

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”



DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICHERCA IN

TERAPIE AVANZATE BIOMEDICHE E CHIRURGICHE

XXXIV CICLO

**L'inibizione di PI3K nel trattamento del tumore della
mammella HER2-positivo e mutazione del gene *PIK3CA***

Relatore:
Ch.mo Prof.
Sabino De Placido

Candidato:
Maria Letizia Cataldo

Anno Accademico 2020/2021

Indice

Abstract	4
1. Epidemiologia del tumore della mammella	7
1.1 Incidenza, prevalenza e mortalità	7
1.2 Fattori di rischio	7
1.3 Prevenzione	10
1.3.1 Chemioprevenzione	10
1.3.2 Screening senologico	11
2. Diagnosi, stadiazione e fattori prognostico-predittivi del tumore della mammella	12
2.1 Presentazione clinica	12
2.2 Diagnosi	12
2.3 Stadiazione	14
2.4 Fattori prognostici e fattori predittivi	14
3. Terapia del tumore della mammella	18
3.1 Terapia locoregionale	18
3.1.1 Chirurgia	18
3.1.2 Radioterapia	19
3.2 Terapia farmacologica	20
3.2.1 Chemioterapia	22
3.2.2 Ormonoterapia	23
3.2.3 Terapie biologiche	24
4. Tumore della mammella HER2+	26
4.1 Recettore HER2	26
4.2 Trattamento farmacologico del tumore della mammella HER2+	26

4.3 Resistenza alla terapia anti-HER2	28
4.4 La via di trasduzione del segnale PI3K-AKT-mTOR nel carcinoma mammario	29
5. Studio	33
5.1 Background e razionale	33
5.2 Materiali e Metodi	34
6. Risultati	44
7. Discussione	60
Bibliografia	65

Abstract:

Background: HER2 is amplified or overexpressed in around 20% of breast cancers. HER2-targeted therapies including anti-HER2 antibodies, tyrosine kinase inhibitors, and antibody-drug conjugates have significantly improved prognosis of patients with HER2+ breast cancer. However, *de novo* and acquired resistance to anti-HER2 treatment remains a problem. Activating mutations in *PIK3CA*, the gene encoding the p110 α catalytic subunit of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), are reported in ~30% of HER2+ breast cancers. Preclinical and clinical evidences showed that *PIK3CA* mutations are associated with resistance to anti-HER2 therapies and poor prognosis. Here, we investigated the *in vitro* and *in vivo* antitumor efficacy of the alpha-specific PI3K inhibitor alpelisib alone or in combination with anti-HER2 therapy using a panel of HER2+ breast cancer cell lines. We also generated models of acquired resistance to alpelisib to investigate mechanisms underlying resistance to the alpha-specific PI3K inhibition.

Materials and Methods: *PIK3CA* mutant (HCC1954, KPL4, JMT1) and *PIK3CA* wild-type (BT474 and SKBR3) HER2+ breast cancer cell lines were used. The HCC1954 and KPL4 cells were chronically exposed to increasing concentrations of alpelisib or alpelisib + trastuzumab to generate derivatives with acquired resistance to alpelisib (AR) and alpelisib + trastuzumab (ATR). Targeted exon-sequencing of 409 cancer-related genes was performed in HCC1954, KPL4 and their AR and ATR derivatives. The transcriptomic profiles of HCC1954, KPL4 and their AR and ATR derivatives were determined by RNA-seq. Cell growth was assessed by MTT and clonogenic assay. Changes in the protein levels of key PI3K-pathway components were assessed by Western blot. Gene expression, cellular and patients' data from the Cancer Dependency Map (DepMap) and KMPlot datasets were interrogated.

Results: HER2+ breast cancer cell lines harboring activating mutations in *PIK3CA* were less sensitive to single or dual anti-HER2 blockade compared to *PIK3CA* wild-type cells. Alpelisib treatment resulted in a dose-dependent inhibition of the growth of cells with or without *PIK3CA* mutations and enhanced the antitumor efficacy of anti-HER2 therapies *in vitro*. In addition, alpelisib strongly delayed tumor growth of HCC1954 *xenografts in vivo*. We next investigated the underlying molecular changes in our acquired AR and ATR cell lines compared to native cells. Functional annotation of the significantly differentially expressed genes suggested the common activation of biological processes associated with oxidation reduction, cell proliferation, immune response and RNA synthesis in resistant models. Eight commonly upregulated genes (log2 fold-change >1, FDR<0.05) across AR and ATR models were identified.

Conclusions: Our findings support the use of an alfa-selective PI3K inhibitor to overcome the therapeutic limitations associated with single- or dual HER2 blockade in *PIK3CA*-mutant HER2+ breast cancer. Future studies are warranted to confirm the potential role of candidate genes/pathways in resistance to alpelisib.

Background: Il recettore di tipo 2 per il fattore di crescita epidermico umano (HER2) è amplificato o sovraespresso in circa il 20% dei tumori al seno. Le terapie mirate contro l'HER2, tra cui gli anticorpi monoclonali, gli inibitori tirosino-chinasici ed i coniugati farmaco-anticorpo anti-HER2, hanno migliorato significativamente la prognosi delle pazienti con carcinoma mammario HER2+. Tuttavia, la resistenza *de novo* e acquisita al trattamento anti-HER2 rimane un problema. Le mutazioni attivanti *PIK3CA*, il gene che codifica per la subunità catalitica p110 α della fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K), sono riscontrate in circa il 30% dei tumori al seno HER2+. Evidenze precliniche e cliniche hanno mostrato che le mutazioni di *PIK3CA* sono associate a resistenza alle terapie anti-HER2 e prognosi infausta. In questo studio, abbiamo valutato l'efficacia antitumorale *in vitro* ed *in vivo* dell'inibitore alfa-specifico della PI3K alpelisib, da solo o in combinazione con la terapia anti-HER2, utilizzando un pannello di linee cellulari di cancro al seno HER2+. Abbiamo inoltre generato modelli di resistenza acquisita ad alpelisib per poter studiare i meccanismi molecolari alla base della resistenza all'inibizione di PI3K alfa-specifica.

Materiali e metodi: Sono state utilizzate linee cellulari di carcinoma mammario HER2+ *PIK3CA* mutate (HCC1954, KPL4, JMT1) e *PIK3CA* wild-type (BT474 e SKBR3). Le cellule HCC1954 e KPL4 sono state esposte cronicamente a concentrazioni crescenti di alpelisib o alpelisib + trastuzumab per generare modelli di resistenza acquisita ad alpelisib (AR) e ad alpelisib + trastuzumab (ATR). È stato eseguito il sequenziamento degli esoni di 409 geni correlati al cancro nelle linee cellulari HCC1954, KPL4 e nei loro derivati AR e ATR. I profili trascrittomici di HCC1954, KPL4 e dei loro derivati AR e ATR sono stati determinati mediante RNA-seq. La crescita cellulare è stata valutata mediante MTT e saggio clonogenico. I cambiamenti nei livelli proteici delle componenti chiave della via di segnale della PI3K sono stati valutati mediante Western blot. Sono stati analizzati i dati di espressione genica, cellulari e clinici presenti nei database “Cancer Dependency Map (DepMap)” e “KMPlot”.

Risultati: Le linee cellulari di carcinoma mammario HER2+ con mutazioni attivanti *PIK3CA* sono risultate meno sensibili al singolo o doppio blocco anti-HER2 rispetto alle cellule *PIK3CA* wild-type. Il trattamento con alpelisib ha determinato un'inibizione dose-dipendente della crescita delle cellule con o senza mutazioni *PIK3CA* e ha potenziato l'efficacia antitumorale delle terapie anti-HER2 *in vitro*. Inoltre, alpelisib ha fortemente ritardato la crescita tumorale di xenotrapianti di cellule HCC1954 *in vivo*. Successivamente abbiamo analizzato i profili molecolari dei nostri modelli cellulari sensibili e resistenti ad alpelisib. L'annotazione funzionale dei geni differenzialmente espressi tra modelli sensibili e resistenti ha evidenziato l'attivazione comune di processi biologici associati alla ossido-riduzione, alla proliferazione cellulare, alla risposta immunitaria e alla sintesi dell'RNA nei modelli resistenti. Sono stati inoltre identificati otto geni up-regolati (\log_2 fold-change >1, FDR<0,05) in tutti i modelli AR e ATR.

Conclusioni: I nostri risultati supportano l'uso di un inibitore PI3K alfa-selettivo per superare i limiti terapeutici associati al singolo o doppio blocco HER2 nel carcinoma mammario HER2+/*PIK3CA*-mutato. Ulteriori studi saranno necessari per confermare il potenziale ruolo di geni/pathway coinvolti nella resistenza ad alpelisib.

1. Epidemiologia del tumore della mammella

1.1 Incidenza, prevalenza e mortalità

Il carcinoma mammario è la seconda neoplasia più comune al mondo, la più frequente nel sesso femminile, ed è responsabile del 14,3% delle morti per neoplasia nelle donne [1]. Si stima che una donna su 8 sia destinata ad ammalarsi di carcinoma mammario nel corso della propria vita con un numero di nuovi casi per anno nel mondo di circa 1,7 milioni. Secondo l'ultima pubblicazione AIOM-AIRTUM I numeri del cancro in Italia, il carcinoma della mammella rappresenta la neoplasia femminile più frequente in tutte le classi di età [2]. In tutto il mondo, dopo decenni durante i quali si è assistito ad un costante incremento dell'incidenza, ascrivibile ad un insieme di fattori tra cui l'implementazione dei programmi di screening mammografici, l'utilizzo di terapie ormonali sostitutive e l'aumentata incidenza di obesità, è stata osservata a partire dagli anni 2000 una riduzione dei tassi di incidenza che si sono mantenuti stabili negli anni successivi [1,2]. La significativa riduzione dell'incidenza mostrata negli USA, prevalentemente per i tumori ormono-responsivi, è stata messa in relazione alla minor prescrizione di terapia endocrina sostitutiva in menopausa [3]. In Italia tale iniziale calo di incidenza, considerando la minore diffusione della terapia ormonale sostitutiva in menopausa, viene principalmente riferita all'effetto di saturazione dell'incidenza grazie alla diffusione dei programmi di screening mammografico [4]. La sopravvivenza a 5 anni delle donne con tumore della mammella è pari all'89%. La sopravvivenza dopo 10 anni dalla diagnosi è superiore all'80% [1,2].

1.2 Fattori di rischio

I tassi di incidenza sono differenti nelle diverse parti del mondo e questa eterogeneità riflette la diversa disponibilità di metodi diagnostici, e soprattutto la diversa influenza di fattori di rischio. Sono stati identificati diversi fattori di aumentato rischio:

Età: Il rischio di sviluppare il carcinoma della mammella aumenta con l'aumentare dell'età [5].

Questa correlazione con l'età potrebbe essere legata al continuo stimolo proliferativo ormonale che subisce l'epitelio mammario nel corso degli anni unito al progressivo danno del DNA e all'accumularsi di alterazioni epigenetiche. La curva di incidenza cresce esponenzialmente sino agli anni della menopausa (50-55 anni) e poi rallenta con un *plateau* dopo la menopausa, per poi riprendere a salire dopo i 60 anni. Questo specifico andamento è legato sia alla storia endocrinologica della donna sia alla presenza dei programmi di screening mammografico.

Sesso: Il carcinoma della mammella è molto più frequente nelle donne rispetto agli uomini (<1% dei casi), anche se, a causa dell'aumento dell'obesità e dell'aspettativa di vita degli uomini, la frequenza in questo sesso sta aumentando [6].

Razza: il tumore della mammella è molto più frequente nelle donne caucasiche rispetto alle donne afroamericane, anche se queste ultime sviluppano forme più aggressive (ad esempio tumori triplo negativi) associate ad una maggiore mortalità. Il tasso di sopravvivenza per le donne afroamericane è inferiore del 9%-10% rispetto alle donne bianche [7].

