



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΤΙΤΛΟΣ»**

**Τριπλά αρνητικός καρκίνος μαστού:  
μοριακές υπογραφές και νέες θεραπείες**

**ΟΝΟΜΑ**

**Αντιγόνη Πουλτσίδα  
Ιατρός, Γενική Χειρουργός**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΗΜΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ, Επιβλέπων**

**ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, Μέλος**

**ΒΑΡΒΑΡΑ ΤΡΑΧΑΝΑ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, Μέλος**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2023**



**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
FACULTY OF MEDICINE**



**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM  
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS  
«Triple Negative Breast Cancer: molecular signatures and novel therapies»**

**NAME**

Antigoni Poultsidi  
Medical Doctor -General Surgeon

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TAKM) είναι ο τύπος του καρκίνου του μαστού που δεν εκφράζει κανέναν από τους κλασσικούς βιοδείκτες- υποδοχείς, βάση ανοσοϊστοχημείας, ER,PR, HER2, που χαρακτηρίζουν τον καρκίνο του μαστού. Αποτελεί το 10-15% των καρκίνων του μαστού και χαρακτηρίζεται από κακή πρόγνωση, Λόγω της κακής πρόγνωσης του σε σχέση με τους άλλους τύπους και της απουσίας γνωστών θεραπευτικών στόχων έχει συγκεντρώσει τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον.

Ο TAKM έχει αναγνωριστεί ως ετερογενής νόσος. Ορόσημο αποτέλεσε η ειδική ταξινόμηση του TAKM, βάση του προφίλ του μεταγραφώματος σε έξι υποτύπους: **basal like (BL1, BL2), immunomodulatory (IM), mesenchymal (M), mesenchymal stem -like (MSL) και luminal androgen receptor like (LAR)**. Πέραν της προηγούμενης ταξινόμησης ερευνητικές ομάδες ταξινόμησαν τον TAKM στη βάση του προφίλ των lncRNA, των μοτίβων μεθυλίωσης του DNA, του πρωτεώματος, του μεταβολώματος, αλλά και στη βάση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (Tumor Microenvironment, TME), στην προσπάθεια ανεύρεσης όχι μόνο νέων πιθανών θεραπευτικών στόχων αλλά και κατάλληλης εξατομικευμένης θεραπευτικής προσέγγισης. Ειδικά το μικροπεριβάλλον του όγκου, με όλα τα στοιχεία του, έχει βασικό ρυθμιστικό ρόλο στην κλινική έκφραση του TAKM και αποτελεί πεδίο εντατικής έρευνας για νέους θεραπευτικούς στόχους. Τα καλύτερα μοντέλα για μεταφραστική έρευνα και προκλινικές μελέτες φάσης I που αποδίδουν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο τον όγκο και το TME, είναι τα μοντέλα ξеноμοσχευμάτων που προέρχονται από ασθενή (patient derived xenografts, PDX) και στη συνέχεια τα οργανοειδή που προέρχονται από ασθενή (Patient Derived Organoids, PDOs)

Ο TAKM έχει ισχυρή συσχέτιση με τον κληρονομικό καρκίνο κι έχει ένδειξη για γενετικό έλεγχο παθολογικών μεταλλάξεων γονιδίων που σχετίζονται με τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού ανεξαρτήτως ηλικίας (80% των όγκων στους φορείς BRCA1 είναι TAKM). Οι ασθενείς αυτοί επωφελούνται από την προσθήκη στη θεραπεία τους αναστολέων της πολυμεράσης της πολυADP-ριβόζης (PARP inhibitors)

Η κλασσική ογκολογική θεραπεία του TAKM πλην της χειρουργικής αντιμετώπισης +/- ακτινοθεραπείας ακόμη και του πρώιμου, περιλαμβάνει χημειοθεραπεία που τώρα πλέον στην πλειοψηφία των περιπτώσεων χορηγείται νεοεπικουρικά (για μέγεθος όγκου  $\geq 2$  cm). Σε αναγνώριση της σημασίας του TME για τον TAKM έχει λάβει έγκριση η ανοσοθεραπεία με αναστολείς των γνωστών στόχων PD-1/PDL-1. Πολλές κλινικές μελέτες είναι σε εξέλιξη για την ανεύρεση των καταλληλότερων θεραπευτικών συνδυασμών των αναστολέων PD-1/PDL-1 για τον πρώιμο, τον μεταστατικό ή τον

υποτροπιάζοντα TAKM: Impassion030, Impassion131, Impassion132 ,Keynote-355, Enhance-1/Keynote -150, TONIC. Πολλές ερευνητικές προσπάθειες εστιάζουν στην ανεύρεση και έτερων θεραπευτικών στόχων στο TME και στην ανοσορύθμιση του για τη βέλτιστη αντικαρκινική ανταπόκριση: στόχευση στα κύτταρα φυσικούς φονείς (Natural Killer cells, NK), τα CD8+ T λεμφοκύτταρα τα μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο, στα μυελοειδούς προέλευσης κατασταλτικά κύτταρα (Myeloid Derived Suppressor Cells, MDSC) και στα κυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ρύθμισή τους.

Κλινικές δοκιμές με αναδυόμενους στόχους είναι επίσης σε εξέλιξη: Σημαντικότερες είναι με τον αναστολέα της πρωτεϊνικής κινάσης B (protein kinase B,PKB ή AKT) το ipatasertib στην IPATunity 130 μελέτη και το sacituzumab gonitecan ένα σύζευγμα αντισώματος έναντι της διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνης Trop-2 με φάρμακο- με τον αναστολέα της τοποϊσομεράσης I gonitecan στην κλινική μελέτη ASCENT

Νέοι βιοδείκτες και ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι αλλά και μέθοδοι εξατομικευμένης αντιμετώπισης συνεχίζουν να αναζητούνται για την βελτίωση της πρόγνωσης του TAKM

## Abstract

Triple-negative breast cancer (TNBC) is the type of breast cancer that lacks the expression of the specific breast cancer-related biomarkers-receptors: estrogen and progesterone (ER and PR), and HER2. TNBC constitutes approximately 10-15% of all breast cancers and is characterized by poor prognosis. Due to its poor prognosis and the lack of therapeutic targets it has become a field of intensive research. TNBC has been recognized as a highly heterogeneous disease. A breakthrough in the study of TNBC has been the specific classification of TNBC by Liehman et al, based on mRNA expression profiles into six subtypes: **basal-like (BL1, BL2), immunomodulatory (IM), mesenchymal (M), mesenchymal stem-like (MSL) και luminal androgen receptor like (LAR)**. Other investigators have studied cohorts of TNBC and classified them into subtypes according to mRNA profiling and lncRNAs, DNA methylation patterns, proteome analysis, metabolic pathways and according to **Tumor Microenvironment (TME) components**. The significance of TME in the immunomodulation of TNBC has been well recognized and is a field of therapeutic targets and interventions. The best models for such translational research, that can recapitulate TME and its dynamics, are patient -derived xenografts, (PDXs) and patient -derived organoids (PDOs). **TNBC has been strongly associated with heredity** (80% of BRCA1 carriers develop TNBCs). It is recommended that all TNBCs should undergo genetic testing regardless of the age of diagnosis. BRCA mutation carriers may benefit from the addition of a PARP inhibitor to their conventional regimen. Conventional oncology treatment for TNBC involves chemotherapy which nowadays is mostly administered in the neoadjuvant setting (for tumors  $\geq 2$ cm). **Immunotherapy with Immune Check Point inhibitors (ICIs) of the pathway PD-1/PDL** has been also approved for the treatment of metastatic or locally advanced or high-risk TNBC. Many clinical trials investigate the best therapeutic combination for ICIs in TNBC: **Impassion030, Impassion131, Impassion132, Keynote-355, Enhance-1/Keynote -150, TONIC**.

**Potential therapeutic targets for the immunomodulation of the TME to achieve improved anticancer effects involve natural killer (NK) cells, CD8<sup>+</sup> T cells, tumor -associated macrophages (TAM), myeloid-derived suppressor cells, and associated cellular pathways.**

In this context emerging therapeutic agents include **a protein kinase B, PKB or AKT inhibitor, (ipatasertib, clinical trial IPATunity 130)** and **sacituzumab govitecan**, an antibody against Trop-2 conjugated to topoisomerase I inhibitor (**clinical trial ASCENT**).

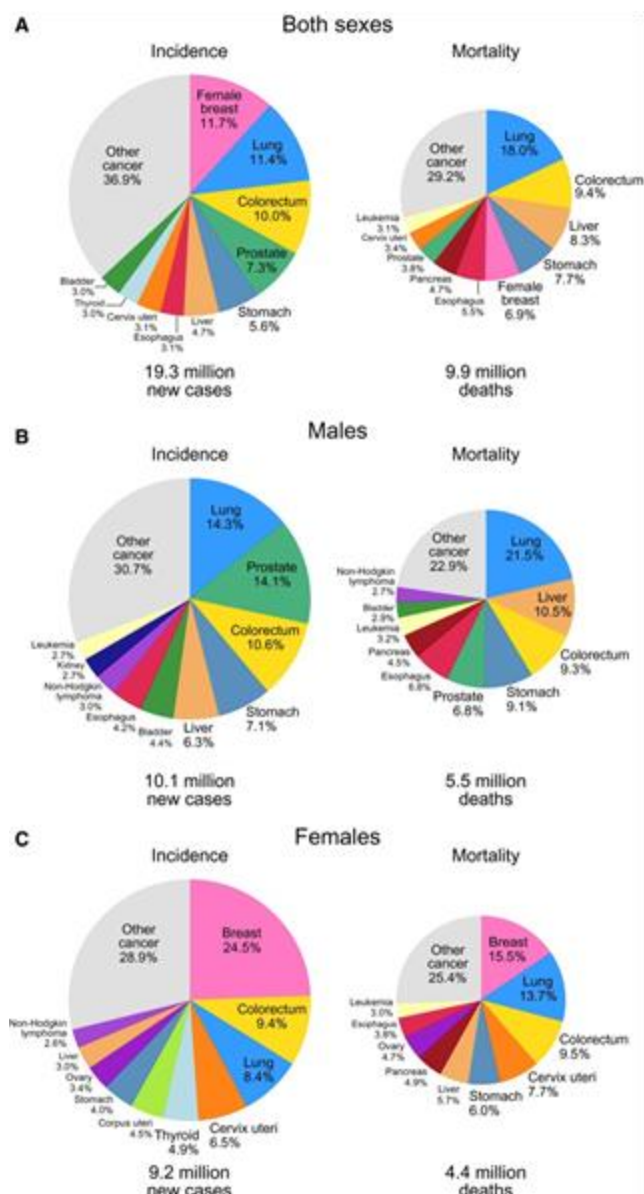
The development of novel methods and the identification of new drug targets for a precision-directed treatment for this deadly disease to improve the outcomes in the management of TNBC are ongoing and the subject of laborious scientific and clinical research.

## Περιεχόμενα

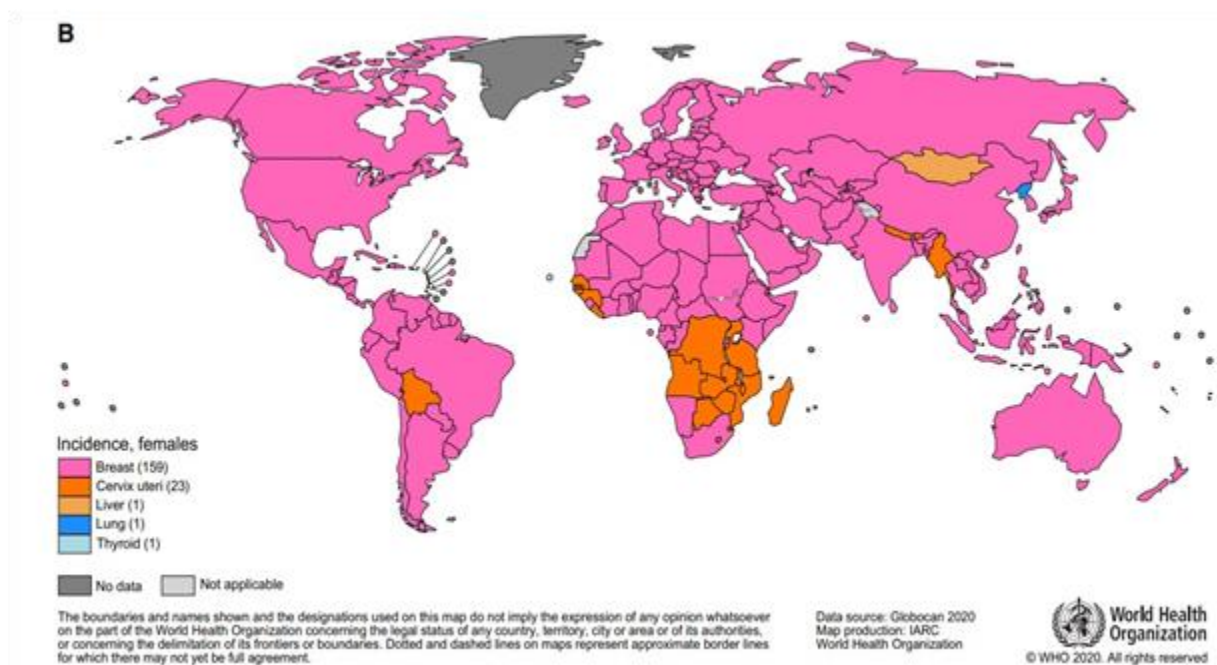
|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Εισαγωγή.....                                                                                 | 7  |
| 2. Ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού.....                                                       | 12 |
| 2.1. Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού .....                                            | 12 |
| 2.2. Υπότυποι καρκίνου του μαστού βάση ανοσοϊστοχημείας και ποσοστά επιβίωσης .....              | 15 |
| 2.3. Ειδική ταξινόμηση TNBC .....                                                                | 17 |
| 2.3.1. Τρέχουσα ομαδοποίηση TAKM .....                                                           | 20 |
| 2.3.2. Υπότυποιβάση του Μικροπεριβάλλοντος .....                                                 | 23 |
| 3. Θεραπεία TAKM .....                                                                           | 23 |
| 3.1. Ενδείξεις για νεοεπικουρική θεραπεία (NeoadjuvantChemotherapy-NAC).....                     | 24 |
| 3.2. Συμβατικά σχήματα χημειοθεραπείας/ανοσοθεραπείας .....                                      | 28 |
| (PARP inhibitor).....                                                                            | 28 |
| 3.3. Θεραπεία 2ης γραμμής.....                                                                   | 33 |
| 3.3.1. Ανοσοθεραπεία .....                                                                       | 34 |
| 3.3.2. Ανοσοθεραπεία σε συνδυασμό με Χημειοθεραπεία.....                                         | 36 |
| 3.3.3. Atezolizumab με nab-Paclitaxel .....                                                      | 36 |
| 3.3.4. Atezolizumab με Paclitaxel .....                                                          | 39 |
| 3.3.5. Χημειοθεραπεία με pembrolizumab .....                                                     | 40 |
| 3.3.6. Χημειοθεραπεία με Nivolumab .....                                                         | 41 |
| 3.4. Γενετικός έλεγχος στον τριπλό αρνητικό καρκίνο του μαστού .....                             | 42 |
| 3.5. Στην εποχή της εξατομικευμένης ιατρικής .....                                               | 46 |
| 4. Αναζήτηση στόχων: Μικροπεριβάλλον στονTAKM .....                                              | 52 |
| 4.1. Ο ρόλος του Μικροπεριβάλλοντος στην ανοσοτροποποίηση του TAKM .....                         | 53 |
| 4.1.1. Ανοσολογικό ΜικροπεριβάλλονTAKM .....                                                     | 54 |
| 4.1.2. ΑνοσοδιεγερτικόΜικροπεριβάλλον TAKM .....                                                 | 58 |
| 5. Κλινικές δοκιμές σε εξέλιξη .....                                                             | 64 |
| 5.1. Χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού στον TAKM..... | 64 |
| 5.2. Εξέταση αναδυόμενων στόχων για το TNBC .....                                                | 66 |
| 6. Συμπέρασμα .....                                                                              | 68 |
| Βιβλιογραφία.....                                                                                | 71 |

## 1. Εισαγωγή

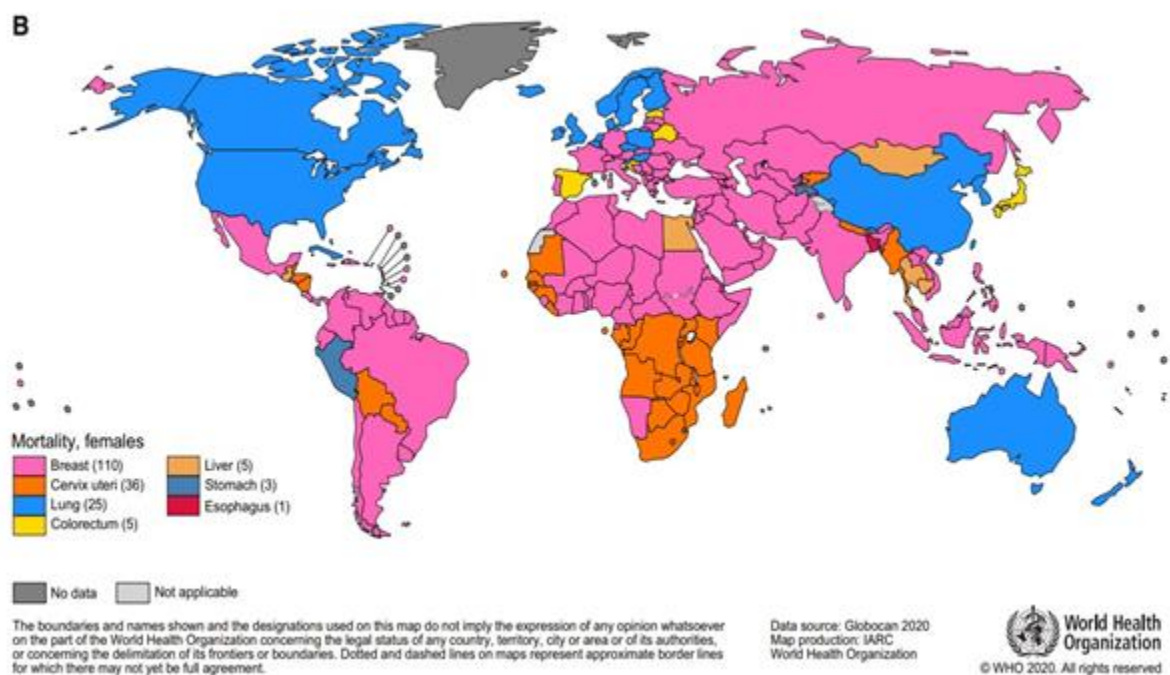
Ο καρκίνος του μαστού έχει γίνει ο μεγαλύτερος σε συχνότητα καρκίνος, με ετήσια επίπτωση 11,7% και για τα δύο φύλα και η δεύτερη αιτία θανάτου που σχετίζεται με τον καρκίνο στις γυναίκες. Ο καρκίνος του μαστού επηρέασε 2,3 εκατομμύρια γυναίκες παγκοσμίως το 2020, με 685.000 θανάτους (ΠΟΥ, 2021).



Εικόνα 1. Συχνότητα καρκίνου και στα δύο φύλα



Εικόνα 2. Συχνότητες εμφάνισης των συνηθέστερων τύπων καρκίνου το 2020 σε κάθε χώρα μεταξύ των γυναικών (ΠΟΥ, 2020)



Εικόνα 3. Συχνότητες θνησιμότητας ανά τύποκαρκίνου ανά χώρα το 2020 μεταξύ των γυναικών (ΠΟΥ, 2020)

Στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού (έως και 85%) η κακοήθης μετάλλαξη ξεκινά ως ένα τοπικό φαινόμενο. Ο καρκίνος του μαστού αναπτύσσεται στα επιθηλιακά κύτταρα των πόρων (85%) ή των λοβίων (15%) του αδενικού ιστού. Η κακοήθης ανάπτυξη αρχικά περιορίζεται στον πόρο ή στο λόβιο (*in situ*), όπου συνήθως παραμένει απαρατήρητη και ασυμπτωματική και με χαμηλό κίνδυνο μετάστασης. Αυτοί οι *in situ* όγκοι (στάδιο 0) μπορούν να αναπτυχθούν με την πάροδο του χρόνου, να διηθήσουν την βασική μεμβράνη των κυττάρων και να επεκταθούν και στον περιβάλλοντα ιστό του μαστού (διηθητικός καρκίνος του μαστού). Στη συνέχεια, μέσω των λεμφαγγείων μπορεί να εξαπλωθούν σε γειτονικούς (επιχώριους) λεμφαδένες (περιοχική μετάσταση) ή με αιματογενή διασπορά, σε άλλα όργανα και μέρη του σώματος (απομακρυσμένη μετάσταση), προκαλώντας τελικά το θάνατο της γυναίκας από καρκίνο του μαστού (WHO, 2021; WCRF, 2022 ).

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να προσβάλλει γυναίκες οποιασδήποτε ηλικίας μετά την εφηβεία, με τα ποσοστά να αυξάνονται παγκοσμίως μετά την ηλικία των 40 ετών. Υπάρχουν παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Τέτοιοι παράγοντες είναι η αύξηση της ηλικίας, η παχυσαρκία, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή ωοθηκών, το ιστορικό έκθεσης σε ακτινοβολία, η πρόωγη εμμηναρχή, η ηλικία πρώτης εγκυμοσύνης, ή απουσία εγκυμοσύνης, η κατάχρηση καπνού και η μετεμμηνοπαυσιακή ορμονοθεραπεία. Αντίστοιχα, υπάρχουν παράγοντες συμπεριφοράς που μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού, όπως ο θηλασμός, η άσκηση, ο έλεγχος του βάρους, η αποφυγή κατάχρησης αλκοόλ και καπνού, η αποφυγή της άσκοπης κατανάλωσης ορμονών και έκθεσης σε ακτινοβολία. Ωστόσο, ακόμη και αν ρυθμιζόνταν όλοι οι προαναφερθέντες παράγοντες κινδύνου, η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού δεν θα μειωνόταν περισσότερο από 30%. Ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του μαστού είναι το γυναικείο φύλο. Ο ανδρικός καρκίνος του μαστού αντιπροσωπεύει μόνο το 0,5-1% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και η θεραπεία του ακολουθεί τις κατευθυντήριες οδηγίες που ισχύουν για τον καρκίνο του μαστού στις γυναίκες. Ευτυχώς, μετά από αρκετές δεκαετίες, τα ποσοστά επιβίωσης άρχισαν να βελτιώνονται τη δεκαετία του 1980, με την βελτίωση των απεικονιστικών ελέγχου και τα προγράμματα προληπτικού πληθυσμιακού ελέγχου σε

συνδυασμό με τις βελτιωμένες επικουρικές θεραπείες (WCRF, 2022; WHO, 2021; NCCN 2022).

Η θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού μπορεί να είναι αρκετά αποτελεσματική, με τα ποσοστά επιβίωσης να αυξάνονται έως και 90% ή περισσότερο, ειδικά με την έγκαιρη ανίχνευση της νόσου στο στάδιο 0 ή στο στάδιο I, τα οποία μπορεί να παραμένουν ασυμπτωματικά για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ως εκ τούτου, εξέχουσα σημασία κατέχει η τακτικότητα τουπροσυμπτωματικού ελέγχου για την πρόωπη ανίχνευση του καρκίνου του μαστού (ΠΟΥ, 2021, Ensenyat-Mendezetal., 2021).

Ιστορικά ο καρκίνος του μαστού χαρακτηρίζεται από την ιστοπαθολογική του ταυτοποίηση (histologicalsubtype), το βαθμό κακοήθειας(grade) και την έκφραση συγκεκριμένων βιοδεικτών όπως αυτοί ανιχνεύονται με ανοσοϊστοχημικές δοκιμασίες: Υποδοχείς οιστρογόνου (ER) και προγεστερόνης (PR) και τα τελευταία 10 χρόνια οHuman EpidermalGrowthFactorReceptor 2 (HER2) καιο δείκτης πολλαπλασιασμούki67. Ο όρος τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TAKM) αναφέρεται σε καρκινικά κύτταρα που δεν εμφανίζουν έκφραση των προαναφερθέντων ορμονικών υποδοχέων, οιστρογόνων και προγεστερόνης (ER και PR) και του HER2.Αποτελεί περίπου το 10-15% όλων των καρκίνων του μαστού και διαφέρει από τις άλλες μορφές διηθητικού καρκίνου του μαστού καθώς αναπτύσσεται και εξαπλώνεται γρήγορα, έχει λιγότερες θεραπευτικές επιλογές και κακή πρόγνωση. Αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι οTAKM είναι μια νέα ορφανή ασθένεια, η οποία δεν έχει αναγνωρισμένους στόχους για μοριακά προσανατολισμένη θεραπεία στο πλαίσιο των τρεχουσών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Το γεγονός αυτό καθιστά την αντιμετώπιση του TAKM πρόκληση τόσο για τους ογκολόγους όσο και για τους ασθενείς (WHO, 2021; Wildetal., 2020).

Η θεραπευτική αντιμετώπισητου καρκίνου του μαστού συνίσταται σε:χειρουργική αντιμετώπιση και επικουρική ακτινοθεραπεία για τον τοπικοπεριοχικό έλεγχο τηςνόσου (στον μαστό και στους επιχώριους-μασχαλιαίους λεμφαδένες) και συστηματική θεραπεία για τη θεραπεία ή την πρόληψη της μετάστασης του καρκίνου. Η ενδοκρινική θεραπεία, η χημειοθεραπεία και, σε ορισμένες περιπτώσεις, η στοχευμένη βιολογική θεραπεία με αντισώματα και/ή η ανοσοθεραπεία είναι όλα επιλογές της συστηματικής αντικαρκινικής θεραπείας. Στο παρελθόν, όλες οι κακοήθειες του μαστού αντιμετωπίζονταν χειρουργικά με

μαστεκτομή και λεμφαδενικό καθαρισμό της σύστοιχης μασχαλιαίας χώρας. Σήμερα, καθιερωμένη πρακτικήστη χειρουργική του καρκίνου του μαστού είναι η χειρουργική διατήρησης του μαστού (BreastConservingSurgery, BCS) και η βιοψία λεμφαδέναφρουρού (SentinelLymphNodeBiopsy, SLNB). Στην περίπτωση αυτή αφαιρείται μόνο η περιοχή του όγκου με Αυτό συνεπάγεται την εκτομή μόνο της περιοχής του όγκου -με ελεύθερα νόσουόρια-και εκτομή και βιοψία του/των λεμφαδένων φρουρών που είναι οι πρώτοι που δέχονται τη λεμφική αποχέτευση από την περιοχή και εντοπίζονται με ειδικές τεχνικές. Μετά από την χειρουργική διατήρησης του μαστού ακολουθεί πάντα ακτινοθεραπεία για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα τοπικής υποτροπής (Yinetal., 2020).Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνονται εφάμιλλα αποτελέσματα όσον αφορά την τοπική υποτροπή και τη συνολική επιβίωση με παλαιότερα ακρωτηριαστικά χειρουργεία.

Η απόφαση για το ποιος θα είναι ο αλγόριθμος της αντιμετώπισης-ποια θεραπεία θα είναι πρώτη, βασίζεται πλέον σε πολλές παραμέτρους: την ηλικία της/του ασθενούς, τη σταδιοποίηση TNM που με την τελευταία ενημέρωση AJCC (Wildetal., 2020) περιλαμβάνει και τους βιοδείκτες του όγκου, την παρουσία γενετικά κληρονομούμενων μεταλλάξεων και όταν υπάρχουν ενδείξεις τογονιδιωματικό προφίλ του όγκου.

Η κλασσική αντιμετώπιση τουπρώιμου TAKMστο πρόσφατο παρελθόνσυνίστατο σε αρχικά χειρουργική αντιμετώπιση (μαστεκτομή ή BCS +/- SLNB +/- λεμφαδενικό καθαρισμό) και στη συνέχεια επικουρική χημειοθεραπεία,χωρίς ωστόσο να επιτυγχάνονται ποσοστά επιβίωσης εφάμιλλα των άλλων υποτύπων για τα αντίστοιχα στάδια. Πλέον βάση κατευθυντήριων οδηγιών ο αλγόριθμος αντιμετώπισης του TAKΜέχει αλλάξει και η χημειοθεραπεία χορηγείται πλέον σε πολύ μεγάλο ποσοστόνεοεπικουρικά(προ χειρουργείου) και σε όλους τους τριπλά αρνητικούς όγκους  $\geq 2$  cm, ανεξάρτητα από την κατάσταση των επιχώριων λεμφαδένων. Αυτό αποτελείένα βήμα προς την εξατομικευμένη ιατρική: στόχος είναι ο έλεγχος της χημειοευαισθησίας της νόσου και της ανταπόκρισης του ασθενούς (ως σύνολο, νόσος-ξενιστής) στην θεραπεία.

Παρόλα αυτά η συνολική επιβίωση (overallSurvival,OS) του μεταστατικού TAKΜέχει παραμένει ουσιαστικά αμετάβλητη τις τελευταίες δύο ή τρεις δεκαετίες λόγω της επιθετικής φύσης του και της έλλειψης αναγνωρισμένων μοριακών στόχων. Γενικά, ο μεταστατικόςTAKM έχει διάμεσο OS περίπου 13 μήνες, καθιστώντας τη βελτίωση της

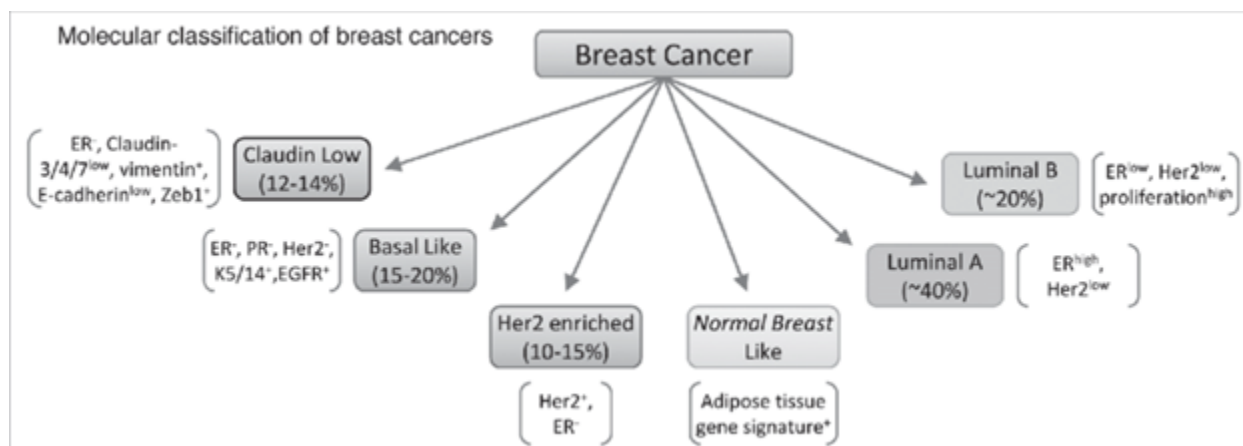
κλινικής έκβασης κρίσιμο έργο στη διαχείριση του TAKM.ΟΤAKM είναι σήμερα ένα από τα πιο ενεργά πεδία ογκολογικής έρευνας. Νέες μοριακά εστιασμένες θεραπείες για τον TAKM, όπως ο αναστολέας πολυμεράσης της πολυ ADP-ριβόζης (αναστολείς PARP) και, πιο πρόσφατα, οι αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (Immune Check Point Inhibitors, ICIs), παρουσιάζουν ολοένα και περισσότερα υποσχόμενα κλινικά αποτελέσματα. Η αναστολή των κινασών σηματοδότησης (τύπου σερίνης/θρεονίνης ή τυροσίνης), η αγγειογένεση, οι επιγενετικές αλλαγές και ο κυτταρικός κύκλος αποτελούν όλα πιθανούς νέους θεραπευτικούς στόχους και ελπιδοφόρα ερευνητικά πεδία για τη θεραπεία του TAKM (Adani-Ifèetal., 2020).

