

## Молекулярно-биологические факторы прогноза трижды негативного подтипа рака молочной железы



*Вторушин С.В.*

### “Hallmarks” ТНРМЖ

- 15-20% от всех карцином молочной железы
- молодой возраст (50% больных моложе 50 лет)
- агрессивное течение
- высокий метастатический потенциал
- высокий риск рецидива (пиковый характер)
- неблагоприятный клинический исход
- высокая степень морфологической, генетической, метаболической и иммунной гетерогенности
- «парадокс ТНРМЖ»
- Постулируется, что микрогланулярный аденоз (MGA) или атипичный MGA является потенциальным предшественником некоторых форм ТНРМЖ.

## Разнообразный спектр морфологии ТНРМЖ

### Low grade:

- аденоидно-кистозная карцинома
- секреторная карцинома
- фиброматозо-подобная карцинома
- аденосквамозная карцинома низкой степени злокачественности
- карцинома из высоких клеток с обратной полярностью

### High grade:

- инвазивная протоковая карцинома, NOS
- плоскоклеточная карцинома
- веретено-клеточная карцинома
- метапластическая карцинома
- карцинома с гетерологичными элементами
- карцинома с медуллярными признаками
- **Большинство (88%) - инвазивная протоковая карцинома NOS (grade 3)**

3

## Значение

### клинико-патологических характеристик ТНРМЖ

- Balkenhol MCA, Vreuls W, Wauters CAP, Mol SJJ, van der Laak JAWM, Bult P. **Histological subtypes in triple negative breast cancer are associated with specific information on survival.** Ann Diagn Pathol. 2020 Jun;46:151490. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2020.151490. Epub 2020 Mar 3. PMID: 32179443.
- Naoko Honma, Hideaki Ogata, Akimitsu Yamada, Yoko Matsuda, Keiichi Kontani, Mika Miyashita, Tomio Arai, Eiichi Sasaki, Kazutoshi Shibuya, Tetuo Mikami, Masataka Sawaki, **Clinicopathological characteristics and prognostic marker of triple-negative breast cancer in older women,** Human Pathology, Volume 111,2021.

4

## Общие иммунофенотипические признаки

- Высокомолекулярные / базальные цитокератины:
  - CK5 / 6, CK14, CK17
- EGFR (89%)
- Отрицательные ER, PR, HER2
- AR (41%)
- SOX10 (31%), GATA3 (35%), маммаглобин (28%), GCDFP-15 (25%) (Histopathology 2020; 77: 936)
- Чувствительность выше при одновременном использовании SOX10 и GATA3 (Breast Cancer Res Treat 2020; 184: 11).

5

Классификация Lehman	Классификация Burstein	TNBC type4
Базальноподобный 1 (BL1)	Базальноподобный иммуноактивированный (BLIA)	Базальноподобный 1 (BL1)
Базальноподобный 2 (BL2)	Базальноподобный иммуносупрессированный (BLIS)	Базальноподобный 2 (BL2)
Люминальный андроген-рецепторный (LAR)	Люминальный андроген-рецепторный (LAR)	Люминальный андроген-рецепторный (LAR)
Мезенхимальный (M)	Мезенхимальный (M)	Мезенхимальный (M)
Мезенхимальноподобный (MSL)		
Иммуномодуляторный (IM)		
Нестабильный (UNS)		

The diagram illustrates the evolution of TNBC classification. It begins with a TNBC breast section, which is categorized into Lehmann six subtypes (MSL, LAR, M, IM, BL2, BL1) in 2011. These are then grouped into Burstein four subtypes (LAR, MES, BLIS, BLIA) in 2015. Finally, the FUSCC classification (IM, LAR, MES, BLIS) is shown in 2016.