Familiarità e fattori ereditari: Circa un quarto delle pazienti affette da neoplasia mammaria presentano una storia familiare per tale patologia. Le donne con un parente di primo grado che ha sviluppato un tumore al seno hanno il doppio delle probabilità di ammalarsi e questa probabilità aumenta se i parenti di primo grado sono più di uno [8]. Anche se la maggior parte di carcinomi mammari sono forme sporadiche, il 5-10% risulta essere legato a fattori ereditari, 1/4 dei quali associati a varianti patogenetiche dei geni *BRCA1* e *BRCA2*. Nelle donne portatrici di varianti patogenetiche del gene *BRCA1* il rischio di ammalarsi nel corso della vita di carcinoma mammario è pari al 65% e nelle donne con varianti patogenetiche del gene *BRCA2* al 40% [9]. Altri geni implicati nelle forme di predisposizione ereditaria del tumore mammario includono *PALB2*, *ATM*, *TP53*, *PTEN* e *CHECK2*.

Fattori ormonali-riproduttivi: una lunga durata del periodo fertile, con un menarca precoce ed una menopausa tardiva e quindi con una più lunga esposizione dell'epitelio ghiandolare agli stimoli proliferativi estrogenici; la nulliparità; il mancato allattamento al seno; l'assunzione della terapia endocrina sostitutiva in post-menopausa rappresentano fattori di rischio per lo sviluppo di carcinoma mammario [10]. Diversi studi hanno dimostrato una forte associazione tra il rischio di sviluppare il tumore mammario ed il tempo di esposizione agli ormoni sessuali, in particolare agli estrogeni che sono coinvolti nella proliferazione dell'epitelio mammario. Proprio per questo motivo il menarca precoce e la menopausa tardiva sono fattori predisponenti. Livelli circolanti di ormoni steroidi sessuali possono essere più fortemente associati al rischio di tumori ormono-responsivi. Quindi anche la terapia ormonale sostitutiva (HRT) con estrogeni e progestinici aumenta il rischio di sviluppare cancro al seno soprattutto in caso di uso prolungato [10]. Inoltre il rischio è maggiore per le donne che effettuano la terapia ormonale subito dopo l'inizio della menopausa rispetto a quelle che la iniziano in un momento più tardivo. Il rischio è maggiore per formulazioni che contengono sia estrogeni che progesterone rispetto a quelle che contengono solo estrogeni [10].

Fattori dietetici e metabolici: l'elevato consumo di alcool e di grassi animali ed il basso consumo di fibre vegetali sembrerebbero essere associati ad un aumentato rischio di carcinoma mammario [11]. Stanno inoltre assumendo importanza l'obesità e la sindrome metabolica. L'obesità è un fattore di rischio riconosciuto, legato all'eccesso di tessuto adiposo che in post-menopausa rappresenta la principale fonte di sintesi di estrogeni circolanti (grazie all'espressione negli adipociti dell'aromatasi, enzima in grado di convertire gli androgeni surrenalici in estrogeni), con conseguente stimolo ormonale sulla ghiandola mammaria. La sindrome metabolica aumenta il rischio di malattie cardiovascolari ma anche di carcinoma mammario: si suppone che nei soggetti con sindrome metabolica esista una resistenza all'insulina a cui l'organismo reagisce con una iperinsulinemia compensatoria. L'insulina

agisce sul recettore di membrana del fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1R), attivando segnali intracellulari fondamentali per la crescita neoplastica (RAS-RAF-MAPK e PI3K-AKT-mTOR). Tali pathway sono in grado di attivare in cross-talk la via di crescita fondamentale delle cellule mammarie, cioè quella del recettore per gli estrogeni, il quale potrà esplicare i suoi effetti indipendentemente dall'interazione con il ligando (“*attività genomica non classica*” del recettore per gli estrogeni). Queste vie trasduzionali sono inoltre coinvolte nei meccanismi di resistenza acquisita all'ormonoterapia e alle terapie anti-HER2 [11].

Pregresso trattamento radioterapico: un rischio elevato di carcinoma mammario è stato riportato in donne di giovane età che hanno ricevuto una radioterapia “a mantellina” per il trattamento del linfoma di Hodgkin [12].

1.3 Prevenzione

1.3.1 Chemioprevenzione

La maggior parte dei fattori di rischio comportamentali ed ambientali per il carcinoma della mammella è associata a modesti rischi relativi di sviluppare la malattia. Non vi è da attendersi, quindi, una significativa riduzione dell'incidenza del carcinoma della mammella legata ad una prevenzione primaria rivolta all'eliminazione dei fattori di rischio. Numerosi studi, invece, si sono posti l'obiettivo di individuare le basi per una prevenzione primaria caratterizzata dall'assunzione di sostanze ad azione anticancerogena (chemioprevenzione). Due modulatori selettivi per il recettore degli estrogeni (*selective estrogen receptor modulator*, SERM), il tamoxifene ed il raloxifene, hanno dimostrato di ridurre l'incidenza del carcinoma mammario ormonosensibile [13]. Inoltre, anche gli inibitori dell'aromatasi di ultima generazione (anastrozolo, letrozolo ed exemestane), esercitando un'azione antiestrogenica indiretta soprattutto in postmenopausa, hanno dimostrato una riduzione dell'incidenza del carcinoma della mammella [14,15]. In considerazione di tali studi, il NICE (*National Institute for Health and Clinical Excellence*) ha elaborato linee guida per l'indicazione al trattamento preventivo

con tamoxifene in premenopausa e con anastrozolo in postmenopausa. Il trattamento dovrebbe essere offerto alle donne con elevato rischio, definito come probabilità di ammalarsi di tumore della mammella nei futuri 5 anni $\geq 1.66\%$ secondo il modello di Gail o con un rischio $>8\%$ a 10 anni nella decade 40-50 o $>30\%$ nell'arco della vita (considerata fino a 85 anni) secondo il modello Tyrer- Cuzick [16].

1.3.2 Screening senologico

Lo screening è una strategia di prevenzione secondaria periodica rivolta alle donne asintomatiche al fine di effettuare la diagnosi di carcinoma mammario in una fase subclinica di malattia. La diagnosi precoce permetterà di offrire trattamenti meno aggressivi e ridurre la mortalità della malattia. La mammografia rappresenta ad oggi il test più efficace di screening [17]. Essa è raccomandata con cadenza biennale nelle donne tra i 50 e i 69 anni (il Piano Nazionale Italiano Prevenzione suggerisce alle Regioni di considerare l'estensione dell'invito alle donne nelle fasce 45-49 anni e 70-74 anni). Nella fascia d'età 40-49 anni la mammografia andrebbe eseguita personalizzando la cadenza sulla base dei fattori di rischio. La riduzione della mortalità per le donne con età 50-69 è stata stimata dalla IARC (*International Agency for Research on Cancer*) pari al 23% per le tutte le donne invitate (aderenti e non) e del 40% per le donne aderenti allo screening. Nelle donne ad alto rischio, per importante storia familiare di carcinoma mammario o perché portatrici di varianti patogenetiche dei geni *BRCA1/2*, i controlli strumentali dovrebbero iniziare all'età di 25 anni o 10 anni prima dell'età di insorgenza del tumore nel familiare più giovane. La risonanza magnetica mammaria annuale con mezzo di contrasto trova indicazione specifica come metodica di screening nelle donne portatrici di varianti patogenetiche dei geni *BRCA1/2* [18,19].

2. Diagnosi, stadiazione e fattori prognostico-predittivi del tumore della mammella

2.1 Presentazione clinica

In una larga parte dei casi di cancro diagnosticati mediante screening mammografico non esistono segni clinici che possano far sospettare la malattia. Al di fuori dei programmi di prevenzione, il primo segno clinico è il riscontro di un nodulo mammario all'autopalpazione. La sede più frequentemente coinvolta è il quadrante supero-esterno. Elementi clinici del nodulo che orientano il sospetto diagnostico verso una malattia maligna sono: consistenza dura, margini mal delimitabili, ipo-mobilità, adesione ai piani superficiali e sottostanti. Altri segni di allarme, anche indicatori di maggiore estensione locale, sono la retrazione di cute o capezzolo e la presenza di linfadenopatia ascellare omolaterale. In un numero limitato di casi la malattia si presenta con i segni dell'infiammazione (cute a "buccia d'arancia", mammella aumentata di volume, dolente e calda), configurando il quadro del carcinoma infiammatorio. Molto più raramente la diagnosi viene posta sulla base di segni e sintomi derivanti da localizzazioni metastatiche di malattia (metastasi linfonodali, cutanee, ossee, polmonari, epatiche, cerebrali) [20].

2.2 Diagnosi

Premesso che il "*gold-standard*" diagnostico sia l'esame istologico, un corretto inquadramento diagnostico non può prescindere da un'iniziale valutazione clinica e strumentale. L'esame clinico delle mammelle inizia con la paziente in posizione seduta e con la fase di ispezione che consente di evidenziare comparativamente eventuali asimmetrie di forma o dimensione, anomalie del colorito, erosioni o retrazioni del capezzolo e cute a "buccia d'arancia". A questo punto si può procedere con la palpazione delle ghiandole mammarie e delle stazioni linfonodali locoregionali (ascellari, sovraclaveari e laterocervicali). In un secondo momento la palpazione viene eseguita anche con la paziente in posizione supina.

La mammografia è l'esame cardine nella diagnostica strumentale senologica, oltre al suo ruolo nei programmi di screening. La sua sensibilità è migliore nel seno adiposo-senile. Solitamente la malattia si presenta come un nodulo con contorni irregolari, segni di infiltrazione e distorsione del parenchima circostante. Non infrequente è il riscontro di sole microcalcificazioni. Importante ai fini diagnostici è anche la guida dell'apparecchio mammografico (stereotassi) per l'agoaspirato o per la "*core needle biopsy*". L'ecografia integra l'esame clinico e la mammografia. La sua sensibilità è minore della mammografia, ma aumenta notevolmente nel seno denso giovanile. La lesione solitamente appare come un nodulo ipoecogeno con margini e superficie irregolare. È possibile valutare contestualmente l'ipervascolarizzazione intralesionale con l'ecocolordoppler. Molto importante è il ruolo dell'ecografia come guida per l'esecuzione di prelievi con ago sottile per esame citologico o prelievo ago-biottico dei noduli mammari. La risonanza magnetica mammaria con mezzo di contrasto può essere utile come indagine di secondo livello. L'esame si basa sulla valutazione morfologica delle lesioni e sul *pattern* di impregnazione contrastografica (velocità di *wash-in* del mezzo di contrasto nel primo minuto).

L'esame citologico mediante aspirazione con ago sottile, eseguito con guida ecografica o mammografica, trova indicazione in tutti i casi in cui le indagini strumentali lasciano sospettare la presenza di una neoplasia. L'agoaspirato con ago sottile risulta essere più rapido, semplice e soprattutto meno invasivo rispetto all'ago-biopsia. Tuttavia, esso non distingue adeguatamente un carcinoma in situ da carcinoma invasivo e la dimensione della lesione condiziona la probabilità di risultato falso negativo. La diagnostica citologica segue una classificazione (da C1 a C5) che correla con un rischio crescente di malignità. L'ago biopsia (con guida ecografica, mammografica o con sistemi semiautomatici) consente il prelievo di frustoli tissutali, i quali forniscono più accurate informazioni diagnostiche e prognostiche. Oltre ad una conferma istologica di malignità, è possibile valutare in maniera attendibile

l'espressione dei recettori ormonali ed altri biomarcatori. La biopsia chirurgica trova indicazione sempre più raramente. Essa è considerata utile in caso di lesioni non palpabili, visibili alla mammografia. In questi casi, sono di ausilio per il chirurgo la deposizione con metodica stereotassica di un tracciante a partire dalla zona da sottoporre a biopsia escissionale (*ROLL, Radioguided Occult Lesion Localization*) o l'inserimento di un repere metallico [21]. La classificazione anatomico-patologica del tumore della mammella segue quella dell'Organizzazione Mondiale della Sanità del 2019 (World Health Organization, WHO) [22].

2.3 Stadiazione

L'estensione locoregionale e sistemica della malattia viene descritta con il sistema TNM. Dal gennaio 2018 è in uso il sistema di classificazione TNM rivisto dall'*American Joint Committee on Cancer* [23]. L'ottava edizione della classificazione AJCC prevede una classificazione anatomica, basata sulla sola estensione anatomica del carcinoma mammario (T, N, M), ed una classificazione prognostica (*Prognostic Stage Group*) che include oltre alle variabili anatomiche anche il grado tumorale, lo stato dei recettori ormonali e lo stato di HER2. Le indagini di primo livello fondamentali per lo *staging* del tumore della mammella sono: esame clinico e strumentale delle mammelle e delle stazioni linfonodali locoregionali, radiografia del torace, ecografia dell'addome, scintigrafia ossea ed eventuali esami mirati in sedi clinicamente sospette. Gli esami di secondo livello sono la tomografia computerizzata (TC) total body con mezzo di contrasto, la TC/RM dell'encefalo e la PET-TC con ¹⁸FDG total body.