## 2. Ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

### 2.1. Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

Μοριακά προφίλ ανθρώπινων καρκίνων μαστού δημιουργήθηκαν πρόσφατα χρησιμοποιώντας μια μέθοδο ιεραρχικής ομαδοποίησης που ομαδοποιεί γονίδια με βάση την ομοιότητα των προτύπων έκφρασης, εξετάζοντας την **mRNA έκφραση 50 γονιδίων σχετιζόμενων με τον καρκίνο του μαστού (Prediction Analysis of Microarray 50, PAM50)**. Οι καρκίνοι του μαστού ταξινομήθηκαν σε τουλάχιστον πέντε κατηγορίες λαμβάνοντας υπόψη διάφορες φυλές/εθνικότητες, κατανομή των παραγόντων κινδύνου, την πρόγνωση, ανταπόκριση στη θεραπευτική αγωγή, κλινικά αποτελέσματα και συνολική επιβίωση χωρίς υποτροπή. Η **μοριακή αυτή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού (PAM50)** ανακοινώθηκε επίσημα στο Διεθνές Συνέδριο για τον Καρκίνο του Μαστού του StGallen το 2013: Οι όγκοι **αυλικού τύπου A και B (luminal A και B)** [και οι δύο εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων (ER) και υποδοχείς προγεστερόνης (PR) και παρουσιάζουν παρόμοια προφίλ με τα φυσιολογικά αυλικά κύτταρα του μαστικού αδένου], ο **εκ βασικών κυττάρων (Basal Like Breast Cancer, BLBC)** ή με «**τριπλά αρνητικό**» **φαινότυπο** (ER και PR-αρνητικός και HER 2 αρνητικοί όγκοι με γονίδια που φυσιολογικά εκφράζονται από τα βασικά/μυοεπιθηλιακά κύτταρα), **όγκοι που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα HER2/neu (HER2/neu ενίσχυση, enriched)** και ο **τύπου φυσιολογικού μαστού (normal -**

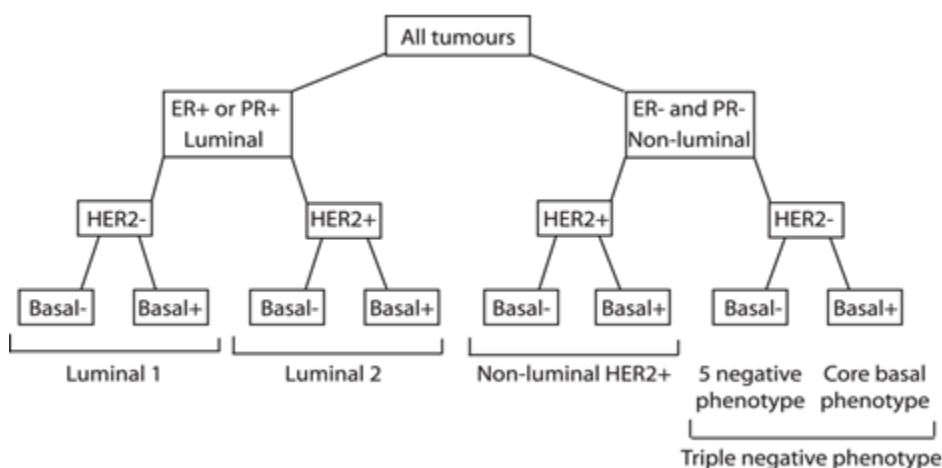
**like)** με κύτταρα που μοιάζουν με φυσιολογικό μαστικό αδένα. Σε σύγκριση με τις ομάδες BCL ή Her2/neu, οι όγκοι αυλικού τύπου A και B βρέθηκαν να έχουν καλύτερη πρόγνωση και λιγότερο επιθετική συμπεριφορά. Η επιθετική συμπεριφορά, τα φτωχά κλινικά αποτελέσματα, η έλλειψη ανταπόκρισης στην τυπική ενδοκρινική θεραπεία, η φτωχότερη επιβίωση και οι μεταλλάξεις BRCA1 έχουν συνδεθεί με τον υπότυπο BCL (Jézéquelet al., 2019; Ensenyat-Mendez, 2021). Ένας πέμπτος υπότυπος εντοπίστηκε το 2007 και καταχωρήθηκε ως ξεχωριστή ομάδα, ο **claudin-low** -με χαμηλή κλοντίνη. Χαρακτηρίζεται από χαμηλή έκφραση των γονιδίων διακυτταρικής προσκόλλησης (χαμηλή κλοντίνη 3,4 και 7 και E-cadherin), από αυξορρόθμιση των γονιδίων επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάπτωσης (EMT) και των μονοπατιών της ανοσοαπόκρισης αλλά και από μοτίβα γονιδιακής έκφρασης κυττάρων που μοιάζουν με βλαστοκύτταρα/λιγότερο διαφοροποιημένα. Ο υπότυπος αυτός έχει φτωχή πρόγνωση: **η πλειοψηφία των χαμηλών σε κλοντίνη όγκων είναι TAKM με μεταπλαστική και μυελοειδή διαφοροποίηση και έχουν μέτρια ανταπόκριση στην καθιερωμένη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία.**



Εικόνα 4. Μοριακή ταξινόμηση υποτύπων καρκίνου του μαστού

Εναλλακτικές ταξινομήσεις του καρκινώματος του μαστού έχουν προταθεί με βάση το προφίλ έκφρασης χρησιμοποιώντας μια ομάδα δεικτών ανοσοϊστοχημείας, σύμφωνα με διάφορες μελέτες. Ο τακτικός έλεγχος με ανοσοϊστοχημεία των όγκων του μαστού μπορεί επομένως να δώσει όχι μόνο κρίσιμες πληροφορίες για την κλινική διαχείριση, αλλά και μια βιώσιμη εναλλακτική λύση σε δαπανηρές δοκιμές γονότυπου. Η σχέση μεταξύ των δεικτών

ανοσοϊστοχημείας και της ανταπόκρισης στη θεραπευτική αγωγή έχει ερευνηθεί εκτενώς. Μόνο λίγες μελέτες με βάση τον πληθυσμό έχουν εξετάσει τη σύνδεση μεταξύ μοριακών υποτύπων που προσδιορίζονται από την ανοσοϊστοχημεία και τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, ειδικά όταν εξετάζουμε τις ευρωπαϊκές χώρες (Garnpiset al., 2020; Hannemann et al., 2006).



Εικόνα 5. Ταξινόμηση υποτύπων καρκίνου του μαστού σύμφωνα με το προφίλ δείκτη IHC

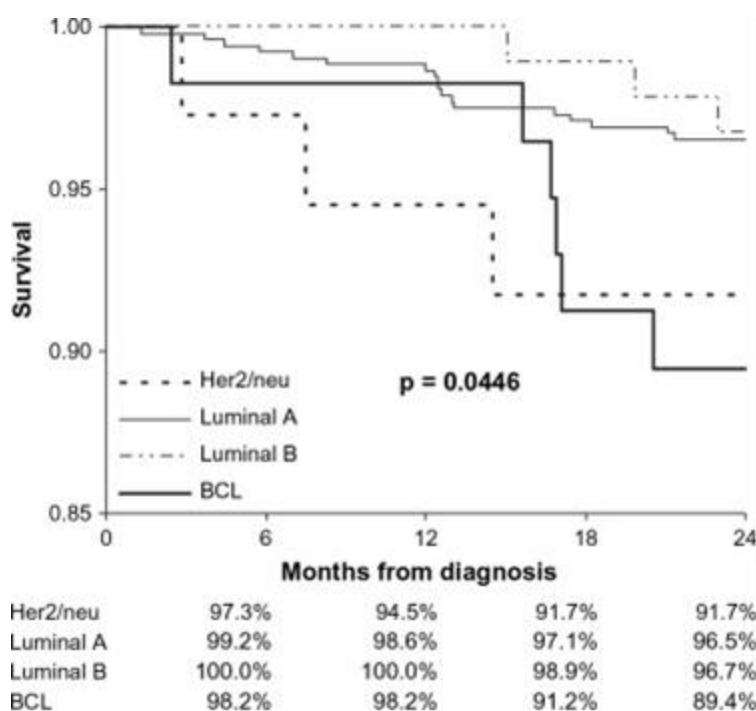
Διαφορετικοί δείκτες ανοσοϊστοχημείας έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατα για την μοριακή κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, επί του παρόντος δεν υπάρχει συναίνεση σχετικά με το καταλληλότερο πάνελ ανοσοϊστοχημείας. Επιπλέον, η πιο πρόσφατη ταξινόμηση των όγκων του μαστού από τον ΠΟΥ δεν διακρίνει τις κακοήθειες BCL ως μοναδική οντότητα ή παραλλαγή (Johansson et al., 2019). Οι Nielsen et al. (2004) δημιούργησαν ένα σύστημα ταξινόμησης που βασίζεται στην απουσία έκφρασης τόσο ER, PR όσο και HER2 σε συνδυασμό με έκφραση CK5/6 ή EGFR. Άλλοι έχουν δείξει ότι η έκφραση της κυτοκερατίνης υψηλού μοριακού βάρους (όπως CK5/6, CK14 και CK17) από μόνη της θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των όγκων BCL από τις τριπλά αρνητικές κακοήθειες. Αντίθετα, πολλαπλές μελέτες υποδεικνύουν ότι η απουσία εκφράσεων ER, PR και Her2 μπορεί να αναγνωρίσει με συνέπεια όγκους BCL και ότι οι τριπλά αρνητικοί όγκοι και οι όγκοι BCL θα πρέπει να θεωρούνται εναλλάξιμοι (Tsang και Tse, 2020).

## 2.2. Υπότυποι καρκίνου του μαστού βάση ανοσοϊστοχημείας και ποσοστά επιβίωσης

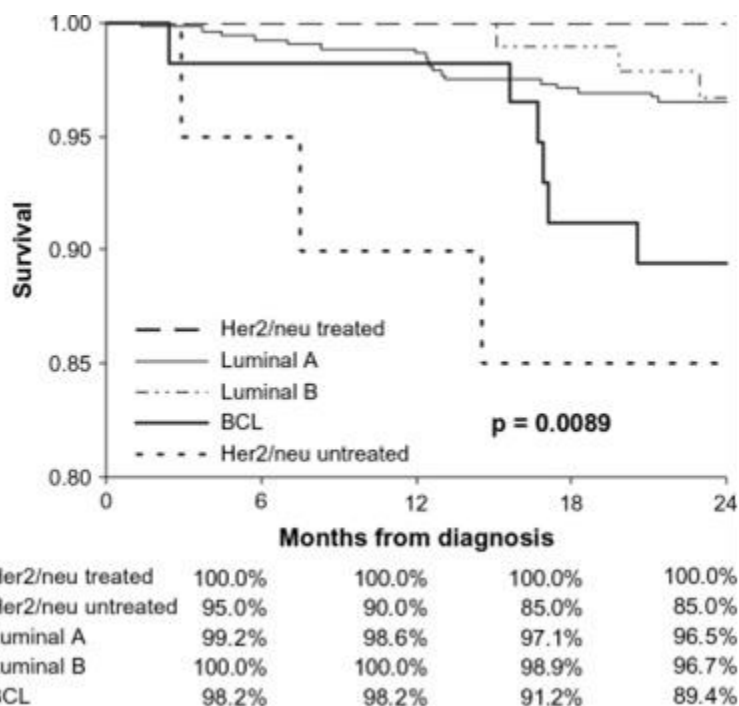
Σε μια έρευνα του 2009, το υποσύνολο των περιπτώσεων που διαγνώστηκαν μεταξύ 2003 και 2005 επιλέχθηκε για να εξεταστεί η επιβίωση 24 μήνες μετά τη διάγνωση. Από τους 712 ασθενείς που μελετήθηκαν, 57 (8,0%) ταξινομήθηκαν ως υπότυπος BCL, 37 (5,2%) ως εμπλουτισμένοι με Her2/neu, 525 (73,7%) ως αυλικού τύπου A και 93 (13,1%) ως αυλικού τύπου B. Μεταξύ αυτών στις υποομάδες και σε ολόκληρο τον πληθυσμό της μελέτης, δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές διαφορές στα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Κατά τη διάρκεια της διετούς περιόδου παρακολούθησης, 30 ασθενείς πέθαναν, δίνοντας 95 τοις εκατό πιθανότητα επιβίωσης (Spitaleetal., 2009).

Η μέθοδος Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή μονομεταβλητών αναλύσεων της επιβίωσης, που αποκάλυψαν ότι η ηλικία, η εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, το στάδιο AJCC, η κλινική συμπεριφορά (M0 έναντι M1), ο βαθμός κακοήθειας, ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki-67 και το μέγεθος του όγκου ήταν όλα σημαντικά προγνωστικοί παράγοντες για την ολική επιβίωση (OS), στον καρκίνο του μαστού (P 0,001). Αντίθετα, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στο βραχυπρόθεσμο OS μεταξύ των διάφορων ιστολογικών τύπων (των πορογενών έναντι των λοβιακών καρκινωμάτων) (P = 0,051).

Η επιβίωση του καρκίνου του μαστού διέφερε σημαντικά μεταξύ των μοριακών υποτύπων (δοκιμή log-rank = 8,1, P = 0,0446). Όπως φαίνεται στην εικόνα 6, οι υπότυποι BCL και Her2/neu είχαν χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης (89,4 τοις εκατό και 91,7 τοις εκατό, αντίστοιχα) δύο χρόνια μετά τη διάγνωση, σε σχέση με ασθενείς με καρκίνο αυλικού τύπου A και B (96,5 τοις εκατό και 96,7 τοις εκατό, αντίστοιχα). Οι διαφορές στο DFS των 2 ετών έγιναν ακόμη πιο σημαντικές μετά τη διαστρωμάτωση του υποτύπου Her2/neu με βάση τη θεραπεία με τραστοζουμάμπη (17 που έλαβαν θεραπεία έναντι 20 ασθενείς που δεν έλαβαν θεραπεία) (εικόνα 7, δοκιμή log-rank = 13,5, P = 0,0089): ειδικότερα, οι ασθενείς Her2 /neu χωρίς θεραπεία εμφάνισαν τα χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης (85 τοις εκατό) (Spitaleetal., 2009).



Εικόνα 6. Επιβίωση ελεύθερη νόσου 2 ετών Kaplan–Meier κατά μοριακούς υποτύπους μαστού στο Ticino (Νότια Ελβετία).

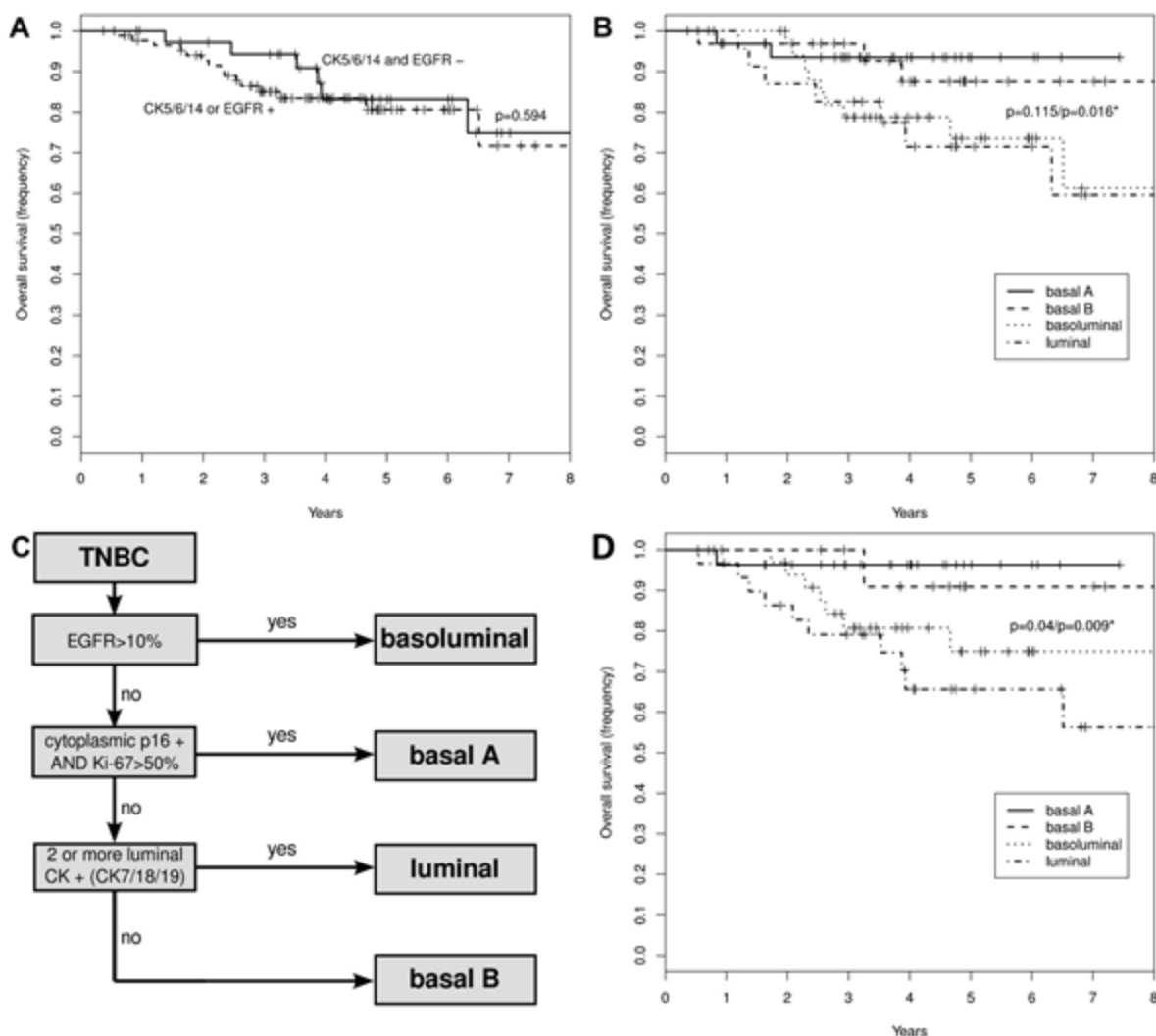


Εικόνα 7. Επιβίωση ελεύθερη νόσου 2 ετών Kaplan–Meier κατά μοριακούς υποτύπους μαστού στο Ticino (Νότια Ελβετία), μετά τη διαστρωμάτωση των περιπτώσεων Her2/neu σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία και δεν έλαβαν θεραπεία με Trastuzumab.

### 2.3. Ειδική ταξινόμηση TNBC

Η επιβίωση του καρκίνου του μαστού διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μοριακών υποτύπων (δοκιμή log-rank = 8,1, P = 0,0446). Όπως φαίνεται, οι υπότυποι BLBC και Her2/neu είχαν χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης (89,4 τοις εκατό και 91,7 τοις εκατό, αντίστοιχα) δύο χρόνια μετά τη διάγνωση, σε σχέση με τους υπότυπους αυλικού τύπου A και B (96,5% και 96,7%, αντίστοιχα). Παρά το γεγονός ότι ο TAKM ταξινομείται ως ξεχωριστή ασθένεια, η κλινική, η ιστολογική και η μοριακή ανάλυση αποκαλύπτουν την εγγενή ετερογένειά του. Οι ασθενείς με TAKM παραπέμπονται συνήθως για χημειοθεραπεία, λόγω της απουσίας στόχων ER, PR και HER2. Ωστόσο, η ανταπόκριση στη θεραπεία ποικίλλει πολύ και οι ασθενείς με TAKM εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά υποτροπών απομακρυσμένης ή/και τοπικής σε σχέση με οποιονδήποτε άλλο υπότυπο καρκίνου του μαστού. Για να ενισχυθεί το θεραπευτικό φάσμα και συνεπακόλουθα η έκβαση των ασθενών με TAKM, απαιτείται επείγοντως καλύτερη γνώση της ετερογένειας του όγκου και μια πιο αποτελεσματική μέθοδος ταξινόμησης που να εντοπίζει στοχεύσιμες διαφορές εντός αυτής της ομάδας (Garrido-Castro, 2019; Liu et al., 2018).

Αρκετές ερευνητικές ομάδες την τελευταία δεκαετία προσπάθησαν να χαρακτηρίσουν τον TAKM σε διάφορα μοριακά επίπεδα. Ορόσημο στην ειδική ταξινόμηση του TAKM αποτέλεσε η εργασία των Lehman et al. που ταξινόμησαν τον TAKM βάση προφίλ μεταγραφώματος σε 6 ομάδες: 2 ομάδες basallike (BL1, BL2), immunomodulatory (IM), mensenchymal (M), mensenchymalstem-like (MSL) και luminal androgen receptorlike (LAR) (Lehman et al., 2011). Οι El Sawaf et al. (2013) ταξινόμησαν τον TAKM βάση ανοσοϊστοχημείας (IHC) και προφίλ μεταγραφώματος χρησιμοποιώντας 13 δείκτες IHC, σε τέσσερις ομάδες βάση προτύπων έκφρασης των κυττοκερατινών (CK): Τα πρότυπα έκφρασης των κυττοκερατινών χρησιμοποιήθηκαν για να χωριστεί ο TAKM σε τέσσερις ομάδες (CK). Εκείνοι με όγκους TAKM αυλού (20%) ή βασοαυλικής (28%), είχαν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό επιβίωσης από τους ασθενείς με βασικούς όγκους A (26%) ή βασικούς B (26%), μετά την υποδιάταξη (El Sawaf et al., 2013).



Εικόνα 8. Βιολογικοί υπότυποι του τριπλού αρνητικού καρκίνου του μαστού

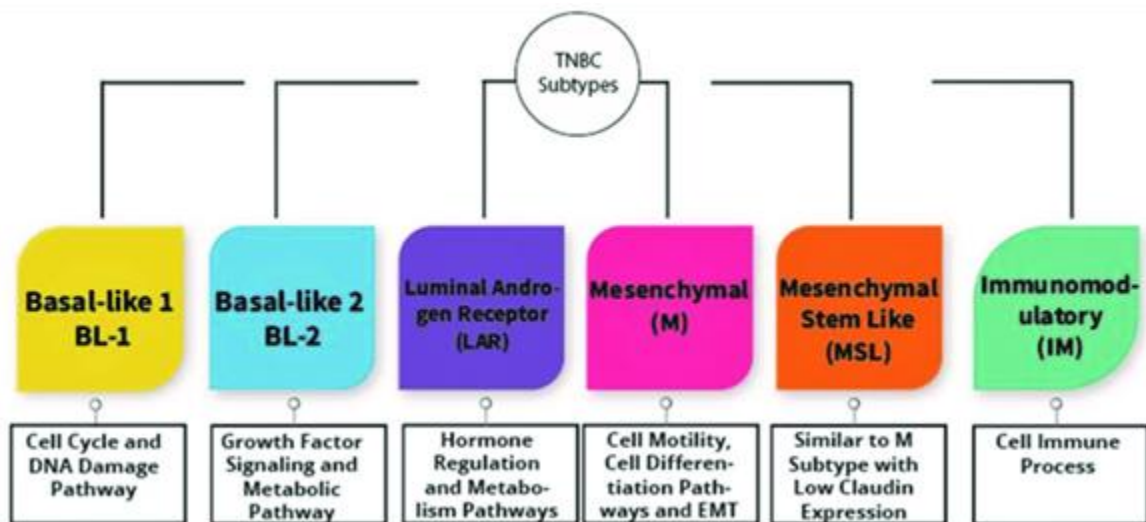
Εναλλακτικά, οι Liu et al. (2016) πρότειναν τη χρήση των lncRNAs (μακρών μη κωδικοποιημένων RNAs) για την ταξινόμηση των TAKM όγκων, λόγω του ρόλου τους ως ρυθμιστές γονιδίων. Δημιούργησαν το σύστημα ταξινόμησης του Πανεπιστημίου Fudan της Σανγκάης (Fudan University Shanghai Cancer Center, FUSCC) συνδυάζοντας προφίλ έκφρασης mRNA και lncRNA. Προσδιορίστηκαν τέσσερις υπότυποι, παρόμοιοι με τα ευρήματα των Lehman et al. και Burstein et al. (Liu et al., 2016): **Immune modulatory subtype (IM)**, **a luminal androgen receptor subtype (LAR)**, **mesenchymal Like subtype (MES)** και **Basal Like and Immune Suppressed (BLIS)**.

Ο **υπότυπος IM** βρέθηκε με έντονη αυξορρύθμιση των γονιδίων που συνδέονται με μονοπάτιασηματοδότησης των ανοσοκυττάρων, και άλλων παραγόντων του ανοσοποιητικού.

Ο δεύτερος **υπότυπος ο LAR** εμπλουτισμένος σε οδούς που σχετίζονται με τις ορμόνες (ανδρογόνα και οιστρογόνα και τη ρύθμισή τους ανάλογος του LARυποτύπου των Lehmanetal.

**Ο τρίτος υπότυπος το MES**, χαρακτηρίστηκε από χαμηλά επίπεδα γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και αυξορρύθμιση των μονοπατιών που σχετίζονται με επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT).

Ένας **τέταρτος υπότυπος, το BLIS**, με αυξορρύθμιση όλων των γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρική διαίρεση και τον κυτταρικό κύκλο και υπορρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται στηνανοσοαπόκριση. Οι ασθενείς με TAKM και BLIS είχαν την χαμηλότερη επιβίωση ελεύθερη υποτροπής από όλους. Αυτές οι ομάδες συγκρίθηκαν με την ταξινόμηση του TAKM σε 6 υποτύπους των Lehmanetal (TNBCtype-6). Ανακάλυψαν ότι οι οιυπότυποι IM και LARκαι στις δύο έρευνες ήταν ουσιαστικά πανομοιότυπες, ο τύπος MES κάλυπτε εν μέρει όλουςτους υποτύπους της ταξινόμησηςLehman αλλά κυρίως τους τύπους MSL και M και ότι υπότυποςBLIS αντιστοιχούσε εν μέρει στους υποτύπους M και BL1 των Lehmannetal.



Εικόνα 9. Οι υπότυποι του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού κατά Lehmanetal

### 2.3.1. Τρέχουσα ομαδοποίηση TAKM

Λόγω της εισαγωγής της αλληλούχησης επόμενης γενιάς, των υπολογιστικών συστημάτων και της εκθετικής αύξησης των διαθέσιμων πηγών δεδομένων τα επόμενα χρόνια, έχουν εμφανιστεί νέες προσεγγίσεις στρωματοποίησης ασθενών με TAKM. Ως αποτέλεσμα, χρησιμοποιούνται νέοι τύποι δεδομένων για τη διαίρεση του TAKM σε διακριτούς υπότυπους με σκοπό την ανίχνευση πιθανών θεραπευτικών στόχων για εξατομικευμένη θεραπεία. Οι τριπλά αρνητικοί όγκοι και το κυκλοφορούν DNA από ασθενείς με TAKM εμφανίζουν διαφορετικά μοτίβα παραλλαγής ενός νουκλεοτιδίου (SingleNucleotideVariation, SNV). Σε μια κοόρτη του FUSCC, οι Jiangetal. (2019) εξέτασαν αυτές τις παραλλαγές στις 4 υποομάδες TAKM (IM, LAR, MES, BLIS). Ανακάλυψαν ότι οι σωματικές μεταλλάξεις και τα CNV δεν κατανεμήθηκαν ομοιόμορφα στις τέσσερις υποομάδες TAKM που είχαν κατηγοριοποιήσει. Ο υπότυπος IM εμφάνιζε υψηλή επίπτωση μεταλλαγών των γονιδίων του ομόλογου ανασυνδυασμού (HDR) και σχετικά υψηλή χρωμοσωμική αστάθεια. Ο υπότυπος BLIS επίσης εμφάνιζε υψηλό ποσοστό μεταλλαγών των γονιδίων του ομόλογου ανασυνδυασμού και υψηλή χρωμοσωμική αστάθεια, ενώ ο LAR με υψηλό ποσοστό μεταλλαγών της οδού PI3K/AKT εμφάνιζε χαμηλή χρωμοσωμική αστάθεια. Ο υπότυπος MES εμφάνιζε φορτίο μεταλλαγών και CNV προφίλ ενδιάμεσου τύπου μεταξύ των LAR των δύο άλλων υποτύπων. **Με βάση τα χαρακτηριστικά των υποτύπων προτείνονται και οι πιθανές κατάλληλες θεραπευτικές επιλογές: για τον IM υπότυπο οι αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού, για τον BLIS κλιμακωτή χημειοθεραπεία και παράγωγα της πλατίνης, για τον LAR ενδοκρινική θεραπεία με στόχευση του ERBB2 και αναστολείς των CDK4/6 και για τον MES στόχευση των CSCs (CirculatingStemCells) και αναστολέα του STAT3 (Jiangetal., 2019; Dilonetal., 2016).**

**Τα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA (mDNA) χρησιμοποιούνται επίσης για να βοηθήσουν στην ταξινόμηση των διαφόρων όγκων (Orozco, 2018).** Το MBDCap-Seq χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την αναγνώριση τριών διακριτών ομάδων μεθυλίωσης DNA στον TAKM. Αυτή η μελέτη ανακάλυψε 865 διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές (differentiallyMethylatedRegions, DMR) στον TAKM, η πλειονότητα των οποίων ήταν

υπερμεθυλιωμένες. Η κατηγορία TAKM με υπομεθυλιωμένους όγκους, είχε καλύτερη πρόγνωση, σύμφωνα με αναλύσεις επιβίωσης (Stirzaker et al., 2015). Το προφίλ του μεθυλώματος του DNA χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για να εξηγηθεί η ετερογένεια του. Ειδικά λογισμικά εντόπισαν **τέσσερις επιτύπους TAKM** (DiNome et al., 2019) **Epi-CL-A, Epi-CL-B, Epi-CL-C, Epi-CL-D**. Ο **επίτυπος Epi-CL-A** περιλαμβάνει κυρίως δείγματα που χαρακτηρίστηκαν ως μεσεγχυματικά από το σύστημα ταξινόμησης του TAKM των 6 υποτύπων των Lehman et al.; στον **Epi-CL-A** παρατηρείται ενεργοποίηση των οδών διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού των μεσεγχυματικών κυττάρων, κάτι που είναι σύμφωνο με την επικάλυψη που υποδεικνύεται παραπάνω. Ο **επίτυπος Epi-CL-B**, συμπίπτει με τον **LAR** υπότυπο των Lehman και τον υπότυπο **BLIS** των Liu et al. και εμφανίζει κακή πρόγνωση; στον **Epi-CL-B**, ωστόσο, η πλειονότητα των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων εμπλέκονται στην οδό επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA, στη διατήρηση της δομής της χρωματίνης και στην κυτταρική διαίρεση. Ο **επίτυπος Epi-CL-C** χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση των οδών που σχετίζονται με την υποξία και την τροποποίηση της ομοιόστασης των πρωτεϊνών. Τέλος, ο **επίτυπος Epi-CL-D** έδειξε ότι υπερεκπροσωπείται με μονοπάτια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό, όπως η απόκριση βήτα ιντερφερόνης, η αυξορρύθμιση της κυτταροτοξικότητας των T λεμφοκυττάρων και της αντιγονοπαρουσιαστικότητας. (DiNome et al., 2019).

**Μια άλλη μέθοδος που αρχίζει να βρίσκει εφαρμογή στην ιατρική ακριβείας είναι η διαστρωμάτωση των ασθενών βάση του πρωτεώματος του όγκου. Βάση ανάλυσης πρωτεϊνών με τη βοήθεια τεχνολογίας μικροσυστοιχιών (ReversePhaseProteinArray, RPPA) οι τριπλά αρνητικοί όγκοι ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα σύμφωνα με τις πρωτεϊνικές υπογραφές, χαρακτηριζόταν κυρίως από αυξορρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών διακοπής του κυτταρικού κύκλου, των βλαβών στο DNA (γονίδια GADD45) και των σηματοδοτικών μονοπατιών του p53, και ονομάστηκε ομάδα με **προβλήματα στο μηχανισμό επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA (DNA Damage, DD)**. Η δεύτερη ομάδα ονομάστηκε **I/H-ομάδα (Inflammation/Hormone)**, λόγω των σχέσεων του με τη φλεγμονή, τους υποδοχείς ορμονών και τα μονοπάτια σηματοδότησης MAPK (Masuda et al., 2017). Στην συνέχεια με περαιτέρω αναλύσεις οι άνωθι ομάδες υποκατηγοριοποιήθηκαν σε πέντε υποτύπους **-βάση RPPA**. Το σύστημα ταξινόμησης RPPA αντιστοιχίστηκε με το σύστημα ταξινόμησης του TAKM του FUSCC (τέσσερις τύποι-TNBC-4) αλλά και με τη**

μοριακή ταξινόμηση του TAKM (PAM50). Ως αποτέλεσμα, οι υπότυποι TNBC-4 BL1 και BL2 βρέθηκαν να υπερεκπροσωπούνται στις υποομάδες RPPA 2 και 1, αντίστοιχα, οι οποίες προσδιορίστηκαν ως σχετιζόμενες με τις βλάβες του DNA (DD). Οι όγκοι TAKM τύπου φυσιολογικούμαστού βάση PAM50 βρέθηκε να αντιστοιχούν περισσότερο με την ομάδα RPPA 4, ένας υπότυπος της ομάδας I/H (Masuda et al., 2017; Lyons, 2019). Επιπλέον, **από μία ολοκληρωμένη ανάλυση του πρωτεώματος και του γονιδιώματος εντοπίστηκαν πρωτεΐνεςπιθανοί δείκτες ευαισθησίας και αντίστασης στα φάρμακα.** Ο εμπλουτισμός με μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, για παράδειγμα, έχει συνδεθεί με ευαισθησία σε φάρμακα που βασίζονται στην παραγωγή μιτοχονδριακής πρωτεΐνης, όπως το belinostat (Liet al., 2021).

**Η πλήρης ποσοτική ανάλυση του πρωτεώματος των κυτταρικών σειρών TAKM** ταξινόμησε τον TAKM σε δύο σημαντικές υποομάδες (βασική A και B) με **διακριτά λειτουργικά χαρακτηριστικά** (Kosok et al., 2020).

Πρόσφατα, **μεταβολικά μονοπάτια έχουν χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας για την ταξινόμηση** του TAKM. Η κοόρτη FUSCC (Jiang, 2019) μελετήθηκε για να διαπιστωθεί εάν υπήρχαν μεταγραφικές αλλαγές στα γονίδια που εμπλέκονται στις μεταβολικές οδούς (Gong, 2021). **Με βάση τον βαθμό εμπλουτισμού των μεταβολικών οδών, οι TAKM όγκοι χωρίστηκαν σε τρεις μοριακούς υποτύπους** (MolecularPathwaySubtypes, MPS). Ο **λιπογενής υπότυπος (lipogenic subtype)** ταυτοποιήθηκε ως **MPS1**, ενώ ο **γλυκολυτικός υπότυπος (glycolic subtype)** **MPS2**, είχε τη χαμηλότερη επιβίωση ελεύθερη υποτροπής μεταξύ των τριών μεταβολικών υποτύπων. Ο **υπότυπος MPS3 αποδόθηκε σε όγκους με μικτό εμπλουτισμό.** Το MPS1 είχε υψηλότερα επίπεδα λιπαρών οξέων, αλλά το MPS2 είχε υψηλότερα επίπεδα διαμεσολαβητών γλυκόλυσης, βάση μελέτης μεταβολώματος σε παρασκευάσματα TAKM. Επιπλέον, ανακάλυψαν ότι τα κύτταρα στον MPS1 εμφάνιζαν αυξημένη απορρόφηση λιπαρών οξέων και ήταν πιο ευαίσθητα στο C75, έναν de novo αναστολέα σύνθεσης λιπιδίων. Οι αναστολείς της γλυκόλυσης, από την άλλη πλευρά, είχαν ισχυρότερη ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων που ταξινομήθηκαν ως MPS2. Παραδόξως, οι ερευνητές κατάφεραν να ευαισθητοποιήσουν τον MPS2 υπότυπο έναντι της στοχευμένης θεραπείας στο PD-1, χρησιμοποιώντας έναν αναστολέα LDH, ο οποίος μείωσε τα επίπεδα γαλακτικού οξέος και προώθησε την ανοσολογική αναγνώριση (Gong, 2021).

### 2.3.2. Υπότυποιβάση του Μικροπεριβάλλοντος

Οι όγκοι TAKM χωρίστηκαν επίσης σε ομάδες ανάλογα με τα ανοσογονιδιωματικά τους προφίλ. Σε τέσσερα σύνολα δεδομένων καρκίνων μαστού, η ανάλυση 29 συνόλων γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό εντόπισε **τρεις ομάδες: με χαμηλή ανοσία, με μέτρια ανοσία και με υψηλή ανοσία**. Η μεγαλύτερη διήθηση με ανοσοκύτταρα και η αντικαρκινική ανοσολογική δραστηριότητα σχετίζονταν με καλύτερη έκβαση στην τελευταία ομάδα (Heetal. 2018). Η έκβαση του TAKM είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από το μικροπεριβάλλον του όγκου, το οποίο και καθορίζει τους υποτύπους απόκρισης. Σε σύγκριση με άλλους υποτύπους του καρκίνου του μαστού, ο TAKM εμφανίζει τη μεγαλύτερη αναλογία σε φλεγμονώδη λεμφοκυτταρική διήθηση (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILs) (Loi, 2019). Συνδέεται με καλύτερη πρόγνωση, μεγαλύτερα ποσοστά πλήρους παθολογικής απόκρισης (pathological Complete Response, pCR) στη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία και καλύτερη ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία (Denkert et al., 2018). Ένας υψηλός αριθμός TILs συνδέθηκε επίσης με καλύτερη επιβίωση σε άλλη μελέτη. Τα αυξημένα επίπεδα ανοσοκατασταλτικών δεικτών όπως τα PD-L1, CD163 και FOXP3, καθώς και ένα γλυκολυτικό μικροπεριβάλλον που χαρακτηρίζεται από έκφραση MCT4, από την άλλη πλευρά, ήταν ενδείξεις ενός χειρότερου αποτελέσματος. Αυτά τα κριτήρια συνδυάστηκαν για να χωρίσουν 174 όγκους TNBC σε **τέσσερις ομάδες. Οι ομάδες 1 και 2, οι οποίες είχαν υψηλή συγκέντρωση TILs αλλά χαμηλά PD-L1 και FOXP3, τα πήγαν καλύτερα από τις ομάδες 3 και 4, που είχαν αυξημένα PD-L1, FOXP3 και MCT4 στο στρώμα** (Adamset al., 2018).