## Базальноподобные субтипы

- 75-80% всех случаев тройного негативного РМЖ

### Базальноподобный тип 1 или иммуноактивированный тип

- высокие показатели индекса Ki67
- высокая частота повреждений ДНК и генов, регулирующих клеточный цикл, в частности мутации *TP53*
- высокая амплификация *MYC*, *CDK6* или *CCNE1*, мутаций в *BRCA2*, *PTEN*, *MDM2*, *RB1*
- наибольшая частота полного ответа на неоадьювантную химиотерапию

7

## Базальноподобные субтипы

### Базальноподобный тип 2 или иммуносупрессивный тип

- ассоциирован с повышенными показателями активности метаболических путей и сигнальных факторов роста
- снижение количества В- и Т- клеток, НК клеток как в цитокиновом, так и в иммунном пути ответа
- худший прогноз

8

## Мезенхимальный субтип

- наличие механизмов, лежащих в основе ЭМП
- низкая экспрессия клаудина
- преобладание генов, ассоциированных с явлениями ангиогенеза и клеточной стволовости
- преобладание метапластических карцином
- часто дискогезивное строение с диффузным разобщением изолированных структур и клеток в строме
- высокая экспрессия PD-L1
- тропизм метастазов к легким
- наличие в опухолевой строме M2 макрофагов, регуляторных Т-клеток и низкое содержание CD8+ Т-клеток
- Клетки claudin-low опухолей молочной железы, отличаются наличием «мезенхимальных» признаков (повышенная экспрессия CD44, виментина, N-cadherin, низкая степень дифференцировки)

9

## LAR субтип (luminal androgen receptor subtype)

- резко выраженная экспрессия рецепторов андрогенов (AR)
- опухоли проявляют люминальный паттерн в экспрессии генов (высокая экспрессия *FOXA1*, *GATA3*, *SPDEF*, *XBP1*)
- выявлены мутации в *PIK3CA* (55%), *KMT2C* (19%) и *CDH1* (13%)
- LAR субтип ассоциирован с более пожилым возрастом пациенток
- характерно наличие апокриновой дифференцировки
- низкие значения индекса Ki67
- отсутствие экспрессии AR - quadruple-negative breast cancer (QNBC)

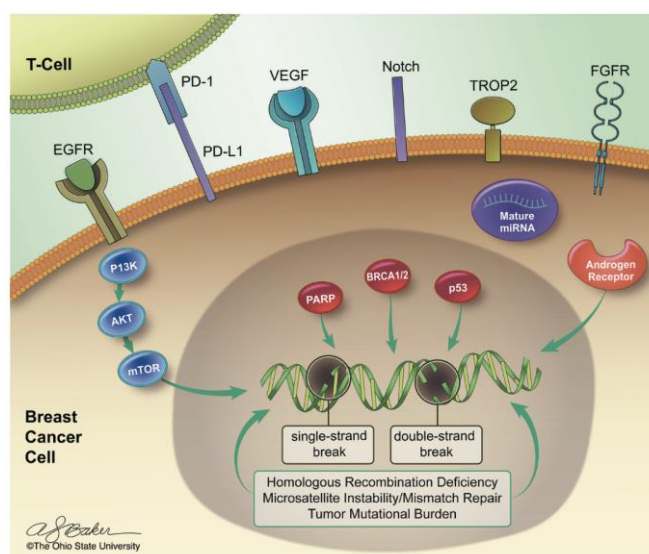
10

## LAR субтип (luminal androgen receptor subtype)

- наибольшая частота метастатического поражения региональных лимфоузлов
- тропизм к метастатическому поражению костей
- наибольшая устойчивость новообразования к неoadъювантной химиотерапии с использованием антрациклинов и/или таксанов
- частота pCR опухоли составляет чуть более 14%
- высокая чувствительность к антиандрогенным препаратам (бикалутамиду и энзалутамиду)
- LAR-клеточные линии имеют практически сопоставимую с ER-позитивной MCF7 клеточной линией высокую чувствительность к CDK4/6 ингибиторам
- чувствительны к двойному ингибированию PI3K и mTOR