2.4 Fattori prognostici e fattori predittivi

Il carcinoma della mammella è una malattia eterogenea e pazienti con tumori apparentemente simili per aspetti clinico-patologici possono presentare un decorso clinico molto diverso. Le caratteristiche molecolari della neoplasia mammaria hanno un notevole impatto prognostico e indirizzano l'approccio terapeutico. Nella pratica clinica, la valutazione immunoistochimica dello stato dei recettori ormonali (recettore per l'estrogeno e per il progesterone), dell'indice

di proliferazione cellulare Ki67 e dell'HER2, permette di identificare in 4 sottogruppi fenotipici di carcinoma mammario che presentano una corrispondenza con i sottotipi derivati dai profili di espressione genica [24]. I gruppi fenotipici di rilevanza clinica e con importanti implicazioni terapeutiche sono:

1. Luminali A: neoplasie con recettori estrogenici e/o progestinici positivi con valore di positività superiore al 20%, HER2 negativo e basso Ki67 ($< 20\%$),
2. Luminali B: neoplasie con recettori ormonali positivi, HER2 negativo ed alta attività proliferativa Ki67 ($\geq 20\%$),
3. HER2-positivi: neoplasie con HER2 iperespresso (score 3+ delle reazioni di immunoistochimica) o amplificato (con la metodica FISH),
4. Triplo-negativi: neoplasie con assenza di espressione dei recettori ormonali e di HER2.

Sulla base del profilo di espressione genica, le neoplasie mammarie sono state classificate in quattro sottotipi molecolari (*intrinsic subtypes*) [25-26]:

1. "Luminal A": neoplasie con marcata espressione dei recettori ormonali,
2. "Luminal B": neoplasie che, pur esprimendo i recettori ormonali, hanno un rischio di recidiva elevato a causa dell'elevato indice proliferativo,
3. "HER2-enriched": caratterizzati dall'espressione di HER2 e dei geni posti sotto il controllo trascrizionale di questa proteina,
4. "Basal-like": neoplasie caratterizzate dalla mancata espressione dei recettori ormonali e di HER2 e da una aumentata espressione delle citocheratine basali (ad esempio citocheratina 5/6 e citocheratina 14),

Tali sottogruppi si sono dimostrati prognosticamente importanti, essendo i *Luminal A* carcinomi a prognosi favorevole, migliore rispetto ai *Luminali B*, mentre i tumori *HER2-enriched* e *Basal-like* sono caratterizzati da una prognosi sfavorevole.

Alla luce delle nuove conoscenze biologiche e l'applicazione tecnologie di sequenziamento di nuova generazione, sono stati definiti ulteriori sottotipi di carcinoma mammario. È stato, ad esempio, identificato un sottogruppo di neoplasie della mammella definito “*claudin low*” e caratterizzato da negatività per i recettori ormonali e l'HER2, elevata espressione di markers di staminalità, bassa espressione di claudine (proteine della giunzione cellula-cellula) e cattiva prognosi [27]. Inoltre, un'analisi genica approfondita dei tumori triplo negativi ha permesso di identificare ben sei differenti sottotipi contraddistinti da una diversa biologia molecolare e da un diverso comportamento clinico: *basal-like 1 e 2* (BL1 e BL2), *immunomodulatory* (IM), *mesenchymal* (M), *mesenchymal stem-like* (MSL) e *luminal androgen receptor* (LAR) [28]. Recenti evidenze hanno evidenziato come i sottotipi *immunomodulatory* e *mesenchymal stem-like* presentino un elevato infiltrato linfocitario tumorale [29], un aspetto che potrebbe essere di rilievo nell'ottica dell'applicazione dell'immunoterapia nel trattamento di queste neoplasie. Altri fattori prognostici e predittivi che si sono dimostrati essere importanti anche nella scelta della migliore strategia terapeutica includono [30-40]:

- Stato dei linfonodi ascellari: la metastatizzazione ai linfonodi ascellari rappresenta, il principale fattore prognostico. Il rischio di recidiva aumenta progressivamente all'aumentare del numero di linfonodi positivi.
- Grado istologico: un grado istologico elevato (G3) è considerato un fattore prognostico sfavorevole. Le tre classi (G1, G2 e G3) sono caratterizzate da rischio di recidiva progressivamente crescente.
- Attività proliferativa: l'attività proliferativa misurata tramite l'espressione del Ki67 (percentuale di nuclei di cellule tumorali che si colorano con l'anticorpo per la proteina MIB1) è un fattore prognostico riconosciuto, oltre che utile come fattore predittivo di risposta. I tumori con elevati livelli di Ki67 presentano un rischio di recidiva di malattia più elevato ed una prognosi peggiore.

- Stato di HER2: la iperespressione di HER2 all'immunoistochimica o l'amplificazione del gene *erbB2* (valutate con metodiche di ibridizzazione in situ, FISH e CISH), rappresentano un consolidato fattore prognostico negativo, un fattore predittivo di risposta ai farmaci anti-HER2 e di resistenza alla terapia endocrina.
- Stato dei recettori ormonali: Esiste una correlazione inversa tra i livelli di positività dei recettori ormonali e il rischio di recidiva. Inoltre, l'espressione dei recettori ormonali è predittiva di ormonosensibilità della neoplasia. Pertanto, i tumori con elevati livelli di recettori ormonali sono quelli che hanno maggiori probabilità di beneficiare di una terapia ormonale.
- Infiltrazione linfocitaria: i carcinomi mammari con spiccato infiltrato linfocitario presentano una prognosi migliore rispetto a carcinomi con deplezione linfocitaria [37]. I tumori triplo-negativi ed i tumori HER2+ sono i sottogruppi che mostrano il maggior grado di infiltrazione dello stroma da parte di linfociti. La valutazione dei TILs (*tumor infiltrating lymphocytes*) segue le raccomandazioni del TIL Working Group.
- Profilo genico: Sono oggi disponibili cinque test di analisi dei profili genici del carcinoma della mammella, ovvero “*Prosigna*”, “*Mammaprint*”, “*Oncotype DX*”, “*Breast Cancer Index*” ed “*Endopredict*”. Il ruolo principale dei test molecolari è valutare se pazienti con carcinoma mammario luminale possano beneficiare di un trattamento chemioterapico adiuvante in aggiunta alla terapia ormonale quando la malattia è ancora in uno stadio precoce.

3. Terapia del tumore della mammella

3.1 Terapia locoregionale

3.1.1 Chirurgia

Il trattamento chirurgico rappresenta il cardine della terapia locoregionale del carcinoma della mammella, coadiuvato dal trattamento radiante. L'evoluzione delle tecniche chirurgiche verificatasi negli ultimi decenni ha riflesso il modificarsi della conoscenza biologica del carcinoma della mammella. Gli studi clinici hanno ampiamente dimostrato che gli interventi demolitivi non comportano vantaggi in termini di sopravvivenza rispetto a quelli conservativi. La prognosi è infatti legata alla capacità di controllare, tramite la terapia medica sistemica, le micrometastasi subcliniche già presenti alla diagnosi. Ciò ha trovato corrispondenza nella maggiore tendenza ad effettuare interventi chirurgici conservativi e nel miglioramento dei trattamenti sistemici adiuvanti [41-43]. La mastectomia radicale di Halsted è oggi limitata ai casi di infiltrazione del muscolo grande pettorale. Essa prevede l'asportazione in blocco della mammella, cute sovrastante, muscoli pettorali e linfonodi ascellari. Le mastectomie radicali modificate, invece, prevedono l'asportazione della mammella, della cute sovrastante, dei linfonodi ascellari (variante di Madden) e del solo muscolo piccolo pettorale (intervento secondo Patey).

La quadrantectomia rappresenta il più conosciuto tra gli interventi conservativi. Essa consiste nell'asportazione del tumore, di un'ampia porzione di tessuto sano circostante, della cute sovrastante e della corrispondente porzione della fascia del muscolo pettorale. A tale intervento va associata la radioterapia della mammella residua allo scopo di ridurre il rischio di recidiva locale. Ancora più conservativo è l'intervento di tumorectomia (*wide excision*) che consiste nell'asportazione del tumore con una porzione più limitata di tessuto mammario sano intorno [44]. La scelta del tipo di intervento a livello mammario (chirurgia radicale vs conservativa) dipende dalla localizzazione, dal rapporto tumore/dimensioni della mammella, dalle

caratteristiche mammografiche, dalla preferenza della paziente e dalla presenza o meno di controindicazioni alla radioterapia. La chirurgia conservativa, laddove tecnicamente possibile, è preferibile, anche mediante resezioni più estese e ricostruzione con tecniche oncoplastiche per garantire un buon risultato estetico [45].

La dissezione linfonodale ascellare ha rappresentato la procedura standard per il trattamento chirurgico delle stazioni linfonodali locoregionali. Essa però può comportare delle sequele non trascurabili, tra cui: linfedema del braccio, dolore, parestesie, riduzione della funzione e mobilità dell'arto. La dissezione ascellare (oggi non più completa, ma piuttosto un *sampling* linfonodale, ovvero asportazione di almeno 10 linfonodi del primo e secondo livello) è indicata in presenza di linfonodi ascellari clinicamente patologici e/o citologicamente positivi, in caso di riscontro di macrometastasi all'esame del linfonodo sentinella, in caso di neoplasie voluminose (T4) o carcinoma infiammatorio [46,47].

La biopsia del linfonodo sentinella è da considerare uno standard terapeutico per le pazienti con carcinoma mammario in stadio clinico I-II e linfonodi clinicamente negativi o con linfonodi clinicamente sospetti ma con successivo agoaspirato negativo [48,49].

3.1.2 Radioterapia

Il trattamento radiante dovrebbe essere preso in considerazione nella maggior parte delle pazienti affette da carcinoma mammario perché riduce il rischio di recidiva locale [50]. Il ruolo della radioterapia nel controllo locoregionale della malattia consiste nell'eradicazione dei residui tumorali nella mammella dopo chirurgia. Essa è sempre indicata dopo chirurgia conservativa, mentre non viene più effettuata dopo interventi chirurgici radicali nelle pazienti in stadio I e II. Può essere indicata dopo mastectomia radicale in presenza di: tumore >5 cm, metastasi linfonodali ascellari in numero >4, margini di resezione infiltrati dal tumore, edema o ulcerazione della cute, presenza di noduli cutanei satellite. La radioterapia va eseguita con

tecnica a due campi contrapposti tangenziali, somministrando 5000 cGy frazionati in 25 dosi da 200 cGy (oggi sono disponibili anche approcci ipofrazionati con maggior dosaggio). In presenza di chirurgia conservativa va aggiunto un *boost* sul letto tumorale di 1000 cGy [51]. Per quanto concerne il timing, è auspicabile una pianificazione integrata e condivisa tra tutti gli specialisti coinvolti nelle scelte terapeutiche. Nelle pazienti non candidate a trattamento chemioterapico, si ritiene utile iniziare la radioterapia nel più breve tempo possibile. Comunemente la radioterapia dovrebbe iniziare dopo la guarigione della ferita chirurgica e entro le 8-20 settimane [52]. Nelle pazienti che ricevono chemioterapia adiuvante, la modalità preferenziale di associazione chemio-radioterapica dovrebbe essere quella sequenziale, soprattutto se vengono utilizzati regimi contenenti antracicline per il rischio di aumentata cardiotossicità. È consigliabile che il trattamento radiante venga avviato entro un mese dal termine della chemioterapia, questo perché è ragionevole dare precedenza al controllo sistemico della malattia, e quindi agire subito contro possibili micrometastasi, rispetto a quello locoregionale.