## 3. Θεραπεία TAKM

Χωρίς καλή κατανόηση της μοριακής παθοφυσιολογίας του TAKM, συμπεριλαμβανομένης των αιτιών της ασθένειας και των μηχανισμών αντίστασης στις υπάρχουσες θεραπείες, η ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών στοχευμένων φαρμάκων για τον TAKM θα είναι δύσκολη. Η τρέχουσα θεραπεία για το νεοδιαγνωσθέν πρώιμο στάδιο του TAKM συνίσταται σε

νεοεπικουρική χημειοθεραπεία (για όγκους  $T \geq 2$  cm) ακολουθούμενη από χειρουργική επέμβαση. Τα τελευταία χρόνια, περισσότερες πληροφορίες αποκαλύφθηκαν για το ρόλο των παθολογικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος στην ανάπτυξη και την επιβίωση του TAKM, αλλά και στην ανάπτυξη της χημειοαντίστασης. Ο EpidermalGrowthFactorReceptor (EGFR), το c-kit, οι κυτοκερατίνες 5, 14 και 17, το p53, το p15 και ηκυκλίνη E είναι μερικές από τις πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται στον TAKM και που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μελλοντικοί θεραπευτικοί στόχοι (Park et al., 2018).

### **3.1. Ενδείξεις για νεοεπικουρική θεραπεία (Neoadjuvant Chemotherapy-NAC)**

Ο κύριος στόχος της νεοεπικουρικής θεραπείας στο παρελθόν ήταν να καταστεί εξαιρεσιμότητα ένας ανεγχείρητος ή τοπικοπεριοχικά προχωρημένος καρκίνος του μαστού. Από την οπτική γωνία του χειρουργού, ο στόχος είναι να επιτευχθεί υποσταδιοποίηση του όγκου ή/και της νόσου στους επιχώριους λεμφαδένες για τη βελτίωση της εξαιρεσιμότητας και τη μείωση της χειρουργικής νοσηρότητας (Arnaout et al., 2018). Η νεοεπικουρική συστηματική θεραπεία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να αυξήσει τα ποσοστά χειρουργικής διατήρησης του μαστού (BCS) σε πρώην υποψήφιες για μαστεκτομή σε νόσο σταδίου II και III, χωρίς ουσιαστική αύξηση στα ποσοστά τοπικής υποτροπής, για τη βελτίωση της αισθητικής για τους υποψηφίους για BCS και για τη μείωση της νοσηρότητας και της έκτασης της χειρουργικής της μασχάλης επί εκτεταμένης θετικής λεμφαδενοπάθειας. (Mamounas et al., 2015; NCCN, 2021).

Ωστόσο, το πιο σημαντικό όφελος της NAC στις μέρες μας θεωρείται η εκτίμηση της βιολογίας του όγκου και το πώς ο ασθενής και ο συγκεκριμένος όγκος ως ενιαία οντότητα ανταποκρίνονται σ' ένα θεραπευτικό σχήμα. Έτσι η νεοεπικουρική χημειοθεραπεία έχει επικρατήσει τα τελευταία χρόνια ως θεραπεία εκλογής για την αντιμετώπιση του TAKM

Για να εξασφαλιστούν τα βέλτιστα τοπικά θεραπευτικά αποτελέσματα σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με NAC, πρέπει να ληφθούν σημαντικά βήματα από τη στιγμή της διάγνωσης έως τη στιγμή της χειρουργικής εκτομής. Αυτές οι φάσεις περιλαμβάνουν μια ακριβή εκτίμηση της θέσης και της έκτασης του αρχικού όγκου του μαστού, καθώς και τον προσδιορισμό της κατάστασης των μασχαλιαίων λεμφαδένων πριν και μετά τη NAC

πληροφορίες που είναι κρίσιμες για τη βελτιστοποίηση της χειρουργικής επέμβασης και της επικουρικής ακτινοθεραπείας μετά τη NAC (King and Morrow, 2015). (NCCN, 2021).

**Στο πλαίσιο της νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας, σε ασθενείς με TAKM με νόσο T1c και/ή θετική λεμφαδενοπάθεια, θα πρέπει να χορηγείται ένα σχήμα που να περιέχει ανθρακυκλίνη και ταξάνη. Η νεοεπικουρική θεραπεία δεν πρέπει συνήθως να παρέχεται σε ασθενείς με cT1a ή cT1bN0 TAKM εκτός ερευνητικής δοκιμής.** Οι ασθενείς με TAKM μπορεί να λάβουν καρβοπλατίνη ως νεοεπικουρική θεραπεία για να βελτιώσουν τις πιθανότητες τους για πλήρη παθολογοανατομική ανταπόκριση (pathologic Complete Response-pCR). Η αναλογία οφέλους/ «κόστους» θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν αποφασίζεται η χορήγηση καρβοπλατίνης. Σε ασθενείς με TAKM πρώιμου σταδίου, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα ώστε να προτείνεται συστηματικά η χορήγηση αναστολέων των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού (Immune Checkpoint Inhibitors, ICIs) στη NAC (Korde et al., 2021).

Οι τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές φάσης III δεν έχουν αποδείξει ακόμη την καλύτερη στρατηγική νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας για ασθενείς με TAKM. Ωστόσο, υπάρχει ευρεία συμφωνία ότι τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που είναι αποτελεσματικά για επικουρική θεραπεία, είναι εξίσου κατάλληλα και για νεοεπικουρική θεραπεία- βάση σημαντικών τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών και μετα-αναλύσεων δεδομένων. Οι κατευθυντήριες οδηγίες φορέων εμπειρογνομόνων είναι ότι το νεοεπικουρικό σχήμα για ασθενείς με κλινικά θετικούς λεμφαδένες και/ή τουλάχιστον T1c TAKM θα πρέπει να περιλαμβάνει **ταξάνες και ανθρακυκλίνες**. (Korde et al., 2021).

Η σύσταση από τις κατευθυντήριες οδηγίες δεν είναι τόσο ισχυρή για την προσθήκη **καρβοπλατίνης** στο νεοεπικουρικό σχήμα με βάση την ανθρακυκλίνη. Το κλασσικό σχήμα νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας με πακλιταξέλη και AC (δοξορουβικίνη και κυκλοφωσφαμίδη) ή EC (επιρουβικίνη και κυκλοφωσφαμίδη) έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τα ποσοστά pCR, έως και 20%, σε ασθενείς υψηλού κινδύνου. Για παράδειγμα, η νεοεπικουρική χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα αύξησε σημαντικά τα ποσοστά pCR από 37,0% σε 52,1%, σύμφωνα με την μετα-ανάλυση των Poggio et al εννέα τυχαιοποιημένων μελετών (2.109 ασθενείς) που συνέκριναν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της βασισμένης σε πλατίνα έναντι της χωρίς πλατίνα νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας σε ασθενείς με

TAKM[αναλογία πιθανοτήτων (OR), 1,96; 95% CI, 1,46 έως 2,62,  $P < 0,001$ ]. Δεν αποτελεί έκπληξη ότι η νεοεπικουρική χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα συσχετίστηκε με σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο αιματολογικών ανεπιθύμητων συμβάντων βαθμού 3 και 4. Σε μια μετα-ανάλυση των τυχαιοποιημένων μελετών που εξετάζει τη νεοεπικουρικήθεραπεία μεβάση την πλατίνα στον TAKM παρατηρήθηκε ένας αυξημένος αριθμόςpCR. Σε σύγκριση με τη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία που δεν περιέχει πλατίνα, η νεοεπικουρική χημειοθεραπεία που περιέχει καρβοπλατίνη ή σισπλατίνη αύξησε σημαντικά το ποσοστό pCR (σχετικός κίνδυνος [RR], 1,45; 95% CI, 1,25 έως 1,68,  $P .0001$ ) (Kordeetal., 2021).

Ωστόσο, υπάρχει πολύ λιγότερη βεβαιότητα σχετικά με το πώς η προσθήκη πλατίνας μπορεί να επηρεάσει μακροπρόθεσμα αποτελέσματα όπως το DFS και το OS. Όλες οι σχετικές δοκιμές δεν είχαν επαρκή ισχύ για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων επιβίωσης. Στην κλινική μελέτη **CALGB 40603(Alliance)**, με την προσθήκη καρβοπλατίνηςστο θεραπευτικό σχήμα (δοξορουβικίνη +κυκλοφωσφαμίδη, AC, κάθε δύο εβδομάδες για 4 κύκλους και στη συνέχεια πακλιταξέλη εβδομαδιαία για 12 εβδομάδες), οι ασθενείς με TAKM σταδίου II-III εμφάνισαν σημαντική βελτίωση στηνpCRστον μαστό ή στην μασχάλη (54% έναντι 41%),  $P =.0029$ ). Οι ασθενείς που έλαβαν καρβοπλατίνη ήταν πιο πιθανό να εμφανίσουν θρομβοπενία και ουδετεροπενία βαθμού 3, καθώς και να τροποποιηθεί η δόση, να χαθούν δόσεις ή να τερματιστεί η θεραπεία λόγω τοξικότητας. Σε μια διάμεση παρακολούθηση 3 ετών, οι ασθενείς που πέτυχαν pCR είχαν καλύτερη επιβίωση χωρίς συμβάντα και OS σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς pCR. Ωστόσο, η συμπερίληψη της καρβοπλατίνης στη συνήθη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία δεν οδήγησε σε μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης (Kordeetal., 2021).

Ασθενείς με HER2+ όσο σταδίου II ή III ή TAKM συμμετείχαν στην τυχαιοποιημένη κλινική **δοκιμή φάσης II GeparSixto** ( $n = 273$ ). Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν για να υποβληθούν σε εβδομαδιαία καρβοπλατίνη ή όχι περαιτέρω θεραπεία μετά τηννεοεπικουρική θεραπεία 18 εβδομάδων με εβδομαδιαία πακλιταξέλη,εβδομαδιαία μη πεγκυλιωμένηλιποσωμικήδοξορουβικίνη και μπεβασιζουμάμπη. Βελτίωση στην pCR παρατηρήθηκε σε όσους έλαβαν καρβοπλατίνη (pCR 53,2% με καρβοπλατίνη έναντι 36,9% χωρίς καρβοπλατίνη,  $P = 0,005$ ). Τα άτομα που έλαβαν καρβοπλατίνηδιέκοπταν τη θεραπεία πιο συχνά (48% έναντι 39%) από εκείνα που δεν έλαβαν καρβοπλατίνη (Kordeetal., 2021).

Για ασθενείς με TAKM σταδίου II-III, οι Loibl et al. ανέφεραν τα ευρήματα μιας διπλής - τυφλής, και με εικονικό φάρμακο, δοκιμής φάσης III (**BrighTNess**) που συνέκρινε την προσθήκη του **αναστολέα PARP veliparib στην καρβοπλατίνη**, ή μόνο καρβοπλατίνη και τη συμβατική νεοεπικουρική χημειοθεραπεία βασισμένη σε ταξάνη, ακολουθούμενη από AC. 634 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες: πακλιταξέλη+ καρβοπλατίνη+ veliparib (316), πακλιταξέλη/καρβοπλατίνη +εικονικό φάρμακο (160) και πακλιταξέλη μόνο + δύο εικονικά φάρμακα (158). Οι ασθενείς που έλαβαν πακλιταξέλη και καρβοπλατίνη ή πακλιταξέλη +καρβοπλατίνη +veliparib εμφάνισαν ποσοστά pCR 58%, 53% αντίστοιχα, ανεξάρτητα της παρουσίας γενετικών μεταλλάξεων BRCA έναντι 31% της ομάδας που έλαβε πακλιταξέλη μόνο. Στις δύο τελευταίες ομάδες, υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά (P .0001). Υπήρξε όφελος στην pCR από την προσθήκη καρβοπλατίνης αλλά δεν υπήρξε εμφανώς όφελος από την προσθήκη του veliparib όχι μόνο στην pCR, αλλά και στην επιβίωση ελεύθερη συμβαμάτων αλλά και στην συνολική επιβίωση. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι ασθενείς που έλαβαν καρβοπλατίνη παρουσίασαν μεγαλύτερη τοξικότητα βαθμού 3 ή 4, όπως αναιμία, ουδετεροπενία και θρομβοπενία. Το OS και η επιβίωση ελεύθερη συμβάντων ήταν δευτερεύοντα καταληκτικά σημεία της μελέτης και κανένα από τα δύο δεν έχει δημοσιευθεί ακόμη. (Korde et al., 2021).

Συμπερασματικά, δοκιμάζονται αρκετές τεχνικές NAC για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων ασθενών με TAKM. Σε αυτήν την υποομάδα, συνιστάται ένα διαδοχικό σχήμα χημειοθεραπείας με συνδυασμό ανθρακυκλίνης ακολουθούμενο από ταξάνη, αν και η αντιστροφή αυτής της σειράς παρέχει συγκρίσιμα ποσοστά ανταπόκρισης (**Neo-tAnGo και swog 0800**). Στην πράξη, η σειρά χορήγησης αυτών των σκευασμάτων ποικίλλει στον Καναδά, με το BC Cancer να αναφέρει υψηλότερη χορήγηση προκαταρκτικά ταξανών (Arnaout et al., 2018). Αν και η χημειοθεραπεία με αυξημένη πυκνότητα δόσεων είναι το πρότυπο στις Ηνωμένες Πολιτείες, δεν αποτελεί καθιερωμένη τακτική. Επιπλέον αναγνωρίζεται το όφελος της συμπερίληψης ενός παράγοντα πλατίνας στην ομάδα TAKM, καθώς και ένα πιθανό όφελος και για γυναίκες χωρίς γενετική μετάλλαξη BRCA, όπως φαίνεται στη GeparSixto μελέτη (η οποία επίσης έδειξε βελτιωμένη ελεύθερης νόσου επιβίωση). Ωστόσο, η συμπερίληψη της καρβοπλατίνης, από την άλλη πλευρά, συνδέεται με αυξημένη τοξικότητα (NCCN, 2021).

### 3.2. Συμβατικά σχήματα χημειοθεραπείας/ανοσοθεραπείας

| Προτεινόμενα σχήματα (θεραπεία εκλογής)                                                                                                                            |                                                                  | Για υψηλού κινδύνου TAKM                                                                                                                                                                   | Επί γενετικών μεταλλάξεων BRCA1/2   | Υπολειμματική νόσος                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <b>doxorubicin/ cyclophosphamide (AC)</b> /14 ημέρεςγια 4 κύκλους<br>(με αυξημένη πυκνότητα δόσεων - <i>dosedense</i> )<br><br>και στη συνέχεια ή προ του σχήματος | <b>Docetaxel/ cyclophosphamide (TC)</b> /21 ημέρες για 4 κύκλους | <u>Προεγχειρητικά</u><br><b>Pembrolizumab +Carboplatin+paclitaxel</b><br><br><b>2ος κύκλος</b><br><u>προεγχειρητικά</u><br><b>Pembrolizumab +cyclophosphamide +doxorubicin ήepirubicin</b> | <b>Olaparib</b><br>(PARP inhibitor) | <b>Capecitabine</b><br><br>Μετά από θεραπεία με αλκυλιωτή /ανθρακυκλίνη/ ταξάνη |
| <b>Paclitaxel</b> /14 ημέρες ή /εβδομάδα για 4 κύκλους                                                                                                             |                                                                  | <b>Μετεγχειρητικά pembrolizumab</b>                                                                                                                                                        |                                     |                                                                                 |

| Προτεινόμενα σχήματα θεραπείας Δεύτερης επιλογής     |                                           |                                                 |                                                          |                                                                    |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>Doxorubicin+ cyclophosphamide (AC) +docetaxel</b> | <b>Epirubicin + cyclophosphamide (EC)</b> | <b>Docetaxel+ Doxorubicin+ cyclophosphamide</b> | <b>Paclitaxel+ carboplatin ή carboplatin+ paclitaxel</b> | <b>Docetaxel + carboplatin</b><br>για προεγχειρητική χορήγηση μόνο |

Πίνακας 1. Προτεινόμενα θεραπευτικά σχήματα για τον TAKM

**Και για υποτροπή TAKM, ή τοπικοπεριοχικά προχωρημένο: ixabepilone και sacituzumabgovitecan, atezolizumab**

Η χημειοθεραπεία, συμπληρωματικά της χειρουργικής επέμβασης +/- της ακτινοβολίας, χρησιμοποιείται επί του παρόντος για τη θεραπεία του TAKM, ανεξάρτητα από το στάδιο. Πλέον για τη μείωση των μεγαλύτερων όγκων, στα πλαίσια της νεοεπικουρικής θεραπείας, προτείνεται και ο συνδυασμός χημειοθεραπείας σε συνδυασμό με ανοσοθεραπεία (pembrolizumab). Σε επικουρική θεραπεία, μπορεί να χορηγηθεί χημειοθεραπεία και pembrolizumab για την πρόληψη της υποτροπής (Kaplan, 2021).

Για προεγχειρητική(νεοεπικουρική) αλλά και επικουρική θεραπεία, προτείνονται δοξορουβικίνη/κυκλοφωσφαμίδη με αυξημένη πυκνότητα δόσεων, ακολουθούμενη από πακλιταξέλη, δοσεταξέλη/κυκλοφωσφαμίδη ή μεολαπαρίμπη (σε περίπτωση μεταλλάξεων BRCA1/2)-επίπεδο σύστασης I. Οι ασθενείς με TAKM υψηλού κινδύνου (στάδια II-III) μπορούν να λάβουν προεγχειρητικά pembrolizumab/carboplatin/paclitaxel, στη συνέχεια pembrolizumab/cyclophosphamide/doxorubicin ή epirubicin και μετεγχειρητικά επικουρικά pembrolizumab (NCCN, 2021). **Οι ασθενείς με TAKM και υπολειπόμενη νόσο μετά από προεγχειρητική θεραπεία με χημειοθεραπεία με βάση ταξάνη, αλκυλιωτή και ανθρακυκλίνη μπορούν να λάβουν καπεσιταβίνη. Άλλα συνιστώμενα σχήματα περιλαμβάνουν δοξορουβικίνη/κυκλοφωσφαμίδη ακολουθούμενη από ντοσιταξέλη, επιρουβικίνη/κυκλοφωσφαμίδη; δοσεταξέλη/δοξορουβικίνη/κυκλοφωσφαμίδη; ή για επιλεγμένους ασθενείς με TAKM προεγχειρητικά, εβδομαδιαία πακλιταξέλη/καρβοπλατίνη ή ντοσεταξέλη/καρβοπλατίνη (American Cancer Society, 2021).** Πίνακας 1. Ωστόσο η συμπερίληψη παραγόντων πλατίνας στη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία ασθενών με TAKM είναι αμφιλεγόμενη (NCCN, 2021).

Μόνο το 5% των ασθενών με TAKM διαγιγνώσκονται αρχικά με μεταστατική νόσο. Ωστόσο, το υψηλότερο ποσοστό υποτροπών επισυμβαίνει τα πρώτα τρία χρόνια μετά τη θεραπεία. Ο TAKM είναι ένας χημειο-ευαίσθητος καρκίνος, ωστόσο αυτοί οι ασθενείς εμφανίζουν υψηλά ποσοστά αντίστασης στη χημειοθεραπεία της νόσου αλλά και υποτροπής της νόσου, το οποίο είναι γνωστό ως το **τριπλά αρνητικό δίλημμα** (O'Reilly et al., 2021). Σε ασθενείς με υποτροπή νόσου, με μη εξαιρεσιμη τοπικοπεριοχική νόσο, ή με μεταστατική

νόσο (στάδιο IV-M1) χορηγείται συστηματική θεραπεία έως ότου η νόσος ανταποκριθεί, ή για όσο παραμένει σταθερή και η τοξικότητα της αγωγής είναι ανεκτή από τον ασθενή. **Οι ασθενείς με TAKM και μεταλλάξεις BRCA1/2 μπορεί να ωφεληθούν από την προσθήκη στη θεραπεία αναστολέα PARP, αλλά και από τη θεραπεία με πλατίνα (καρβοπλατίνη ή σισπλατίνη).**

**Η κυκλοφωσφαμίδη, η δοσεταξέλη, η δεσμευμένη σε λευκωματίνη πακλιταξέλη (nab-paclitaxel), η επιρουβική και η ιξαμπεπιλόνη είναι μεταξύ των άλλων φαρμάκων που ενδείκνυνται. Οι κατευθυντήριες οδηγίες συνιστούν διαδοχικές μεμονωμένες θεραπείες, ωστόσο απαριθμούν μερικούς συνδυασμούς χημειοθεραπείας για ασθενείς με σημαντικό φορτίο νόσου, ασθένεια που εξελίσσεται γρήγορα ή σπλαχνικές κρίσεις.**

Εάν δεν υπάρχει ανταπόκριση στα παραπάνω σχήματα, προτείνεται διαφορετική προσέγγιση. Το olaparib ή το talazoparib, και τα δύο συστάσεις κατηγορίας 1, θα μπορούσαν να χορηγηθούν σε ασθενείς με μετάλλαξη BRCA1/2. Το Pembrolizumab συν χημειοθεραπεία (πακλιταξέλη, πακλιταξέλη συνδεδεμένη με λευκωματίνη ή γεμισιταβίνη και καρβοπλατίνη) συνιστώνται σε ασθενείς με TAKM με έκφραση PD-L1. Το pembrolizumab και η χημειοθεραπεία είναι η ιδανική θεραπεία πρώτης γραμμής, αν και εάν η θεραπεία δεν έχει χορηγηθεί προηγουμένως, μπορεί να χορηγηθεί ως δεύτερης γραμμής ή και ανεξαρτήτως. Η πρωτεΐνη PD-L1 εμφανίζεται σε περίπου 1 στους 5 ασθενείς με TAKM (Allott et al., 2020). Ο ασθενής και ο κλινικός ιατρός μπορεί να αποφασίσουν κάποια στιγμή να εξαιρεθούν από τη συστηματική θεραπεία και αντ' αυτού να επιλέξουν υποστηρικτική φροντίδα.

Το 2021, οι κατευθυντήριες γραμμές του NCCN για τη θεραπεία του TAKM ενημερώθηκαν αρκετές φορές. Η πιο πρόσφατη έκδοση είναι η 2.2023.

**Το sacituzumabgovitecan μετακινήθηκε από τα "άλλα προτεινόμενα σχήματα" στα "προτιμώμενα σχήματα" στην ενημέρωση του 8.2021 για συστηματικές θεραπείες για υποτροπιάζοντα μη εξαιρεσιμο (τοπικό ή περιοχικό) καρκίνο ή σταδίου IV (M1). Σε υποσημείωση αναφέρεται ότι αυτή η θεραπεία αφορά ενήλικες ασθενείς με μεταστατικό TAKM που έχουν υποβληθεί σε τουλάχιστον δύο προηγούμενα σχήματα. Σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα ή ανθεκτικό μεταστατικό TAKM, η κλινική δοκιμή φάσης 3 ASCENT 10, συνέκρινε τη χορήγηση sacituzumabgovitecan με χορήγηση χημειοθεραπείας ενός φαρμάκου**

της επιλογής του θεραπόντος. Η επιβίωση χωρίς εξέλιξη (PFS) σε ασθενείς που δεν είχαν εγκεφαλικές μεταστάσεις ήταν το πρωτεύον καταληκτικό σημείο. Στη μελέτη, 468 άτομα τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν είτε sacituzumabgonitican είτε χημειοθεραπεία. Σε όλους τους ασθενείς χορηγήθηκαν ταξάνες εκ των προτέρων. Το σκέλος της sacituzumabgonitican είχε διάμεσο PFS 5,6 μήνες (95 τοις εκατό CI, 4,3-6,3, 166 συμβάντα), ενώ το σκέλος της χημειοθεραπείας είχε διάμεσο PFS 1,7 μήνες (95 τοις εκατό CI, 1,5-2,6, 150 συμβάντα) (αναλογία κινδύνου [HR] για εξέλιξη της νόσου ή θάνατο, 0,41· 95 τοις εκατό CI, 0,32-0,52). Η ομάδα της sacituzumabgonitican είχε διάμεση συνολική επιβίωση (OS) 12,1 μήνες (95 τοις εκατό διάστημα εμπιστοσύνης: 10,7-14,0), ενώ η ομάδα χημειοθεραπείας είχε διάμεσο OS 6,7 μήνες (95 τοις εκατό διάστημα εμπιστοσύνης: 5,8-7,7). Στην ομάδα της sacituzumabgonitican, το 35% των ασθενών εμφάνισε αντικειμενική ανταπόκριση, έναντι 5% στην ομάδα χημειοθεραπείας. Ανεπιθύμητες ενέργειες βαθμού 3 ή υψηλότερου σχετιζόμενες με τη θεραπεία εμφανίστηκαν σε κάθε ομάδα, με τρεις θανάτους σε κάθε ομάδα λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών που δεν συνδέθηκαν με τη θεραπεία με sacituzumabgonitican. Το όφελος από την sacituzumabgonitican ήταν εμφανές σε όλες τις κλινικές και τις προκαθορισμένες υποομάδες, συμπεριλαμβανομένων ασθενών που είχαν λάβει προηγουμένως θεραπεία με αναστολείς PD-1 ή PD-L1, σύμφωνα με τους συγγραφείς (<https://clinicaltrials.gov>).

Από τις κατευθυντήριες οδηγίες διαγράφηκε επίσης η επιλογή για atezolizumab και πακλιταξέλη δεσμευμένη σε λευκωματίνη και ο συνοδευτικός έλεγχος των ειδικών βιοδεικτών ως πρόσθετη στοχευμένη θεραπεία για υποτροπή νόσου μη εξαιρεσίμη (τοπική ή περιοχική) ή για νόσο σταδίου IV (M1) από την ενημέρωση 8.2021. Αν και η ατεζολιζουμάμπη έλαβε γρήγορη έγκριση για τον TAKM, τα αποτελέσματα της φάσης 3 κλινικής δοκιμής που ανακοινώθηκαν μετά την έγκριση ήταν απογοητευτικά. **Η δοκιμή IMpassion131 για προχωρημένο TAKM εξέτασε την ατεζολιζουμάμπη και την πακλιταξέλη ως θεραπείες πρώτης γραμμής.** Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα ανακοινώθηκαν τον Αύγουστο του 2021. Η μελέτη περιελάμβανε 651 τυχαιοποιημένα άτομα που δεν είχαν λάβει προηγούμενα συστηματική θεραπεία ή δεν είχαν λάβει (νεο)επικουρική χημειοθεραπεία στους προηγούμενους 12 μήνες. Τους χορηγήθηκε ατεζολιζουμάμπη ή εικονικό φάρμακο, συν πακλιταξέλη, σε αναλογία 2:1 μέχρι την εξέλιξη της νόσου ή την αφόρητη τοξικότητα. Χωρίστηκαν σε ομάδες με βάση την κατάστασή τους

σε PD-L1 και άλλα χαρακτηριστικά. Το πρωτεύον καταληκτικό σημείο της έρευνας ήταν το PFS, με το OS ως δευτερεύον καταληκτικό σημείο. Η προσθήκη ατεζολιζουμάμπης στην πακλιταξέλη δεν αύξησε το PFS στον θετικό σε PD-L1 πληθυσμό (HR, 0,82, 95 τοις εκατό CI, 0,60-1,12, P=,20, διάμεσος PFS 6,0 μήνες με ατεζολιζουμάμπης - πακλιταξέλη έναντι 5,7 μήνες με εικονικό φάρμακο). Στον θετικό σε PD-L1 πληθυσμό, ο συνδυασμός συνδέθηκε με υψηλότερο μη επιβεβαιωμένο ποσοστό καλύτερης συνολικής ανταπόκρισης (63 τοις εκατό έναντι 55 τοις εκατό με εικονικό φάρμακο), καθώς και με μεγαλύτερη διάρκεια διάρκειας ανταπόκρισης (7,2 μήνες έναντι 5,5 μηνών). Στα τελικά αποτελέσματα για OS δεν βρέθηκε διαφορά μεταξύ των σκελών (HR, 1,11, 95 τοις εκατό CI, 0,76-1,64, διάμεσος 22,1 μήνες με ατεζολιζουμάμπη-πακλιταξέλη έναντι 28,3 μήνες με εικονικό φάρμακο-πακλιταξέλη στον θετικό σε PD-L1 πληθυσμό). **Τα αποτελέσματα του πληθυσμού με πρόθεση θεραπείας ήταν παρόμοια με αυτά του θετικού πληθυσμού PD-L1. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ο συνδυασμός δεν είχε καμία επίδραση στο PFS ή το OS σε σύγκριση με την πακλιταξέλη μόνη της** (NCCN Guidelines, 2021).

Στην ενημέρωση του 7.2021 προτείνεται για τους ασθενείς με γενετικές μεταλλάξεις BRCA1/2 και TAKM να εξεταστεί το ενδεχόμενο χορήγησης επικουρικά **olaparib** για 1 έτος εάν έχουν 1) νόσο pT2 ή pN1 μετά από επικουρική χημειοθεραπεία ή 2) υπολειπόμενη ασθένεια μετά από προεγχειρητική χημειοθεραπεία. Ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού, HER2 αρνητικοί, με μεταλλάξεις BRCA1/2 με χειρουργική αντιμετώπιση της τοπικής νόσου και νεοεπικουρική ή επικουρική χημειοθεραπεία, συμπεριλήφθηκαν στη **διπλή τυφλή τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης 3 OlympiA**. Οι 1836 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν ολαπαρίμπη ή εικονικό φάρμακο για ένα έτος, με πρωτεύον καταληκτικό σημείο την επιβίωση χωρίς διηθητική νόσο. Το ποσοστό επιβίωσης στα 3 έτη χωρίς διηθητική νόσο στο σκέλος της ολαπαρίμπης ήταν 85,9% έναντι 77,1% στο σκέλος του εικονικού φαρμάκου μετά από διάμεση παρακολούθηση 2,5 ετών (95% CI, 4,5-13,0, HR για επεμβατική νόσο ή θάνατο, 0,58 99,5 τοις εκατό CI, 0,41-0,82, P.001). Το σκέλος της ολαπαρίμπης είχε 87,5% απομακρυσμένο ποσοστό επιβίωσης χωρίς ασθένεια σε σύγκριση με 80,4 τοις εκατό στο σκέλος του εικονικού φαρμάκου (95% CI, 3,0 έως 11,1, HR για απομακρυσμένη ασθένεια ή θάνατο, 0,57, 99,5% CI, 0,39-0,83, P.0). Οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι η ολαπαρίμπη σχετιζόταν με λιγότερους θανάτους από την ομάδα του εικονικού φαρμάκου (59 και 86 αντίστοιχα) (HR, 0,68, 99% CI, 0,44-1,05, P=.02). Οι

ερευνητές δεν ασχολήθηκαν με ανεπιθύμητα περιστατικά. Σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο, διαπίστωσαν ότι η ολαπαρίμπη σχετιζόταν με σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωσηελεύθερη διηθητικής ή απομακρυσμένης νόσου. Η ενημέρωση του 5.2021 προσθέτει μια υποσημείωση (αρχικά με την ένδειξη "j") που δηλώνει ότι επειδή οι ασθενείς στη μελέτη Olympia δεν έλαβαν καπεσιταμπίνη, δεν υπάρχουν δεδομένα για την αλληλουχία ή τον τρόπο επιλογής του ενός έναντι του άλλου. (Bardia, 2021).

### 3.3. Θεραπεία 2ης γραμμής

Οι ασθενείς με μεταστατικό τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (μTAKM) έχουν συχνά κακή πρόγνωση και λίγες θεραπευτικές επιλογές. Ο TAKM είναι δύσκολο να αντιμετωπιστεί λόγω της απουσίας μοριακών στόχων και η χημειοθεραπεία παραμένει η καθιερωμένη θεραπεία σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο, ή με μη εξαιρεσιμη τοπική υποτροπή. Για ασθενείς που δεν έχουν λάβει προηγουμένως αυτά τα φάρμακα ως νεοεπικουρική ή επικουρική θεραπεία, το NationalComprehensiveCancerNetwork (NCCN) συνιστά τις ανθρακυκλίνες ή τις ταζάνες ως προτιμώμενες εναλλακτικές θεραπείας πρώτης γραμμής (O'Reillyetal., 2021; Lietal., 2019). Οι δόσεις για τα προτιμώμενα σχήματα χημειοθεραπείας περιγράφονται στις κατευθυντήριες οδηγίες. Με βάση τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών φάσης 3 που απέδειξαν την αποτελεσματικότητα αυτών των παραγόντων, οι οποίοι εκμεταλλεύονται την ήδη ελαττωματική επιδιόρθωση του DNA επί μεταλλάξεων BRCA1/2, **οι ασθενείς με μεταλλάξεις BRCA1/2 μπορούν να ωφεληθούν από την χορήγηση αναστολέων της πολυμεράσης της πολυADP-ριβόζης (PARPinhibitors) ή από χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα (σισπλατίνη ή καρβοπλατίνη)** (NCCN Guidelines, 2022). Η συνδυασμένη χημειοθεραπεία δεν έχει αποδειχθεί ότι παρατείνει την επιβίωση και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο τοξικότητας και ως εκ τούτου η τρέχουσα συνιστώμενη αγωγή είναι η χημειοθεραπεία ενός παράγοντα. Η συνδυασμένη χημειοθεραπεία, από την άλλη πλευρά, μπορεί να είναι χρήσιμη για ασθενείς με προχωρημένη ή ταχέως εξελισσόμενη νόσο (NCCN Guidelines 2022, Bardiaetal., 2019).