11

## Прогностические и предиктивные биомаркеры ТНRMЖ



12

## Молекулярно-биологические факторы прогноза ТНРМЖ

Биомаркер	Приблизительная распространенность в ТНРМЖ	Механизм	Таргетная терапия	Прогностическое/предиктивное значение
<b>BRCA 1/2 germline mutation</b>	10–20%	Гомологичная рекомбинация и репарация двухцепочечных разрывов ДНК	PARP inhibitor	Более высокий ответ на платину и предиктор ответа на ингибиторы PARP
<b>Повышенный показатель HRD</b>	45–70%	Гомологичная рекомбинация и репарация двухцепочечных разрывов ДНК	Нет клинически полезной таргетной терапии	Предиктор pCR при неоадьювантной терапии платиной
<b>PDL1</b>	вариабельно, зависит от стадии заболевания, антитела	Уклонение от иммунного надзора	Ингибиторы контрольных точек	Улучшение pCR и выживаемости в исследованиях с иммунотерапией
<b>TILs</b>	Вариабельна	Опухолевое микроокружение	Нет клинически полезной таргетной терапии	улучшает pCR, DFS, and OS раннем ТНРМЖ; предиктор ответа HAXT
<b>Высокая мутационная нагрузка опухоли</b>	3–11%	Соматические мутации на мегабазу ДНК	Pembrolizumab	Предиктор ответа на пембролизумаб
<b>MSI-H / dMMR</b>	<2% of all breast cancer	Ошибки, связанные с дефектом репликации ДНК	Pembrolizumab	Предиктор ответа на пембролизумаб

Биомаркер	Приблизительная распространенность в ТНРМЖ	Механизм	Таргетная терапия	Прогностическое/предиктивное значение
<b>AR</b>	30–35%	Стероидный транскрипционный фактор	Abiraterone Acetate Bicalutamide Enzalutamide	Улучшенная DFS; может быть связано с химиорезистентностью
<b>EGFR</b>	13–76%	Рецепторная тирозинкиназа, участвующая в пролиферации / выживании клеток	Нет клинически полезной таргетной терапии	прогностический фактор, связанный с худшей DFS
<b>VEGF</b>	30–60%	Связываются с рецепторными тирозинкиназами и способствуют ангиогенезу	Нет клинически полезной таргетной терапии	Высокая экспрессия связана с прогрессированием заболевания и метастазами
<b>FGFR</b>	FGFR1 гиперэкспрессия: 18% FGFR1 амплификация гена: 33% FGFR2 амплификация гена: < 5%	Рецепторная тирозинкиназа, участвующая в пролиферации клеток	aTKIs (FGFR-selective or multi-targeted) aFGFR isoform antibodies aFibroblast growth factor ligand inhibitors	Амплификация FGFR1: неясно Амплификация FGFR2: плохая ОС
<b>HER2</b>	45–55% всех ПМЖ с HER2 IHC 1+ или 2+ 2% ПМЖ с мутацией HER	Низкая экспрессия белка HER2 с неопределяемой амплификацией гена ERBB2	antibody–drug conjugates aVaccines aAnti-HER2 TKIs, for HER2-mutated	Возможный предиктор ответа на ADC и TKI
<b>TP53 mutation</b>	80%	Кодирует белок фактора транскрипции, который способствует остановке клеточного цикла	Нет клинически полезной таргетной терапии	Противоречивые сообщения о прогностической значимости