3.2 Terapia farmacologica

La scelta del trattamento sistemico farmacologico per le pazienti affette da neoplasia mammaria è guidata dallo stadio della malattia, dalle sue caratteristiche biologiche e dalle sue finalità. La terapia sistemica per le neoplasie in stadio iniziale (stadio I-III) ha lo scopo di eradicare eventuali micrometastasi occulte e si attua quando le caratteristiche istopatologiche del tumore indicano un rischio di diffusione della malattia. Essa può essere suddivisa in:

1. Neoadiuvante: si effettua prima della chirurgia e ha come scopo quello di ridurre le dimensioni del tumore primitivo e/o di consentire un intervento chirurgico conservativo. Inoltre, la terapia neoadiuvante consente anche una valutazione precoce dell'efficacia della terapia sistemica. Nei tumori localmente avanzati non operabili,

la paziente è giudicata inizialmente non suscettibile di intervento chirurgico radicale (per le dimensioni e/o per la presenza di N2/N3) e pertanto il trattamento sistemico neoadiuvante ha la finalità di permettere la successiva chirurgia. Una chirurgia conservativa può essere presa in considerazione per le pazienti che ottengono una ottima risposta dopo trattamento neoadiuvante [53-55]

2. Adiuvante: si effettua dopo la chirurgia radicale.

In presenza di una malattia metastatica, invece, la terapia sistemica si prefigge essenzialmente di prolungare la sopravvivenza, alleviare o ritardare la comparsa dei sintomi e migliorare la qualità della vita. La scelta più appropriata della terapia sistemica della malattia metastatica deve tener conto di diversi fattori, tra cui: il carico di malattia, le caratteristiche biologiche, la presenza di eventuali sintomi e/o di crisi viscerale, l'intervallo libero da malattia e i precedenti trattamenti ricevuti. In base a questa valutazione, la malattia metastatica può essere definita a basso rischio di mortalità a breve termine (malattia "indolente") o ad alto rischio (malattia "aggressiva"). La malattia "indolente" è quella in cui vi è un lungo intervallo libero da malattia (>24 mesi dal termine della terapia adiuvante), un interessamento metastatico prevalentemente osseo e/o ai tessuti molli e un numero limitato di lesioni metastatiche. La malattia "aggressiva" è invece abitualmente quella che si presenta con "crisi viscerale" definita come uno stato di disfunzione severa di un organo con possibilità di rapida evoluzione e rischio di morte imminente, tale da richiedere una terapia ad effetto rapido, con un elevato numero di metastasi in organi multipli o con un breve intervallo libero di malattia (comparsa di metastasi durante la terapia adiuvante, o entro 12 mesi dal termine).

La decisione di quali terapie utilizzare nella singola paziente richiede una attenta valutazione dei fattori prognostici e predittivi di risposta, comorbidità della paziente, benefici attesi dal trattamento e preferenza della paziente [56-59]. A seconda del tipo di farmaci utilizzati la

terapia sistemica per il carcinoma della mammella si divide in: chemioterapia, ormonoterapia, terapia biologica.

3.2.1 Chemioterapia

La chemioterapia rappresenta uno dei cardini di terapia medica sistemica del tumore della mammella. Nel setting adiuvante, rappresenta uno standard nei tumori HER2+ e nel TNBC. Per quanto riguarda i tumori luminali, è opportuno valutare alcuni fattori che predicono la necessità di chemioterapia in aggiunta all'ormonoterapia. Tali fattori sono: la bassa espressione di ER e PgR, la presenza di metastasi linfonodali, un'elevata attività proliferativa, l'invasione ematica e linfatica peritumorale e le dimensioni del tumore >5 cm. Oggi sono disponibili anche dei test genomici in grado di predire la sensibilità dei tumori alla chemioterapia quali l'OncotypeDX, il MammaPrint, il Breast Cancer Index e l'Endopredict. I regimi polichemioterapici disponibili per il carcinoma mammario vengono divisi in regimi di prima, seconda e terza generazione [56]. I regimi di prima generazione sono basati sulla combinazione di ciclofosfamide, methotrexate, fluorouracile (CMF). Sono oggi poco utilizzati ed hanno per lo più valore storico. Quelli di seconda generazione sono i regimi contenenti antracicline. Questi sono mediamente più efficaci dei regimi CMF-like, tuttavia sono gravati da una maggior tossicità, soprattutto cardiaca. I regimi di terza generazione comprendono antracicline e taxani somministrati in sequenza oppure in combinazione. I regimi sequenziali sono associati ad un profilo di tossicità migliore rispetto ai regimi in combinazione. Questi regimi costituiscono gli schemi terapeutici più utilizzati nelle donne a rischio moderato-alto. Nel setting metastatico i chemioterapici più efficaci sono i taxani (docetaxel, paclitaxel, *nab*-paclitaxel), le antracicline (adriamicina, epirubicina, doxorubicine liposomiali), i derivati del platino (carboplatino, cisplatino), la vinorelbina, la capecitabina, l'eribulina [60-62]. Nelle pazienti con malattia in fase avanzata la monochemioterapia viene in genere preferita rispetto ai regimi di

polichemioterapica in considerazione della pari efficacia e di un migliore profilo di tollerabilità [63].

3.2.2 Ormonoterapia

L'ormonoterapia o terapia endocrina è indicata in tutte le pazienti affette da neoplasia mammaria con un'espressione dei recettori ormonali [recettore estrogenico (*estrogen receptor*, ER) e/o del recettore del progesterone (*progesteron receptor*, PgR)] $\geq 1\%$. La scelta del tipo e della durata della terapia endocrina tiene conto dello stadio della malattia, dello stato menopausale e della sensibilità della neoplasia alla terapia endocrina (tumore endocrino-sensibile o endocrino-resistente). I principali farmaci ormonali attualmente disponibili includono:

1. Gli inibitori non steroidei (anastrozolo e letrozolo) e steroidei (exemestane) dell'aromatasi che agiscono bloccando la produzione, al di fuori delle ovaie, degli ormoni femminili che stimolano la crescita delle cellule tumorali. Gli inibitori dell'aromatasi trovano indicazione nel trattamento delle donne in post-menopausa o in premenopausa in associazione al blocco della funzione ovarica su base chirurgica (ovariectomia, radioterapia) o farmacologica (analoghi dell'LHRH ipotalamico);
2. Gli analoghi del LHRH ipotalamico, i quali determinano una down-regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio e quindi un calo della produzione gonadica di estrogeni;
3. I modulatori selettivi del recettore estrogenico (*selective estrogen receptor modulator*, SERM), tra cui il tamoxifene ed il raloxifene, che bloccano l'azione degli estrogeni a livello periferico interferendo con il legame tra l'ormone e il proprio recettore. Questi farmaci vengono prevalentemente utilizzati nelle donne in premenopausa da soli o in associazione agli analoghi dell'LHRH;

4. I down-regolatori selettivi del recettore estrogenico (*selective estrogen receptor down-regulator*, SERD), tra cui il fulvestrant, che bloccano lo stimolo proliferativo estrogenico riducendo i livelli proteici del recettore estrogenico. I SERD sono utilizzati attualmente nella pratica clinica solo nel setting metastatico.

3.2.3 Terapie biologiche

Lo studio dei fenomeni biologici responsabili della insorgenza delle neoplasie mammarie e dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo di resistenze ai trattamenti farmacologici ha permesso lo sviluppo e l'introduzione nella pratica clinica di diversi farmaci a bersaglio molecolare che hanno migliorato significativamente l'efficacia delle terapie sistemiche ed incrementato le aspettative di vita delle pazienti affette da neoplasia mammaria. Tra questi, gli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti 4 e 6 (CDK4/6) palbociclib, ribociclib ed abemaciclib hanno dimostrato di incrementare i tassi di risposta obiettiva, la sopravvivenza libera da progressione di malattia (*progression free survival*, PFS) e la sopravvivenza globale (*overall survival*, OS) nelle pazienti con neoplasia mammaria ER+/HER2- in fase avanzata rispetto alla sola ormonoterapia [64]. Nei tumori triplo-negativi, il blocco dei checkpoint immunitari con anticorpi monoclonali anti-PD1 (pembrolizumab) o anti PD-L1 (atezolizumab), in grado di ripristinare l'immunosorveglianza nei tessuti tumorali, ha dimostrato di incrementare l'efficacia della chemioterapia e la sopravvivenza delle pazienti sia nella malattia in fase iniziale che metastatica [65]. Nei tumori HER2-positivi, infine, il trattamento sistemico sia nel setting precoce che in quello metastatico prevede l'utilizzo di agenti biologici anti-HER2 tra cui:

1. Anticorpi monoclonali: Il trastuzumab lega il dominio extracellulare di HER2, inibendone la segnalazione a valle. Il pertuzumab, invece, lega i siti del recettore HER2 implicati nella dimerizzazione con HER3 [66]. Gli eterodimeri HER2- HER3 sono, infatti, quelli che esplicano un maggior effetto mitogeno. Entrambi i farmaci hanno

anche un'attività indiretta, correlata al reclutamento del sistema immunitario dell'ospite (citotossicità cellulare anticorpo-mediata, ADCC) [67,68];

2. Inibitori tirosin-chinasici: lapatinib, neratinib e tucatinib. Queste piccole molecole si legano ai domini intracellulari ad attività tirosin-chinasica di HER2, inibendo l'attivazione delle pathway proliferative a valle del recettore [69];
3. Farmaci anticorpo coniugati (*Antibodies-Drug-Conjugated*, ADC): T-DM1 e Trastuzumab-deruxtecan. Gli ADC anti-HER2 sono costituiti da tossine cellulari abbinate al trastuzumab che hanno dimostrato un'elevata efficacia nella terapia oncologica delle pazienti con neoplasia HER2+. Gli ADC anti-HER2, oltre ad avvantaggiarsi degli effetti antitumorali del trastuzumab, consentono di veicolare il farmaco chemioterapico selettivamente all'interno delle cellule tumorali HER2+. Il T-DM1 è costituito da due componenti legate covalentemente: il trastuzumab e l'emtansine, un chemioterapico che blocca la polimerizzazione dei microtubuli. Il Trastuzumab deruxtecan è costituito da un anticorpo monoclonale coniugato con un legame stabile ad un inibitore della topoisomerasi I, un derivato dell'exatecano, tramite un linker tetrapeptidico clivabile in maniera selettiva all'interno della cellula tumorale [70].

4. Tumore della mammella HER2+

4.1 Recettore HER2

L'iperpressione e/o l'attivazione dei recettori di membrana tirosin-chinasici appartenenti alla famiglia dei recettori per il fattore di crescita epidermico umano (*human epidermal growth factor receptor, HER*) è un evento frequente in molte neoplasie epiteliali, incluso il carcinoma mammario. La famiglia HER comprende quattro recettori (HER1, HER2, HER3 e HER4) e dodici ligandi. HER2 è un recettore orfano, in quanto nessuno dei ligandi della famiglia HER ad oggi noto è in grado di attivarlo. L'attivazione del recettore HER2 avviene attraverso la formazione di omo-dimeri con altri recettori HER2 o di etero-dimeri con altri membri della famiglia HER (HER1, HER2, HER4). Quando attivati, gli omo- e gli etero-dimeri HER2 innescano vie di segnale di trasduzione intracellulare, in particolare la via di segnale della fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K) e la via di segnale RAS-MAPK, che favoriscono la proliferazione, la sopravvivenza e la metastatizzazione delle cellule tumorali [71-73].

Il recettore HER2 è iperespresso in circa il 20% delle neoplasie mammarie configurando il sottotipo HER2-positivo (HER2+). In accordo con linee guida dell'*American Society of Clinical Oncology (ASCO)/College of American Pathologists (CAP)* [74] il carcinoma mammario viene definito HER2+ se riscontrata una positività di score 3+ valutata con la metodica immunoistochimica o se è presente un'amplificazione del gene che codifica l'HER2 (*c-erbB2*) con la metodica FISH (*c-erbB2:CEP17* ratio >2 o un numero di copie di *erbB2* >6).