Εάν η νόσος εξελιχθεί μετά από τη θεραπεία πρώτης γραμμής, η συνιστώμενη θεραπευτική στρατηγική είναι η χορήγηση περαιτέρω χημειοθεραπευτικών με διαδοχικό τρόπο, χωρίς

διακοπές της θεραπείας και για όσο διάστημα είναι ανεκτή. Για ασθενείς που έχουν προχωρημένη νόσο και δεν μπορούν πλέον να ανεχθούν τη χημειοθεραπεία, υπάρχουν πλέον και άλλες θεραπευτικές επιλογές.(NCCN Guidelines, 2021).Γι αυτές τις περιπτώσεις έχει λάβει έγκριση η χορήγηση του **sacituzumabgovitecan** ένα σύζευγμα αντισώματος με φάρμακο- ένα αντίσωμα που στοχεύει στη διαμεμβρανικήγλυκοπρωτεΐνηTrop-2 σε συνδυασμό με το SN-38 που είναι ενεργόςμεταβολίτης της ιρινοτεκάνης και αναστολέας της τοποϊσομεράσης I.Το Trop-2 βρίσκεται στην μεμβράνη των κυττάρων και υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Με τη σύνδεση στον υποδοχέα Trop-2 το σύζευγμα γρήγορα καθίσταται ενδοκυττάριο και απελευθερώνει εντός του κυττάρου το SN-38.Η επακόλουθη βλάβη του DNA οδηγεί σε απόπτωση και κυτταρικό θάνατο. Το **pembrolizumab**, ένα ανοσοθεραπευτικό φάρμακο,μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του PD-1, έχει εγκριθεί ως μονοθεραπεία σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα μικροδορυφορικής αστάθειας (MicrosatelliteInstability, MSI), ελαττωματική επιδιόρθωση ασυμφωνίας DNA(deficientMismatchRepair, dMMR) ή υψηλό φορτίο μετάλλαξης στον όγκο (TumorMutationalBurden, TMB) (NCCN Guidelines, 2021). Θα πρέπει να τονιστεί, ωστόσο, ότι η έγκριση του pembrolizumab σε ασθενείς με αυτούς τους βιοδείκτες βασίζεται σε κλινικές δοκιμές που απέκλεισαν άτομα με TAKM (Syed, 2020). Ησυνιστώμενη από τις κατευθυντήριες γραμμές NCCN θεραπευτική αγωγή για το μTAKM συνοψίζεται στην εικόνα 9 (NCCN Guidelines, 2021). Το αθροιστικόποσοστό συνολικής ανταπόκρισης (ORR) ήταν 23% και η διάμεση συνολική επιβίωση (OS) ήταν 17,5 μήνες σε μια μετα-ανάλυση κλινικών δοκιμών φάσης 3 της χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής για τον μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Η αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας περιορίζεται ακόμη περισσότερο καθώς οι ασθενείς προχωρούν, με ένα συγκεντρωτικό ORR 11% που αναφέρεται σε πρόσφατη μετα-ανάλυση (Lietal. 2019). Επειδή οι ανταποκρίσεις είναι συνήθως βραχύβιες και η χημειοθεραπεία συνδέεται με τοξικότητα που μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα ζωής των ασθενών, χρειάζονται επείγοντως νέες θεραπείες για τη βελτίωση των αποτελεσμάτων των ασθενών με μTAKM.

### 3.3.1. Ανοσοθεραπεία

Τα Τ κύτταρα, τα εκτελεστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, μπορούν να αναγνωρίσουν νεοαντιγόνα στα καρκινικά κύτταρα και να ενεργοποιήσουν μια «αντικαρκινική» ανοσοαπόκριση. Η ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων, υπό φυσιολογικές συνθήκες ρυθμίζεται στενά από πολλούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης αλληλεπιδράσεως με ανασταλτικούς υποδοχείς γνωστών ως σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, που υπό φυσιολογικές συνθήκες εμποδίζουν την αυτοαντιδραστικότητα έναντι των κυττάρων του ίδιου του σώματος (Keenan and Tolane, 2020). **Οι υποδοχείς του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Programmed Death PD-1) και οι προσδέτες του (Programmed Death Ligand PD-L1 και PD-L2) είναι από τα πιο γνωστά σημεία ελέγχου.** Τα Τ κύτταρα, τα Β κύτταρα και τα φυσικά φονικά κύτταρα, παράγουν PD-1, που αλληλεπιδρά με τους προσδέτες του που εκφράζονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα έτσι αναστέλλεται η απόκριση και στη συνέχεια η λειτουργία των Τ λεμφοκυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να μειώσουν την κυτταροτοξική δραστηριότητα των Τ-κυττάρων τροποποιώντας τη σηματοδότηση που επάγεται από τα σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού μέσω ευρείας έκφρασης του PD-L1: το PDL-1 εκφράζεται ευρέως στα καρκινικά κύτταρα και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Hargadon et al., 2018).

Μία από τις μεγάλες εξελίξεις στην έρευνα για τον καρκίνο την τελευταία δεκαετία ήταν η ανοσοθεραπεία, η οποία στοχεύει στην επανενεργοποίηση της αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης. **Οι αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (Immune checkpoint inhibitors, ICIs) και ειδικά τα μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν τους PD-1 και PD-L1, είναι από τις πιο αποτελεσματικές ανοσοθεραπείες και με μακροπρόθεσμες θεραπευτικές αποκρίσεις για μια ποικιλία συμπαγών όγκων.** Παρά την επιτυχία τους, πολλοί ασθενείς δεν ωφελούνται από τη θεραπεία με ICIs, εξαιτίας των διαφορών της ανοσογονικότητας των διαφόρων όγκων. Η αυξημένη συγκέντρωση Τ κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου, μοριακοί δείκτες ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού και αυξημένα επίπεδα έκφρασης PD-L1 έχουν συνδεθεί με καλύτερες αποκρίσεις σε ICIs στους λεγόμενους «θερμούς» όγκους (Duan et al., 2020, Li et al., 2020).

Τα τελευταία χρόνια, η καλύτερη γνώση των μοριακών μηχανισμών έχει αποκαλύψει ότι ορισμένοι καρκινικοί είναι πιο ανοσογονικοί από άλλους. **Ο TAKM είναι καλός υποψήφιος**

για ICIs λόγω του υψηλότερου φορτίου μεταλλάξεων (περισσότερα νεοαντιγόνα), του αυξημένου αριθμού ανοσοδιηθητικών κυττάρων στον όγκο και των υψηλών επιπέδων έκφρασης PD-L1. Τα ICIs έχουν μελετηθεί σε έναν αριθμό κλινικών δοκιμών σε άτομα με μεταστατικό ΤΑΚΜ με περιορισμένη αποτελεσματικότητα ως μονοθεραπεία και πλέον δοκιμάζονται στο πλαίσιο συνδυαστικών θεραπειών. (Adel, 2021· Simmonsetal., 2020).

### 3.3.2. Ανοσοθεραπεία σε συνδυασμό με Χημειοθεραπεία

Φάρμακα με συμπληρωματικούς τρόπους δράσης συνδυάζονται με βέλτιστους τρόπους για να μεγιστοποιήσουν την προσθετική ή ακόμα και τη συνεργική αποτελεσματικότητα. Τα συνδυαστικά σχήματα με ανοσοθεραπεία έχουν επίσης σχεδιαστεί για να εκμεταλλεύονται τις πιθανές ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις του συνεργατικού φαρμάκου. Οι ακριβείς ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις των χημειοθεραπευτικών ποικίλλουν ανάλογα με τον παράγοντα, αλλά γενικά, καθώς τα καρκινικά κύτταρα καταστρέφονται, τα καρκινικά νεοαντιγόνα που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία, μπορούν να πυροδοτήσουν και να ενισχύσουν την αντικαρκινική ανοσοαπόκριση. Επιπλέον, **χημειοθεραπευτικά όπως αναστολείς τοποϊσομεράσης, φάρμακα εναντίων των μικροσωληνίσκων, αλκυλιωτικοί παράγοντες και αντιμεταβολίτες, μειώνουν τα ανοσοκατασταλτικά κύτταρα όπως τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα και τα κατασταλτικά κύτταρα που προέρχονται από τα μυελοειδή, καθιστώντας το μικροπεριβάλλον του όγκου πιο φιλικό στην ανοσοθεραπεία** (Adel, 2021).

### 3.3.3. Atezolizumab με nab-Paclitaxel

Στον μεταστατικό ΤΑΚΜ, ο συνδυασμός ICIs με χημειοθεραπεία έχει αποδειχθεί πολύ πιο αποτελεσματικός από ICIs ενός παράγοντα, με αποτέλεσμα την έγκριση από τον FDA δύο νέων θεραπευτικών σχημάτων, καθιερώνοντας νέες θεραπείες εκλογής για ασθενείς με έκφραση PD-L1. Ο συνδυασμός του **αναστολέα PD-L1 atezolizumab και πακλιταξέλης συνδεδεμένης με νανοσωματίδια λευκωματίνης (nab-paclitaxel) δοκιμάστηκε στην**

**τυχαιοποιημένη δοκιμή φάσης 3 IMpassion130** μετά από πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα από μια κλινική δοκιμή φάσης 1 (Schmidetal. 2018). 451 ασθενείς (Πίνακας 1) τυχαιοποιήθηκαν και ορίστηκαν να λάβουν atezolizumab 840 mg IV τις ημέρες 1 και 15 σε κύκλους 28 ημερών με nab-paclitaxel 100 mg/m<sup>2</sup> IV τις ημέρες 1, 8 και 15 ή εικονικό φάρμακο με nab-paclitaxel. Ο συνδυασμός βελτίωσε την επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου (PFS) τόσο στο συνολικό πληθυσμό (αναλογία κινδύνου [HR], 0,80, 95% CI, 0,69-0,92, P =,002) όσο και σε ασθενείς με PD-L1 θετικούς όγκους (που ορίζονται ως αυτοί με 1% έκφραση PD-L1 σε κύτταρα του ανοσοποιητικού που διεισδύουν στον όγκο ως ποσοστό της περιοχής του όγκου) (HR, 0,62, 95% CI, 0,49-0,78, P =,001). Αν και η διάμεσηολική επιβίωση (OS) ήταν αριθμητικά υψηλότερη με την προσθήκη του atezolizumab, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική (HR, 0,86, 95% CI, 0,72-1,02, P =,078). Ωστόσο, η διερευνητική ανάλυση αποκάλυψε σημαντική βελτίωση στο OS για τον PD-L1 θετικό πληθυσμό (HR, 0,71, 95% CI, 0,54-0,94). Ανεπιθύμητα συμβάντα (AdverseEvents, AE) βαθμού 3/4 εμφανίστηκαν στο 49 τοις εκατό των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με atezolizumab, έναντι του 43 τοις εκατό των ασθενών που έλαβαν εικονικό φάρμακο, με την ουδετεροπενία, την περιφερική νευροπάθεια, τον μειωμένο αριθμό ουδετεροφύλων και την σωματική εξάντληση να είναι τα πιο κοινά, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 (Schmidetal., 2018). **Σύμφωνα με κατευθυντήριες οδηγίες, ο συνδυασμός atezolizumab και nab-paclitaxel είναι μια προτιμώμενη θεραπευτική επιλογή για την αρχική θεραπεία του μεταστατικού ΤΑΚΜ σε ασθενείς με θετική νόσο PD-L1**, όπως προσδιορίζεται από ένα συνοδευτικό διαγνωστικό εγκεκριμένο από την FDA (Schmidetal., 2018; Murciano-Goroff, 2020).

| <b>Table 1. Characteristics of the Patients at Baseline.*</b> |                                                |                                           |                                                |                                           |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>Characteristic</b>                                         | <b>Intention-to-Treat Population</b>           |                                           | <b>PD-L1–Positive Subgroup</b>                 |                                           |
|                                                               | <b>Atezolizumab + Nab-Paclitaxel (N = 451)</b> | <b>Placebo + Nab-Paclitaxel (N = 451)</b> | <b>Atezolizumab + Nab-Paclitaxel (N = 185)</b> | <b>Placebo + Nab-Paclitaxel (N = 184)</b> |
| <b>Age</b>                                                    |                                                |                                           |                                                |                                           |
| Median (range) — yr                                           | 55 (20–82)                                     | 56 (26–86)                                | 53 (26–82)                                     | 53 (28–85)                                |
| Distribution — no. (%)                                        |                                                |                                           |                                                |                                           |
| 18–40 yr                                                      | 63 (14.0)                                      | 51 (11.3)                                 | 31 (16.8)                                      | 24 (13.0)                                 |
| 41–64 yr                                                      | 284 (63.0)                                     | 285 (63.2)                                | 111 (60.0)                                     | 117 (63.6)                                |
| ≥65 yr                                                        | 104 (23.1)                                     | 115 (25.5)                                | 43 (23.2)                                      | 43 (23.4)                                 |
| Female sex — no. (%)                                          | 448 (99.3)                                     | 450 (99.8)                                | 184 (99.5)                                     | 184 (100)                                 |
| Race or ethnic group — no. (%)†                               |                                                |                                           |                                                |                                           |
| White                                                         | 308 (68.3)                                     | 301 (66.7)                                | 125 (67.6)                                     | 129 (70.1)                                |
| Asian                                                         | 85 (18.8)                                      | 76 (16.9)                                 | 38 (20.5)                                      | 28 (15.2)                                 |
| Black                                                         | 26 (5.8)                                       | 33 (7.3)                                  | 9 (4.9)                                        | 14 (7.6)                                  |
| Native American                                               | 17 (3.8)                                       | 23 (5.1)                                  | 8 (4.3)                                        | 9 (4.9)                                   |
| Hawaiian or other Pacific Islander                            | 1 (0.2)                                        | 0                                         | 0                                              | 0                                         |
| Multiple                                                      | 2 (0.4)                                        | 3 (0.7)                                   | 0                                              | 0                                         |
| Unknown                                                       | 12 (2.7)                                       | 15 (3.3)                                  | 5 (2.7)                                        | 4 (2.2)                                   |
| ECOG performance-status score — no./total no. (%)‡            |                                                |                                           |                                                |                                           |
| 0                                                             | 256/450 (56.9)                                 | 270/450 (60.0)                            | 107/185 (57.8)                                 | 112/184 (60.9)                            |
| 1                                                             | 193/450 (42.9)                                 | 179/450 (39.8)                            | 77/185 (41.6)                                  | 72/184 (39.1)                             |
| 2                                                             | 1/450 (0.2)                                    | 1/450 (0.2)                               | 1/185 (0.5)                                    | 0                                         |
| Metastatic disease — no./total no. (%)                        | 404/450 (89.8)                                 | 408/450 (90.7)                            | 162/185 (87.6)                                 | 159/183 (86.9)                            |
| No. of sites of metastatic disease — no./total no. (%)        |                                                |                                           |                                                |                                           |
| 0–3                                                           | 332/450 (73.8)                                 | 341/449 (75.9)                            | 149/185 (80.5)                                 | 140/183 (76.5)                            |
| ≥4                                                            | 118/450 (26.2)                                 | 108/449 (24.1)                            | 36/185 (19.5)                                  | 43/183 (23.5)                             |
| Site of metastatic disease                                    |                                                |                                           |                                                |                                           |
| Liver — no. (%)§                                              | 126 (27.9)                                     | 118 (26.2)                                | 44 (23.8)                                      | 39 (21.2)                                 |
| Bone — no. (%)                                                | 145 (32.2)                                     | 141 (31.3)                                | 54 (29.2)                                      | 49 (26.6)                                 |
| Brain — no. (%)                                               | 30 (6.7)                                       | 31 (6.9)                                  | 15 (8.1)                                       | 11 (6.0)                                  |
| Lung — no. (%)                                                | 226 (50.1)                                     | 242 (53.7)                                | 86 (46.5)                                      | 98 (53.3)                                 |
| Lymph node only — no./total no. (%)                           | 33/450 (7.3)                                   | 23/449 (5.1)                              | 18/185 (9.7)                                   | 13/183 (7.1)                              |
| Previous therapy — no. (%)                                    |                                                |                                           |                                                |                                           |
| Neoadjuvant or adjuvant therapy                               | 284 (63.0)                                     | 286 (63.4)                                | 125 (67.6)                                     | 117 (63.6)                                |
| Taxane§                                                       | 231 (51.2)                                     | 230 (51.0)                                | 96 (51.9)                                      | 94 (51.1)                                 |
| Anthracycline                                                 | 243 (53.9)                                     | 242 (53.7)                                | 109 (58.9)                                     | 101 (54.9)                                |

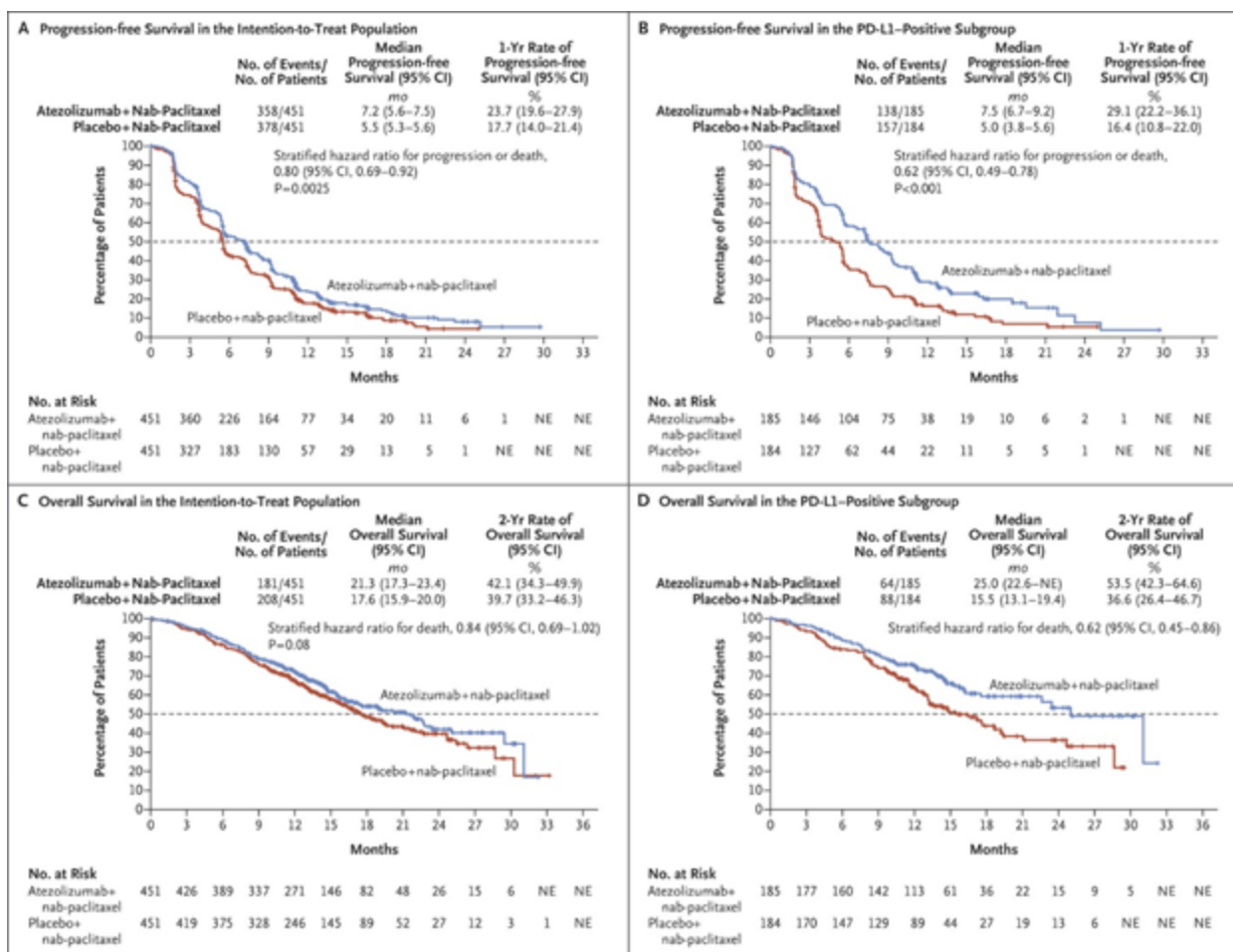
\* The summary statistics are based on the full population indicated in the column heading. If data regarding the baseline characteristic were not available for all patients, the total number of patients who could be evaluated for this characteristic is presented. The characteristics of the patients at baseline were well balanced between the two trial groups, and the baseline characteristics of the patients in the PD-L1–positive subgroup appeared to be generally representative of the intention-to-treat population. Percentages may not total 100 because of rounding. Nab-paclitaxel denotes nanoparticle albumin-bound paclitaxel.

† Race and ethnic group were reported by the patients.

‡ Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance-status scores are assessed on a 5-point scale, with higher numbers indicating greater disability. A score of 0 indicates no disability, a score of 1 that the patient is ambulatory and capable of light work but restricted in physically strenuous activity, and a score of 2 that the patient is ambulatory, awake and active more than 50% of waking hours, and capable of all self-care but unable to work. Two patients were enrolled with an ECOG performance-status score of 1 but had a score of 2 at the start of the trial intervention.

§ Data were from the case-report form.

Πίνακας 2.. Χαρακτηριστικά των ασθενών στο Schmidetal.



Εικόνα 9. Ανάλυση Kaplan–Meier της επιβίωσης χωρίς πρόοδο και της συνολικής επιβίωσης

### 3.3.4. Atezolizumab με Paclitaxel

Επειδή το nab-paclitaxel δεν είναι ευρέως διαθέσιμο, οι ερευνητές σχεδίασαν ένα τυχαιοποιημένο πείραμα φάσης 3 για να δουν εάν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η πακλιταξέλη στη θέση της σε ασθενείς με μεταστατικό TAKM που δεν είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία (**IMpassion131**). Συνολικά 651 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν **atezolizumab** 840 mg IV τις ημέρες 1 και 15 ενός κύκλου 28 ημερών, καθώς και **πακλιταξέλη** 90 mg/m<sup>2</sup> IV τις ημέρες 1, 8 και 15 ή εικονικό φάρμακο + πακλιταξέλη. Παραδόξως, η πακλιταξέλη σε συνδυασμό με την ατεζολιζουμάμη δεν είχε καμία επίδραση στο PFS ή το OS στον γενικό πληθυσμό ή σε ασθενείς με θετική νόσο PD-L1 (Helwick, 2021). Οι λόγοι γι' αυτό ακόμη διερευνώνται, αλλά έχει προταθεί ότι η αυξημένη χρήση

προφαρμακευτικής αγωγής με στεροειδή για τη μείωση των ΑΕ της πακλιταξέλης στο IMpassion131 θα μπορούσε να ήταν ένας παράγοντας. Η τυχαιοποιημένη δοκιμή φάσης 3 **IMpassion132 (NCT03371017)** διερευνά τη χρήση της **ατεζολιζουμάμπης σε συνδυασμό με άλλες μορφές χημειοθεραπείας με καπεσιταμπίνη ή καρβοπλατίνη** για μεταστατικό TAKM που δεν είχε λάβει προηγουμένως θεραπεία που υποτροπιάζει 12 μήνες ή λιγότερο μετά την καθιερωμένη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία (Cortes et al., 2019).

### 3.3.5. Χημειοθεραπεία με pembrolizumab

Σε αρκετές κλινικές δοκιμές που βρίσκονται σε εξέλιξη, ο αναστολέας PD-1 pembrolizumab αξιολογείται σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Το **pembrolizumab σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία (πακλιταξέλη, nab-πακλιταξέλη ή γεμισιταμπίνη συν καρβοπλατίνη)** βελτίωσε το PFS σε ασθενείς με μεταστατικό TAKM στην **τυχαιοποιημένη φάσης III μελέτη KEYNOTE-355** (HR, 0,65; 95% CI, 0,81; 20 = 0. Πίνακας 135), εξασφαλίζοντας την έγκριση του FDA για αυτόν τον θεραπευτικό συνδυασμό σε ασθενείς με θετική PD-L1 νόσο. Σ' αυτή τη μελέτη 847 συμμετέχοντες τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν pembrolizumab 200 mg IV κάθε 3 εβδομάδες συν χημειοθεραπεία ή εικονικό φάρμακο + θεραπεία. Σε ασθενείς με CPS μεγαλύτερο ή ίσο με 10, η διάμεση PFS με το pembrolizumab ήταν 9,7 μήνες και 5,6 μήνες με εικονικό φάρμακο (Schmid et al., 2020; Miles et al., 2020). Ωστόσο, ασθενείς με CPS μεγαλύτερο ή ίσο με 1 είχαν διάμεσο PFS 7,6 και 5,6 μήνες, αποδεικνύοντας ότι ο εμπλουτισμός PD-L1 βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με pembrolizumab. *(To CPS ,Combined Positive Score, είναι ο αριθμός των PDL-1 κυττάρων του όγκου -των λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων- δια του συνολικού αριθμού των βιώσιμων κυττάρων του όγκου X100. Σε αυτή τη μελέτη θεωρήθηκαν ως εμπλουτισμένοι σε PDL-1 οι όγκοι με CPS ≥ 10)*

Η αναιμία (49% έναντι 46%), η ουδετεροπενία (41% έναντι 38%) και η ναυτία (39% έναντι 41%) ήταν τα πιο κοινά ανεπιθύμητα συμβάντα (Adverse Events, AE) με AE βαθμού 3 και υψηλότερα να εμφανίζονται στο 68% και στο 67% των ασθενών, αντίστοιχα. Το OS εξακολουθεί να παρακολουθείται (Cortes et al., 2020). Πρόσθετα στοιχεία έδειξαν ότι τα δευτερεύοντα καταληκτικά σημεία (ORR, διάρκεια ανταπόκρισης και ποσοστό ελέγχου της νόσου) ευνοήθηκαν επίσης από τον συνδυασμό pembrolizumab/χημειοθεραπείας, και ότι

τοόφελος στην PFS φάνηκε ανεξάρτητα από τον τύπο της χημειοθεραπείας που χρησιμοποιήθηκε (Rugoetal., 2020) Αυτά τα ευρήματα αντικατοπτρίζονται τώρα στις νέες κατευθυντήριες γραμμές NCCN, οι οποίες υποδεικνύουν ότι αυτός ο συνδυασμός αποτελεί σύσταση κατηγορίας 1 για ασθενείς που είναι υποψήφιοι για ανοσοθεραπείες.

Η δοκιμή φάσης 1b/2 **ENHANCE-1/KEYNOTE-150** (NCT02513472) μελετά το συνδυασμό **pembrolizumab και eribulin σε** ασθενείς με μεταστατικό TAKM που έχουν λάβει προηγουμένως δύο ή λιγότερες συστηματικές θεραπείες. Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε PD-L1 θετικές υποομάδες και PD-L1 αρνητικές υποομάδες, καθώς και με βάση τον αριθμό των προηγούμενων θεραπειών που είχαν λάβει: ομάδα πρώτης γραμμής (στρώμα 1, καμία προηγούμενη θεραπεία, N = 60) και ομάδα δεύτερης γραμμής (στρώμα 2, 1-2 προηγούμενες θεραπείες, N = 89). Τα ανεπιθύμητα συμβάντα από τη θεραπεία (AEs)περιελάμβαναν κόπωση (66%), ναυτία (65%), περιφερική αισθητηριακή νευροπάθεια (41%), αλωπεκία (40%) και δυσκοιλιότητα (37%). (Tolaneyetal., 2020).

### 3.3.6. Χημειοθεραπεία με Nivolumab

Μια **προσαρμοστική, μη συγκριτική κλινική μελέτη φάσης 2 (μελέτη TONIC)** είχε σκοπό να εξετάσει αυτήν την έννοια της **συνεργατικής δράσης συνδυαστικών θεραπειών, συνδυάζοντας χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία ακολουθούμενη από το nivolumab**, μεβάση προκλινικά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η **χημειοθεραπεία και η ακτινοβολία είχαν ανοσοτροποποιητικά αποτελέσματα** (Scurratal., 2017). Εξήντα επτά ασθενείς με μεταστατικό TAKM τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν nivolumab χωρίς εισαγωγή θεραπείας ή με εισαγωγή 2 εβδομάδων ακτινοβολίας χαμηλής δόσης, ή κυκλοφωσφαμίδης, ή σισπλατίνης ή δοξορουβικίνης, ακολουθούμενη από nivolumab. Το ORR για ολόκληρη την κοόρτη ήταν 20%. Οι ομάδες σισπλατίνης (ORR, 23%) και δοξορουβικίνης (ORR, 35%) είχαν τις περισσότερες αποκρίσεις. Τα γονίδια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό, στα μονοπάτια των PD-1, PD-L1 και της κυτταροτοξικότητας των T-κυττάρων αυξορυθμίστηκαν μετά από εισαγωγική θεραπεία μεδοξορουβικίνη και σισπλατίνη. Η βραχυπρόθεσμη χορήγηση δοξορουβικίνηςκαι σισπλατίνης μπορεί να δημιουργήσει ένα πιο ευνοϊκό μικροπεριβάλλονόγκου και να αυξήσει την πιθανότητα απόκρισης στην αναστολή του PD-1

στο TNBC, σύμφωνα με τα κλινικά και μεταφραστικά ευρήματα αυτής της μελέτης, η οποία υποστηρίζει περαιτέρω δοκιμές με αυτούς τους συνδυασμούς (Voorwerketal, 2019).

### **3.4. Γενετικός έλεγχος στον τριπλό αρνητικό καρκίνο του μαστού**

Ο καρκίνος του μαστού εμφανίζει αύξηση στις γυναίκες κάτω των 55 ετών και στις περισσότερες χώρες κάτω των 50 ετών με την ετήσια ποσοστιαία μεταβολή (AnnualPercentChange,APC) να είναι υψηλότερη μεταξύ των γυναικών κάτω των 40 ετών (Lima, Kehm&Terry, 2021). Επειδή τα προγράμματα πληθυσμιακού προσυμπτωματικού ελέγχου δεν είναι διαθέσιμα σε όλες τις χώρες και συνήθως δεν απευθύνονται σε γυναίκες κάτω από την ηλικία των 45 ή 50 ετών, οι κλινικές κατευθυντήριες οδηγίες για τον εντοπισμό γυναικών υψηλού κινδύνου που χρήζουν προγενέστερα προληπτικό έλεγχο ή/και στοχευμένες στρατηγικές μείωσης του κινδύνου, βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στο οικογενειακό ιστορικό καρκίνου και/ή σε γνωστές παθογόνες μεταλλάξεις (PV) σε γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού ή σε άλλους πολύ ειδικούς παράγοντες (ακτινοβολία στο θωρακικό τοίχωμα πριν την ηλικία των 30, ευρήματα άτυπης υπερπλασίας κλπ). Όλοι αυτοί οι παράγοντες όμως δεν μπορούν να εξηγήσουν την αυξανόμενη επίπτωση που στην πλειοψηφία είναι αποτέλεσμα περιβαλλοντικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με την υποκείμενη ευαισθησία κι έτσι τα υπάρχοντα πρότυπα για τον εντοπισμό των γυναικών υψηλότερου κινδύνου είναι και θα συνεχίσουν να είναι ανεπαρκή (Jakuboski, McDonald&Terry, 2022). Επιπλέον σε πολλές χώρες πολιτιστικές πεποιθήσεις κι έθιμα για την απόκρυψη πληροφοριών στο ευρύτερο οικογενειακό περιβάλλον καθιστούν τη γνώση του οικογενειακού ιστορικού καρκίνου πιο περιορισμένη (Thomsonetal., 2015; Hovicketal., 2015).

ΟΤΑΚΜαποτελεί το 11,3% όλων των καρκίνων του μαστού στις Ηνωμένες Πολιτείες, το 19,5% όλων των καρκίνων του μαστού σε γυναίκες κάτω των 40 ετών και το 13,6% των καρκίνων του μαστού σε γυναίκες κάτω των 55 ετών (Τα ποσοστά είναι υψηλότερα σε χώρες χωρίς προληπτικό έλεγχο) (Lima, Kehm, Terryetal, 2021).

**Η διάγνωση με ΤΑΚΜείναι ισχυρή ένδειξη για γενετικό έλεγχο μεταλλάξεων που σχετίζονται με τον κληρονομικό καρκίνο. Σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες συνιστάται ο γενετικός έλεγχος για όλους τους ασθενείς με διάγνωση ΤΑΚΜ,**

**ανεξαρτήτως ηλικίας και ανεξαρτήτως οικογενειακού ιστορικού.** Η ένδειξη για γενετικό έλεγχο επί άλλων μοριακών υποτύπων, εξακολουθεί να τίθεται βάση οικογενειακού ιστορικού και ηλικίας κατά τη διάγνωση. Με τις προσεγγίσεις αυτές ωστόσο, περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς με καρκίνο του μαστού με παθολογικές μεταλλάξεις (Pathologic Variants, PV) δεν εντοπίζονται (Beitsch et al., 2019; Yadav et al., 2020; Manahan et al., 2019).

Παρά το γεγονός ότι ο επιπολασμός των παθογόνων μεταλλαγών σε μη προσβεβλημένες γυναίκες είναι σημαντικά χαμηλότερος από ό,τι σε γυναίκες που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού, η τακτική της χρήσης του οικογενειακού ιστορικού ως κριτήριο για γενετικό έλεγχο, χάνει πάνω από το 50% του BRCA1/2, αλλά και πολλών άλλων παθογόνων μεταλλαγών σε μη προσβεβλημένες γυναίκες. (Hu et al., 2021; Rowley et al., 2019). Ως αποτέλεσμα, στις γυναίκες χωρίς οικογενειακό ιστορικό σπάνια θα προσφερθεί γενετικός έλεγχος και ο προληπτικός έλεγχος για καρκίνο του μαστού θα ξεκινήσει σύμφωνα με τις οδηγίες προσυμπτωματικού ελέγχου πληθυσμού χαμηλού κινδύνου, που σε πολλές χώρες είναι 50 ετών και άνω (Yadav & Couch, 2019).

Υπάρχουν αρκετά υπολογιστικά μοντέλα που ασχολούνται αποκλειστικά με τα γονίδια BRCA1 και BRCA2 στον καρκίνο του μαστού όπως το BRCAPRO με 85% ευαισθησία. Το μοντέλο BOADICEA περιλαμβάνει αρκετά γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας που μπορεί να ευθύνονται για τον καρκίνο του μαστού. Σε σύγκριση με άλλα μοντέλα, δεν είναι τόσο στατιστικά σημαντικό όσο το μοντέλο BRCAPRO για την αναγνώριση μεταλλαγμένων φορέων και μη φορέων (Barucha et al., 2020).