Биомаркер	Приблизительная распространенность в ТНРМЖ	Механизм	Таргетная терапия	Прогностическое/ предиктивное значение
<b>MicroRNAs</b>	NA	Некодирующие РНК, которые регулируют посттранскрипционную экспрессию генов, участвующих в канцерогенезе	Нет клинически полезной таргетной терапии	Особые сигнатуры, связанные с худшим DFS, худшей OS и химиорезистентностью
<b>PI3K/AKT/mTOR pathway</b>	<i>PI3K</i> 7–9% <i>PTEN</i> 30–50%	PI3K - внутриклеточные липидкиназы в сигнальном каскаде, который способствует пролиферации / выживанию клеток PTEN - гены-супрессоры опухолей, подавляющие сигнальный каскад	Апелелисиб Ипатасертиб Капивасертиниб	Возможные предикторы ответа на ингибиторы PI3K / AKT / mTOR
<b>NTRK gene fusion</b>	<1%	Слияние генов приводит к образованию постоянно активных белков TRK, которые способствуют росту опухоли.	Larotrectinib Entrectinib	Предиктор ответа на ингибиторы киназы рецептора тропомизина
<b>NOTCH signaling pathway</b>	10%	Онкоген, участвующий в пролиферации клеток, гибели клеток, дифференцировке клеток и поддержании стволовых клеток	*AL101	Худшая выживаемость DFS and OS

Jasmine Sukumar, Kelly Gast, Dionisia Quiroga, Maryam Lustberg & Nicole Williams (2021) Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development, Expert Review of Anticancer Therapy, 21:2, 135-148, DOI: 10.1080/14737140.2021.1840984 To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14737140.2021.1840984>

## Рецептор андрогенов (AR)

- В многочисленных исследованиях оценивалась роль антиандрогенных препаратов в лечении местнораспространенного или метастатического РМЖ.
- Два исследования фазы II, посвященные применению нестероидных ингибиторов AR, бикалутамида и энзалутамида, показали, что соотношение клинической пользы составляет примерно 20-25%.
- В настоящее время проводится несколько клинических исследований mts РМЖ для оценки использования блокады AR в сочетании с различными таргетами, включая ингибиторы CDK4 / 6 и ингибиторы PI3K (NCT 03090165, NCT 02457910).



## Рецептор андрогенов (AR)

- Одна из нерешенных проблем таргетной терапии AR - **как лучше всего определить AR-позитивность?**
- До сих пор в клинических испытаниях для определения AR-положительности использовался **IHC**, но положительная экспрессия определялась с **разными пороговыми значениями**.
- **PREDICT AR**, диагностический тест, созданный для выявления сигнатуры андрогенного гена в ходе исследования MDV3100-11, может предоставить дополнительные рекомендации относительно того, кому будет полезна терапия, направленная на AR.
- Использование этого диагностического анализа связано с большей клинической пользой в исследовании, однако перед его всесторонним использованием необходимо провести дополнительную валидацию.

17

## FGFR (1-4)

- Распространенность гиперэкспрессии FGFR1 была отмечена в 18%, с амплификацией гена FGFR1 примерно в 33% ТНPMЖ.
- Амплификация FGFR2 встречается менее чем в 5% ТНPMЖ.
- Наличие амплификации FGFR1 при люминальном PMЖ неизменно связано с худшим прогнозом.
- **Роль FGFR1 в ТНPMЖ спорна, данные неоднозначны.**
- Экспрессия FGFR2 коррелирует с низкой общей выживаемостью.
- Ингибирование передачи сигналов FGFR является обнадеживающей фармакологической мишенью (TKI как селективные, так и мультикиназные, антитела против изоформ FGFR).

18

## HER2-low

- Как прогностический биомаркер остается менее ясным, с противоречивыми результатами.
- В настоящее время проводится оценка множества ADC.
- Анти-HER2 ADC Trastuzumab deruxtecan (DS-8201a) показал положительный ответ в фазе 1 исследования распространенных солидных опухолей с низким уровнем HER2, в том числе в РМЖ (NCT02564900).
- Он изучается в рамках фазы III (NCT03734029), а также в исследованиях I фазы в сочетании с ингибиторами контрольных точек (NCT04042701, NCT03523572).
- Вакцины против HER2 также проходят оценку при РМЖ HER2-low, при этом часть из них показывают благоприятные результаты в подгруппе ТНРМЖ.
- Нератиниб продемонстрировал эффективность при метастатическом РМЖ с мутацией *HER2*, с низким уровнем HER2, и другие анти-HER2 TKI, включая поцитиниб (NCT02544997) и пиротиниб (NCT03412383), находятся в стадии изучения.