4.2 Trattamento farmacologico del tumore della mammella HER2+

Nelle pazienti con carcinoma mammario HER2+ operato, il trattamento farmacologico prevede l'utilizzo della chemioterapia in associazione all'anticorpo monoclonale trastuzumab somministrato [75]. In considerazione della potenziale cardiotossicità del trastuzumab, nelle pazienti candidate ad un regime chemioterapico a base di antracicline seguito da un taxano, il

trattamento con trastuzumab dovrebbe iniziare in concomitanza con il taxano e poi in monoterapia fino al completamento di un anno complessivo di trattamento. Invece, nei regimi non sequenziali contenenti antracicline e taxani, il trastuzumab dovrebbe essere somministrato dopo il completamento della chemioterapia [76]. Lo studio APHINITY ha valutato il ruolo dell'aggiunta del pertuzumab al trattamento adiuvante con chemioterapia e trastuzumab [77]. Lo studio ha dimostrato un aumento statisticamente significativo della sopravvivenza libera da malattia invasiva (*invasive disease-free survival*, iDFS) a favore della combinazione trastuzumab + pertuzumab. Il trattamento adiuvante con pertuzumab in associazione a chemioterapia e trastuzumab è attualmente approvato per le pazienti con carcinoma mammario HER2+ ad alto rischio di recidiva. Nelle pazienti con carcinoma mammario HER2+ candidate a terapia sistemica neoadiuvante, l'associazione trastuzumab-chemioterapia dovrebbe essere considerata la prima scelta di trattamento in quanto associata ad una maggiore probabilità di ottenere una risposta patologica completa (*pathological complete response*, pCR) [78]. Studi recenti hanno valutato il ruolo di altri farmaci anti-HER2 (lapatinib e pertuzumab) in aggiunta al trastuzumab nel trattamento neoadiuvante del carcinoma HER2+, evidenziando come la combinazione di due agenti anti-HER2 produca tassi di pCR più elevati rispetto alla monoterapia con trastuzumab [79-82]. Nel setting metastatico, la chemioterapia con taxani (docetaxel o paclitaxel) in combinazione con il doppio blocco trastuzumab e pertuzumab rappresenta lo standard di prima linea in quanto questo trattamento si associa ai migliori risultati in termini di sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale come dimostrato dallo studio CLEOPATRA [83]. In pazienti selezionate, con carcinoma mammario HER2+/ER+ ad andamento estremamente indolente e/o laddove un trattamento chemioterapico sia controindicato, il trattamento con inibitori delle aromatasi + terapia anti-HER2 può essere un'alternativa alla chemioterapia di prima linea. Il T-DM1, in monoterapia, è indicato per il trattamento di pazienti adulte affette da tumore mammario HER2-positivo, inoperabile,

localmente avanzato o metastatico, sottoposte in precedenza a trattamento con trastuzumab e un taxano, somministrati separatamente o in associazione. Le pazienti devono essere state sottoposte in precedenza a terapia per la malattia localmente avanzata o metastatica, oppure aver sviluppato recidiva di malattia nel corso di o entro 6 mesi dal completamento della terapia adiuvante [84]. Di recente due nuovi farmaci anti-HER2 hanno ricevuto dalla *European Medicines Agency* (EMA) l'approvazione per il trattamento delle neoplasie mammarie HER2+ in fase avanzata. In particolare, il tucatinib è indicato in associazione a trastuzumab e capecitabina per il trattamento di pazienti affetti da cancro della mammella localmente avanzato o metastatico HER2-positivo che abbiano ricevuto almeno 2 precedenti regimi di trattamento anti-HER2; il Trastuzumab deruxtecan in monoterapia è indicato per il trattamento di pazienti con cancro della mammella HER2-positivo non resecabile o metastatico, che hanno ricevuto due o più precedenti regimi a base di anti-HER2. Linee terapeutiche superiori alla terza sono possibili in base delle condizioni cliniche della paziente e alla presenza di opzioni ragionevoli considerando il rapporto tossicità/efficacia.

4.3 Resistenza alla terapia anti-HER2

Nonostante la comprovata efficacia clinica delle terapie anti-HER2, il fenomeno della resistenza è frequente e costituisce un importante ostacolo al successo di questi trattamenti [85]. La resistenza ai farmaci anti-HER2 può essere attribuita a molteplici meccanismi molecolari, molti dei quali condivisi tra diversi agenti. Come per altre terapie a bersaglio molecolare, possiamo distinguere una resistenza intrinseca (*de novo*) e una resistenza acquisita. La prima è già presente all'inizio del trattamento, solitamente per mutazioni dei membri della famiglia HER o per alterazioni epigenetiche e post-traduzionali che coinvolgono il recettore HER2 [86]. La seconda si sviluppa in corso di trattamento ed è correlata all'insorgenza di mutazioni adattative o alla selezione di subcloni resistenti [87,88]. Una delle cause di

insuccesso della terapia anti-HER2 è rappresentata dall'incompleta inibizione dei recettori della famiglia HER. A tal proposito, studi preclinici e clinici hanno documentato la superiorità della combinazione di due anticorpi monoclonali anti-HER2 (trastuzumab e pertuzumab) o l'associazione di uno di questi con inibitori tirosin-chinasici dei recettori della famiglia HER (lapatinib, neratinib, tucatinib) rispetto alla monoterapia. Purtroppo, anche quando viene raggiunta un'inibizione completa di HER2, la resistenza alla terapia può sorgere dall'attivazione di driver di crescita alternativi. Un altro potenziale meccanismo di resistenza è rappresentato dal “*crosstalk*” bidirezionale con il recettore estrogenico [89]. Circa il 50% dei tumori HER2+ co-esprime il recettore per gli estrogeni e sono definiti HER2+/ER+. La proliferazione di questi tumori dipende sia dall'HER2 che dal recettore estrogenico e le loro vie di segnale sono strettamente interconnesse. Infatti, l'inibizione farmacologica di uno di questi driver risulta in una iperattivazione compensatoria dell'altro favorendo la comparsa di resistenza farmacologica [90,91]. Altri meccanismi di resistenza includono la riattivazione del *signaling* di HER2 attraverso la iperespressione di ligandi/recettori o alterazioni di HER2 (ad esempio mutazioni attivanti di HER2), o attraverso l'attivazione di vie di sopravvivenza alternative (ad esempio l'attivazione della pathway β integrina–SRC–FAK [92]) o l'iperattivazione delle vie di segnalazione a valle del recettore HER2 (fosfoinositolo-3 chinasi e RAS-MAPK) [85].

4.4 La via di trasduzione del segnale PI3K-AKT-mTOR nel carcinoma mammario

Le fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) rappresentano una famiglia di chinasi lipidiche eterodimeriche la cui funzione principale è quella di fosforilare l'idrossile in posizione 3 presente sull'anello inositico del fosfatidilinositolo [93]. Le PI3K sono distinte in tre classi (I, II e III) in base ai domini proteici che le costituiscono e ne determinano la specificità. Il PI3K di classe I è suddiviso in due sottoclassi, IA e IB. La classe IA è costituita da una subunità

regolatoria (p85) e una subunità catalitica (p110). L'interazione della subunità catalitica con i residui di fosfotirosina dei recettori per fattori di crescita attivati o delle proteine di segnalazione non-recettoriali (RAS) o adattatrici (ad esempio GAB) determina l'attivazione delle PI3K [94] e comporta la fosforilazione del fosfatidilinositolo-bi-fosfato (PIP2) in fosfatidilinositolo-tri-fosfato (PIP3). Il PIP3 attiva direttamente AKT e altre proteine che dispongono di domini di omologia della plestrina [95]. A sua volta, AKT induce molteplici effettori citosolici e nucleari. La fosforilazione AKT-mediata inibisce l'attività del complesso TSC1-TSC2 che regola mTORC1. La fosforilazione di AKT riduce l'attività di BAD, mentre favorisce il funzionamento di MDM2, promuovendo la degradazione di p53, che svolge un ruolo anche nell'apoptosi cellulare. La regolazione del ciclo cellulare avviene tramite la stimolazione delle cicline A e D e l'inibizione di GSK3. Quest'ultimo evento è responsabile, inoltre, dell'aumento del metabolismo del glucosio. PTEN è strettamente coinvolto nella regolazione di questi meccanismi attraverso il suo substrato PIP3. L'attività nucleare di PTEN modula la sopravvivenza cellulare, inducendo alcuni mediatori chiave come RAD51, CDKNP e P300 [96] (**Figura 1**). La via di segnale di PI3K/AKT/mTOR è coinvolta in molteplici processi cellulari, come la sintesi proteica, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, l'omeostasi del glucosio e la riparazione del DNA [96]. L'iperattivazione di questa via di segnale è riscontrata in diversi tipi di neoplasie solide, incluso il carcinoma mammario, ed è stata associata a progressione tumorale e resistenza farmacologica [97,98]. Il meccanismo principale di iperattivazione della via di segnale della PI3K è rappresentato da mutazioni che coinvolgono i geni di classe IA, in particolare del gene PIK3CA codificante l'isofoma alfa della p110 (p110 α) [99]. Nelle pazienti affette da carcinoma mammario, le alterazioni più comuni si trovano nel dominio chinasi (esone 20: p.H1047R) o in quello elicoidale (esone 9: p.E545K e p.E542K) [101-102]. Altre alterazioni geniche inattivanti la funzione di oncosoppressori che

regolano l'attività di PI3K, in primis il gene phosphatase and tensin homolog (PTEN), possono portare all'attivazione aberrante di questa via.

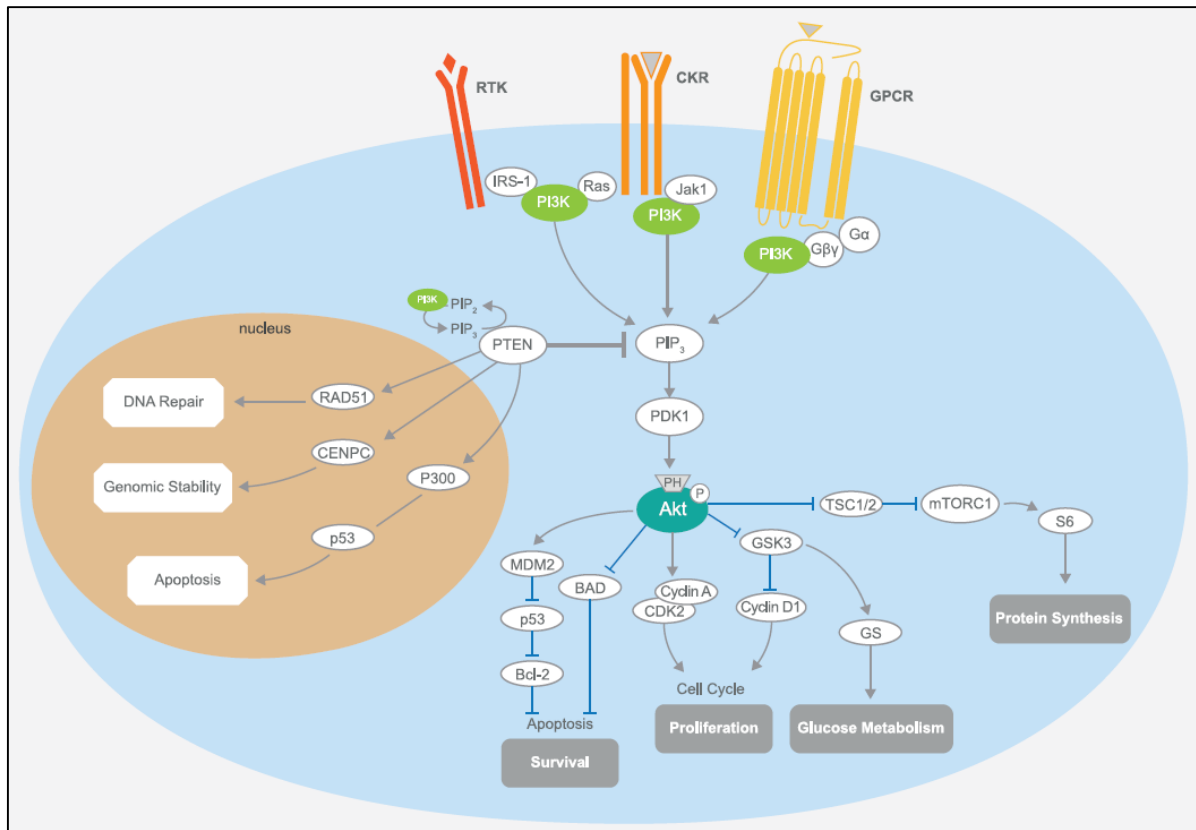


Figura 1. Rappresentazione schematica della via di segnalazione di PI3K/AKT/mTOR e dei suoi componenti principali. RTK: recettore tirosin-chinasico; CKR: recettore della chemochina; GPCR: recettore accoppiato alla proteina G; IRS-1: substrato 1 del recettore dell'insulina; PI3K:fosfatidilinositolo 3-chinasi; JAK1: Janus chinasi 1; PIP3: fosfatidilinositolo (3,4,5)-trisfosfato; PDK1: isoenzima della piruvato deidrogenasi chinasi 1; TSC: complesso della sclerosi tuberosa; mTORC1: bersaglio nei mammiferi della rapamicina complesso 1; MDM2: omologo di mouse double minute 2; BAD: BCL2 associated agonist of cell death; GSK3: glicogeno sintasi chinasi-3; CDK2: chinasi ciclina-dipendente 2; CENPC: proteina C del centromero.