Στο παρελθόν, για τον εντοπισμό των μεταλλάξεων που ευθύνονται για μια γενετική ασθένεια, τα αντίστοιχα γονίδια αναλύονταν ένα προς ένα, με τη μέθοδο Sanger. Η Sanger ωστόσο είναι μέθοδος πρώτης γενιάς με χαμηλή απόδοση και μπορεί να αναλύσει μικρό αριθμό δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ωστόσο, επειδή είναι αναλογική μέθοδος, δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη. Σήμερα, με την αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) ή την αλληλούχιση δεύτερης γενιάς, είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών γονιδίων σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα.. Έτσι οι νέες μέθοδοι είναι ταχύτερες, πιο οικονομικές και ταυτόχρονα δίνουν τις απαραίτητες πληροφορίες για τη θεραπεία της νόσου, καθώς ανιχνεύουν ένα ευρύ φάσμα μεταλλάξεων όπως αντικατάσταση, προσθήκη ή

διαγραφή βάσης κ.λπ. Η μέθοδος NGS αναλύει ολόκληρες αλληλουχίες συγκεκριμένων γονιδίων (πίνακες), που σχετίζονται με κάποια ασθένεια, ή αλληλουχίες ολόκληρων εξονίων (WholeExomeSequencing, WES)ή/και αλληλουχία ολόκληρου γονιδιώματος (WholeGenomeSequencing,WGS). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται σε πολλές πλατφόρμες, όπως GenomeAnalyzer / HiSeq / MiSeq (IlluminaSolexa), SOLID System (ThermoFisher Scientific), Ion PGM / IonProton (ThermoFisher Scientific) και HeliScopeSequencer (HelicosBioSciences) (Tellyetal. , 2019).

**Ο TAKM εμφανίζει ένα διακριτό μοτίβο μετάλλαξης τόσοεπί μεταλλάξεων της βλαστικής σειράς όσο και επί σωματικών μόνο μεταλλαγών, το οποίο είναι εντυπωσιακά διαφορετικό από άλλους υποτύπους καρκίνου του μαστού,** σύμφωνα με τη γονιδιωματικήαλληλούχιση (Shietal., 2018). Η πλειονότητα των όγκων στους φορείς BRCA1 είναι TAKM(80%) αλλά και επί σποραδικών καρκίνων οι TAKM όγκοι έχουν πολλές κλινικοπαθολογικές ομοιότητες με τους μεταλλαγμένους στο BRCA1 όγκους. (το φαινόμενο αυτό ονομάζεται BRCAness και ίσως να συνδέεται με αδρανοποίηση του BRCA1 γονιδίου).**Η καλύτερη κατανόηση αυτών των φαινομένων θα μπορούσε να έχει επιπτώσεις στην αντιμετώπιση του TAKM αλλά και του κληρονομικού καρκίνου.** (Lipsetal., 2013).

Όσον αφορά την περίπτωση σωματικής μετάλλαξης, που φαίνεται να είναι η πιο κοινή, με την έλευση της νέας γενιάς πολλαπλών γονιδιακών τεστ και τη μείωση του κόστους των,όλο και περισσότεροι ασθενείς με καρκίνο του μαστού υποβάλλονται σε εξέταση για τον έλεγχο της γονιδιακής υπογραφής του όγκου. Μεταξύτωνδιαθέσιμωντεστείναιτο**21 Gene Panel (OncotypeDx), το 70 Gene Panel (MammaPrint), το 50 Gene Panel (PAM 50), το 12 Gene Gene Panel (EndoPredict) καιτο Breast Cancer Index (BCI)**. Αν και όλα αυτά είναι «εξαιρετικές εξετάσεις», το OncotypeDx προτιμάται για τους ασθενείς καθώς είναι προγνωστικό για τα οφέλη της χημειοθεραπείας. Αυτό το πάνελ εξετάζει τα 21 γονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις οδηγούν συχνότερα σε καρκίνο του μαστού και τα οποία είναι: BRCA1, BRCA2, PALB2, BARD1, BRIP, NF1, MSH2, MSH6, PMS2, NB1, PTK1, CDKRE2, MSH6 ,PMS2, CDKN2A, RAD51C, RAD51D, RAD50, NB1 και PTK1 (Sabour, etal, 2017).**To Oncotype DX®** (Genomic Health, Redwood, CA) αναπτύχθηκε για πρώτη φορά το 2004 και είναι ένα τεστ 21 γονιδίων (16 γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο του

μαστού και 5 γονίδια αναφοράς). Αυτή η εξέταση μπορεί να ποσοτικοποιήσει τόσο την πιθανότητα υποτροπής εντός 10 ετών (δηλαδή είναι προγνωστική) όσο και το ποσοστό επιβίωσης χωρίς υποτροπή, από το συνδυασμό επικουρικής ενδοκρινικής θεραπείας και επικουρικής χημειοθεραπείας. Αν και δεν έχει εγκριθεί επί του παρόντος από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), το Oncotype DX είναι το μόνο γονιδιωματικό τεστ που συνιστάται από τις κατευθυντήριες οδηγίες θεραπείας που δημοσιεύονται από την Αμερικανική Εταιρεία Κλινικής Ογκολογίας (ASCO) και το National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Προτείνεται επίσης από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Παθολογικής Ογκολογίας (ESMO) και από το Διεθνές Συνέδριο για τον Καρκίνο του Μαστού στο St. Gallen. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι έχει υψηλό ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων για όγκους που είναι HER2+ και επομένως δεν είναι κατάλληλο για χρήση σε αυτούς τους ασθενείς (Fayanju, Park&Lucci, 2017).

**Το MammaPrint**, που συζητήθηκε για πρώτη φορά το 2006, είναι ένα τεστ ανάλυσης 70 γονιδίων που αναπτύχθηκε από την Agendia (Irvine, CA), ένα εμπορικό spin-off του Ολλανδικού Ινστιτούτου Καρκίνου (NKI) και του νοσοκομείου Antonivan Leeuwenhoek στο Άμστερνταμ. **Αυτό το τεστ ήταν το πρώτο που έλαβε έγκριση από τον FDA και είναι το πιο δημοφιλές γονιδιωματικό τεστ για τον καρκίνο του μαστού συμπεριλαμβανομένου του TNBC στην Ευρώπη.**

Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύονται με τα γενετικά τεστ ταξινομούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του Αμερικανικού Κολλεγίου Ιατρικής Γενετικής και Γονιδιωματικής και της Μοριακής Παθολογικής Εταιρείας σε πέντε κατηγορίες: **καλοήθειες, πιθανώς καλοήθειες, παραλλαγές αγνώστου σημασίας (Variant of Unknown Significance, VUS), πιθανώς παθογόνες και παθογόνες.** Τα καλοήθη και πιθανώς καλοήθη ευρήματα αναφέρονται συνήθως ως αρνητικά, ενώ τα παθογόνα ή δυνητικά παθογόνα ευρήματα αναφέρονται ως θετικά. Η ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων μπορεί να είναι δύσκολη και απαιτεί εμπειρία και τεχνογνωσία. Σε ασθενείς με αρνητική έκβαση, η διαχείριση κινδύνου θα πρέπει να βασίζεται στο οικογενειακό ιστορικό και σε άλλους παράγοντες που προδιαθέτουν για καρκίνο του μαστού. Σε αυτήν την περίπτωση, τα μοντέλα Tyrer-Cuzick και BOADICEA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της πιθανότητας ενός ατόμου να εμφανίσει καρκίνο του μαστού. Αυτά τα εργαλεία εκτιμούν την πιθανότητα μια γυναίκα να

αναπτύξει καρκίνο του μαστού μέσα σε διάστημα 10 ετών και κατά τη διάρκεια της ζωής της. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν σημαίνει απαραίτητα ότι το άτομο διατρέχει χαμηλό κίνδυνο να αναπτύξει καρκίνο του μαστού. Υπάρχει πιθανότητα να ανήκει σε ομάδα υψηλού κινδύνου και να χρειάζεται τακτικό έλεγχο και μαγνητική τομογραφία (Manahanetal., 2029).

Η εύρεση μεταλλάξεων αγνώστου σημασίας, προκαλεί μεγάλο άγχος στους ασθενείς, παρόμοιο με εκείνους που λαμβάνουν θετικό αποτέλεσμα. Ένα τέτοιο αποτέλεσμα δεν θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για τη διαχείριση κινδύνων και τη λήψη αποφάσεων. Αντίθετα, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το οικογενειακό ιστορικό και άλλοι παράγοντες κινδύνου.

Είναι απαραίτητο να εξηγηθούν αυτά τα αποτελέσματα στους ασθενείς κατά τη διάρκεια της γενετικής συμβουλευτικής, ώστε να μην παρερμηνευθούν καθώς έχουν παρατηρηθεί αδικαιολόγητες παρεμβάσεις με βάση αυτά τα αποτελέσματα. Όσοι λαμβάνουν τέτοια αποτελέσματα το αποτέλεσμα θα πρέπει να εγγραφούν σε ερευνητικές μελέτες ή να εγγραφούν για την ταξινόμηση αβέβαιων μεταλλάξεων. Παραδείγματα τέτοιων μητρώων είναι η μελέτη PROMPT 92 και η κοινοπραξία ENIGMA (Yadavetal, 2019; Fayanju, Park&Lucci, 2017).

Η διαχείριση ασθενών με θετικά αποτελέσματα εστιάζει στη μείωση του κινδύνου και στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου. Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να συζητηθεί το ενδεχόμενο μιας προληπτικής χειρουργικής επέμβασης και η εντατικοποίηση του προληπτικού ελέγχου από διεπιστημονική ομάδα. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις θα πρέπει να παρακολουθούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα και από ομάδα που είναι ενημερωμένη για τα τρέχοντα δεδομένα. Προκειμένου να μειωθεί επιτυχώς ο κίνδυνος ή να διευκολυνθεί η έγκαιρη ανίχνευση καρκίνου σε τέτοιους ασθενείς, οι κλινικοί γιατροί πολλών ειδικοτήτων πρέπει να γνωρίζουν το τρέχον τοπίο των γενετικών εξετάσεων και τον αντίκτυπο των αποτελεσμάτων (Yadav&Couch, 2019).

### **3.5. Στην εποχή της εξατομικευμένης ιατρικής**

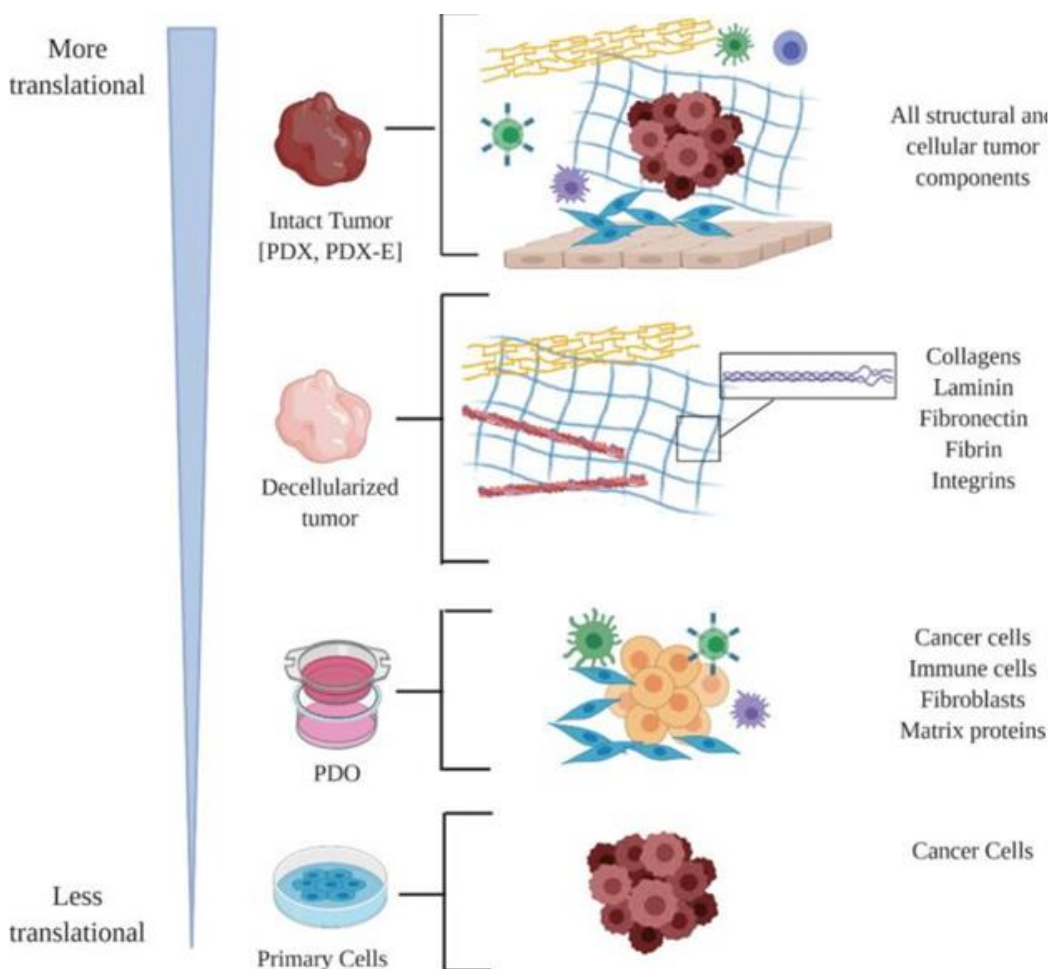
Λόγω των σημαντικών ανακαλύψεων στην ανακάλυψη στόχων και τις μεταφραστικές μεθοδολογίες για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της θεραπείας του καρκίνου, τα τελευταία χρόνια εμφανίστηκαν υποσχόμενες νέες στοχευμένες θεραπείες και φαρμακευτικά

σχήματα για την διαχείριση του καρκίνου του μαστού. Η άμεση μετάφραση των ανακαλύψεων στο θεραπευτικό πλαίσιο διευκολύνεται από συστήματα προκλινικών μοντέλων που μιμούνται με ακρίβεια τη βιολογία του ανθρώπινου όγκου. Τα μοντέλα ξενομοσχευμάτων που προέρχονται από ασθενή (PatientDerivedXenografts, PDX) -είναι τα πιο ακριβή μοντέλα που μιμούνται τη μικροανατομία των ανθρώπινων συμπαγών όγκων είτε *in vivo* με εμφύτευση των όγκων σε ζωικά μοντέλα, είτε *ex vivo* με εμφύτευση των όγκων σε οργανοειδή που προέρχονται από ασθενείς (patientderivedorganoids, PDO)(Matossianetal., 2020) .

Για μια σειρά συμπαγών μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, η χρήση μοντέλων PDX σε προκλινικές έρευνες έχει βελτιώσει σημαντικά τα αποτελέσματα της βασικής έρευνας και των μελετών (Murayama&Gotoh,etal, 2019).Τα περισσότερα δεδομένα που σχετίζονται με τονTAKM ωστόσο προέρχεται από ασθενείς της λευκής φυλής κι έτσι δεν αντιπροσωπεύεται ικανοποιητικά ο πληθυσμός των ασθενών που πλήττεται περισσότερο από τονTAKM: άτομα αφρικανικής και ισπανικής καταγωγής.Η τρέχουσα χρήση των μοντέλων PDX στην έρευνα για την ανακάλυψη φαρμάκων για τον TAKM καθώς και προσπάθειες από διάφορα ιδρύματα παγκοσμίως για την ανάπτυξη μοντέλων PDX από άτομα διαφόρων εθνικοτήτων που εμφανίζουν διάφορες γενετικές παραλλαγές, θα βοηθήσει στον εντοπισμό κυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης ενδογενών και εξωγενών, μοναδικών στιςδιάφορες εθνοτικέςκοόρτες (Matossianetal., 2020; Dobroleckietal., 2016).

Πριν από την εισαγωγή των μοντέλων PDX, το τυπικάμοντέλα προκλινικής έρευνας για τους συμπαγείς όγκους,ήταν οι αθάνατες κυτταρικές σειρές και τα ορθοτοπικάξενομοσχεύματα (Matossianetal., 2020). Αυτά τα μοντέλα, αν και παρείχαν βασικές γνώσεις σχετικά με τη βιολογία του καρκίνου και τις επιπτώσεις της φαρμακευτικής αγωγής στα κυτταρικά συστήματα, ήταν περιορισμένα στην ικανότητά τους να αναδημιουργούν το μικροπεριβάλλον του όγκου, δηλ. την κυτταρική ετερογένεια και τις χημικές αντιδράσεις που δημιουργούνται από την αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων και του εξωκυττάριουχώρου στον ασθενή. (Cifaniet al,2015). Η ανακαλλιέργεια αθάντων κυτταρικών σειρών που έχουν αναπτυχθεί σε κυτταρική καλλιέργεια για χρόνια δημιουργεί

μη αναστρέψιμες γενετικές και συμπεριφορικές αλλαγές που όπως έχει φανείδεν υπήρχαν στον αρχικό όγκο (Manning, Buck&Cook, 2016).



Εικόνα 10. Διάφορες εφαρμογές των μοντέλων TNBC PDX για τη μελέτη διαφορετικών πτυχών του TNBC

Στην έρευνα για τον καρκίνο, η χρήση κατά δυνατόν «φυσιολογικών» μοντέλων είναι ζωτικής σημασίας για την αποκάλυψη νέων άγνωστων στόχων και διεργασιών στους διάφορους τύπους καρκίνου. Τα μοντέλα PDX αποτελούν ένα μεταφραστικό σύστημα μοντέλων που χρησιμοποιείται πλέον ευρέως στην έρευνα για τον καρκίνο. Αυτά τα μοντέλα διευκολύνουν τη μετάφραση των εργαστηριακών ανακαλύψεων στην κλινική πράξη, αλλά και το αντίστροφο, καθιστούν ευκολότερη τη μετάφραση της κλινικής παρατήρησης σε θεραπευτική ανακάλυψη στο εργαστήριο (Hidalgo et al., 2014). Τα μοντέλα PDX κατέχουν σημαντική θέση στην έρευνα για τον καρκίνο, επειδή επιτρέπουν τον έλεγχο φαρμάκων ή συνδυασμών τους πριν τη δοκιμή τους σε πραγματικούς ασθενείς (Sulaiman & Wang, 2017). Λόγω των προστατευτικών από τον καρκίνο χαρακτηριστικών του μικροπεριβάλλοντος του

όγκου, τα μοντέλα PDX είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για την έρευνα κακοηθειών που εμφανίζουν σημαντική ετερογένεια τόσο στο ενδοκυττάριο όσο και στο εξωκυττάριο περιβάλλον τους, όπως οι TAKΜόγκοι. Κάθε δημιουργημένο μοντέλο PDX παρέχει μια ευκαιρία για την καλύτερη κατανόηση των βιολογικών χαρακτηριστικών και της ετερογένειας του TAKΜ. (Elkhalifaetal., 2019).

PDO και οργανοειδή που προέρχονται από όγκους PDX που μεταμοσχεύθηκαν σειριακά σε μοντέλα ποντικού (PDX-O) έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες για νέα φάρμακα για να παρέχουν κρίσιμες μεταφραστικές συνδέσεις μεταξύ *in vitro* καλλιιεργειών και *in vivo* παρατηρήσεων. Τα οργανοειδή διατηρούν μεγάλο μέρος του πολύπλοκου και διακριτού μικροπεριβάλλοντος των όγκων μεμονωμένων ασθενών, καθώς και την κυτταρική τους σύνθεση (Barecheetal. 2018). Αυτά τα μοντέλα είναι σημαντικά γιατί, ενώ τα μοσχεύματα όγκου που λαμβάνονται από ασθενείς είναι τα πιο μεταφραστικά, δεν μπορούν να διατηρηθούν σε περιβάλλον κυτταροκαλλιιεργειας για μακρά χρονικά διαστήματα και μακροχρόνια έρευνα. Τα οργανοειδή, από την άλλη πλευρά, διατηρούν τη μικροανατομία των όγκων και μπορούν να καλλιιεργηθούν σε ειδικές συνθήκες "χαμηλής προσκόλλησης". Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων φαρμάκων με τα πολλά στοιχεία ενός όγκου, όπως είναι οι ινοβλάστες, οι εξωκυττάριας πρωτεΐνες, τα καρκινικά κύτταρα αλλά και τα στοιχεία και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Mills etal., 2018).

Για την εξομοίωση τηςθεραπείας με την κλινική πράξη, ιστοτεμάχια του όγκου μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία σε έναειδικό τριβλίο. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο εάν υπάρχουν αρκετοί προσπελάσιμοι όγκοι PDX. Τα οργανοειδή που σχηματίζονται από το PDX μπορούν να κατασκευαστούν από μικρά κομμάτια ιστού και στη συνέχεια να διεγερθούν. Τα PDX-Os και τα PDOs έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές μεταφραστικές τεχνικές για την αξιολόγηση των αντιδράσεων στα φάρμακα σε ευρύτερη κλίμακα. Η ενσωμάτωση μοντέλων PDX-O και PDO στην έρευνα για τον καρκίνο έχει γίνει πλέον ένα απαραίτητο μέρος της έρευνας για εξατομικευμένες θεραπείες (Matossianetal., 2020).

Ένα από τα καθοριστικά χαρακτηριστικά του TAKΜ είναι η απόκτηση αντίστασης στα χημειοθεραπευτικά, αλλά και η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην απόπτωση. Τα

ρυθμιστικά γονίδια της απόπτωσης έχει ανακαλυφθεί ότι εκφράζονται διαφορετικά σε όγκους που προέρχονται από ασθενείς διάφορων φυλών. Επιπλέον οι ασθενείς με υπολειμματικό φορτίο νόσου μετά από νεοεπικουρική χημειοθεραπεία εμφανίζουν χειρότερη πρόγνωση από τους nonTAKM, παρά την ισχυρή αρχική ανταπόκριση των TAKM όγκων στη χημειοθεραπεία (Siddhart&Sharma, 2018; Matossianetal., 2020).

Η σύγκριση όγκων χωρίς θεραπεία με ομοειδείς όγκους μετά τη θεραπεία είναι μια πιθανή εφαρμογή των μοντέλων PDX στην έρευνα του TAKM. Αυτοί οι ομοειδείς ιστοί όγκου είναι εξαιρετικά χρήσιμοι για την κατανόηση των διαφόρων διεργασιών που επισυμβαίνουν μέσα στον όγκο αλλά και στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία Η επεξεργασίας του από τον όγκο του ασθενούς πριν και μετά τη θεραπεία, δίνει τη δυνατότητα να διερευνηθούν τόσο οι ενδογενείς όσο και οι εξωγενείς κυτταρικοί μηχανισμοί που έχουν αλλάξει ως απόκριση στην έκθεση στο φάρμακο (Lovitt, Shelper&Avery,etal., 2018). Τα μοντέλα αυτά βοηθούν επίσης για την κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στην αντίσταση στα φάρμακα. TAKM όγκοι ασθενών που έλαβαν πλήρη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία και είχαν περιορισμένη ανταπόκριση αξίζει να ερευνηθούν για τον έλεγχο αλλαγής στη γονιδιακή τους έκφραση μετά από τη θεραπεία. (Brown, Hua&Tanwar,etal., 2019).

Τα κύτταρα του TAKM βασίζονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου για την επιβίωση και την εξέλιξη του όγκου, το οποίο ορίζεται ως η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και τα άλλα κυτταρικά στοιχεία (ανοσορρυθμιστικά κύτταρα και ινοβλάστες) που περιβάλλουν τα καρκινικά κύτταρα μέσα σε ένα όγκο (Jiaget al., 2016). Για την κατανόηση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων κυττάρου-κυττάρου και κυττάρων-στρώματος, απαιτείται ενδελεχής εξέταση και ανάλυση του πλήρους όγκου στο εργαστήριο (Efthekarietal., 2017). Τα μοντέλα PDX είναι μία από τις πιο ακριβείς τεχνικές για την μελέτη της θεμέλιας ουσίας του όγκου και των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων εντός αυτής (Yamaguchi&Perkins, 2018). Αν και τα μοντέλα καρκίνου σε τσιπ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων κυττάρου-στρώματος-μικροπεριβάλλοντος, δεν μπορούν να αντιπροσωπεύσουν με ακρίβεια τον αρχικό όγκο του ασθενούς (Sleebomet al., 2018). Επιπλέον, σε σύγκριση με ξενομοσχεύματα που προέρχονται από κυτταρικές σειρές, ή με έρευνα που βασίζεται σε κυτταρικές σειρές ή άλλα μοντέλα ex vivo, τα μοντέλα PDX παρέχουν πιο αξιόπιστα δεδομένα. Η στόχευση στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία

αναπτύσσεται ως νέα μέθοδος στη θεραπεία διηθητικών όγκων που δεν διαθέτουν γνωστούς στοχεύσιμους υποδοχείς, όπως ο TAKM. Οι Schedin και Borges ανακάλυψαν κρίσιμους δεσμούς μεταξύ των διαφόρων φάσεων του μαζικού αδένου στη διάρκεια ζωής μια γυναίκας και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (Schedin&Borges,etal., 2009; Harisi&Jeney,etal.,2015). Ανακάλυψαν ότι μετά τη γαλουχία, η εκφύλιση και υποστροφή του μαζικού αδένου προκαλούσε φλεγμονή στους ιστούς και αντιδράσεις των μονοπατιών επούλωσης τραυμάτων, που είχαν ως αποτέλεσμα την εναπόθεση υψηλού κινδύνου ινώδους τύπου κολλαγόνου, το οποίο έχει συνδεθεί με κακή επιβίωση σε Ευρωπαίες και Αμερικανίδες με διηθητικό καρκίνο του μαστού (Harisi,Jeneyetal., 2015). Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν τη σημασία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας κατά την φυσιολογική ανάπτυξη του μαζικού αδένου και υποδεικνύουν την ανάγκη για περισσότερη έρευνα, προκειμένου να κατανοήσουμε καλύτερα το ρυθμιστικό ρόλο της στον καρκίνο.

Η τρισδιάστατη αρχιτεκτονική των ιστών, η οποία είναι μοναδική για κάθε ασθενή, είναι επίσης ένα άλλο βασικό χαρακτηριστικό των όγκων που μπορεί να εξεταστεί χρησιμοποιώντας μοντέλα PDX. Η αρχιτεκτονική των ιστών, ιδίως η ευθυγράμμιση/προσανατολισμός, οι βιοφυσικές και δομικές ιδιότητες των όγκων, καθώς και η σύνθεση των κολλαγόνων ινών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας στην περιοχή του όγκου, παίζουν σημαντικό ρόλο στους ρυθμούς ανάπτυξης του όγκου και στην δυνατότητα μετάστασης. (Carey, Martin,&Reinhart-King, etal, 2017). Η ανάπτυξη του όγκου και οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις καθοδηγούνται από τη μηχανική της ετερογενούς εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η μελέτη της σε βάθος είναι ζωτικής σημασίας για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών μεθόδων σε υποτύπους καρκίνου με τόσο ετερογένεια τόσο σε κυτταρικό επίπεδο, αλλά και σε κλινική έκφραση, όπως ο TAKM. Επιπλέον, οι εμβιομηχανικές συμπεριφορές έχει αποδειχθεί ότι προβλέπουν τη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων και το μεταστατικό δυναμικό. Η οργάνωση του κολλαγόνου και των ελαστικών ινών είναι κρίσιμης σημασίας για την ανάπτυξη καρκίνου και η σύνθεση αυτών των χαρακτηριστικών του μικροπεριβάλλοντος του όγκου διαφέρει μεταξύ της μαύρης και της λευκής φυλής, υποδεικνύοντας τη σημασία τους για την ανάπτυξη καρκίνου. Η μοναδική ευθυγράμμιση των ινών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και τα μηχανοαισθητήρια εμβιομηχανικά χαρακτηριστικά των ανθρώπινων καρκίνων του μαστού,

διατηρούνται χρησιμοποιώντας μοντέλα PDX, ειδικά όταν προέρχονται από ιστοτεμάχια πρωτοπαθών όγκων (Malandrinoetal., 2018).

#### **4. Αναζήτηση στόχων: Μικροπεριβάλλον στονΤΑΚΜ**

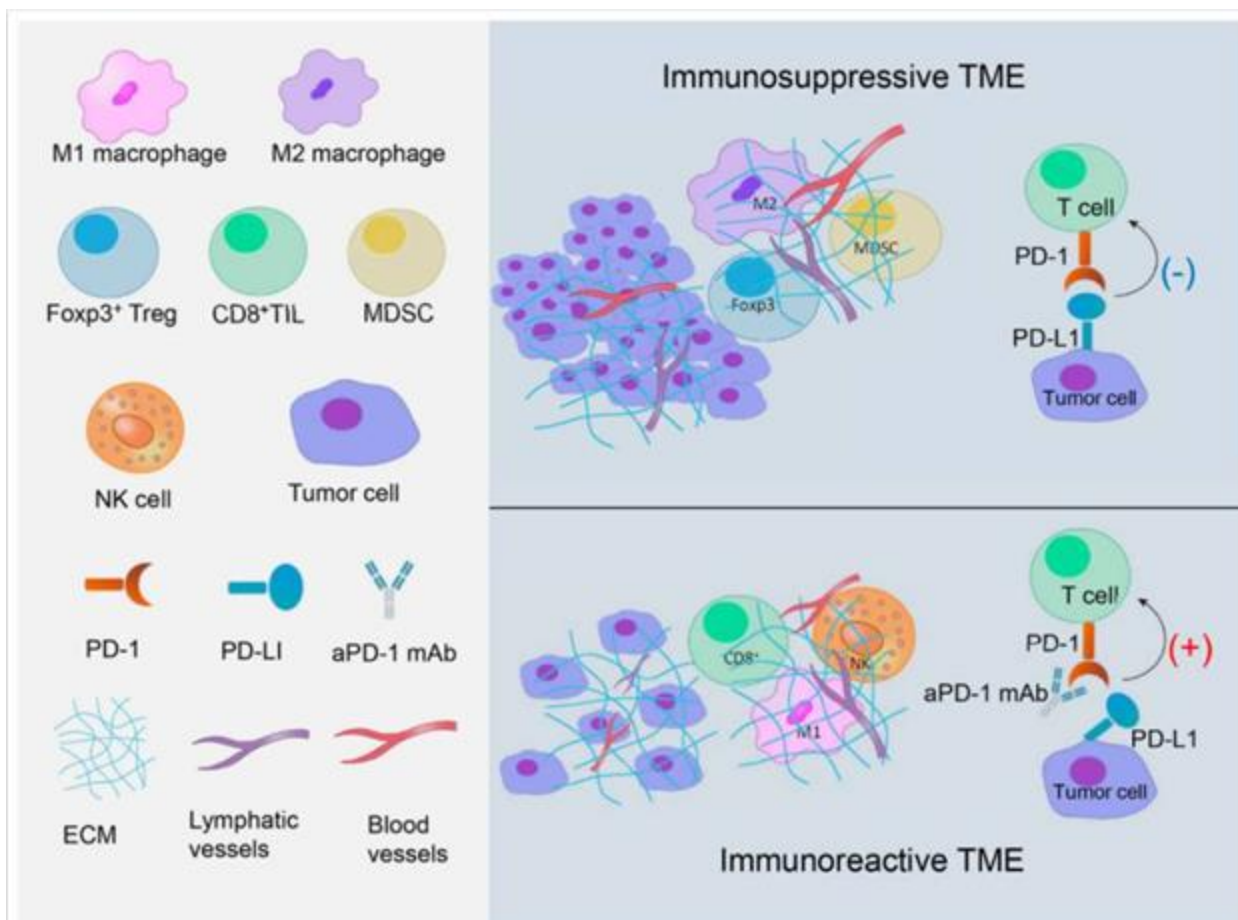
Οι τριπλά αρνητικοί όγκοι δεν αντιδρούν στην παρούσα ενδοκρινική και στοχευμένη θεραπεία Her2 και έχουν κακή πρόγνωση λόγω της έλλειψης έκφρασης/ενίσχυσης των πρωτεϊνών ER/PR/Her2. Οι τριπλά αρνητικοί όγκοι με υψηλότερη συγκέντρωση ανοσοκυττάρων, γνωστά ως «καυτοί όγκοι», έχουν καλύτερη πρόγνωση και ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία, ενώ εκείνοι με χαμηλότερη συγκέντρωση ανοσοκυττάρων, γνωστοί ως «ψυχροί όγκοι», έχουν χειρότερη πρόγνωση και φτωχή ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία (Zhengetal., 2021). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα λιποκύτταρα, οι ινοβλάστες, καθώς και οι διαλυτές ουσίες που εκκρίνονται από όλα τα κυτταρικά στοιχεία (συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων), συνθέτουν το μικροπεριβάλλον του όγκου (TumorMicroEnvironmentTME) (Gupta, Roy&Dwarakanath, 2017). Το TME μπορεί να ταξινομηθείμε διάφορους τρόπους: ανάλογα με την προέλευση, ξενιστή και μη ξενιστή, ανάλογα με την κυτταρική προέλευση και ανάλογα με τα στοιχεία του (Varnetal., 2017). Το TME είναι ένα περίπλοκο δίκτυο που είναι παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσορρύθμιση του ΤΑΚΜ και στην ανάπτυξη του όγκου.

Η δημιουργία και η ανάπτυξη του καρκίνου είναι κάτι περισσότερο από μια βιολογική διαδικασία που προκαλείται από απομονωμένα καρκινικά κύτταρα και πρέπει να μελετηθεί σε συνδυασμό με το σύνθετο TME, με έμφαση στην αλληλεπίδραση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας τους, με όποια πολυπλοκότητα κι αν προσθέτει αυτό. Η απελευθέρωση πολυάριθμων ανοσοκατασταλτικών και ανοσοδιεγερτικώνκυτοκινών, καθώς και οι αλλαγές στην αναλογία των ανοσοκυττάρων, είναι βασικά χαρακτηριστικά της εξέλιξης του ΤΑΚΜ (Marra, Viale&Curigliano, 2019). Ο ΤΑΚΜ έχει ταξινομηθεί σε «υποομάδες του ανοσολογικούμικροπεριβάλλοντος του όγκου (TumorImmuneMicroEnvironment,TIME) με βάση τη σύσταση του TME.Η ταξινόμηση αυτή βοηθά στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης στις θεραπείες και στην εξατομικευμένη χορήγησημελλοντικών θεραπειών με βάση τα χαρακτηριστικά του ΤΑΚΜ.Η

χημειοθεραπεία, η πιο κοινή θεραπεία για τον TAKM έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο (ImmunogenicCellDeath, ICD),ότι προωθεί την απελευθέρωση μοριακών μοτίβων που σχετίζονται με βλάβη (DamageAssociatedMolecularPatterns,DAMPs) όπως το πλαίσιο ομάδας υψηλής κινητικότητας 1 (HighMobilityGroupBox 1,HMGB1), τα εξωσώματα και η σφιγγοσίνη 1-φωσφορικός υποδοχέας 1 (sphingosine-1-phosphatereceptor 1,S1PR1), από κατεστραμμένα ή ενεργοποιημένα κύτταρα μέσω της οδού σηματοδότησης Toll-likereceptor 4 TLR4και διεγείρει την απελευθέρωση μορίων του ανοσοποιητικού όπως TGF-β, IK12p7 και IFN-γ (Zhangetal., 2019; Huangetal., 2018).