19

## TP53 mutation

- Из-за вариабельной экспрессии p53 значение статуса *TP53* как прогностического биомаркера неясно.
- Мутированный *TP53* ранее рассматривался как «не поддающийся лечению», совсем недавно было создано несколько соединений, нацеленных на мутированный p53.
- Соединения, включая PRIMA-1, APR-246, PK11007 и COTI-2, как было показано, реактивируют мутантный p53 и восстанавливают свойства дикого типа.

20

## PDL1 and TILs

- Исследование Keynote 355, в котором оценивалась комбинация пембролизумаба и химиотерапии в качестве терапии первой линии при метастатическом РМЖ, показало улучшение ВБП у пациентов, опухоли которых экспрессировали PDL1 (CPS  $\geq$  10)
- Однако, исследование фазы 3 Impassion131, в котором оценивали атезолизумаб с паклитакселом, не достигло основной конечной точки улучшения ВБП. Различия, наблюдаемые в ВБП между **IMPAssion 130** и **IMPAssion 131**, могут быть связаны с химиотерапией или премедикацией стероидами.
- Основываясь на этих результатах, наб-паклитаксел и атезолизумаб по-прежнему следует рассматривать как терапию первой линии для пациентов с метастатическим ТНРМЖ и PDL1-положительной опухолью.

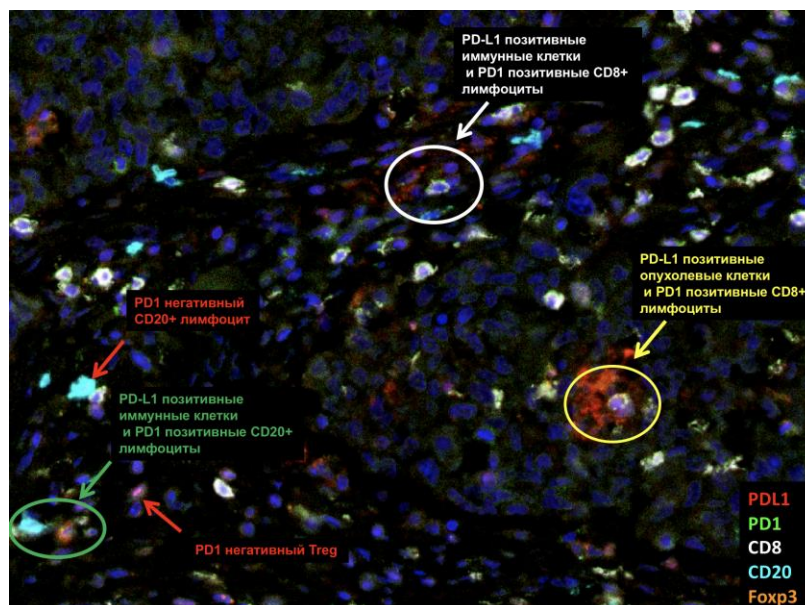
21

## PDL1 and TILs

- TILs сильно выражены примерно в 20% случаев ТНРМЖ.
- Увеличение TILs связано с улучшением DFS, OS и частоты pCR с NACT на ранних стадиях ТНРМЖ.
- В анализе двух адъювантных испытаний фазы III, наблюдается снижение рецидивов и летальных исходов примерно на 15% на каждые 10% увеличения TILs.
- TILs потенциально может предсказать ответ на иммунотерапию. KEYNOTE-086 показал, что более высокие значения TILs были связаны со значительным улучшением ORR для пембролизумаба.
- TIL также изучались как биомаркеры метастатического ТНРМЖ, при этом более высокие уровни связаны с лучшим прогнозом. Его способность прогнозировать ответ на иммунотерапию пембролизумабом в этих условиях была продемонстрирована в KEYNOTE-119 у пациентов с TILs  $\geq$ 5%.
- Международный консенсус Санкт-Галлен 2019 рекомендуют TILs как рутинную характеристику в ТНРМЖ.