Mutazioni attivanti dell'oncogene *PIK3CA* sono riscontrate in circa il 40% delle pazienti con malattia ER+/HER2-negativa, sia nel setting precoce che in quello metastatico. Mentre nelle neoplasie in stadio precoce ER+/HER2- la presenza di mutazioni di *PIK3CA* è associata a una migliore sopravvivenza libera da recidiva, nei casi di tumore metastatico le mutazioni *PIK3CA* sono associate a resistenza alla chemioterapia, resistenza alla terapia endocrina e conseguentemente a prognosi peggiore [98,101,102]. Riguardo il carcinoma mammario

HER2+ invece, le mutazioni di *PIK3CA* sono riscontrate nel 30% dei casi e sembrano essere associate a prognosi peggiore sia in fase iniziale che in quella avanzata. In particolare, la presenza di mutazioni *PIK3CA* è stata associata ad un più basso tasso di risposte patologiche complete in seguito terapia neoadiuvante anti-HER2 (trastuzumab da solo od in combinazione con pertuzumab o lapatinib) in diversi studi clinici [103,104]. Nel setting metastatico, è stato riscontrato un più alto rischio di progressione di malattia durante il trattamento di prima linea con chemioterapia e trastuzumab ± pertuzumab in pazienti con neoplasia mammaria HER2+ e mutazione di *PIK3CA* rispetto alle pazienti con assenza di mutazione *PIK3CA* [105].

Nel complesso questi dati indicano l'iperattivazione della via di segnalazione di PI3K/AKT/mTOR come un potenziale meccanismo di resistenza alle terapie anti-HER2 e pongono le basi per l'utilizzo di farmaci inibenti questa via di segnale al fine di superare la resistenza ed incrementare gli *outcome* clinici delle pazienti con neoplasia mammaria HER2+/*PIK3CA* mutata.

5. Studio

5.1 Background e razionale

Il recettore 2 per il fattore di crescita epidermico umano (HER2) è amplificato o iperespresso in circa il 20% dei carcinomi della mammella. Queste neoplasie, definite HER2-positive (HER2+), presentano un fenotipo aggressivo con una spiccata tendenza alla invasione ed alla metastatizzazione a distanza che clinicamente si associa ad una prognosi sfavorevole. Le pazienti con neoplasia mammaria HER2+ storicamente presentavano tassi di sopravvivenza libera da malattia (*disease-free survival*, DFS) e di sopravvivenza globale (*overall survival*, OS) inferiori rispetto alle pazienti non esprimenti HER2. Lo sviluppo delle terapie anti-HER2, come gli anticorpi monoclonali (trastuzumab e pertuzumab), gli inibitori tirosino-chinasici (lapatinib, neratinib, tucatinib) e gli antibody-drug conjugates (T-DM1 e trastuzumab-deruxtecan) ha cambiato la storia naturale del carcinoma mammario HER2+, sia in fase precoce che metastatica, trasformandolo in un fenotipo a prognosi migliore in virtù dell'efficacia dei trattamenti. Tuttavia, l'efficacia della terapia anti-HER2 è limitata da meccanismi di resistenza che possono essere presenti *ab initio* (resistenza primaria) o acquisiti durante il corso del trattamento (resistenza secondaria o acquisita).

Le mutazioni attivanti *PIK3CA*, il gene che codifica la subunità catalitica alfa (p110 α) della PI3K sono riscontrate in circa il 30% dei carcinomi della mammella HER2+ [96, 102]. Diverse evidenze cliniche hanno rilevato che le mutazioni *PIK3CA* sono associate ad una riduzione della efficacia dei farmaci anti-HER2 [103-105]. Nello studio di fase III CLEOPATRA, che ha testato la chemioterapia in associazione a trastuzumab e pertuzumab come trattamento di prima linea per la malattia metastatica HER2+, la progressione libera da malattia è risultata essere significativamente inferiore nelle pazienti con mutazione *PIK3CA* rispetto alle pazienti *PIK3CA wild-type*. Inoltre, nel setting neoadiuvante, le terapie anti-HER2 hanno ottenuto tassi di risposte patologiche complete (*pathological complete response*, pCR)

più bassi nelle pazienti con mutazioni *PIK3CA* rispetto a quelli ottenuti nelle pazienti *PIK3CA wild-type* [103-105]. Nel setting preclinico, diversi studi hanno dimostrato che l'efficacia delle terapie anti-HER2 è incrementata dall'utilizzo di inibitori di pan-PI3K [106, 107]. Tuttavia, questi farmaci, data l'assenza di specificità per le diverse isoforme della PI3K, presentavano un profilo di tossicità severo che ne ha limitato l'applicabilità nella pratica clinica. Lo sviluppo di inibitori PI3K specifici dell'isoforma α è stato in grado di migliorare significativamente il profilo di tossicità associato alla inibizione di PI3K. Tra gli inibitori α -selettivi, l'alpelisib è l'unico attualmente approvato per l'utilizzo nella pratica clinica, ed in particolare per il trattamento del carcinoma mammario metastatico ER+/HER2- in associazione a fulvestrant [108].

Nel presente studio abbiamo valutato l'efficacia antitumorale *in vitro* ed *in vivo* dell'alpelisib da solo od in combinazione alle terapie anti-HER2 in modelli preclinici di carcinoma mammario HER2+. Inoltre abbiamo sviluppato e caratterizzato biologicamente modelli di resistenza acquisita ad alpelisib allo scopo di identificare potenziali meccanismi molecolari coinvolti nella resistenza all'inibizione di PI3K alfa-specifica.

5.2 Materiali e Metodi

Linee cellulari e farmaci. Le linee cellulari di carcinoma mammario HER2+ utilizzate nello studio sono state le SKBR3 (ATCC® HTB-30™), le BT474 (ATCC® HTB-20™) e le HCC-1954 (ATCC® CRL-2338™) ottenute dalla American Type Culture Collection (ATCC) e le linee cellulari KPL4 e JMT1, gentilmente concesse dal laboratorio del Prof. Roberto Bianco del Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II". Le linee cellulari SKBR3, KPL4 e HCC1954 sono state mantenute nel mezzo di coltura RPMI con il 10% FBS (Gibco) e l'1% di antibiotici/antimicotici (Gibco) a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. La linea cellulare BT474 è stata mantenuta in coltura

nelle stesse condizioni, ma utilizzando il mezzo di coltura DMEM al 10% FBS + 1% antibiotici/antimicotici. Tutti gli esperimenti sono stati condotti entro due mesi dallo scongelamento delle cellule acquisite. Prima dell'uso, le linee cellulari sono state testate per l'eventuale presenza di Mycoplasma. L'alpelisib è stato fornito da Novartis ed è stato disciolto in DMSO. Il trastuzumab ed il pertuzumab sono stati acquistati da SelleckChemed.

Derivazione di linee cellulari resistenti ad alpelisib. Le linee cellulari resistenti al trattamento con alpelisib (*Alpelisib-Resistant*, AR) ed alla combinazione di alpelisib + trastuzumab (*Alpelisib-Trastuzumab-Resistant*, ATR) sono state derivate attraverso l'esposizione delle cellule a dosi crescenti dei farmaci in un periodo di circa 12 mesi. In particolare, le cellule sono state cresciute nel loro mezzo originale con concentrazioni crescenti di alpelisib (da 0.125 μ M a 1 μ M) oppure con alpelisib (da 0.125 μ M a 1 μ M) + trastuzumab (da 1 a 10 μ g/ml).

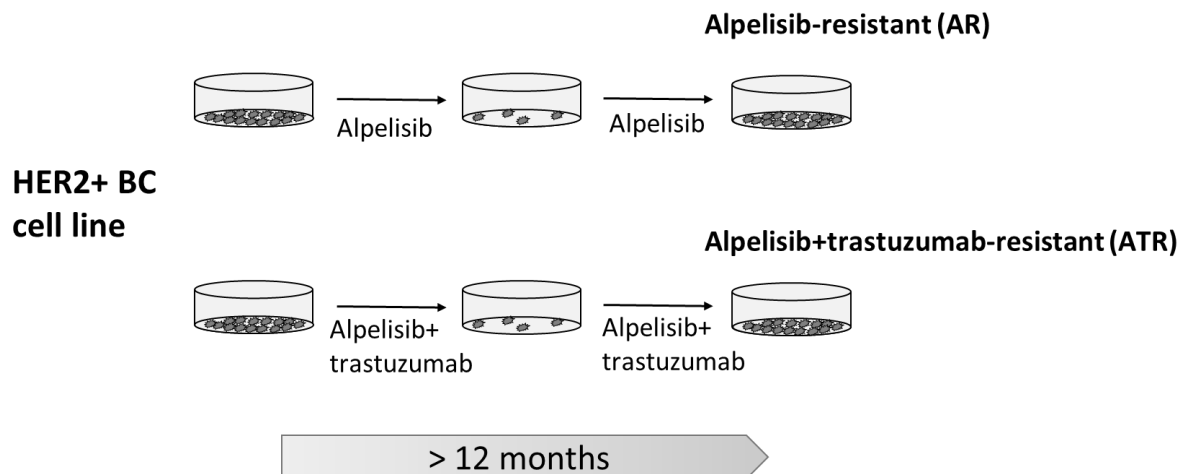


Figura 2. Rappresentazione schematica degli esperimenti per la derivazione di linee cellulari resistenti ad alpelisib.

Linea Cellulare		
PIK3CA WT		
BT474	BT474-AR	BT474-ATR
SKBR3	SKBR3-AR	SKBR3-ATR
PIK3CA mutate		
KPL4	KPL4-AR	KPL4-ATR
HCC1954	HCC1954-AR	HCC1954-ATR

Tabella 1. L'elenco delle cellule HER2+ AR ed ATR.

Conta cellulare. Le cellule sono state piastrate in triplicato in piastre da 24 pozzetti. Il giorno successivo è stato aggiunto il farmaco (o la combinazione di farmaci) a diverse concentrazioni per 6 giorni. Il mezzo contenente farmaco è stato sostituito ogni 72 ore. Le cellule, dopo tripsinizzazione, sono state raccolte in una soluzione di terreno di coltura e trypan blue con rapporto 1:1 e sono state contate utilizzando la camera di Burker.

MTT assay. Il saggio colorimetrico MTT è utilizzato per misurare la vitalità cellulare. Questo metodo sfrutta la capacità delle deidrogenasi mitocondriali delle sole cellule vive di scindere l'anello tetrazolico della molecola di MTT (3-4,5-dimetiltiazolo-2-il-2,5-difeniltetrazolio bromuro) di colore giallo, per formare un sale di formazano, di colore violetto. La quantità di formazano prodotta è proporzionale al numero di cellule vive. In questo studio, le cellule sono state messe in coltura in triplicato in multiwell da 24 nel proprio terreno di coltura a 37°C, al 5% di CO₂. Dopo 24 ore sono state trattate con i farmaci (da soli o in combinazione) a diverse concentrazioni per sei giorni. Il sale MTT è stato risospeso in terreno di coltura senza siero né antibiotici e 500 µl di sospensione sono stati aggiunti ad ogni pozzetto, dopo un delicato lavaggio con terreno di coltura senza siero. Successivamente i pozzetti sono stati incubati a

37°C per due ore. Dopo l'incubazione sono stati svuotati e aggiunti 500 µl di alcool isopropilico-HCl ad ogni pozzetto, infine le piastre sono state poste in agitazione per 20 minuti al buio a temperatura ambiente e in seguito analizzate in un lettore di micropiastre (EZ read 400, Biochrom). L'assorbanza è stata misurata alla lunghezza d'onda di 570 nm mentre il background è stata sottratto misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 690 nm. La percentuale di sopravvivenza relativa è stata valutata secondo la seguente formula: $[(O.D. \text{ giorno 6 trattamento} / O.D. \text{ giorno 6 controllo}) \times 100]$.