#### **4.1. Ο ρόλος του Μικροπεριβάλλοντος στην ανοσοτροποποίηση του TAKM**

Το μικροπεριβάλλον όγκου (Tumormicroenvironment,TME) μπορεί να χαρακτηριστεί ως «ανοσοκατασταλτικό» ή «ανοσοδιεγερτικό» με βάση το ρόλο του στην ανοσολογική απόκριση. Οι κύριοι τύποι κυττάρων στο μικροπεριβάλλον, η φλεγμονώδης λεμφοκυτταρική διήθηση του όγκου (TumordinfiltratingLymphocytes, TILs), είναι ποικίλοι και αποτελούνται κυρίως από λεμφοκύτταρα εντός του όγκου αλλά και στο στρώμα του όγκου. Τα TILs χωρίζονται σε πολυάριθμους υποτύπους, με τα CD3+ T κύτταρα και CD20+ B κύτταρα να είναι τα πιο κοινά σε συμπαγείς όγκους, ωστόσο η διήθηση των CD20+ B κυττάρων είναι λιγότερο συχνή. Τα CD8+ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CD8+ TILs), τα CD4+ βοηθητικά T λεμφοκύτταρα και τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα Foxp3+ (Foxp3+ Tregs) είναι όλα CD3+ T λεμφοκύτταρα. Οι διάφοροι υποπληθυσμοί των TILs, συμμετέχουν στην ανοσοτροποποίηση του καρκίνου του μαστού μέσω διαφορετικών οδών και με διακριτούς ρόλους,.(Benseetal., 2016). Τα TME που είναι ανοσοκατασταλτικά και ανοσοδιεγερτικά απεικονίζονται στην Εικόνα 11.



Εικόνα 11. Ανοσοκατασταλτικό και ανοσοαντιδραστικό TME (Zheng et al, 2021)

#### 4.1.1. Ανοσολογικό Μικροπεριβάλλον TAKM

Ο υποδοχέας προγραμματισμένου θανάτου-1 (PD-1) ανήκει στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών (IgSF) και σε συνάρτηση με τον προσδέτη του (PD-L1) είναι κύρια αρνητικά συνεργατικά μόρια σηματοδότησης που παίζουν βασικό ρόλο στην ανοσορρύθμιση του ξενιστή. Ο PD-L1 εκφράζεται σε πολλούς συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Τα TILs εκφράζουν τον υποδοχέα PD-1 (Bertucci et al., 2015). Θεωρητικά, η έκφραση του PD-L1 στα καρκινικά κύτταρα, σε συνδυασμό με την PD-1 έκφραση στα TILs έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργοποίησης των TILs, επιτρέποντας στα κύτταρα του όγκου να επιβιώνουν με ανοσολογική διαφυγή.

Στο TME υπάρχουν και άλλοι ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες που βοηθούν την ανάπτυξη κακοηθειών οι οποίες έχουν διαφύγει την ανοσολογική παρακολούθηση του ξενιστή (Brockwelletal., 2017). Έχουν ανακαλυφθεί αρκετοί αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος κι έχει αποδειχθεί η αποτελεσματικότητά τους σε ασθενείς με TAKM. Ωστόσο λόγω της μεταβλητότητας της έκφρασης του PD-L1 σε διαφορετικές περιοχές όγκου και των μη στανταρισμένων μεθόδων ανίχνευσης και των διαφορετικών αντισωμάτων, οι κλινικές έρευνες έχουν αποκαλύψει έναν παράδοξο ρόλο του PD-L1 όσον αφορά την προγνωστική του αξία σε ασθενείς με TAKM (Adamsetal., 2019, Zhengetal., 2021).

Πολλοί παράγοντες που σχετίζονται με το TME που μπορούν να επηρεάσουν τα θεραπευτικά οφέλη των αναστολέων PD-1/PD-L1 στον TAKM θα μπορούσαν να ευθύνονται για τα αποκλίνοντα αποτελέσματα. Πολλαπλές οδοί σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένου του άξονα microRNA-200/ZEB1, του WNT, της απώλειας του άξονα PTEN, PI3K και MUC1-C/MYC/NF-B, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την έκφραση του PD-L1 σε προκλινικές έρευνες (Castagnoli et al., 2019). Η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή που σηματοδοτούν τα μονοπάτια JAK-STAT και TNF, των γονιδίων που σχετίζονται με τα μονοπάτια των PD-1/PD-L1 και των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων, εμφανίζει αυξορρόθμιση μετά από θεραπεία με δοξορουβικίνη και σισπλατίνη, σύμφωνα με τους Voorwerk και συνεργάτες. Στον TAKM, η βραχυπρόθεσμη και χαμηλή δόση δοξορουβικίνης και σισπλατίνης μπορεί να οδηγήσει σε «ανοσοδιεγερτικό» TME και να ενισχύσει την ανταπόκριση σε PD-1 αναστολείς (Voorwerk et al., 2019). Προκειμένου να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα των αναστολέων PD-1/PD-L1 στον TAKM, απαιτούνται κατάλληλα σχεδιασμένες κλινικές δοκιμές ώστε να διερευνηθεί η επίδραση των διάφορων μεταβλητών που σχετίζονται με το TME.

Όπως ήδη αναφέρθηκε υπάρχουν διάφοροι τύποι TILs στο TME, καθένας από τους οποίους έχει αποδειχθεί ότι έχει διαφορετική προγνωστική αξία σε ασθενείς με TAKM. Τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα (Tregs) είναι λεμφοκύτταρα που παίζουν ρόλο στην ανοσοκαταστολή και αναγνωρίζονται από την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα forkheadbox P3 (Foxp3) και παλαιότερα από τον δείκτη CD25+ αν και πλέον δεν θεωρούνται όμοιοι πληθυσμοί. (Hashemi et al., 2020). Σε όγκους TAKM με χαμηλή κλοντίνη, τα Foxp3+ Tregs αποτελούν την

πλειονότητα των TILs και έχει προταθεί ότι η παρουσία τους στο TME αποτρέπει τους αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού να έχουν αποτελεσματική δράση (Taylor et al., 2017). Οι Jamiyan και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν ανοσοϊστοχημεία για να αξιολογήσουν την έκφραση του Foxp3<sup>+</sup> Tregs στο στρώμα σε 107 δείγματα TAKM και ανακάλυψαν ότι **μια χαμηλή συγκέντρωση Foxp3<sup>+</sup> Tregs στο στρώμα, συνδέθηκε τόσο με καλή επιβίωση ελεύθερη υποτροπής (RFS) όσο και με καλύτερη συνολική επιβίωση (OS)**. Αντίθετα η υψηλή έκφραση Foxp3<sup>+</sup> TILs εντός του όγκου, συνδέθηκε θετικά με βελτιωμένο OS σε 43 ιστούς TAKM και τα Foxp3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> TILs συσχετίστηκαν θετικά με καλύτερο OS (Zhang et al., 2019). Παρόλα αυτά η έκφραση mRNA του Foxp3 με qRT-PCR σε 826 δείγματα ιστού όγκου μαστού, συμπεριλαμβανομένων 84 δειγμάτων TAKM, **δεν συσχετίστηκε σημαντικά με την επιβίωση ελεύθερης νόσου** (DFS) και κανένας από τους δείκτες που ερευνήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων των CD3, CD8 και Foxp3, δεν συσχετίστηκε με την OS (Tsiatas et al., 2017). Ο ρόλος και η προγνωστική αξία της παρουσίας των Tregs στον καρκινικό ιστό του μαστού και στο στρώμα του στον TAKM εξακολουθεί να συζητείται και χρειάζεται περισσότερη έρευνα (Ge et al., 2019).

Με την απελευθέρωση κυτοκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων, τα μακροφάγα M2, τα κύρια μακροφάγα που σχετίζονται με όγκους (Tumor Associated Macrophages, TAMs), μπορούν να προάγουν την έναρξη, την αγγειογένεση, την διήθηση και τη μετάσταση του καρκίνου του μαστού δημιουργώντας ένα ανοσοκατασταλτικό TME. Σε 278 ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο TAKM, τα TAM που εκφράζουν CD163<sup>+</sup> (δείκτης των μακροφάγων M2) σχετίζονται ισχυρά με ινοβλάστες σχετιζόμενους με τον όγκο και επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση, που συνδέονται με επιθετικές συμπεριφορές και χαμηλό DFS (Zhou et al., 2018; , 2021). Σε 287 ασθενείς με TAKM, μια άλλη κλινική δοκιμή διαπίστωσε ότι η αυξημένη έκφραση των TAMs CD68<sup>+</sup> (δείκτης μακροφάγων M2) σχετίζεται με φτωχή επιβίωση ελεύθερη απομακρυσμένης μετάστασης (DMFS), DFS και OS. Σε ένα TAKM μοντέλο ποντικού, *in vivo* και *ex vivo* έρευνες αποκάλυψαν ότι η παρουσία CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> TAMs σχετίζεται με αναπτυσσόμενα κύτταρα όγκου. Τα TAM αυξάνουν την ενεργοποίηση της οδού MAPK στην κυτταρική σειρά 4T1, σύμφωνα με έρευνα αλληλούχισης του RNA (Zhang et al., 2019). Τα μακροφάγα που κινητοποιούνται από αντιδραστικά είδη οξυγόνου

(ROS) παράγουν έναν ανοσοκατασταλτικού τύπου (M2), αυξάνουν την έκφραση του PD-L1 μέσω NF-Βσηματοδότησης, και απελευθερώνουν ανοσοκατασταλτικές χημειοκίνες όπως ιντερλευκίνη-10 (IL-10), IL-17, IL-4, IL-1, πρωτεΐνη 3 που δεσμεύει τον αυξητικό παράγοντα τύπου ινσουλίνης (IGFBP-3) και προσδέτη χημειοκίνης 1 (μοτίβο C-X-C). Η οδός σηματοδότησης JAK2/STAT3 μπορεί να αυξήσει την έκφραση του PD-L1 στα μακροφάγα CD169+, αλλά όχι στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, επιτρέποντας στον όγκο να διαφύγει από την ανοσολογική επιτήρηση (Roux et al., 2019). Το S100A4 στοιχείο του μικροπεριβάλλοντος που συνδέεται με μετάσταση και φλεγμονή, διεγείρει τον υπότυπο εκ βασιικών κυττάρων προκαλώντας τη διαφοροποίηση και πόλωση του M2, καθώς και αύξηση της απελευθέρωσης προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως IL-8, IL-6, CXCL10, CCL2 και CCL5 (Jing et al., 2020). Επιπλέον, ο κύριος παράγοντας διέγερσης της μετανάστευσης των μακροφάγων, ο παράγοντας διέγερσης αποικιών των μακροφάγων (M-CSF), προωθεί τη συσσώματωση των μακροφάγων M2 αυξάνοντας την επιμήκυνση των ψευδοπόδων. Σε μια σειρά ιστών TAKM, ο αναστολέας της διαφοροποίησης (Inhibitor of Differentiation ID) 4 έχει μια σημαντική σχέση με την έκφραση της πρωτεΐνης CD68 που είναι δείκτης των M2 μακροφάγων. Το ID4 ενεργοποιεί μια αγγειογενετική διαδικασία σε μακροφάγα μέσω παρακρινικής σηματοδότησης, η οποία περιλαμβάνει μείωση των αντι-αγγειογενετικών ομώνυμων miR-15b/107 και αύξηση των mRNAs που σχετίζονται με την αγγειογένεση (Donzelli et al., 2018; Donzelli et al., 2020). Για να οδηγήσουν τα μακροφάγα σε κύτταρα που υπερεκφράζουν και να τα πολώσουν σε προκαρκινικά-TAMs, τα κύτταρα TAKM που υπερεκφράζουν GM-CSF BRCA1-IRIS παράγουν μεγάλες ποσότητες GM-CSF σε συνάρτηση από το NF-Β και το HIF-1 (M2). Η έκφραση του TGF-1 στα TAMs ενεργοποιείται από το GM-CSF με την ενεργοποίηση της σηματοδότησης STAT5, NF-Β ή/και ERK (Zhen et al., 2021).

Τα μυελοειδούς προέλευσης κατασταλτικά κύτταρα, (myeloid derived suppressor cells, MDSC) αποτελούν σημαντικά στοιχεία του δικτύου καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος. Πριν από τη νεοεπικουρική θεραπεία, τα CD33+ MDSCs αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου για προοδευτική νόσο (PD) και σταθερή νόσο (SD) στους ιστούς του καρκίνου του μαστού. Οι τριπλά αρνητικοί όγκοι έχουν υψηλότερη έκφραση MDSC από τους υπόλοιπους υπότυπους του καρκίνου του μαστού και η στρατολόγησή τους στον αρχικό όγκο και στις μεταστάσεις πραγματοποιείται

με την μεσολάβηση της εξαρτώμενης από το Nr63 ενεργοποίηση των χημειοκινών CCL22 και CXCL2 (Kumaretal., 2018). Ο περιορισμός της γλυκόλυσης μειώνει τα MDSC καταστέλλοντας την έκφραση των καρκινικών κοκκιοκυττάρων G-CSF και GM-CSF στο υποξικό TME των ζώων που φέρουν όγκο από την κυτταρική σειρά 4T1, ενώ η υποξία προάγει τον πολλαπλασιασμό των MDSC και αυξάνει την έκφραση PD-L1 στο υποξικό TME των ποντικών που έχουν όγκο από την κυτταρική σειρά 4T1. Η στρατολόγηση, ο πολλαπλασιασμός, ο μεταβολισμός και η ανοσοκατασταλτική ικανότητα των MDSC έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλονται από το μονοκλωνικό αντίσωμα που εξουδετερώνει την IL-8 (HuMax-IL8) και το παραδοσιακό κινέζικο φάρμακο **Prim-O-glucosylcimifugin** (POG) σε μελέτες (Qianetal., 2019;Gaoetal., 2019). Απελευθερώνοντας φλεγμονώδεις κυτοκίνες που προάγουν ένα προ-μεταστατικό TME, στο μοντέλο 4T1 TAKMεπάγονται με επιτυχία αυξημένοι αριθμοί ανοσοκατασταλτικών MDSC. Τα MDSC στο περιφερικό αίμα χωρίζονται σε δύο τύπους: μονοκυτταρικά MDSC (M-MDSC) και κοκκιοκυτταρικά MDSC (G-MDSC). Μετά τη θεραπεία με δοξορουβικίνη και κυκλοφωσφαμίδη, τα επίπεδα G-MDSC εκτοξεύονται ενώ τα M-MDSC πέφτουν κατακόρυφα (Piranliogluetal., 2019). Το CCL5 έχει βρεθεί ότι είναι ένας κρίσιμος ρυθμιστής της ενεργοποίησης του Rb1 και συνδέεται με την ανοσοκατασταλτική δράση των MDSC, ιδιαίτερα στην υποομάδα G-MDSC (Banetal., 2017).

#### 4.1.2. ΑνοσοδιεγερτικόΜικροπεριβάλλον TAKM

Τα φυσικά φονικά κύτταρα (NaturalKillercells, NK), τα οποία είναι ένα είδος κυτταροτοξικού λεμφοκυττάρου, είναι σημαντικά στοιχεία του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος και ο ρόλος τους στην αύξηση της αντικαρκινικής ανοσίας στον TAKM έχει ερευνηθεί εντατικά. Στον πρωτοπαθή πρώιμο όγκο, τα κύτταρα NK είναι άφθονα. Ωστόσο, στις μεταστατικές εστίες η παρουσία τους είναι σπάνια. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα κύτταρα NK παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική επιτήρηση, αλλά ότι το TME καταστέλλει τα κύτταρα NK μετά την ανάπτυξη του καρκίνου. Για να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της αντικαρκινικής δράσης των NK κυττάρων που διηθούν τον όγκο, η διαφυγή από την ενεργόανοσοκαταστολήπου προάγεται μέσω του TME είναι ένας κρίσιμος παράγοντας. Ο Zhang και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν ανοσοϊστοχημεία για να ανιχνεύσουν την έκφραση των NKp46, Foxp3, CD8, CD163 και

Gas6 σε 278 ιστούς TAKM με στόχο την ανάπτυξη ενός προβλεπτικού μοντέλου κινδύνου για τον TAKM. Σε μια πολυπαραγοντική ανάλυση, το στάδιο TNM, τα θετικά κύτταρα Foxp3 και τα προγνωστικά score κινδύνου βρέθηκαν να είναι ανεξάρτητοι δείκτες για OS και για DFS στον TAKM (Tianetal., 2016). Η έκφραση PD-1 σε κύτταρα CD56dimCD16dim/NK αυξάνεται από την IL-18 που προέρχεται από όγκο, η οποία συνδέεται με κακή πρόγνωση στον TAKM. Ο McArdle και οι συνεργάτες του εξέτασαν τον αριθμό των NK κυττάρων, των MDSC, των υποομάδων μονοκυττάρων και του Foxp3+ Tregs στο περιφερικό αίμα 85 ασθενών με καρκίνο του μαστού και ανακάλυψαν ότι ενώ η χημειοθεραπεία δεν είχε καμία επίδραση στο ποσοστό αυτών των ανοσοκυττάρων, τα κύτταρα του περιφερικού αίματος μπορούσαν να υποδείξουν TAKM ασθενείς με υψηλό κίνδυνο υποτροπής μετά από χημειοθεραπεία (Fouldsetal., 2018). Σε σύγκριση με τα κυκλοφορούντα κύτταρα NK, τα κύτταρα NK που διηθούν τον όγκο, φαίνεται να έχουν μειωμένη δραστηριότητα (Choucairetal., 2019· Shenoudaetal., 2017). *In vitro*, κύτταρα NK που λαμβάνονται από ασθενείς με καρκίνο του μαστού ή από υγιείς δότες επιδεικνύουν υψηλή κυτταροτοξικότητα έναντι κυττάρων όγκου που προέρχονται από ασθενείς και *in vivo*, καταστέλλουν την έναρξη και την εξέλιξη του όγκου σε ανοσοκατασταλμένους ποντικούς. NK κύτταρα από περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού που καλλιεργούνται και διευρύνονται *ex vivo*, έχουν κυτταροτοξική δράση έναντι αυτόλογων ή αλλογενών κυττάρων από πρωτοπαθή όγκο του μαστού, τριπλά αρνητικό αλλά και θετικό σε υποδοχέα οιστρογόνου/υποδοχέα προγεστερόνης από PDX. (Shenoudaetal., 2017). Σε 75 ασθενείς με TAKM, η παρουσία κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) κατά την έναρξη της θεραπείας συνδέεται με την παρουσία κυττάρων NK στην περιφέρεια. Τα CTCs σε συνδυασμό με τον αριθμό των περιφερικών NK (CTC-NK) μπορούν να προβλέψουν με μεγαλύτερη ακρίβεια το PFS σε ασθενείς με TAKM (Liuetal., 2018). Τα κύτταρα NK είναι βασικοί πρωταγωνιστές της εξαρτώμενης από αντίσωμα κυτταρικής κυτταροτοξικότητας (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) και κατά συνέπεια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στις θεραπείες που βασίζονται σε αντίσωμα (Ab). Βάση αυτής της συνθήκης τα NK κύτταρα είναι σημαντικά για την ενίσχυση της δραστηριότητας του αντισώματος L-ICN έναντι του ιστικού παράγοντα (Tissue Factor, TF). Ο ιστικός παράγων υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού και ειδικά στον TAKM (50-85%) στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων επί

**παθολογικής νεοαγγειογένεσης και εξετάζεται ως θεραπευτικός στόχος στον TAKM σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες.** Η αποτελεσματικότητα της ανοσοαπόκρισης που εκλύεται από την σύνδεση του L-ICON με τον TF εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό, όπως αναφέρθηκε από τα NK κύτταρα. Τα NK κύτταρα των ασθενών όμως με καρκίνο εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα και γι' αυτό διερευνάται η ενίσχυσή τους μέσω της δημιουργίας **NK-CAR (Chimeric Antigen Receptor)** κυττάρων. Τα NK-CAR μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως μονοθεραπεία (ανοσοθεραπεία) για την στόχευση του ιστικού παράγοντα (TF-NK-CAR) αλλά και για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας του L-ICON. Το σύμπλεγμα ιστικού παράγοντος και του ανοσοσυζεύγματος TF-L-ICON-CAR-NK, εμφανίζει άμεσες κυτταροτοξικές επιδράσεις έναντι των κυττάρων του TAKM. (Hu, et al, 2020). Το **Avelumab, ένα ανθρώπινο IgG anti-PD-L1 mAb**, εμφανίζει και παράπλευρη δραστηριότητα στον TAKM πέραν της οδού PD-1/PD-L1. επάγοντας την ADCC και βελτιώνοντας την κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων μέσω IL-2 και IL-15. (Julia et al., 2018). Το CD85j, ένας ανασταλτικός υποδοχέας που εκφράζεται ουσιαστικά στον TAKM και αναγνωρίζει τόσο τα κλασικά όσο και τα μη κλασικά μόρια HLA-I, μπορεί να εμποδίσει τη δράση της κετουξιμάμπης (cetuximab), αναστολέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα μέσω της λειτουργικής ανεπάρκειας των NK-κυττάρων, ακόμη και όταν οι διεγερτικές κυτοκίνες IL-2 ή IL-15 είναι άφθονες. Ένα άλλο «διφασικό αντίσωμα» - Bispecific Ab (MesobsFab), δοκιμάζεται για την ενίσχυση της κινητοποίησης των NK κυττάρων και την διείσδυσή τους στα καρκινικά κύτταρα. Η στόχευση είναι διπλή, προς την μεσοθηλίνη που είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα του TAKM και προς το CD16 ένα ισχυρό υποδοχέα των NK κυττάρων. Η διπλή αυτή σύνδεση διευκολύνει την πρόσβαση των NK στα καρκινικά κύτταρα για να ασκήσουν την κυτταροτοξική τους δράση. Η προσέγγιση αυτή θα μπορούσε να οδηγήσει σε βιώσιμη ανοσοθεραπεία βασισμένη σε αντισώματα, για ασθενείς με TAKM (Del Bano et al., 2019). Μόρια από υποδοχείς προαγωγής και καταστολής στα NK κύτταρα, αλληλεπιδρούν με προσδέτες στα κύτταρα-στόχους τροποποιώντας τη δραστηριότητα των NK κυττάρων. Ο Transcript-1 που μοιάζει με λεκτίνη (OCIL, CLEC2D, LLT1), είναι ένας προσδέτης που εκφράζεται στον TAKM και αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα NKRP1A των NK κυττάρων αναστέλλοντας την ενεργοποίησή τους. Τα αντισώματα που αναστέλλουν τον LLT1 στον TAKM εμποδίζουν την

αλληλεπίδραση με τον NKR1A και προάγουν τη λύση του TAKM από πρωτογενή κύτταρα NK (Marruffo et al., 2018).

Σε κακοήθειες, τα CD8<sup>+</sup> TILs είναι ο πιο κοινός τύπος κυτταρολυτικών λεμφοκυττάρων. Ο Kronqvist και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν IHC για να ανιχνεύσουν την έκφραση των στρωματικών TILs και των CD8<sup>+</sup> TILs σε 179 ασθενείς με TNBC και διαπίστωσαν ότι η προβλεπτική σημασία των CD8<sup>+</sup> TILs και των TILs διέφερε ανάλογα με την περιοχή του όγκου (Vihervuori et al., 2019). Σε μια μεγάλη ομάδα 12.439 ασθενών με καρκίνο του μαστού, η παρουσία CD8<sup>+</sup> TILs συσχετίστηκε με σημαντική μείωση του σχετικού κινδύνου θανάτου τόσο στους θετικούς σε ER, όσο και στους αρνητικούς σε ER και θετικούς σε HER2 υποτύπους. Ο Ishida και οι συνεργάτες του ανέλυσαν τους υπολειπόμενους όγκους για CD8<sup>+</sup> TIL και Foxp3<sup>+</sup> Tregs σε 131 ασθενείς με TAKM που είχαν υποβληθεί σε σενεοεπικουρική χημειοθεραπεία (NAC) σε τρία διαφορετικά ιδρύματα, καθώς και την ποσοστιαία αλλαγή τους πριν και μετά το NAC. Οι ασθενείς με TAKM και υψηλή συγκέντρωση CD8<sup>+</sup> TILs ή με υψηλή αναλογία CD8/Foxp3 σε υπολειπόμενους όγκους, έχουν σημαντικά καλύτερη επιβίωση ελεύθερη υποτροπής (RFS) και ειδική επιβίωση για τον καρκίνο του μαστού (BCSS), σύμφωνα με τους ερευνητές. (Miyashita, 2015). Σε άλλη μελέτη βρέθηκε σχέση μεταξύ CD8<sup>+</sup> TILs και βελτιωμένων DMFS, DFS και BCSS στους συνολικά 207 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και στους 56 της TAKM ομάδας (Papaioannou et al., 2019). Περισσότερα CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> Tregs και λιγότερα CD8<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup> κυτταροτοξικά T-κύτταρα παρατηρήθηκαν σε καρκινώματα TAKM που υπερεκφράζουν BRCA1-IRIS (IRISOE), υποδεικνύοντας ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ μακροφάγων και κυττάρων IRIS πυροδότησε ανοσοκατασταλτικό TME εντός κακοηθειών TAKM. (Zhenget al., 2021). Σε 52 ασθενείς TAKM που έλαβαν NAC με βάση ταξάνη-ανθρακυκλίνη, TOPOII και CD4<sup>+</sup> TILs συσχετίστηκαν σημαντικά θετικά με CD8<sup>+</sup> TILs και είχαν σημαντικά υψηλότερο DFS 5 ετών, αλλά μόνο οι ασθενείς με υψηλό ποσοστό διήθησης με CD8<sup>+</sup> TILs είχε σημαντικά καλύτερη 5ετή επιβίωση (OS). Η CaMKK2, μια εξαρτώμενη από ασβέστιο/καλμοδουλίνη κινάση που εκφράζεται σε στρωματικά κύτταρα όγκου, μπορεί να διεγείρει την ανάπτυξη του όγκου. Η αναστολή CaMKK2 σταμυελοειδή κύτταρα αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου στον TAKM, ενισχύοντας ανοσοδιεγερτικούς υποπληθυσμούς των μυελοειδών και την ενδοκαρκινική συσσώρευση CD8<sup>+</sup> T κυττάρων (Rao et al., 2017; Racioppo et al., 2019). Ο αναστολέας PARP Olaparib

ενεργοποίησε τα CD8<sup>+</sup> T κύτταρα και αύξησε τη διήθηση του όγκου από αυτά μέσω της οδού cGAS/STING, δικαιολογώντας τον συνδυασμό αναστολέων PARP με ανοσοθεραπεία για τον TAKM (Pantelidouetal., 2019). Σε μια πρόσφατη μελέτη, βρέθηκε ότι η παρουσία των CD8<sup>+</sup> TILs ήταν σημαντική για την αποτελεσματικότητα ενός εμβολίου μολυσμένων κυττάρων (ICV) που αποτελείται από αυτόλογα καρκινικά κύτταρα επιμολυσμένα *in vitro* με τονογονικό ιό Maraba MG1, σε ποντίκι BALB/επου έφερε όγκους 4T1. Τα ανθρώπινα CD8<sup>+</sup> TILs βρέθηκαν να έχουν αυξημένες μεταναστευτικές και πολλαπλασιαστικές ικανότητες μετά την έκθεσή τους σε ICV (Niavaranietal., 2020). Μια σειρά από έρευνες έχουν ρίξει φως στο ρόλο ποικίλων ποσοστών διήθησης των CD8<sup>+</sup> TIL στην ανοσορρύθμιση του TAKM και στην αντικαρκινική τους δράση. Οι Almohanadetal. ανακάλυψαν ότι ένας τύπος «χημειοαπωθητικού» μέσα σε συστάδες καρκινικών κυττάρων και όχι οι πυκνές ίνες κολλαγόνου, εμποδίζει τη διείσδυση των CD8<sup>+</sup> TILs στα καρκινικά κύτταρα, κάτι που μπορεί να συνεπάγεται κακή πρόγνωση στον TAKM ρυθμίζοντας χωροταξικά τους συντελεστές διάχυσης/χημειοταξίας των T κυττάρων μέσω διαφορετικών εξισώσεων. Μέσω της τριπλής συνδυαστικής καταστολής της οδού σηματοδότησης PDGFR/MEK1/2/JAK2 *in vivo* στον TAKM, τα ενδοκαρκινικά CD8<sup>+</sup> TILs βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας (Kalimuthoetal., 2019). Σε μια ομάδα ασθενών με TAKM, οι Gruossoetal. ανακάλυψαν ότι υπήρχαν πολλά διαφορετικά προφίλ εντοπισμού των CD8<sup>+</sup> TILs με διακριτές μετα-υπογραφές και με διαφορετικές προγνωστικές ενδείξεις (Zhengetal., 2021). *In vivo* και *in vitro*, οι Dongetal. εντόπισαν ρυθμιστές της διήθησης του όγκου και της αποκοκκίωσης, με έλεγχο του γονιδιώματος των CD8 T λεμφοκυττάρων με τεχνολογία *genomescaleCRISPRscreens*, υπό συνθήκες ανοσοθεραπείας καρκίνου. Ο έλεγχος *in vivo* αναγνώρισε επιτυχώς γνωστούς στόχους ανοσοθεραπείας, συμπεριλαμβανομένων των PD-1 και Tim-3, καθώς και γονίδια που προηγουμένως ήταν άγνωστα στα T κύτταρα. Το γονίδιο DHX37 που εντοπίστηκε φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας των CD8 T κυττάρων και η επεξεργασία του μέσω τεχνολογίας CRISPRCas9 μπορεί να αποτελέσει έναν θεραπευτικό στόχο ανοσοθεραπείας για την αυξορρύθμιση της δραστηριότητας των CD8<sup>+</sup> TILs.(Dongetal., 2019).

**Τα κλασικά μακροφάγα, γνωστά και ως μακροφάγα φαινοτύπου M1, είναι προφλεγμονώδη μακροφάγα που μπορούν να διεγείρουν την ανοσολογική απόκριση και να καταπολεμήσουν τον καρκίνο. Η πόλωση των μακροφάγων M1 μειώνει την έκφραση**

του nuclearREStcorepressor 1 (CoREST), του LSD1, and της zincfingerproteinSNAIL, σύμφωνα με μελέτες *in vitro* και *in vivo*, και οι αναστολείς LSD1 μπορούν να στοχεύσουν επιτυχώς τόσο τη σύνδεση CoREST όσο και ειδικούς τομείς δέσμησης του LSD1 προάγοντας την αλλαγή των μακροφάγων προς τον φαινότυπο M1 στον TAKM. Μια άλλη μελέτη διαπίστωσε ότι τα μονοκύτταρα πολώθηκαν προς τον υπότυπο M1 αφού εκτέθηκαν σε εμβολιασμό επιμολυσμένων κυττάρων (Infected Cell Vaccination, ICV) (Tan et al., 2019· Zheng et al., 2021).

| Items                 | Clinical Significance          | Involved Mechanisms                                                                                                                                                             |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PD-1/PD-L1            | Paradoxical role in prognosis  | microRNA-200/ZEB1 axis, WNT signaling, loss of PTEN, PI3K signaling, and MUC1-C/MYC/NF-κB pathway                                                                               |
| Foxp3+ Tregs          | Paradoxical role in prognosis  | Notch pathway, IL-35/STAT1/STAT3, secretion of anti-inflammatory mediators such as interleukin                                                                                  |
| M2 macrophages        | Adverse prognostic indicator   | MAPK pathway, NF-κB/PD-L1, release of immunosuppressive chemokines, JAK2/STAT3 signaling pathway, S100A4 activation, angiogenic program, HIF-1α, STAT5, NF-κB and ERK signaling |
| MDSCs                 | Risk factor for PD plus SD     | ΔNp63-dependent activation of the chemokines CXCL2 and CCL22, Glycolysis, hypoxia, secretion of inflammatory cytokines, Rb1 activation                                          |
| NK cells              | Positive prognostic indicator  | ADCC, Lectin-like Transcript-1 activation, bispecific antibody (MesobsFab) modulating chemorepellent inside tumor cell clusters                                                 |
| CD8 <sup>+</sup> TILs | Favorable prognostic indicator | Inhibition of PDGFRβ/MEK1/2/JAK2 signal pathway, distinct metasignatures of CD8 <sup>+</sup> TILs, DHX37/PDCD11/NF-κB                                                           |
| M1 macrophages        | Favorable prognostic indicator | M1 polarization by FAD, CoREST and exposure to cell vaccine (ICV), release of CCL5                                                                                              |

Πίνακας 3. Κλινική σημασία και εμπλεκόμενοι μηχανισμοί ανοσοκυττάρων και δεικτών (Zheng et al, 2021)

## 5. Κλινικές δοκιμές σε εξέλιξη

Οι κλινικές δοκιμές για τον τριπλό αρνητικό καρκίνο του μαστού είναι σημαντικές ερευνητικές μελέτες που αξιολογούν την αποτελεσματικότητα των νέων φαρμακευτικών θεραπειών για τη θεραπεία ασθενών με καρκίνο του μαστού σε οποιοδήποτε στάδιο. Αυτές οι δοκιμές είναι κρίσιμες για τη μεταφορά νέων επιστημονικών ανακαλύψεων σχετικά με την πρόληψη, τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου από τα εργαστήρια και στην κλινική πράξη, όπου οι ασθενείς μπορούν να επωφεληθούν άμεσα από αυτές. Καθ' όλη τη διάρκεια του 2021, ξεκίνησαν μια σειρά από κλινικές μελέτες στον τομέα του καρκίνου του μαστού, συμπεριλαμβανομένης της έρευνας για ένα σύμπλεγμα αντισώματος-φαρμάκου που κατευθύνεται προς τον TROP2, έναν αναστολέα PI3K/mTOR και μια πρώτη δοκιμή στον άνθρωπο που αξιολογεί ένα ογκολυτικό έναντι του καρκίνου.(<https://clinicaltrials.gov>).

### 5.1. Χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού στον TAKM

Η ανοσοθεραπεία ήταν μείζον θέμα στα περισσότερα επιστημονικά συνέδρια το 2020, με τα σημαντικά ευρήματα από πολλές δοκιμές ανοσοθεραπείας στον TAKM να παρουσιάζονται στις ετήσιες συνεδριάσεις τόσο της ASCO όσο και της ESMO. Δεδομένων των ελπιδοφόρων αλλά περιορισμένων αποτελεσμάτων της θεραπείας με αναστολείς σημείου ελέγχου (anti-PD-1/PD-L1) σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία στον προχωρημένο TAKM, διεξάγονται αρκετές δοκιμές για να διαπιστωθεί εάν η εισαγωγή της ανοσοθεραπείας νωρίτερα στην πορεία της νόσου μπορεί να βελτιώσει τα αποτελέσματα χωρίς να μειώσει την ποιότητα της ζωής σε ασθενείς με νόσο πρώιμου σταδίου (Adamsetal., 2018; NCCN, 2021).

