates GJ, Fox SB, Han C et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin Oncol*, 2006, 24: 5373-5380.
- 59.** Ono M, Tsuda H, Shimizu C et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 132: 793-805.
- 60.** Issa-Nummer Y, Darb-Esfahani S, Loibl S et al. Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer—a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial. *PLoS One*, 2013, 8: 797.
- 61.** Ladoire S, Arnould L, Apetoh L et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 2413-2420.
- 62.** Loi S, Michiels S, Salgado R et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are prognostic in triple-negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol*, 2014, 25: 1544-1550.
- 63.** Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 1949-1955.
- 64.** Denkert C, Loibl S, Noske A et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J. Clin Oncol*, 2010, 28: 105-113.
- 65.** Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol*, 2015, 33: 983-991.
- 66.** Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2: 361-370.
- 67.** Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia*, 2006, 8: 190-198.
- 68.** Emens LA, Braiteh FS, Cassier P et al. Inhibition of PD-L1 by MPDL3280A leads to clinical activity in patients with metastatic triple-negative breast cancer. San Antonio. 2014. TX: San Antonio Breast Cancer Symposium. 2014.
- 69.** Ali HR, Glont SE, Blows FM et al. PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes. *Ann Oncol*, 2015, 26: 1488-1493.

- 70.** Muenst S, Schaerli AR, Gao F et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 146: 15-24.
- 71.** Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular Subtypes. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 5158-5165.
- 72.** Nagalla S, Chou JW, Willingham MC et al. Interactions between immunity, proliferation and molecular subtype in breast cancer prognosis. *Genome Biol*, 2013, 14: 34.
- 73.** Calabro A, Beissbarth T, Kuner R et al. Effects of infiltrating lymphocytes and estrogen receptor on gene expression and prognosis in breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 116: 69-77.
- 74.** Rody A, Holtrich U, Pusztai L et al. T-cell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-negative and HER2-positive breast Cancers. *Breast Cancer Res*, 2009, 11: 15.
- 75.** Nanda R, Chow LQ, Dees EC et al. A phase Ib study of pembrolizumab (MK-3475) in patients with advanced triple-negative breast cancer. San Antonio. 2014. TX: San Antonio Breast Cancer Symposium. 2014.
- 76.** Emens LA, Braiteh FS, Cassier P et al. Inhibition of PD-L1 by MPDL3280A leads to clinical activity in patients with metastatic triple-negative breast cancer (TNBC) Philadelphia. 2015. PA: American Association for Cancer Research 106th Annual Meeting.
- 77.** Santagata S, Thakkar A, Ergonul A et al. Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome. *J Clin Invest*, 2014, 124: 859-70.
- 78.** McNamara KM, Yoda T, Takagi K et al. Androgen receptor in triple negative breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, 133: 66-76.
- 79.** Lehmann BD, Bauer JA, Chen X et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*, 2011, 121: 2750-67.
- 80.** Park HS, Jang MH, Kim EJ et al. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod Pathol*, 2014, 27: 1212-22.
- 81.** Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 5505-12.
- 82.** Hu R et al. Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women. *Clin. Cancer. Res.*, 2011 Apr., 17(7): 1867-1874.
- 83.** Tsang JY, Ni YB, Chan SK et al. Androgen receptor expression shows distinctive significance in ER positive and negative breast cancers. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21: 2218-28.
- 84.** Lim E, Ni M, Cao S et al. Importance of breast cancer subtype in the development of androgen receptor directed therapy. *Curr Breast Cancer Rep*, 2014, 6: 71-8.
- 85.** Hickey TE, Robinson JL, Carroll JS et al. Minireview: the androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene. *Mol Endocrinol*, 2012, 26: 1252-67.
- 86.** McGhan LJ et al. Androgen receptor-positive triple negative breast cancer: a unique breast cancer subtype. *Ann. Surg. Oncol.*, 2014 Feb, 21(2): 361-367.
- 87.** Rakha EA et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*, 2007 Jan, 109(1): 25-32.
- 88.** He J et al. Prognostic value of androgen receptor expression in operable triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. *Med. Oncol.*, 2012 Jun, 29(2): 406-410.
- 89.** Park S et al. Expression of androgen receptors in primary breast cancer. *Ann. Oncol.*, 2010 Mar, 21(3): 488-492.
- 90.** Cuenca-Lopez MD, Montero JC, Morales JC et al. Phospho-kinase profile of triple negative breast cancer and androgen receptor signaling. *BMC Cancer*, 2014, 14: 302.
- 91.** Lehmann BD, Bauer JA, Schafer JM et al. PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res*, 2014, 16: 406.
- 92.** Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM et al. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res*, 2014, 16: 7.
- 93.** Kwok CW, Treeck O, Buchholz S et al. Receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) as therapeutic targets in triple negative breast cancers (TNBC). *Target Oncol*, 2014.
- 94.** Rizza P, Barone I, Zito D et al. Estrogen receptor beta as a novel target of androgen receptor action in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*, 2014, 16: 21.