Silenziamento mediante RNA interference. Valutare gli effetti sul metabolismo cellulare prodotti dal silenziamento dei geni o dalla iperespressione delle proteine da essi codificate è uno dei metodi per studiare la loro funzione. Il silenziamento basato sull'RNA interference (RNAi) permette di bloccare l'espressione di specifici geni e quindi permette di osservare direttamente gli effetti dovuti al silenziamento di un determinato gene. In cellule di mammifero le molecole che causano RNAi sono corti oligonucleotidi di RNA a doppio filamento, lunghi circa 20 nucleotidi, che vengono tagliati da una nucleasi chiamata Dicer e maturati a small interfering RNA (siRNA) in grado di appaiarsi all'mRNA complementare. In questo processo il filamento antisense del doppio filamento di siRNA diventa parte di un complesso multiproteico detto RNA-Induced Silencing Complex (RISC) che appaia il siRNA all'mRNA complementare introducendo un taglio nell'mRNA. Il trascritto viene quindi degradato e la proteina non viene espressa. L'RNAi offre un approccio utile per studi di perdita di funzione genica negli organismi eucariotici. Nel nostro studio, le cellule di carcinoma mammario HER2+ sono state transfettate con Lipofectamina RNAiMAX® (Invitrogen) e 20 nM siRNA [siControl - OriGene cat. #; siAKR1C1#1-2-3 OriGene_SR301163], e piastrate in multiwell da 96 pozzetti (per i saggi di crescita cellulare) o in dischi da 60 mm (per i saggi di immunoblot) ed incubate a 37°C, 5% CO₂ per 24 ore. Il giorno successivo, il terreno di trasfezione (senza

antibiotici/antimicotici) è stato sostituito con il mezzo di coltura completo specifico per ogni linea cellulare in presenza o in assenza di farmaco. Il mezzo di coltura \pm farmaci è stato sostituito ogni 72 ore. Il sesto giorno post-trasfezione le cellule sono state analizzate mediante metodica dell'MTT o clonogenic assay. Per i saggi di immunoblot, le cellule sono state raccolte e lisate 72 ore post-trasfezione.

Estrazione di proteine totali da cellule e misurazione della concentrazione proteica. Le cellule, coltivate a 37 °C al 5% di CO₂, sono state trattate con i farmaci per 48/72 ore. Il pellet cellulare è stato ottenuto dopo trattamento con tripsina e centrifugazione per 5' a 1300 giri/minuto. Per l'estrazione proteica è stato utilizzato un buffer di lisi contenente inibitori delle proteasi [Complete-EDTA FREE (Roche): NaF 20mM, Na₄O₇P₂ (4mM), β -glicerofosfato (5mM) e NaVO₃ (2mM) e composto da: 50mM Tris-HCl pH 7,4, NaCl 150mM, NP-40 1%, SDS 0,1%, Sodio deossicolato 0,25%, EDTA 1mM]. I campioni sono stati incubati in ghiaccio per 30 minuti e poi centrifugati a 13200 giri/minuto per 20 minuti a 4°C. Il sopranatante è stato sottoposto a lettura spettrofotometrica per la quantizzazione proteica effettuata con il 'Bio-Rad protein assay' (Biorad Laboratories). Il principio di tale metodica è basato sull'osservazione dello spostamento del massimo di assorbimento del colorante Comassie Blu Brillaint da 495 nm a 595 nm in seguito al legame alle proteine in soluzioni acide. La colorazione del campione si modificherà in base alla concentrazione del campione in esame. Per stabilire la concentrazione esatta del campione è stata costruita una retta di taratura che esprime il valore di assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm, in funzione della concentrazione di una proteina nota come l'albumina bovina (Bovin Serum Albumin, BSA). Sono state preparate delle soluzioni con concentrazioni crescenti e note di BSA miscelando ogni singolo volume di proteina con 800 μ l di acqua distillata e 200 μ l di Bio-Rad; è stata preparata anche una cuvetta per il 'bianco' con gli stessi volumi di acqua e Bio-Rad ma senza campione, che serve ad

azzerare la lettura spettrofotometrica a 595 nm. L'assorbanza relativa ad ogni campione è stata letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm ed è stata poi riportata in un grafico sull'asse delle ordinate (OD), mentre sull'asse delle ascisse è presente la concentrazione relativa di BSA (**Figura 3**).

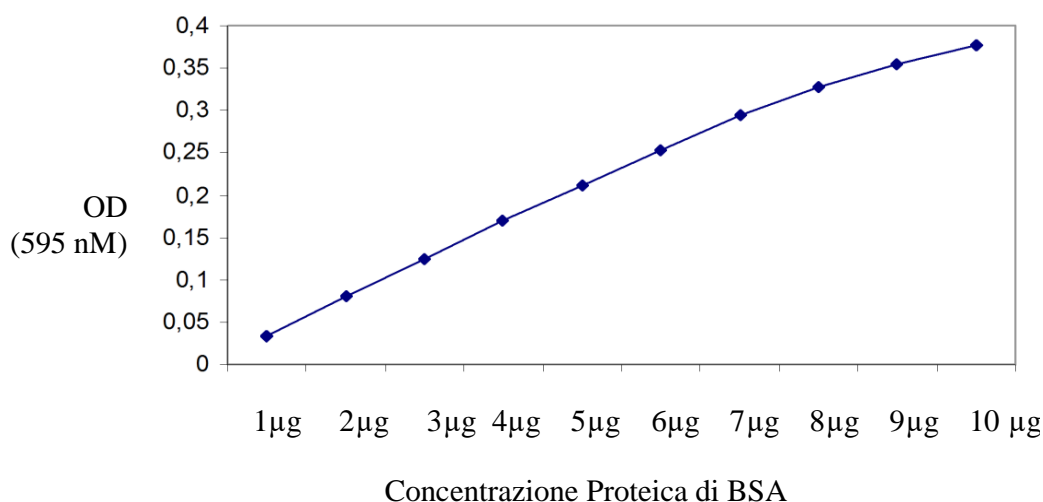


Figura 3. Curva di BSA.

Una volta ottenuta la retta di taratura è stata effettuata la stessa procedura per la preparazione dei campioni: un volume del campione (1 µl) è stato mescolato con 800 µl di acqua e 200 µl di Bio-Rad, è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro ed il valore di densità ottica ottenuto è stato interpolato sulla retta di taratura. In questo modo è stato ottenuto il valore corrispondente alla concentrazione proteica in µg del campione sull'asse delle ascisse.

SDS-PAGE. Una volta effettuata la quantizzazione, uguali quantità di proteina (40 µg) sono state caricate su un gel di poliacrilammide in presenza di SDS in condizioni denaturanti. L'SDS (sodio dodecil fosfato) è un detergente anionico che lega le proteine caricandole negativamente in modo che il rapporto carica/massa sia costante e le proteine si separino solo in base al peso molecolare. Questa metodica prevede l'utilizzo di un gel discontinuo composto da "stacking" gel e "running" gel, a differente concentrazione di acrilammide. Lo "stacking" gel, ad una

minore concentrazione di acrilammide (5%), ha la funzione di impaccare le proteine in un'unica banda prima che entrino nel gel di separazione. Il "running" gel, ad una più alta e differente concentrazione di acrilammide (dal 6% al 15%) permette la separazione dei campioni proteici in base alla massa relativa. La soluzione del "running" gel al 10% è stata così preparata:

- 2,7 ml di soluzione acrilammide/bis-acrilammide (37,5:1) al 30%,
- 2,5 ml di Tris-HCl 1,5M (pH 8,8),
- 0,1 ml di SDS 10%,
- 0,1 ml di ammonio persolfato (APS) al 10%,
- 0,006 ml di Temed e
- acqua distillata per un volume finale di 10 ml.

La mix viene fatta polimerizzare fra due lastre di vetro separate da due spaziatori. Una volta avvenuta la polimerizzazione del "running", è stato preparato lo "stacking":

- 0,83 ml di soluzione acrilammide/bis-acrilammide (37,5:1) al 30%,
- 0,63 ml di Tris-HCl 1 M (pH 6,8),
- 0,05 ml di SDS 10%,
- 0,05 ml di Ammonio Persolfato al 10%,
- 0,005 ml di Temed e
- acqua distillata per un volume finale di 5 ml.

Il Temed funge da iniziatore della reazione di polimerizzazione mentre l'APS da catalizzatore. Ai campioni da caricare è stato aggiunto, in un rapporto di 3:1, il buffer di caricamento (Laemmli Buffer) preparato nel seguente modo: 240 mM Tris pH 6.8, 8% SDS, 40% glicerolo, 0,04% blu di bromofenolo, 5% beta-mercaptoetanolo. I campioni, dopo essere stati bolliti a 95°C per 5 minuti, sono stati caricati nel gel insieme ai marcatori di peso molecolare che servono da riferimento. La corsa elettroforetica è stata effettuata in un'opportuna cameretta collegata ad un alimentatore elettrico contenente una soluzione a pH 8,8 di Tris 25 mM, SDS 0,3%, Glicina 200 mM. La corsa è stata condotta per 20' a 15 mA e successivamente a 25 mA per due ore.

Western Blot. Dopo l'elettroforesi le proteine sono state trasferite su un filtro di nitrocellulosa in una soluzione tampone di trasferimento (TRIS 25 mM, Glicina 200 mM) a pH 8,8 e metanolo (20%) mediante la creazione dell'apposito 'sandwich' per il trasferimento. Esso è costituito ponendo in successione su vari strati una spugnetta, tre fogli di carta 3 MM (imbevuti nel tampone di trasferimento), il gel di poliacrilammide, la membrana di nitrocellulosa, tre fogli di carta da filtro 3 MM ed un'ulteriore spugnetta. Il trasferimento è stato condotto applicando una corrente di 100 Volts per 60 minuti a freddo. Il filtro è stato colorato con Rosso Ponceau per verificare l'avvenuto trasferimento, lavato ed è stato poi effettuato il blocking con una soluzione al 5% di latte (non-fat dry milk) in TBS-T (TBS 1X e 0,1% di Tween 20) per 60 minuti a temperatura ambiente, al fine di saturare i siti aspecifici ai quali potrebbe legarsi l'anticorpo primario. Il filtro è stato poi incubato con l'anticorpo primario diluito (a diluizioni differenti a seconda dell'anticorpo) in TBS-T al 5% di latte per tutta la notte, a 4°C. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: p-HER2 (CST #2243, 1:1000), PTEN (CST #9559, 1:1000), AKT (CST #9272, 1:1000), p-AKT S473 (CST #9271, 1:1000), S6K, p-S6K T389 (CST #9205, 1:1000), B-actina (CST #4970, 1:5000). Dopo l'incubazione il filtro è stato lavato in TBS-T per 10 minuti per tre volte al fine di rimuovere l'eccesso di anticorpo primario. A questo punto il filtro è stato incubato con l'anticorpo secondario, diluito 1:2000, il cui eccesso è stato eliminato con altri 3 lavaggi da 10 minuti in TBS-T. La membrana infine è stata sottoposta all'azione dell'ECL (Enhanced ChemiLuminescence detection system) (Amersham), un sistema di rivelazione basato sull'emissione di luce non radioattiva da parte di anticorpi marcati con perossidasi, che impressiona la lastra fotografica. Il filtro è stato incubato per circa cinque minuti con una miscela costituita da eguali volumi dei due reagenti. Trascorso questo tempo il filtro è stato posto in una cassetta per autoradiografia e, in camera oscura, è stato messo a contatto con una lastra autoradiografica (Hyperfilm ECL) (Amersham). I tempi di

esposizione variano in base all'affinità dell'anticorpo con l'antigene in esame (da un minimo di 15 secondi a 1 minuto o più). Al termine dello sviluppo, la proteina di interesse è stata individuata confrontando le bande ottenute con le proteine di peso molecolare noto. Le immagini sono state analizzate con il software NIH ImageJ per la quantificazione dei livelli proteici nei diversi campioni.