**HIMpassion031 είναι μια κλινική δοκιμή φάσης III σε ασθενείς με TAKM πρώιμου σταδίου που αξιολογεί την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των αναστολέων σημείου ελέγχου του ανοσοποιητικού atezolizumab (μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του PDL1) σε συνδυασμό με νεοεπικουρική χημειοθεραπεία.** Οι αναστολείς σημείων ελέγχου λειτουργούν εμποδίζοντας την οδό PD-1/PD-L1 να καταστρέφει το ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο έχει αποδειχθεί ότι είναι ενεργό σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στο

μικροπεριβάλλον ορισμένων κακοηθειών του μαστού, επιτρέποντας στους όγκους να αποφεύγουν την ανίχνευση από το ανοσοποιητικό σύστημα (<https://clinicaltrials.gov>, Perez-Garciaetal., 2020). Η μελέτη αυτή βασίζεται στη μελέτη **IMpassion130**, μέσω της οποίας **εγκρίθηκε το θεραπευτικό σχήμα atezolizumab συν nab-paclitaxel από τον FDA για μεταστατικό TAKM (μTAKM)**. Πριν υποβληθούν σε χειρουργική επέμβαση καρκίνου του μαστού, 333 νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με TAKM τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν είτε ατεζολιζουμάμπη συν χημειοθεραπεία (nab-paclitaxel, δοξορουβικίνη ή κυκλοφωσφαμίδη) είτε τα ίδια φάρμακα χημειοθεραπείας συν ένα εικονικό φάρμακο. Κατά τη στιγμή της επέμβασης, αξιολογήθηκε η ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία. Οι ερευνητές ανέφεραν αύξηση 16% στην πλήρη παθολογοανατομική ανταπόκριση (χωρίς διηθητικό καρκίνο τη στιγμή της επέμβασης) σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αναστολείς σημείου ελέγχου συν χημειοθεραπεία σε σύγκριση με αυτούς που έλαβαν εικονικό φάρμακο στο συνέδριο ESMO του 2020 (<https://clinicaltrials.gov> ; Mittendorfetal., 2020).

Παρουσιάστηκαν επίσης αποτελέσματα σε σχέση με την επίπτωση της θεραπείας στην ικανότητά των ασθενών να εκτελούν φυσιολογικούς ρόλους εντός της οικογένειας ή του χώρου εργασίας τους, τη σωματική, συναισθηματική, κοινωνική και γνωσιακή τους λειτουργία και τη συνολική ποιότητα ζωής που σχετίζεται με την υγεία. Οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αναστολείς σημείων ελέγχου δεν είχαν χειρότερη ποιότητα ζωής ή λειτουργικότητα από εκείνους που έλαβαν μόνο χημειοθεραπεία. Αυτό είναι ένα σημαντικό αποτέλεσμα επειδή οποιαδήποτε θεραπεία μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ποιότητα ζωής και τη λειτουργική κατάσταση του ασθενούς, ειδικά σε ασθενείς του πρώιμου σταδίου καρκίνου του μαστού που δεν έχουν συμπτώματα (Mittendorfetal., 2020).

**Η κλινική μελέτη Keynote-355**, είναι μια τυχαιοποιημένη, διπλή τυφλή μελέτη φάσης III που συγκρίνει τον συνδυασμό ενός άλλου αναστολέα σημείου ελέγχου που ονομάζεται **pembrolizumab (μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του υποδοχέα PD-1)**, με χημειοθεραπεία έναντι εικονικού φαρμάκου συν χημειοθεραπεία, για ασθενείς με προχωρημένο TAKM (με μη εξαιρεσιμη τοπική/περιοχική υποτροπή ή με μεταστατική νόσο). Οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης PD-L1 στους όγκους τους παρουσίασαν κλινικά σχετική βελτίωση στην επιβίωση χωρίς εξέλιξη νόσου με την προσθήκη pembrolizumab σε

σύγκριση με το εικονικό φάρμακο(9,7 μήνες έναντι 5,6 μηνών) (<https://clinicaltrials.gov>; Cortesetal. , 2020).

Παρουσιάστηκαν επίσης αποτελέσματα από μια μελέτη υποομάδας για το όφελος του pembrolizumab σε κάθε ομάδα χημειοθεραπείας (nab-paclitaxel, paclitaxel και gemcitabine/carboplatin) στο SanAntonioBreastCancerSymposium (SABCS). Αν και η δοκιμή δεν σχεδιάστηκε για τη διεξαγωγή στατιστικών συγκρίσεων μεταξύ των ομάδων χημειοθεραπείας, η ανοσοθεραπεία βρέθηκε να έχει επιπλέον όφελος σε όλα τα σχήματα χημειοθεραπείας, παρέχοντας περισσότερη υποστήριξη για τη χρήση της ανοσοθεραπείας anti-PD1, anti-PD-L1 για τη θεραπεία του μΤΑΚΜ (<https://clinicaltrials.gov>, Cortesetal., 2020B).Οι ασθενείς με μεγαλύτερο διάστημα χωρίς νόσο πριν από τη μεταστατική διάγνωση, καθώς και εκείνοι που δεν είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε χημειοθεραπεία, έτειναν να ανταποκρίνονται καλύτερα συνολικά. Με βάση αυτά τα ευρήματα το pembrolizumab έλαβε επιταχυνόμενη έγκριση από τον FDA σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία για ασθενείς με μΤΑΚΜ θετικούς σε PD-L1 που δεν είχαν λάβει προηγουμένως θεραπεία. Αυτός είναι ο δεύτερος αναστολέας σημείων ελέγχου που έχει εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία του μΤΑΚΜ. Εντός του 2022, δεδομένα για τη συνολική επιβίωση θα πρέπει να είναι διαθέσιμα (<https://clinicaltrials.gov>; Javier-Cortezetal., 2020).

## 5.2. Εξέταση αναδυόμενων στόχων για το TNBC

**HIPATunity 130** είναι μια τυχαιοποιημένη δοκιμή φάσης III που συνδυάζει το στοχευμένο φάρμακο **ipatasertib** με **πακλιταξέλη** σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό TNBC που έχουν μεταλλάξεις στην οδό PIK3CA/AKT1/PTEN. Το **ipatasertib**, ένας από του στόματος χορηγούμενος αναστολέας πρωτεϊνικής κινάσης B (proteinkinaseB,PKBή AKT)στοχεύει στην PKB/AKT, η οποία δρα ως κύριος ρυθμιστής αυτής της σηματοδοτικής οδού που προάγει την ανάπτυξη. Σε αντίθεση με τις δοκιμές φάσης II, **LOTUS** και **PAKT**, οι οποίες διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς που έλαβαν ipatasertib ή παρόμοιο αναστολέα AKT συν χημειοθεραπεία είχαν καλύτερη συνολική επιβίωση από εκείνους που έλαβαν χημειοθεραπεία συν ένα εικονικό φάρμακο, η δοκιμή IPATunity δεν

βρήκε διαφορά στην επιβίωση χωρίς εξέλιξη νόσου μεταξύ ασθενών που έλαβαν ipatasertib συν χημειοθεραπεία και εκείνων που έλαβαν χημειοθεραπεία συν ένα εικονικό φάρμακο (<https://clinicaltrials.gov>, Turneretal., 2021, Dentetal., 2020· Schmidetal., 2020).

Ωστόσο, η έρευνα σε σχέση με την επιβίωση βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη, όπως και η ανάλυση βιοδεικτών για τον εντοπισμό ασθενών που θα ωφεληθούν περισσότερο από τη φαρμακευτική αγωγή με ipatasertib. Η ΔρRebeccaDent του Εθνικού Κέντρου Καρκίνου της Σιγκαπούρης σημείωσε ότι υπάρχουν ακόμα πολλά που δεν γνωρίζουμε για τις επιπτώσεις της στόχευσης της AKT, ειδικά στον TAKM, που είναι μια εξαιρετικά ετερογενής ασθένεια με μια ποικιλία μοριακών μονοπατιών, όταν συζητάμε τα ευρήματα και το μέλλον της στοχευμένης αναστολής της οδού AKT, λαμβάνοντας υπόψιν και τα ασυνεπή αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών. Τόνισε ότι η συνεχιζόμενη και μελλοντική έρευνα πιθανότατα θα αποκαλύψει δείκτες που θα βοηθήσουν στον εντοπισμό του κατάλληλου πληθυσμού ασθενών για την αναστολή της οδού AKT (<https://clinicaltrials.gov>, 2022; Turneretal., 2021).

**HASCENT** ήταν μια ανοιχτή τυχαιοποιημένη δοκιμή φάσης III σε ασθενείς με μTAKM που απέτυχαν σε τουλάχιστον δύο χημειοθεραπείες και ολοκληρώθηκε πρόσφατα. Ο στόχος της μελέτης ήταν να αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα του στοχευμένου φαρμάκου **sacituzumabgovitecan**(SG) έναντι της χημειοθεραπείας όσον αφορά την επιβίωση χωρίς εξέλιξη. Η Trop-2, μια πρωτεΐνη που συνδέεται με κακή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού και εμφανίζεται σε υψηλή συγκέντρωση στα κύτταρα του TAKM, στοχεύεται από το SG, έναν συνδυασμό αντισώματος-φαρμάκου. Το SG έλαβε επιταχυνόμενη έγκριση από τον FDA το 2020 για προχωρημένο, ανθεκτικό TAKM με την εμπορική ονομασία **Trodely** με βάση τα αποτελέσματα μιας έρευνας φάσης II που αναφέρθηκε στο The NewEngland Journal of Medicine (<https://clinicaltrial.gov>; Kalinskyetal., 2020).

Η ΔρSaraHurvitz του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνια του Λος Άντζελες παρουσίασε μια ανάλυση υποομάδας που περιελάμβανε 468 ασθενείς (265 που λάμβαναν SG και 233 λάμβαναν χημειοθεραπεία) και συνέκρινε την αποτελεσματικότητα του SG με τη χημειοθεραπεία με βάση την έκφραση του όγκου σε Trop-2 και τη γονιδιακή (κληρονομική) κατάσταση μετάλλαξης BRCA1/BRCA2 του ασθενούς. Οι ασθενείς που έλαβαν SG εμφάνισαν υψηλότερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη (DFS) και συνολική επιβίωση, επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα από την έρευνα φάσης II. Ενώ όλοι οι ασθενείς ωφελήθηκαν

ανεξάρτητα από τα επίπεδα Ttp-2, εκείνοι με τα υψηλότερα επίπεδα είδαν το μεγαλύτερο όφελος, με τα ποσοστά επιβίωσης χωρίς εξέλιξη νόσου αλλά και συνολικής επιβίωσης να εμφανίζονται τριπλάσια σε σχέση με τους ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία, χωρίς ωστόσο τα αποτελέσματα να είναι στατιστικά σημαντικά γιατί η υποομάδα περιελάμβανε έναν μικρό αριθμό ασθενών θετικών σε BRCA και δεν περιλάμβανε ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις (<https://clinicaltrials.gov>; O'Shaughnessy et al., 2022).

## 6. Συμπέρασμα

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνός καρκίνος στις γυναίκες παγκοσμίως με αναφερόμενη συχνότητα εμφάνισης 11,7 τοις εκατό το 2020. Είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Η θνησιμότητα από ασθένειες έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, παρά την αυξανόμενη συχνότητα νέων κρουσμάτων. Το γεγονός αυτό αποδίδεται κυρίως στη διάγνωση της νόσου σε πρώιμο στάδιο με την ευρεία εφαρμογή του προσυμπτωματικού ελέγχου, καθώς και στην πρόοδο στη θεραπευτική προσέγγιση.

ΟΤΑΚΜ είναι μια μορφή καρκίνου του μαστού που αντιπροσωπεύει περίπου το 15% όλων των διηθητικών καρκίνων του μαστού. Λόγω απουσίας των τριών βιοδεικτών που σχετίζονται με άλλες μορφές καρκίνου του μαστού, και που είναι κρίσιμοι για την πρόγνωση και τη θεραπεία, αναφέρεται ως τριπλά αρνητικός. Είναι ένας από τους πιο δύσκολους τύπους καρκίνου του μαστού στην αντιμετώπισή του. Οι ερευνητές, από την άλλη πλευρά, προχωρούν συνεχώς και σταθερά προς πιο αποτελεσματικές θεραπείες. Συνολικά, το 77 τοις εκατό των τριπλά αρνητικών ασθενών με καρκίνο του μαστού επιβιώνουν πέντε χρόνια μετά τη διάγνωσή τους. Χωρίς τον προσδιορισμό συγκεκριμένων δεικτών για αυτόν τον υπότυπο καρκίνου του μαστού, η δυνατότητα χρήσης μιας εξατομικευμένης θεραπευτικής προσέγγισης θα είναι περιορισμένη. Τέτοιοι δείκτες θα επιτρέψουν την εφαρμογή μοναδικής προσαρμοσμένης και αποτελεσματικής θεραπείας σε στοχευμένους πληθυσμούς ασθενών προκειμένου να επιτευχθούν τα καλύτερα αποτελέσματα.

Επιπλέον, το μικροπεριβάλλον του όγκου (TME) παίζει κρίσιμο ρόλο στην ανοσορύθμιση στον τριπλό αρνητικό καρκίνο του μαστού (TAKM). Η ταξινόμηση του TAKM σε υποτύπους προέκυψε από την καλύτερη κατανόηση του ανοσοκατασταλτικού και του ανοσοδιεγερτικού TME. Μπορεί να είμαστε σε θέση να θεραπεύσουμε ασθενείς με TAKM με μεγαλύτερη ακρίβεια στο μέλλον με βάση τον υπότυπό τους. Παράγοντες που μεταβάλλουν το TME, αυξάνουν τη δραστικότητα των ανοσοδιεγερτικών λεμφοκυττάρων, εμποδίζουν την ανοσοκατασταλτική λειτουργία των κυττάρων και αποτρέπουν τις ανασταλτικές οδούς σηματοδότησης είναι όλα πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες. Για τη διερεύνηση νέων και αποτελεσματικών συνδυαστικών σχημάτων για θεραπεία ακριβείας του TAKM, οι ανοσοκατασταλτικές και ανοσοδιεγερτικές λειτουργίες του TME, η συμβολή του στην ταξινόμηση του TAKM σε υποτύπους, η συμμετοχή του στην ανοσορρύθμιση του TAKM και η τροποποίηση του TME που προκαλείται από τη χημειοθεραπεία, είναι όλες σημαντικές πτυχές για την διαχείριση του TAKM. Το TME έχει ανοίξει νέους δρόμους στους ερευνητές για τη διερεύνηση νέων και αποτελεσματικών συνδυαστικών σχημάτων για θεραπεία ακριβείας του TAKM.

Για να μεταφραστούν οι μεταλλάξεις στον TAKM από κληρονομικούς ή και από μεμονωμένους παράγοντες κινδύνου σε προγνωστικούς θεραπευτικούς βιοδείκτες, τα υπάρχοντα υπολογιστικά μοντέλα, οι αλγόριθμοι και οι πόροι για τους γονιδιακούς ελέγχους πρέπει να αλλάξουν γρήγορα για να συμβαδίσουν με την εξέλιξη των θεραπειών για το πρώιμο και τον προχωρημένο TAKM.

Το γεγονός ότι το 14% των γυναικών οποιασδήποτε ηλικίας με TAKM έχουν γενετική παθολογία μετάλλαξη και οι παθολογικές μεταλλάξεις BRCA1, BRCA2, PALB2 και RAD51D συνδέθηκαν με υψηλή συχνότητα TAKM (OR >5,0) υπογραμμίζει την ανάγκη για ευρύτερο γενετικό έλεγχο ανεξάρτητα ηλικίας και οικογενειακού ιστορικού.

Τέλος, για μελλοντικές δοκιμές, ενώ η έκφραση PD-L1 είναι ένας καλά εδραιωμένος βιοδείκτης για την επιλογή ασθενών για θεραπεία με ICIs, υπάρχουν όρια και χρειάζεται περισσότερη έρευνα σε άλλους εναλλακτικούς βιοδείκτες για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης. Επιπλέον, καθώς περισσότεροι ερευνητές εξετάζουν νέες θεραπείες, η έλλειψη συστηματικής συλλογής ιστού όγκου στις περισσότερες δοκιμές που αφορούν ασθενείς με TAKM παραμένει ένα σοβαρό πρόβλημα. Αποτελεί σημαντικό εμπόδιο για μια

μεταφραστική προσέγγιση στον τεράστιο όγκο δεδομένων σε σχέση με τους ασθενείς που έχουν συγκεντρωθεί από κλινικές μελέτες μέχρι σήμερα. Σε αυτήν την εποχή της μεταφραστικής ογκολογίας, το ζήτημα της συλλογής ιστών θα πρέπει να έχει κορυφαία προτεραιότητα σε όλες τις δοκιμές που χρησιμοποιούν ένα στοχευμένο φάρμακο στον TAKM. Για την δημιουργία της εποχής της εξατομικευμένης ιατρικής ή της ιατρικής ακριβείας είναι κρίσιμο να εντοπιστούν υποσύνολα ασθενών που παρουσιάζουν ειδικούς προβλεπτικούς δείκτες για την ανταπόκριση και να αντιμετωπιστούν ανάλογα με την ειδική σωστά εστιασμένη θεραπεία.

## Βιβλιογραφία

- Adams, S., Schmid, P., Rugo, H. S., Winer, E. P., Loirat, D., Awada, A., Cescon, D. W., Iwata, H., Campone, M., Nanda, R., Hui, R., Curigliano, G., Toppmeyer, D., O'Shaughnessy, J., Loi, S., Paluch-Shimon, S., Tan, A. R., Card, D., Zhao, J., Karantza, V. & Cortés, J. (2019) Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(3): 397–404. Doi:10.1093/annonc/mdy517
- Adams, T.A., Vail, P.J., Ruiz, A., Mollae, M., McCue, P.A., Knudsen, E.S. et al. (2018) Composite Analysis of Immunological and Metabolic Markers Defines Novel Subtypes of Triple Negative Breast Cancer. *Mod Pathol* 31:288–98. doi:10.1038/modpathol.2017.126
- Adani-Ifè, A., Amégbor, K., Doh, K. and Darré, T. (2020) Breast cancer in togolese women: immunohistochemistry subtypes. *BMC Women's Health* 20:261. doi: 10.1186/s12905-020-01130-2
- Adel, N.G. (2021) Current Treatment Landscape and Emerging Therapies for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Am J Manag Care*. 27(5):S87-S96. doi:10.37765/ajmc.2021.88626
- Allott, E.H., Shan, Y., Chen, M. et al. (2020) Bimodal age distribution at diagnosis in breast cancer persists across molecular and genomic classifications. *Breast Cancer Res Treat*. 179(1):185-195. doi: 10.1007/s10549-019-05442-2
- Arnaout, A., Lee, J., Gelmon, K., Poirier, B., Lu, F. I., Akra, M., Boileau, J. F., Tonkin, K., Li, H., Illman, C., Simmons, C. & Grenier, D. (2018) Neoadjuvant therapy for breast cancer: updates and proceedings from the Seventh Annual Meeting of the Canadian Consortium for Locally Advanced Breast Cancer. *Current Oncology*, 25(5): e490–e498. Doi:10.3747/co.25.4153
- Ban, Y., Mai, J., Li, X., Mitchell-Flack, M., Zhang, T., Zhang, L., Chouchane, L., Ferrari, M., Shen, H. & Ma, X. (2017) Targeting Autocrine CCL5-CCR5 Axis Reprograms

- Immunosuppressive Myeloid Cells and Reinvigorates Antitumor Immunity. *Cancer research*, 77(11): 2857–2868. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2913
- Bardia, A., Hurvitz, S.A., Tolaney, S.M., et al. (2021) Sacituzumab govitecan in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 384:1529-41. doi:10.1056/NEJMoa2028485
- Bareche, Y., Venet, D., Ignatiadis, M., Aftimos, P., Piccart, M., Rothe, F. & Sotiriou, C. (2018) Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(4), 895–902. doi:10.1093/annonc/mdy024
- Beitsch, P. D., Whitworth, P. W., Hughes, K., Patel, R., Rosen, B., Compagnoni, G., Baron, P., Simmons, R., Smith, L. A., Grady, I., Kinney, M., Coomer, C., Barbosa, K., Holmes, D. R., Brown, E., Gold, L., Clark, P., Riley, L., Lyons, S., Ruiz, A., ... Nussbaum, R. L. (2019) Underdiagnosis of Hereditary Breast Cancer: Are Genetic Testing Guidelines a Tool or an Obstacle?. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37(6): 453–460. doi: 10.1200/JCO.18.01631
- Bense, R. D., Sotiriou, C., Piccart-Gebhart, M. J., Haanen, J., van Vugt, M., de Vries, E., Schröder, C. P., & Fehrmann, R. (2016) Relevance of Tumor-Infiltrating Immune Cell Composition and Functionality for Disease Outcome in Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(1): djw192. Doi:10.1093/jnci/djw192
- Bertucci, F., Finetti, P., Birnbaum, D., & Mamessier, E. (2015). The PD1/PDL1 axis, a promising therapeutic target in aggressive breast cancers. *Oncoimmunology*, 5(3): e1085148. Doi:10.1080/2162402X.2015.1085148
- Bharucha, P., Chiu, K., François, F., Scoot, L. Jessica L., Khorjekar, G. & Tirada, N. (2020) Genetic Testing and Screening Recommendations for Patients with Hereditary Breast Cancer, Published Online May, 29, 2020. doi: 10.1148/rg.2020190181
- Brockwell, N. K., Owen, K. L., Zanker, D., Spurling, A., Rautela, J., Duivenvoorden, H. M., Baschuk, N., Caramia, F., Loi, S., Darcy, P. K., Lim, E., & Parker, B. S. (2017) Neoadjuvant Interferons: Critical for Effective PD-1-Based Immunotherapy in TNBC. *Cancer immunology research*, 5(10): 871–884. Doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0150

- Boughey, J. C., Ballman, K. V., Le-Petross, H. T., McCall, L. M., Mittendorf, E. A., Ahrendt, G. M., Wilke, L. G., Taback, B., Feliberti, E. C., & Hunt, K. K. (2016) Identification and Resection of Clipped Node Decreases the False-negative Rate of Sentinel Lymph Node Surgery in Patients Presenting With Node-positive Breast Cancer (T0-T4, N1-N2) Who Receive Neoadjuvant Chemotherapy: Results From ACOSOG Z1071 (Alliance). *Annals of surgery*, 263(4): 802–807. Doi: 10.1097/SLA.0000000000001375
- Brown, Y., Hua, S. & Tanwar, P.S. (2019) Extracellular matrix-mediated regulation of cancer stem cells and chemoresistance. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 109: 90–104. doi: j.biocel.2019.02.002
- Carey, S. P., Martin, K. E. & Reinhart-King, C. A. (2017) Three-dimensional collagen matrix induces a mechanosensitive invasive epithelial phenotype. *Scientific reports*, 7, 42088. doi: 10.1038/srep42088
- Castagnoli, L., Cancila, V., Cordoba-Romero, S. L., Faraci, S., Talarico, G., Belmonte, B., Iorio, M. V., Milani, M., Volpari, T., Chiodoni, C., Hidalgo-Miranda, A., Tagliabue, E., Tripodo, C., Sangaletti, S., Di Nicola, M. & Pupa, S. M. (2019) WNT signaling modulates PD-L1 expression in the stem cell compartment of triple-negative breast cancer. *Oncogene*, 38(21): 4047–4060. Doi: 10.1038/s41388-019-0700-2
- Castaneda, S. A., & Strasser, J. (2017) Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy. *Surgical oncology clinics of North America*, 26(3): 371–382. Doi: 10.1016/j.soc.2017.01.013
- Choucair, K., Duff, J. R., Cassidy, C. S., Albrethsen, M. T., Kelso, J. D., Lenhard, A., Staats, H., Patel, R., Brunicardi, F. C., Dworkin, L., & Nemunaitis, J. (2019). Natural killer cells: a review of biology, therapeutic potential and challenges in treatment of solid tumors. *Future oncology* (London, England), 15(26), 3053–3069. <https://doi.org/10.2217/fon-2019-0116>
- Cifani, P., Kirik, U., Waldemarson, S. & James, P. (2015) Molecular Portrait of Breast-Cancer-Derived Cell Lines Reveals Poor Similarity with Tumors. *Journal of proteome research*, 14(7): 2819–2827. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00375

- Cortés, J., Lipatov, O., Im, S.A., Gonalves, A. and Winer, E.P. (2019) LBA21 - KEYNOTE-119: Phase III study of pembrolizumab (pembro) vs single-agent chemotherapy (chemo) for metastatic triple negative breast cancer (mTNBC) *Ann Oncol.* 30:v859–v860.doi: 10.1093/annonc/mdz394.010
- Cortes, J., Cescon, D.W., Rugo, H.S. et al (2020) KEYNOTE-355 Investigators. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet.* 396(10265):1817-1828. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32531-9
- Denkert, C., Minckwitz, G., Darb-Esfahani, S., Lederer, B., Heppner, B.I., Weber, K.E. et al. (2018) Tumour-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis in Different Subtypes of Breast Cancer: A Pooled Analysis of 3771 Patients Treated With Neoadjuvant Therapy. *Lancet Oncol* 19:40–50. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30904-X
- Del Bano, J., Florès-Florès, R., Josselin, E., Goubard, A., Ganier, L., Castellano, R., Chames, P., Baty, D., & Kerfelec, B. (2019) A Bispecific Antibody-Based Approach for Targeting Mesothelin in Triple Negative Breast Cancer. *Frontiers in immunology*, 10: 1593. Doi:10.3389/fimmu.2019.01593
- Dent, R., Antunes De Melo e Oliveira, M., Isakoff, S.J. et al (2020) Final results of the double-blind placebo-controlled randomized phase II LOTUS trial of first-line ipatasertib plus paclitaxel for inoperable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. 2020 ESMO Breast Cancer Virtual Meeting.
- Dillon, J.L., Mockus, S.M., Ananda, G., Spoltow, V., Wells, W.A, Tsongalis, G.J. et al. (2016) Somatic Gene Mutation Analysis of Triple Negative Breast Cancers. *Breast* 29:202–7. doi: 10.1016/j.breast.2016.06.018
- DiNome, M.L., Orozco, J.I.J., Matsuba, C., Manughian-Peter, A.O et al. (2019) Clinicopathological Features of Triple-Negative Breast Cancer Epigenetic Subtypes. *Ann Surg Oncol* 26:3344–53. Doi: 10.1245/s10434-019-07565-8
- Dobrolecki, L. E., Airhart, S. D., Alferez, D. G., Aparicio, S., Behbod, F., Bentires-Alj, M., Briskin, C., Bult, C. J., Cai, S., Clarke, R. B., Dowst, H., Ellis, M. J., Gonzalez-Suarez,

- E., Iggo, R. D., Kabos, P., Li, S., Lindeman, G. J., Marangoni, E., McCoy, A., Meric-Bernstam, F. & Lewis, M. T. (2016) Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research. *Cancer metastasis reviews*, 35(4), 547–573. doi:10.1007/s10555-016-9653-x
- Dong, M. B., Wang, G., Chow, R. D., Ye, L., Zhu, L., Dai, X., Park, J. J., Kim, H. R., Errami, Y., Guzman, C. D., Zhou, X., Chen, K. Y., Renauer, P. A., Du, Y., Shen, J., Lam, S. Z., Zhou, J. J., Lannin, D. R., Herbst, R. S. & Chen, S. (2019) Systematic Immunotherapy Target Discovery Using Genome-Scale In Vivo CRISPR Screens in CD8 T Cells. *Cell*, 178(5): 1189–1204.e23. Doi: 10.1016/j.cell.2019.07.044
- Donzelli, S., Milano, E., Pruszko, M., Sacconi, A., Masciarelli, S., Iosue, I., Melucci, E., Gallo, E., Terrenato, I., Mottolese, M., Zylicz, M., Zylicz, A., Fazi, F., Blandino, G. & Fontemaggi, G. (2018) Expression of ID4 protein in breast cancer cells induces reprogramming of tumour-associated macrophages. *Breast cancer research : BCR*, 20(1): 59. Doi: 10.1186/s13058-018-0990-2
- Donzelli, S., Sacconi, A., Turco, C., Gallo, E., Milano, E., Iosue, I., Blandino, G., Fazi, F., & Fontemaggi, G. (2020) Paracrine Signaling from Breast Cancer Cells Causes Activation of ID4 Expression in Tumor-Associated Macrophages. *Cells*, 9(2): 418. Doi: 10.3390/cells9020418
- Duan, Q., Zhang, H., Zheng, J. and Zhang, L. (2020) Turning cold into hot: firing up the tumor microenvironment. *Trends Cancer*. 6(7):605-618. doi: 10.1016/j.trecan.2020.02.022
- Eftekhari, R., Esmaeili, R., Mirzaei, R., Bidad, K., de Lima, S., Ajami, M., Shirzad, H., Hadjati, J., & Majidzadeh-A, K. (2017) Study of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Cancer cell international*, 17, 123. doi: 10.1186/s12935-017-0492-9
- Elkhalifa, D., Alali, F., Al Moustafa, A. E. & Khalil, A. (2019) Targeting triple negative breast cancer heterogeneity with chalcones: a molecular insight. *Journal of drug targeting*, 27(8): 830–838. doi: 10.1080/1061186X.2018.1561889
- Elsawaf, Z., Sinn, H.P., Rom, J., Bermejo, J.L., Schneeweiss, A. and Aulmann, S. (2013) Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer Are Associated With Distinct

- Morphological Changes and Clinical Behaviour. *Breast* 22:986–92. doi: 10.1016/j.breast.2013.05.012
- Ensenyat-Mendez<sup>1</sup>, M., Llinàs-Arias, P., Orozco, J., et al. (2021) Current Triple-Negative Breast Cancer Subtypes: Dissecting the Most Aggressive Form of Breast Cancer. *Frontiers in Oncology* 11. doi: 10.3389/fonc.2021.681476
- Fayanju, O., Park K.U. & Lucci, A. (2017) Molecular Genomic Testing for Breast Cancer: Utility for Surgeons, Published online 2017 Nov 20. doi: 10.1245/s10434-017-6254-z
- FDA (2021) FDA issues alert about efficacy and potential safety concerns with atezolizumab in combination with paclitaxel for treatment of breast cancer. FDA. September 8, 2020. Accessed May 2, 2022. Available at: [www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-issues-alert-about-efficacy-and-potential-safety-concerns-atezolizumab-combination-paclitaxel](http://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-issues-alert-about-efficacy-and-potential-safety-concerns-atezolizumab-combination-paclitaxel)
- Foulds, G. A., Vadakekolathu, J., Abdel-Fatah, T., Nagarajan, D., Reeder, S., Johnson, C., Hood, S., Moseley, P. M., Chan, S., Pockley, A. G., Rutella, S. & McArdle, S. (2018) Immune-Phenotyping and Transcriptomic Profiling of Peripheral Blood Mononuclear Cells From Patients With Breast Cancer: Identification of a 3 Gene Signature Which Predicts Relapse of Triple Negative Breast Cancer. *Frontiers in immunology*, 9: 2028. Doi:10.3389/fimmu.2018.02028
- Gao, W., Zhang, X., Yang, W., Dou, D., Zhang, H., Tang, Y., Zhong, W., Meng, J., Bai, Y., Liu, Y., Yang, L., Chen, S., Liu, H., Yang, C. & Sun, T. (2019) Prim-O-glucosylcimifugin enhances the antitumour effect of PD-1 inhibition by targeting myeloid-derived suppressor cells. *Journal for immunotherapy of cancer*, 7(1): 231. doi:10.1186/s40425-019-0676-z
- Garpis, N., Damaskos, C., Garpis, A., Nikolettos, K. et al. (2020) Molecular Classification and Future Therapeutic Challenges of Triple-negative Breast Cancer. *In Vivo*. 34(4):1715-1727. doi: 10.21873/invivo.11965.
- Garrido-Castro, A.C., Lin, N.U. and Polyak, K. (2019) Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discov.* 9(2):176-198. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1177.