22

## PDL1 and TILs



23

## ЦОК и внеклеточная ДНК

- вкДНК имеет наибольшую корреляцию с изменениями опухолевой нагрузки и дает самый ранний показатель ответа на лечение у 53%.
- Ретроспективное когортное исследование 164 пациентов с метастатическим ТНРМЖ показало, что наличие фракций вкДНК более 10% связано с худшими исходами, независимо от клинико-патологических данных.
- Помимо вкДНК, оценка ЦОК в начале новой схемы лечения метастатического РМЖ и через несколько недель после этого имеет прогностическое значение.
- Инструмент для выявления минимальной остаточной болезни.

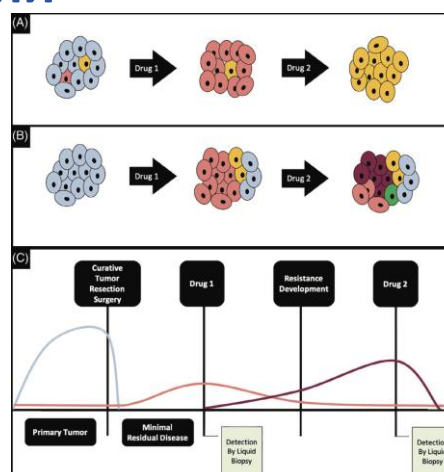
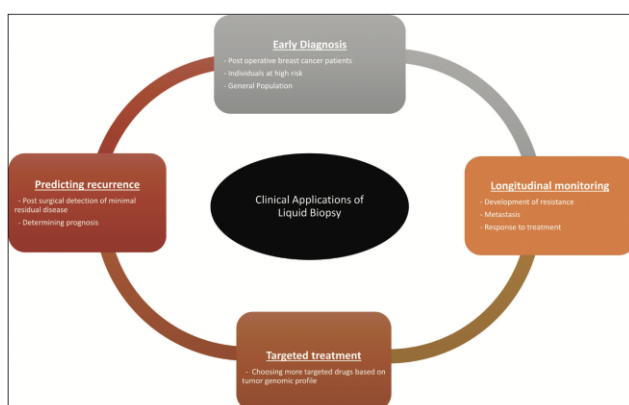
24

## ЦОК и внеклеточная ДНК

- ЦОК  $\geq 5$  на 7,5 мл были связаны со снижением ВБП и ОВ.
- Недавний экспертный консенсус Cristofanilli et al. определили, что количество ЦОК можно использовать для стратификации пациентов с метастатическим РМЖ на две подгруппы с прогностической значимостью.
- Пациенты IV стадии с ЦОК  $\geq 5$  на 7,5 мл были классифицированы как агрессивные, а пациенты с  $<5$  ЦОК на 7,5 мл - как пациенты с “индолентной стадией”. В группе с “индолентными IV стадиями” медиана ОВ была выше по сравнению с агрессивной группой (36,3 против 16,0 месяцев,  $p < 0,0001$ ).
- **Коррекция терапии на основе этих пороговых значений ЦОК не улучшила общие результаты выживаемости.**

25

## Клиническое применение жидкостной биопсии



- Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. Clin Genet. 2019 Jun;95(6):643-660. doi: 10.1111/cge.13514. Epub 2019 Feb 27. PMID: 30671931.