- Ge, Y., Böhm, H. H., Rathinasamy, A., Xydia, M., Hu, X., Pincha, M., Umansky, L., Breyer, C., Hillier, M., Bonertz, A., Sevko, A., Domschke, C., Schuetz, F., Frebel, H., Dettling, S., Herold-Mende, C., Reissfelder, C., Weitz, J., Umansky, V., &Beckhove, P. (2019) Tumor-Specific Regulatory T Cells from the Bone Marrow Orchestrate Antitumor Immunity in Breast Cancer. *Cancer immunology research*, 7(12): 1998–2012. Doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0763
- Gong, Y., Ji, P., Yang, Y.S., Xie, S., Yu, T.J., Xiao, Y. et al. (2021) Metabolic-Pathway-Based Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer Reveals Potential Therapeutic Targets. *Cell Metab* 33:51–64.e9. doi:10.1016/j.cmet.2020.10.012
- Goto, W., Kashiwagi, S., Takada, K., Asano, Y., Takahashi, K., Fujita, H., Takashima, T., Tomita, S., Hirakawa, K. &Ohira, M. (2018) Significance of intrinsic breast cancer subtypes on the long-term prognosis after neoadjuvant chemotherapy. *Journal of translational medicine*, 16(1): 307. Doi: 10.1186/s12967-018-1679-0
- Gupta, S., Roy, A., &Dwarakanath, B. S. (2017). Metabolic Cooperation and Competition in the Tumor Microenvironment: Implications for Therapy. *Frontiers in oncology*, 7: 68. Doi:10.3389/fonc.2017.00068
- Hannemann, J., Kristel, P., van Tinteren, H., Bontenbal, M., van Hoesel, Q.G., Smit, W.M., Nooij, M.A. et al. (2006) Molecular subtypes of breast cancer and amplification of topoisomerase II alpha: predictive role in dose intensive adjuvant chemotherapy. *British journal of cancer*, 95(10), 1334–1341. doi:10.1038/sj.bjc.6603449
- Hargadon, K.M., Johnson, C.E. and Williams, C.J. (2018) Immune checkpoint blockade therapy for cancer: an overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int Immunopharmacol*. 62:29-39. doi: 10.1016/j.intimp.2018.06.001
- Harisi, R. &Jeney, A. (2015) Extracellular matrix as target for antitumor therapy. *OncoTargets and therapy*, 8, 1387–1398. doi: 10.2147/OTT.S48883
- Hashemi, V., Maleki, L. A., Esmaily, M., Masjedi, A., Ghalamfarsa, G., Namdar, A., Yousefi, M., Yousefi, B., &Jadidi-Niaragh, F. (2020). Regulatory T cells in breast cancer as a potent anti-cancer therapeutic target. *International immunopharmacology*, 78: 106087. Doi:10.1016/j.intimp.2019.106087

- He, Y., Jiang, Z., Chen, C. and Wang, X. (2018) Classification of Triple-Negative Breast Cancers Based on Immunogenomic Profiling. *J Exp Clin Cancer Res* 37:327–13. doi: 10.1186/s13046-018-1002-1
- Helwick, C. (2021) IMpassion131: No benefit for atezolizumab plus paclitaxel in triple-negative breast cancer. *The ASCO Post*. October 10, 2020. Accessed May 10, 2022. Available at: [ascopost.com/issues/october-10-2020/impassion131-no-benefit-for-atezolizumab-plus-paclitaxel-in-triple-negative-breast-cancer/](https://ascopost.com/issues/october-10-2020/impassion131-no-benefit-for-atezolizumab-plus-paclitaxel-in-triple-negative-breast-cancer/)
- Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A. V., Budinská, E., Byrne, A. T., Caldas, C., Clarke, R. B., de Jong, S., Jonkers, J., Mælandsmo, G. M., Roman-Roman, S., Seoane, J., Trusolino, L., & Villanueva, A. (2014) Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer discovery*, 4(9): 998–1013. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0001
- Hovick, S. R., Yamasaki, J. S., Burton-Chase, A. M., & Peterson, S. K. (2015) Patterns of family health history communication among older African American adults. *Journal of health communication*, 20(1), 80–87. doi: 10.1080/10810730.2014.908984
- Hu Z. (2020) Tissue factor as a new target for CAR-NK cell immunotherapy of triple-negative breast cancer. *Scientific reports*, 10(1): 2815. Doi: 10.1038/s41598-020-59736-3
- Hu, C., Hart, S. N., Gnanaolivu, R., Huang, H., Lee, K. Y., Na, J., Gao, C., Lilyquist, J., Yadav, S., Boddicker, N. J., Samara, R., Klebba, J., Ambrosone, C. B., Anton-Culver, H., Auer, P., Bandera, E. V., Bernstein, L., Bertrand, K. A., Burnside, E. S., Carter, B. D. & Couch, F. J. (2021) A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *The New England journal of medicine*, 384(5), 440–451. doi: 10.1056/NEJMoa2005936
- Huang, C. Y., Chiang, S. F., Ke, T. W., Chen, T. W., Lan, Y. C., You, Y. S., Shiau, A. C., Chen, W. T., & Chao, K. (2018) Cytosolic high-mobility group box protein 1 (HMGB1) and/or PD-1+ TILs in the tumor microenvironment may be contributing prognostic biomarkers for patients with locally advanced rectal cancer who have undergone neoadjuvant chemoradiotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 67(4): 551–562. Doi: 10.1007/s00262-017-2109-5

- Jakuboski, S.H., McDonald, J.A. & Terry, M.B. (2022) Do current family history-based genetic testing guidelines contribute to breast cancer health inequities?.*npj Breast Cancer* 8, 36. doi: 10.1038/s41523-022-00391-4
- Jézéquel, P., Kerdraon, O., Hondermarck, H., Guérin-Charbonnel, C., Lasla, H., Gouraud, W. et al. (2019) Identification of Three Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer With Potential Therapeutic Implications. *Breast Cancer Res.* 21:65–14. doi: 10.1186/s13058-019-1148-6
- Jiagge, E., Oppong, J. K., Bensenhaver, J., Aitpillah, F., Gyan, K., Kyei, I., Osei-Bonsu, E., Adjei, E., Ohene-Yeboah, M., Toy, K., Jackson, K. E., Akpaloo, M., Acheampong, D., Antwi, B., Agyeman, F. O., Alhassan, Z., Fondjo, L. A., Owusu-Afriyie, O., Brewer, R. N., Gyamfuah, A., & Awuah, B. (2016) Breast Cancer and African Ancestry: Lessons Learned at the 10-Year Anniversary of the Ghana-Michigan Research Partnership and International Breast Registry. *Journal of global oncology*, 2(5): 302–310. doi: 10.1200/JGO.2015.002881
- Jiang, Y.Z., Ma, D., Suo, C., Shi, J., Xue, M. et al. (2019) Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies. *Cancer Cell.* 35(3):428-440.e5. doi: 10.1016/j.ccell.2019.02.001.
- Jing, W., Guo, X., Wang, G., Bi, Y., Han, L., Zhu, Q., Qiu, C., Tanaka, M., & Zhao, Y. (2020) Breast cancer cells promote CD169<sup>+</sup> macrophage-associated immunosuppression through JAK2-mediated PD-L1 upregulation on macrophages. *International immunopharmacology*, 78: 106012. Doi: 10.1016/j.intimp.2019.106012
- Johansson, A.L.V., Trewin, C.B., Hjerkind, K.V., Ellingjord-Dale, M., Johannesen, T.B. and Ursin, G. (2019) Breast cancer-specific survival by clinical subtype after 7 years follow-up of young and elderly women in a nationwide cohort. *Int J Cancer.* 144(6):1251-1261. doi: 10.1002/ijc.31950.
- Juliá, E. P., Amante, A., Pampena, M. B., Mordoh, J., & Levy, E. M. (2018). Avelumab, an IgG1 anti-PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitor, Triggers NK Cell-Mediated Cytotoxicity and Cytokine Production Against Triple Negative Breast Cancer Cells. *Frontiers in immunology*, 9: 2140. Doi:10.3389/fimmu.2018.02140

- Kalimutho, M., Sinha, D., Mittal, D., Srihari, S., Nanayakkara, D., Shafique, S., Raninga, P., Nag, P., Parsons, K. & Khanna, K. K. (2019) Blockade of PDGFR $\beta$  circumvents resistance to MEK-JAK inhibition via intratumoral CD8<sup>+</sup> T-cells infiltration in triple-negative breast cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR, 38(1), 85. Doi: 10.1186/s13046-019-1075-5
- Kalinsky, K., Diamond, J. R., Vahdat, L. T., Tolaney, S. M., Juric, D., O'Shaughnessy, J., Moroosse, R. L., Mayer, I. A., Abramson, V. G., Goldenberg, D. M., Sharkey, R. M., Maliakal, P., Hong, Q., Goswami, T., Wegener, W. A. & Bardia, A. (2020) Sacituzumab govitecan in previously treated hormone receptor-positive/HER2-negative metastatic breast cancer: final results from a phase I/II, single-arm, basket trial. *Annals of oncology* : official journal of the European Society for Medical Oncology, 31(12): 1709–1718. Doi:10.1016/j.annonc.2020.09.004
- Keenan, T.E. and Tolaney, S.M. (2020) Role of immunotherapy in triple-negative breast cancer. *J Natl ComprCancNetw*. 18(4):479-489. doi: 10.6004/jnccn.2020.7554
- King, T. A., & Morrow, M. (2015) Surgical issues in patients with breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. *Nature reviews. Clinical oncology*, 12(6): 335–343. Doi:10.1038/nrclinonc.2015.63
- Korde, L.A, Somerfield, M., Carey, L., Crews, J., Denduluri, N., E. Hwang, E.S., Khan, S.A, Loibl, S., Morris, E.A., Perez, A., Regan, M.M., Spears, P., Sudheendra, P., Symmans F., Yung, R., Harvey, B. & Hershman, D. (2021) Neoadjuvant Chemotherapy, Endocrine Therapy, and Targeted Therapy for Breast Cancer: ASCO Guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 39(13): 1485-1505. Doi: 10.1200/JCO.20.03399
- Kumar, S., Wilkes, D. W., Samuel, N., Blanco, M. A., Nayak, A., Alicea-Torres, K., Gluck, C., Sinha, S., Gabrilovich, D. & Chakrabarti, R. (2018)  $\Delta$ Np63-driven recruitment of myeloid-derived suppressor cells promotes metastasis in triple-negative breast cancer. *The Journal of clinical investigation*, 128(11): 5095–5109. Doi:10.1172/JCI99673
- Lehmann Br. ,1 A. Bauer J,1 Chen Xi en , Sanders M, Chakravarthy B, Shyr Yu,2 and Jennifer A. Pietenpol J(2011)1Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and

- preclinical models for selection of targeted therapies *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7):2750–2767. Doi:10.1172/JCI45014
- Li, H., Liu, Z.Y., Wu, N., Chen, Y.C., Cheng, Q. and Wang, J. (2020) PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. *Mol Cancer*. 19(1):107. doi: 10.1186/s12943-020-01227-0
- Li, C.H, Karantza V., Aktan, G. and Lala, M. (2019B) Current treatment landscape for patients with locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer: a systematic literature review. *Breast Cancer Research* 21: 143. doi: 10.1186/s13058-019-1210-4
- Li, S., Li, X., Yang, S., Pi, H., Li, Z. et al. (2021) Proteomic Landscape of Exosomes Reveals the Functional Contributions of CD151 in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cell Proteomics*. 20:100121. doi: 10.1016/j.mcpro.2021.100121
- Lima, S. M., Kehm, R. D., & Terry, M. B. (2021). Global breast cancer incidence and mortality trends by region, age-groups, and fertility patterns. *EClinicalMedicine* 38, 100985. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.100985
- Lips, E. H., Mulder, L., Oonk, A., van der Kolk, L. E., Hogervorst, F. B., Imholz, A. L., Wesseling, J., Rodenhuis, S., & Nederlof, P. M. (2013) Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *British journal of cancer*, 108(10), 2172–2177. Doi:10.1038/bjc.2013.14
- Liu, Y.R, Jiang, Y.Z., Xu, X.E., Yu, K.D et al. (2016) Comprehensive Transcriptome Analysis Identifies Novel Molecular Subtypes and Subtype-Specific RNAs of Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Cancer Res* 18:33–10. doi: 10.1186/s13058-016-0690-8
- Liu, Z., Li, M., Jiang, Z. and Wang, X. (2018) A Comprehensive Immunologic Portrait of Triple-Negative Breast Cancer. *Translational oncology* 11(2):311–329. doi: 10.1016/j.tranon.2018.01.011
- Liu, X., Ran, R., Shao, B., Rugo, H. S., Yang, Y., Hu, Z., Wei, Z., Wan, F., Kong, W., Song, G., Jiang, H., Liang, X., Zhang, R., Yan, Y., Xu, G., & Li, H. (2018). Combined peripheral natural killer cell and circulating tumor cell enumeration enhance prognostic efficiency in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Chinese journal of*

- cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu, 30(3): 315–326.  
Doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2018.03.04
- Loi, S., Drubay, D., Adams, S., Pruner, G., Francis, P.A. et al. (2019) Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol* 37:559–69. doi:10.1200/JCO.18.01010
- Lovitt, C. J., Shelper, T. B. & Avery, V. M. (2018) Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC cancer*, 18(1), 41.doi10.1186/s12885-017-3953-6
- Lyons, T.G. (2019) Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 20(11):82. doi: 10.1007/s11864-019-0682-x.
- Malandrino, A., Mak, M., Kamm, R. D.&Moeendarbary, E. (2018) Complex mechanics of the heterogeneous extracellular matrix in cancer. *Extreme Mechanics Letters*, 21, 25–34.doi: 10.1016/j.eml.2018.02.003
- Mamounas E. P. (2015) Impact of neoadjuvant chemotherapy on locoregional surgical treatment of breast cancer. *Annals of surgical oncology*, 22(5):1425–1433. Doi:10.1245/s10434-015-4406-6
- Manahan, E. R., Kuerer, H. M., Sebastian, M., Hughes, K. S., Boughey, J. C., Euhus, D. M., Boolbol, S. K., & Taylor, W. A. (2019) Consensus Guidelines on Genetic` Testing for Hereditary Breast Cancer from the American Society of Breast Surgeons. *Annals of surgical oncology*, 26(10), 3025–3031. doi: 10.1245/s10434-019-07549-8
- Manning, H. C., Buck, J. R. & Cook, R. S. (2016) Mouse Models of Breast Cancer: Platforms for Discovering Precision Imaging Diagnostics and Future Cancer Medicine. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 57 Suppl 1(Suppl 1), 60S–8S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.157917>
- Marra, A., Viale, G. &Curigliano, G. (2019). Recent advances in triple negative breast cancer: the immunotherapy era. *BMC medicine*, 17(1): 90. Doi:10.1186/s12916-019-1326-5
- Marrufo, A. M., Mathew, S. O., Chaudhary, P., Malaer, J. D., Vishwanatha, J. K., & Mathew, P. A. (2018) Blocking LLT1 (CLEC2D, OCIL)-NKR1A (CD161) interaction enhances

- natural killer cell-mediated lysis of triple-negative breast cancer cells. *American journal of cancer research*, 8(6), 1050–1063.
- Masuda, H., Qi, Y., Liu, S., Hayashi, N., Kogawa, T. et al. (2017) Reverse Phase Protein Array Identification of Triple-Negative Breast Cancer Subtypes and Comparison With mRNA Molecular Subtypes. *Oncotarget* 8:70481–95. 10.18632/oncotarget.19719
- Matossian, M.D., Giardina, A.A., Wright, M.K., Elliott, S., Loch, M.M., Nguyen, K., Zea, A.H., Lau, F.H., Moroz, K., Riker, A.I., Jones, S.D., Martin, E.C., Bunnell, B.A., Miele, L., Collins-Burow, B.M. & Burow, M. E. (2020) Patient-Derived Xenografts as an Innovative Surrogate Tumor Model for the Investigation of Health Disparities in Triple Negative Breast Cancer. *Women's health reports (New Rochelle, N.Y.)*, 1(1): 383–392. doi: 10.1089/whr.2020.0037
- Miles, D.W., Gligorov, J., André, F. et al. (2020) Primary results from IMpassion131, a double-blind placebo-controlled randomised phase III trial of first-line paclitaxel (PAC) ± atezolizumab (atezo) for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC). *Ann Oncol*. 31:S1142-S1215. doi: 10.1016/j.annonc.2020.08.2243
- Mills, M. N., Yang, G. Q., Oliver, D. E., Liveringhouse, C. L., Ahmed, K. A., Orman, A. G., Laronga, C., Hoover, S. J., Khakpour, N., Costa, R. & Diaz, R. (2018) Histologic heterogeneity of triple negative breast cancer: A National Cancer Centre Database analysis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 98, 48–58. doi: 10.1016/j.ejca.2018.04.011
- Mittendorf, E. A., Zhang, H., Barrios, C. H., Saji, S., Jung, K. H., Hegg, R., Koehler, A., Sohn, J., Iwata, H., Telli, M. L., Ferrario, C., Punie, K., Penault-Llorca, F., Patel, S., Duc, A. N., Liste-Hermoso, M., Maiya, V., Molinero, L., Chui, S. Y., & Harbeck, N. (2020) Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 396(10257), 1090–1100. Doi: 10.1016/S0140-6736(20)31953-X

- Miyashita, M., Sasano, H., Tamaki, K., Hirakawa, H., Takahashi, Y., Nakagawa, S., Watanabe, G., Tada, H., Suzuki, A., Ohuchi, N. & Ishida, T. (2015) Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Breast cancer research : BCR*, 17(1): 124. Doi:10.1186/s13058-015-0632-x
- Murayama, T. & Gotoh, N. (2019) Patient-Derived Xenograft Models of Breast Cancer and Their Application. *Cells*, 8(6): 621. <https://doi.org/10.3390/cells8060621>
- Murciano-Goroff, Y.R., Warner, A.B. and Wolchok, J.D. (2020) The future of cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations. *Cell Res.* 30(6):507-519. doi: 10.1038/s41422-020-0337-2
- NCCN Guidelines (2021) Breast Cancer. National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology. Version 2.2021. Accessed May 1, 2021. Available at: [www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/breast.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf)
- Niavarani, S. R., Lawson, C., Boudaud, M., Simard, C., & Tai, L. H. (2020) Oncolytic vesicular stomatitis virus-based cellular vaccine improves triple-negative breast cancer outcome by enhancing natural killer and CD8<sup>+</sup> T-cell functionality. *Journal for immunotherapy of cancer*, 8(1): e000465. Doi:10.1136/jitc-2019-000465
- Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., Cheang, M. et al. (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 5367–5374. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0220
- O'Reilly, D., Sendi, M.A. and Kelly, C.M. (2021). Overview of recent advances in metastatic triple negative breast cancer. *World journal of clinical oncology* 12(3): 164–182. doi: 10.5306/wjco.v12.i3.164
- Orozco, J.I.J., Knijnenburg, T.A., Manughian-Peter, A.O., Salomon, M.P., Barkhoudarian, G., Jalas, J.R., et al. (2018) Epigenetic Profiling for the Molecular Classification of Metastatic Brain Tumors. *Nat Commun* 9:4627–14. doi: 10.1038/s41467-018-06715-y
- O'Shaughnessy, J., Brufsky, A., Rugo, H. S., Tolaney, S. M., Punie, K., Sardesai, S., Hamilton, E., Loirat, D., Traina, T., Leon-Ferre, R., Hurvitz, S. A., Kalinsky, K., Bardia, A.,

- Henry, S., Mayer, I., Zhu, Y., Phan, S., & Cortés, J. (2022) Analysis of patients without and with an initial triple-negative breast cancer diagnosis in the phase 3 randomized ASCENT study of sacituzumabgovitecan in metastatic triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 10.1007/s10549-022-06602-7. Advance online publication. Doi:10.1007/s10549-022-06602-7
- Pal, T., Agnese, D., Daly, M., La Spada, A., Litton, J., Wick, M., Klugman, S., Esplin, E. D., Jarvik, G. P., & Professional Practice and Guidelines Committee (2020) Points to consider: is there evidence to support BRCA1/2 and other inherited breast cancer genetic testing for all breast cancer patients? A statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 22(4): 681–685. doi: 10.1038/s41436-019-0712-x
- Pantelidou, C., Sonzogni, O., De OliveriaTaveira, M., Mehta, A. K., Kothari, A., Wang, D., Visal, T., Li, M. K., Pinto, J., Castrillon, J. A., Cheney, E. M., Bouwman, P., Jonkers, J., Rottenberg, S., Guerriero, J. L., Wulf, G. M. & Shapiro, G. I. (2019) PARP Inhibitor Efficacy Depends on CD8+ T-cell Recruitment via Intratumoral STING Pathway Activation in BRCA-Deficient Models of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer discovery*, 9(6): 722–737. Doi:10.1158/2159-8290.CD-18-1218
- Papaoiannou, E., Sakellakis, M., Melachrinou, M., Tzoracoleftherakis, E., Kalofonos, H. & Kourea, E. (2019) A Standardized Evaluation Method for FOXP3+ Tregs and CD8+ T-cells in Breast Carcinoma: Association With Breast Carcinoma Subtypes, Stage and Prognosis. *Anticancer research*, 39(3): 1217–1232. Doi: 10.21873/anticancer.13232
- Park, J.H., Ahn, J.H. and Kim, S.B. (2018) How shall we treat early triple-negative breast cancer (TNBC): from the current standard to upcoming immuno-molecular strategies. *ESMO open*, 3(Suppl 1), e000357. doi:10.1136/esmoopen-2018-000357
- Pérez-García, J., Soberino, J., Racca, F., Gion, M., Stradella, A. & Cortés, J. (2020) Atezolizumab in the treatment of metastatic triple-negative breast cancer. *Expert opinion on biological therapy*, 20(9), 981–989. Doi: 10.1080/14712598.2020.1769063

- Piranlioglu, R., Lee, E., Ouzounova, M., Bollag, R. J., Vinyard, A. H., Arbab, A. S., Marasco, D., Guzel, M., Cowell, J. K., Thangaraju, M., Chadli, A., Hassan, K. A., Wicha, M. S., Celis, E. & Korkaya, H. (2019) Primary tumor-induced immunity eradicates disseminated tumor cells in syngeneic mouse model. *Nature communications*, 10(1): 1430. doi:10.1038/s41467-019-09015-1
- Qian, X., Zhang, Q., Shao, N., Shan, Z., Cheang, T., Zhang, Z., Su, Q., Wang, S. & Lin, Y (2019). Respiratory hyperoxia reverses immunosuppression by regulating myeloid-derived suppressor cells and PD-L1 expression in a triple-negative breast cancer mouse model. *American journal of cancer research*, 9(3), 529–545.
- Racioppi, L., Nelson, E. R., Huang, W., Mukherjee, D., Lawrence, S. A., Lento, W., Masci, A. M., Jiao, Y., Park, S., York, B., Liu, Y., Baek, A. E., Drewry, D. H., Zuercher, W. J., Bertani, F. R., Businaro, L., Geradts, J., Hall, A., Means, A. R., Chao, N. & McDonnell, D. P. (2019) CaMKK2 in myeloid cells is a key regulator of the immune-suppressive microenvironment in breast cancer. *Nature communications*, 10(1): 2450. Doi:10.1038/s41467-019-10424-5
- Rao, N., Qiu, J., Wu, J., Zeng, H., Su, F., Qiu, K., Wu, J., & Yao, H. (2017) Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and the Expression of Topoisomerase II $\alpha$  in the Prediction of the Clinical Outcome of Patients with Triple-Negative Breast Cancer after Taxane-Anthracycline-Based Neoadjuvant Chemotherapy. *Chemotherapy*, 62(4): 246–255. Doi:10.1159/000470900
- Roux, C., Jafari, S. M., Shinde, R., Duncan, G., Cescon, D. W., Silvester, J., Chu, M. F., Hodgson, K., Berger, T., Wakeham, A., Palomero, L., Garcia-Valero, M., Pujana, M. A., Mak, T. W., McGaha, T. L., Cappello, P., & Gorrini, C. (2019) Reactive oxygen species modulate macrophage immunosuppressive phenotype through the up-regulation of PD-L1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(10): 4326–4335. Doi: 10.1073/pnas.1819473116
- Rowley, S. M., Mascarenhas, L., Devereux, L., Li, N., Amarasinghe, K. C., Zethoven, M., Lee, J., Lewis, A., Morgan, J. A., Limb, S., Young, M. A., James, P. A., Trainer, A. H., & Campbell, I. G. (2019) Population-based genetic testing of asymptomatic women for breast and ovarian cancer susceptibility. *Genetics in medicine : official journal of the*

American College of Medical Genetics, 21(4): 913–922. doi: 10.1038/s41436-018-0277-0

Rugo, H.S., Schmid, P., Cescon, D.W. et al. (2020) Additional efficacy endpoints from the phase 3 KEYNOTE-355 study of pembrolizumab plus chemotherapy vs placebo plus chemotherapy as first-line therapy for locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer. Presented at the (virtual) San Antonio Breast Cancer Symposium. Abstract GS3-01.

Sabour, L., Maryam Sabour, M. &Ghorbian, S. (2017) Clinical Applications of NextGeneration Sequencing in Cancer Diagnosis. *Pathol Oncol Res*;23(2):225-234, doi: 10.1007/s12253-016-0124-z.

Schedin, P. & Borges, V. (2009) Breaking down barriers: the importance of the stromal microenvironment in acquiring invasiveness in young women's breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 11(2), 102. doi:10.1186/bcr2235

Schmid, P., Adams, S., Rugo, S. (2018) Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 379:2108-2121. doi: 10.1056/NEJMoa1809615

Schmid, P., Abraham, J., Chan, S., Wheatley, D., Brunt, A. M., Nemsadze, G., Baird, R. D., Park, Y. H., Hall, P. S., Perren, T., Stein, R. C., Mangel, L., Ferrero, J. M., Phillips, M., Conibear, J., Cortes, J., Foxley, A., de Bruin, E. C., McEwen, R., Stetson, D.& Turner, N. C. (2020) Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(5): 423–433. Doi:10.1200/JCO.19.00368

Schmid P, Rugo HS, Adams S, et al (2020) IMpassion130 Trial Investigators. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 21(1):44-59. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30689-8

- Scurr, M. et al. (2017) Low-dose cyclophosphamide induces antitumor T-cell responses, which associate with survival in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 23(22), 6771–6780. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0895
- Shenouda, M. M., Gillgrass, A., Nham, T., Hogg, R., Lee, A. J., Chew, M. V., Shafaei, M., Aarts, C., Lee, D. A., Hassell, J., Bane, A., Dhesy-Thind, S. & Ashkar, A. A. (2017) Ex vivo expanded natural killer cells from breast cancer patients and healthy donors are highly cytotoxic against breast cancer cell lines and patient-derived tumours. *Breast cancer research : BCR*, 19(1): 76. Doi:10.1186/s13058-017-0867-9
- Shi, Y., Jin, J., Ji, W. et al. (2018) Therapeutic landscape in mutational triple negative breast cancer. *Mol Cancer* 17:99. Doi:10.1186/s12943-018-0850-9
- Siddharth, S. & Sharma, D. (2018) Racial Disparity and Triple-Negative Breast Cancer in African-American Women: A Multifaceted Affair between Obesity, Biology, and Socioeconomic Determinants. *Cancers*, 10(12): 514. doi: 10.3390/cancers10120514
- Shah, C., Bauer-Nilsen, K., McNulty, R. H. & Vicini, F. (2020) Novel radiation therapy approaches for breast cancer treatment. *Seminars in oncology*, 47(4): 209–216. Doi:10.1053/j.seminoncol.2020.05.003
- Simmons, C.E., Brezden-Masley, C., McCarthy, J., McLeod, D. and Joy, A.A. (2020) Positive progress: current and evolving role of immune checkpoint inhibitors in metastatic triple-negative breast cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 12:1-15. doi: 10.1177/1758835920909091
- Sleeboom, J., EslamiAmirabadi, H., Nair, P., Sahlgren, C. M., & den Toonder, J. (2018) Metastasis in context: modeling the tumor microenvironment with cancer-on-a-chip approaches. *Disease models & mechanisms*, 11(3), dmm033100. doi: 10.1242/dmm.033100
- Spitale, A., Mazzola, P., Soldini, D., Mazzucchelli, L. and Bordoni, A. (2009) Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Annals of Oncology* 20(4): 628-635. doi:10.1093/annonc/mdn675

- Stirzaker, C., Zotenko, E., Song, J.Z. et al. (2015) Methylome Sequencing in Triple-Negative Breast Cancer Reveals Distinct Methylation Clusters With Prognostic Value. *Nat Commun* 6:5899–11. doi:10.1038/ncomms6899
- Sulaiman, A. & Wang, L. (2017) Bridging the divide: preclinical research discrepancies between triple-negative breast cancer cell lines and patient tumors. *Oncotarget*, 8(68): 113269–113281. doi:10.18632/oncotarget.22916
- Tan, A., Tu, W., McCuaig, R., Hardy, K., Donovan, T., Tsimbalyuk, S., Forwood, J. K. & Rao, S. (2019) Lysine-Specific Histone Demethylase 1A Regulates Macrophage Polarization and Checkpoint Molecules in the Tumor Microenvironment of Triple-Negative Breast Cancer. *Frontiers in immunology*, 10: 1351. Doi:10.3389/fimmu.2019.01351
- Taylor, N. A., Vick, S. C., Iglesia, M. D., Brickey, W. J., Midkiff, B. R., McKinnon, K. P., Reisdorf, S., Anders, C. K., Carey, L. A., Parker, J. S., Perou, C. M., Vincent, B. G., & Serody, J. S. (2017) Treg depletion potentiates checkpoint inhibition in claudin-low breast cancer. *The Journal of clinical investigation*, 127(9): 3472–3483. Doi: 10.1172/JCI90499
- Telli, M., Gradishar, W. & Ward, J. (2019) NCCN Guidelines Updates. *Breast Cancer*, 17:5.5. doi: 10.6004/jnccn.2019.5006
- Thompson, T., Seo, J., Griffith, J., Baxter, M., James, A., & Kaphingst, K. A. (2015) The context of collecting family health history: examining definitions of family and family communication about health among African American women. *Journal of health communication*, 20(4), 416–423. doi:10.1080/10810730.2014.977466
- Tian, W., Wang, L., Yuan, L., Duan, W., Zhao, W., Wang, S. & Zhang, Q. (2016) A prognostic risk model for patients with triple negative breast cancer based on stromal natural killer cells, tumor-associated macrophages and growth-arrest specific protein 6. *Cancer science*, 107(7): 882–889. Doi:10.1111/cas.12964
- Tolaney, S. M., Kalinsky, K., Kaklamani, V. G. et al. (2020) A phase Ib/II study of eribulin (ERI) plus pembrolizumab (PEMBRO) in metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC) (ENHANCE 1). *J Clin Oncol*. 38(suppl 15):1015. doi: 10.1200/JCO.2020.38.15\_suppl.1015

- Tsang, J.Y.S. and Tse, G.M. (2020) Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv AnatPathol* 27(1):27-35. doi: 10.1097/PAP.0000000000000232.
- Tsiatas, M., Kalogeras, K. T., Manousou, K., Wirtz, R. M., Gogas, H., Veltrup, E., Zagouri, F., Lazaridis, G., Koutras, A., Christodoulou, C., Pentheroudakis, G., Petraki, C., Bafaloukos, D., Pectasides, D., Kosmidis, P., Samantas, E., Karanikiotis, C., Papakostas, P., Dimopoulos, M. A. & Fountzilas, G. (2018) Evaluation of the prognostic value of CD3, CD8, and FOXP3 mRNA expression in early-stage breast cancer patients treated with anthracycline-based adjuvant chemotherapy. *Cancer medicine*, 7(10): 5066–5082. Doi: 10.1002/cam4.1730
- Turner, N., Dent, R. A., O'Shaughnessy, J., Kim, S. B., Isakoff, S. J., Barrios, C., Saji, S., Bondarenko, I., Nowecki, Z., Lian, Q., Reilly, S. J., Hinton, H., Wongchenko, M. J., Kovic, B., Mani, A., & Oliveira, M. (2022) Ipatasertib plus paclitaxel for PIK3CA/AKT1/PTEN-altered hormone receptor-positive HER2-negative advanced breast cancer: primary results from cohort B of the IPATunity130 randomized phase 3 trial. *Breast cancer research and treatment*, 191(3): 565–576. Doi:10.1007/s10549-021-06450-x
- Varn, F. S., Mullins, D. W., Arias-Pulido, H., Fiering, S., & Cheng, C. (2017). Adaptive immunity programmes in breast cancer. *Immunology*, 150(1): 25–34. Doi:10.1111/imm.12664
- Vihervuori, H., Autere, T. A., Repo, H., Kurki, S., Kallio, L., Lintunen, M. M., Talvinen, K. & Kronqvist, P. (2019) Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8+ T cells predict survival of triple-negative breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 145(12):3105–3114. Doi:10.1007/s00432-019-03036-5
- Voorwerk, L., Slagter, M., Horlings, H. M., Sikorska, K., van de Vijver, K. K., de Maaker, M., Nederlof, I., Kluin, R., Warren, S., Ong, S., Wiersma, T. G., Russell, N. S., Lalezari, F., Schouten, P. C., Bakker, N., Ketelaars, S., Peters, D., Lange, C., van Werkhoven, E., van Tinteren, H., ... Kok, M. (2019) Immune induction strategies in metastatic triple-negative breast cancer to enhance the sensitivity to PD-1 blockade: the TONIC trial. *Nature medicine*, 25(6): 920–928. Doi: 10.1038/s41591-019-0432-4

- WCRF (2022) Breast Cancer Statistics. World Cancer Research Fund International. Accessed April 27, 2022. Available at: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/breast-cancer-statistics/>
- WHO (2021) Breast Cancer. World Health Organization. Accessed April 27, 2022. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Wild, C.P., Weiderpass, E., Stewart, B.W, editors (2020) World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://publications.iarc.fr/586>
- Yadav, S. & Couch, F.J. (2019) Germline Genetic Testing for Breast Cancer Risk: The Past, Present, and Future. American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting, 39, 61–74. doi: 10.1200/EDBK\_238987
- Yadav, S., Hu, C., Hart, S. N., Boddicker, N., Polley, E. C., Na, J., Gnanaolivu, R., Lee, K. Y., Lindstrom, T., Armasu, S., Fitz-Gibbon, P., Ghosh, K., Stan, D. L., Pruthi, S., Neal, L., Sandhu, N., Rhodes, D. J., Klassen, C., Peethambaram, P. P., Haddad, T. C., ... Couch, F. J. (2020) Evaluation of Germline Genetic Testing Criteria in a Hospital-Based Series of Women With Breast Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(13), 1409–1418. doi: 10.1200/JCO.19.02190
- Yamaguchi, R. & Perkins, G. (2018) Animal models for studying tumor microenvironment (TME) and resistance to lymphocytic infiltration. *Cancer biology & therapy*, 19(9), 745–754. doi: 10.1080/15384047.2018.1470722
- Yin, L., Duan, J.J., Bian, X.W. et al. (2020) Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res* 22: 61. doi:10.1186/s13058-020-01296-5 Zheng, H.; Siddharth, S.; Parida, S.; Wu, X.; Sharma, D. Tumor Microenvironment: Key Players in Triple Negative Breast Cancer Immunomodulation. *Cancers* 2021, 13, 3357. <https://doi.org/10.3390/cancers1313>

- Zhang, Q., Le, K., Xu, M., Zhou, J., Xiao, Y., Yang, W., Jiang, Y., Xi, Z., & Huang, T. (2019) Combined MEK inhibition and tumor-associated macrophages depletion suppresses tumor growth in a triple-negative breast cancer mouse model. *International immunopharmacology*, 76: 105864. Doi: 10.1016/j.intimp.2019.105864
- Zhang, L., Wang, X. I., Ding, J., Sun, Q., & Zhang, S. (2019). The predictive and prognostic value of Foxp3+/CD25+ regulatory T cells and PD-L1 expression in triple negative breast cancer. *Annals of diagnostic pathology*, 40: 143–151. Doi:10.1016/j.anndiagpath.2019.04.004
- Zhang, Y., Yang, S., Yang, Y., & Liu, T. (2019). Resveratrol induces immunogenic cell death of human and murine ovarian carcinoma cells. *Infectious agents and cancer*, 14: 27. Doi:10.1186/s13027-019-0247-4
- Zheng, H., Siddharth, S., Parida, S., Wu, X. & Sharma, D. (2021) Tumor Microenvironment: Key Players in Triple Negative Breast Cancer Immunomodulation. *Cancers*, 13(13): 3357. doi: 10.3390/cancers13133357
- Zhou, J., Wang, X. H., Zhao, Y. X., Chen, C., Xu, X. Y., Sun, Q., Wu, H. Y., Chen, M., Sang, J. F., Su, L., Tang, X. Q., Shi, X. B., Zhang, Y., Yu, Q., Yao, Y. Z., & Zhang, W. J. (2018) Cancer-Associated Fibroblasts Correlate with Tumor-Associated Macrophages Infiltration and Lymphatic Metastasis in Triple Negative Breast Cancer Patients. *Journal of Cancer*, 9(24): 4635–4641. Doi: 10.7150/jca.28583

<https://clinicaltrials.gov>

NCCN guidelines (breast cancer):<https://www.nccn.org>