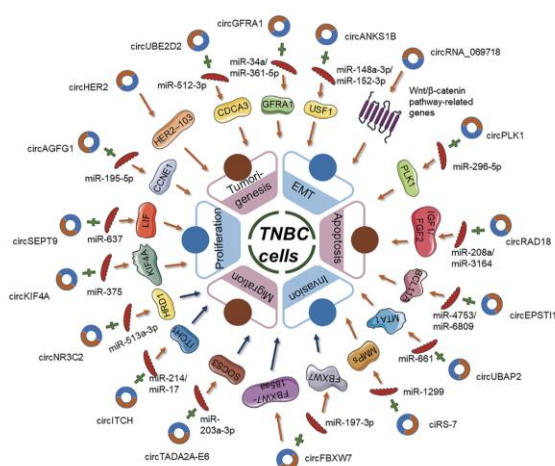
26

## Остаточная болезнь как прогностический биомаркер ТНРМЖ

- Остаточное заболевание определяется как наличие инвазивного рака в опухоли или лимфатических узлах после НАХТ.
- Наличие остаточного заболевания связано с повышенным риском рецидива.
- Капецитабин в адъюватном режиме улучшает ВБП и ОВ у пациентов с резидуальным заболеванием.
- Несколько исследований, сравнивающих образцы биопсии до и после лечения, обнаружили существенные геномные изменения, которые могли быть причиной устойчивости к традиционным химиотерапевтическим методам.
- **Метастатический ТНРМЖ демонстрирует большую биологическую гетерогенность и генетическую сложность по сравнению с ранней стадией.**
- Молекулярный анализ образцов биопсии после лечения может потребоваться у пациентов с ТНРМЖ, у которых не наблюдается рCR после НАХТ, чтобы адаптировать адъювантную терапию для улучшения ее результатов.

27

## circRNA как потенциальные диагностические и прогностические биомаркеры ТНРМЖ



<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.06.017>.

Molecular Therapy: Nucleic Acids Vol. 26 December 2021 a 2021 The Author(s). 63 This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

28

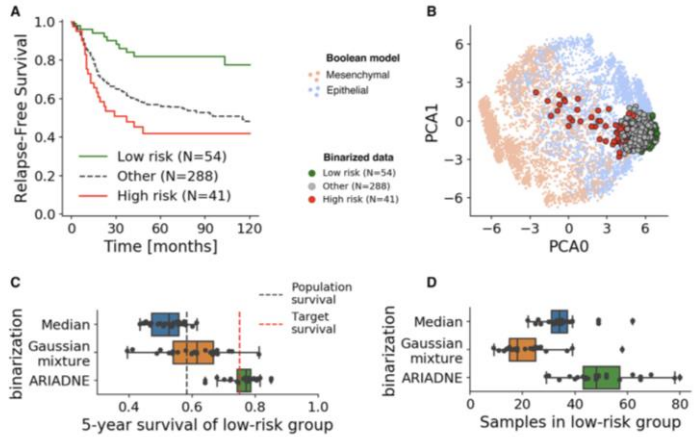
# Гибридное состояние ЭМП

## ARIADNE

**Triple Negative Breast Cancer**  
Collected transcriptomes with known clinical history

**Phenotypic Landscape**  
Project transcriptomes on landscape using a Boolean model for the EMT

**Patient stratification**  
Hybrid phenotypes stratify low-risk vs high-risk patients



Classification of triple-negative breast cancers through a Boolean network model of the epithelial-mesenchymal transition  
Cell Systems 12, 457–462, May 19, 2021 a 2021 Elsevier Inc. 29

# Трансформация парадигмы лечения ТНРМЖ

- Молекулярный подтип ТНРМЖ позволяет идентифицировать молекулярно-гомогенные группы с обогащением определенных геномных изменений.
- Клинические исследования конкретных подтипов могут быть эффективным методом разработки лекарств.
- По мере накопления данных клинических испытаний парадигма лечения в контексте транскриптомного подтипа может быть окончательно разработана и адаптирована для пациентов с ТНРМЖ.



single marker, single targeted therapy	
<i>PIK3CA/ACT1/PTEN</i> altered	→ PI3K pathway inhibitor
PD-L1 positive	→ anti-PD-L1 antibody, anti-PD-1 antibody
<i>BRCA 1/2</i> -mutated	→ platinum, PARP inhibitor
AR overexpression	→ AR inhibitor

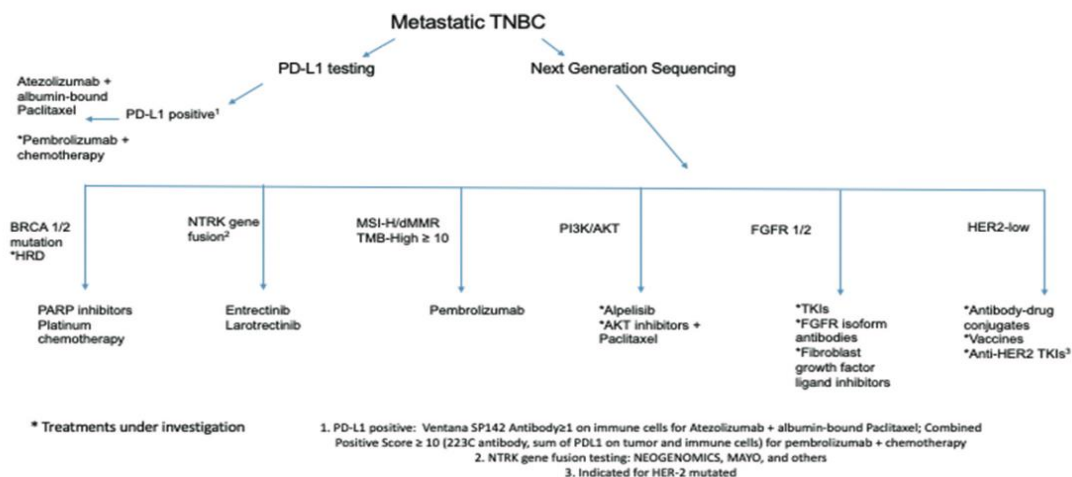
molecular subtyping, subtype-specific targeted therapy	
LAR	<i>ERBB2</i> mutated → pyrotinib <i>PIK3CA/ACT1/PTEN</i> altered → PI3K inhibitor
IM	immune-inflamed cluster → anti-PD-L1, anti-PD-1 antibody
BLIS	high HRD or <i>BRCA1/2</i> mutated → platinum, PARP inhibitor
MES	<i>PIK3CA/ACT1/PTEN</i> altered → PI3K inhibitor <i>JAK/STAT</i> pathway upregulation → JAK/STAT inhibitor

Zhao S, Zuo WJ, Shao ZM, Jiang YZ. Molecular subtypes and precision treatment of triple-negative breast cancer. *Ann Transl Med.* 2020;8(7):499. doi:10.21037/atm.2020.03.194



## Одобренные варианты лечения ТНРМЖ на основе биомаркеров

J. SUKUMAR ET AL.



### Заключение:

- Идентификация как прогностических, так и предиктивных биомаркеров для принятия решений в лечении становится все более важной.
- Многие белковые мишени (EGFR, VEGF, FGFR, HER2 и рецептор андрогенов) находятся в стадии исследования, и в настоящее время прямое клиническое применение ограничено.
- Экспрессия РНК была идентифицирована как прогностический биомаркер, но в настоящее время нет доступных методов лечения, направленных на РНК.
- Иммуноterapia становится потенциальным вариантом лечения, основанным на иммунных биомаркерах (PD-L1, TMB, MSI-H / ddMR).
- Роль циркулирующих опухолевых клеток и циркулирующей опухолевой ДНК остается областью активных исследований.
- Обнаружение соматических мутаций путем секвенирования ДНК метастатической опухолевой ткани необходимо для определения возможных вариантов таргетного лечения.



## P.S.

- Цель любого диагноза - правильно поставить его с первого раза.
- Тем не менее, огромное количество основанных на фактических данных знаний, которые патологи должны получать, изучать, обрабатывать и, что наиболее важно, применять в своей повседневной практике, просто невозможно поддерживать одной личности.
- С помощью доказательной медицины патологоанатомы сегодня должны уметь интегрировать информацию, полученную в результате различных анализов, и сопоставлять ее с клинической информацией. Все чаще это означает, что патологи должны будут покинуть лабораторию и играть более активную роль в принятии клинических решений у постели больного.

«Эдди Ма - директор по клиническим решениям»



## Спасибо за внимание!