Estrazione ed analisi RNA. Cellule KPL4 e HCC1954 sono state piastrate in mezzo completo e successivamente trattate con DMSO o 1 μ M alpelisib o 1 μ M alpelisib + 10 μ g/ml trastuzumab per 48 ore. Le cellule KPL4-AR e HCC1954-AR sono state piastrate in mezzo di coltura completo in presenza di 1 μ M alpelisib. Le cellule KPL4-ATR e HCC1954-ATR sono state piastrate in mezzo di coltura completo in presenza di 1 μ M alpelisib + 10 μ g/ml trastuzumab. Le cellule sono state raccolte e l'RNA purificato mediante RNA purification kit (Maxwell, Promega). RNA totale è stato quantizzato usando Quant-iT Ribo-Green RNA Assay Kit (Invitrogen) e normalizzato a 4 ng/mL; 200 ng di ogni campione sono stati usati per preparare una library in una variante automatica dell'Illumina Tru Seq RNA Sample Preparation protocol (Revision A, 2010). Tale metodo utilizza oligo(dT) beads per selezionare mRNA dall'RNA totale ed è seguito da frammentazione tramite calore e sintesi di cDNA dal template di RNA. Il cDNA risultante è andato incontro a preparazione della library (end repair, base "A" addition, adapter ligation, and enrichment) usando adapters disegnati dal Broad Institute per multiplexing. Dopo la fase di enrichment, le libraries sono state quantizzate tramite qPCR usando KAPA Library Quantification Kit per Illumina Sequencing Platforms. L'intero processo è stato eseguito in piastre da 96 pozzetti e tutte le fasi di pipetting eseguite con Agilent Bravo o PerkinElmer JANUS Mini liquid handlers. I dati di espressione genica trasformati in scala logaritmica sono stati ottenuti mediante DESeq2, filtrando i geni poco espressi (<10% dei campioni con cont pari a zero e media>4). Ciò ha evidenziato trascritti che sono serviti da

input per le successive analisi: *gene ontology (GO) enrichment analysis* come precedentemente descritto [109].

Esperimento in vivo e xenografts. Cellule HCC1954 (1×10^6) risospese in RPMI + Matrigel in rapporto 1:1 sono state inoculate nel sottocute del fianco destro di topi ovariectomizzati atimici (Charles River). Circa 2 settimane dopo, i topi con tumori dai volumi $\geq 200 \text{ mm}^3$ sono stati randomizzati nei seguenti gruppi di trattamento: 1) controllo; 2) trastuzumab (30 mg/kg tramite somministrazione intraperitoneale due volte a settimana; 3) alpelisib (30 mg/kg somministrato per via orale tramite *gavage* 1 volta al giorno; 4) la combinazione trastuzumab + alpelisib. Il peso degli animali e le dimensioni tumorali sono stati misurati 2 volte alla settimana e il volume tumorale in mm^3 è stato calcolato secondo la formula: $\text{volume} = \text{larghezza}^2 \times \text{lunghezza} / 2$. Al raggiungimento di un volume tumorale $> 1500 \text{ mm}^3$ i tumori sono stati raccolti e congelati in azoto liquido. I tumori sono stati asportati 4 ore dopo l'ultima dose di farmaco.

Analisi statistica. I risultati, tranne dove specificato, sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come media \pm SEM. Un p-value < 0.05 , calcolato mediante t-test di Student o test ANOVA, è stato considerato statisticamente significativo.

6. Risultati

Valutazione dell'attività antitumorale degli anticorpi monoclonali anti-HER2 e dell'inibitore alfa-selettivo della PI3K alpelisib in modelli cellulari di carcinoma mammario HER2-positivo.

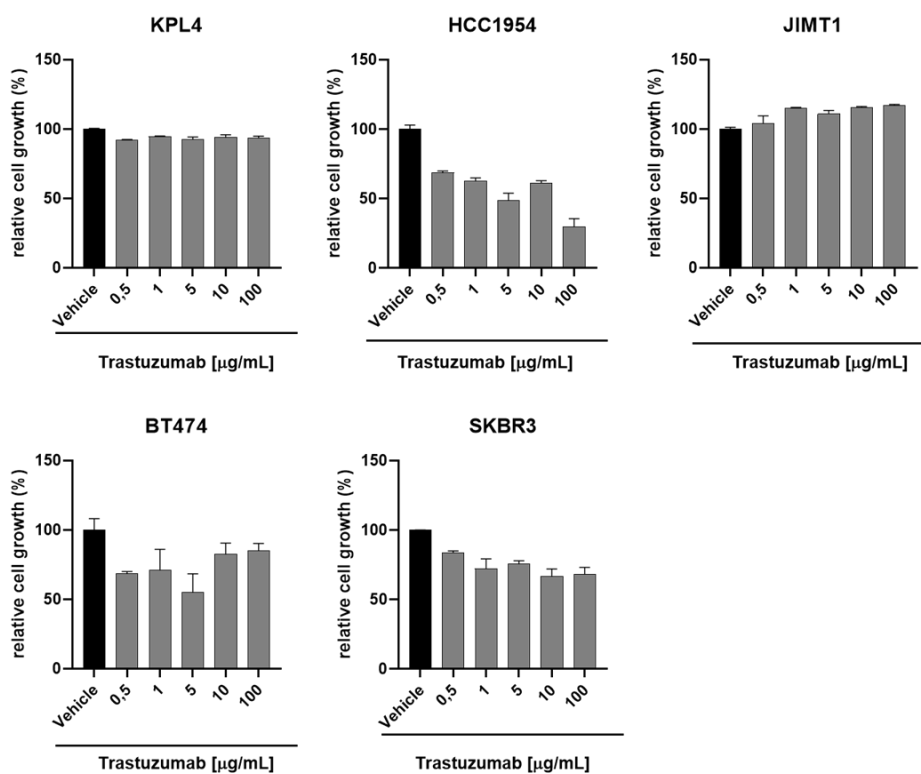
L'obiettivo iniziale del nostro studio ha riguardato la valutazione dell'efficacia antitumorale *in vitro* degli anticorpi monoclonali anti-HER2, trastuzumab e pertuzumab, in linee cellulari di carcinoma della mammella HER2+. A tal fine abbiamo selezionato un pannello di linee cellulari HER2+ con (KPL4, HCC1954 e JIMT1) e senza (SKBR3 e BT474) mutazioni attivanti il gene *PIK3CA*. Lo stato dei recettori ormonali [recettore per l'estrogeno (ER) e per il progesterone (PgR)] e lo stato mutazionale del gene *PIK3CA* sono riportati nella **Tabella 2**.

Linea cellulare	ER	PgR	<i>PIK3CA</i>		
KPL4	-	-	mutato	c.3140A>C	p.H1047R
HCC1954	-	-	mutato	c.3140A>C	p.H1047R
JIMT-1	-	-	mutato	c.1258T>C	p.C420R
SKBR3	-	-	WT		
BT474	+	-	WT		

Tabella 2. Stato dei recettori ormonali e del gene *PIK3CA* nelle linee di carcinoma mammario HER2+.

In linea con i risultati di precedenti studi preclinici, la monoterapia con trastuzumab e pertuzumab (dosi crescenti da 0.5 µg/ml a 100 µg/ml) ha inibito la crescita tumorale delle linee cellulari BT474, SKBR3 e HCC1954 (*range* di inibizione della crescita = 10 - 50%). Al contrario gli anticorpi monoclonali anti-HER2 hanno dimostrato un modesto o nessun effetto inibitorio della crescita delle linee cellulari KPL4 o JIMT1, rispettivamente (**Figura 4 A, B**).

A.



B.

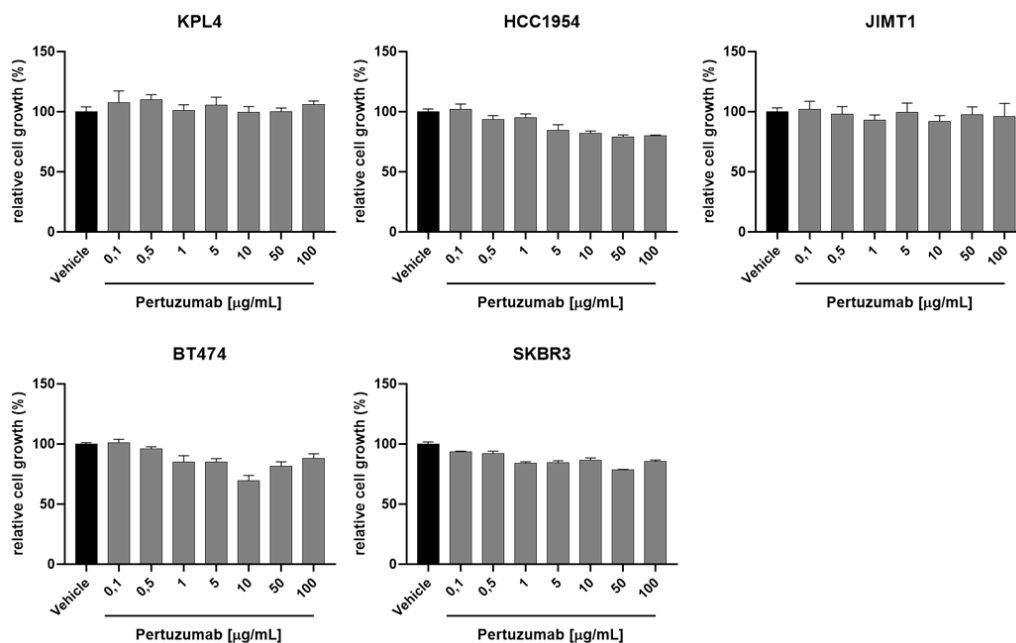


Figura 4. Inibizione *in vitro* della crescita cellulare di linee cellulari di carcinoma mammario HER2+ trattate con trastuzumab (A) o pertuzumab (B).

Numerosi studi preclinici e clinici hanno dimostrato che il doppio blocco anti-HER2 con trastuzumab e pertuzumab inibisce più efficacemente la crescita tumorale rispetto alla monoterapia con trastuzumab. Pertanto questa combinazione è stata testata nei nostri modelli cellulari. L'aggiunta di pertuzumab (10µg/ml) al trastuzumab (10µg/ml) ha determinato una più marcata inibizione della crescita tumorale *in vitro* rispetto al solo trastuzumab nelle linee cellulari *PIK3CA* wild type (BT474 e SKBR3) ma non nelle linee *PIK3CA* mutate (KPL4, HCC1954 e JIMT1) (**Figura 5**). Nel complesso, questi risultati suggeriscono che la presenza di una mutazione attivante *PIK3CA* comporta una minore sensibilità al singolo o al doppio blocco anti-HER2 in modelli cellulari di carcinoma mammario HER2+.

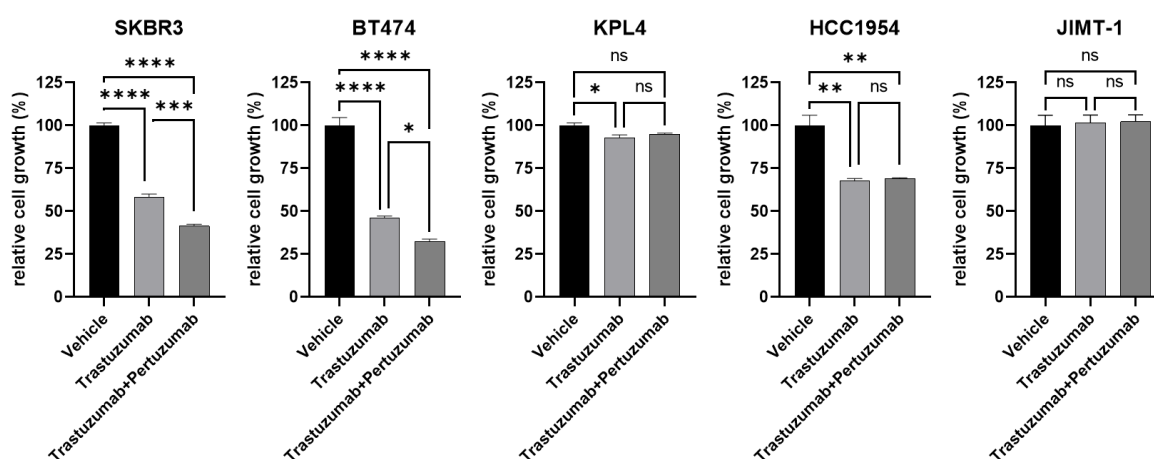


Figura 5. Inibizione *in vitro* della crescita cellulare di linee cellulari di carcinoma mammario HER2+ trattate con trastuzumab o trastuzumab + pertuzumab. *, p-value <0.05; **, p-value <0.01; ***, p-value <0.001; ****, p-value <0,0001; ns, not significant.

Al fine di testare l'efficacia dell'inibitore alfa-selettivo della PI3K alpelisib le nostre linee cellulari HER2+ sono state esposte a dosi crescenti (da 0.01 µmol/L a 10 µmol/L) di alpelisib. Al termine degli esperimenti sono state generate curve dose/risposta dalla quale sono stati stimati i valori di IC₅₀ (concentrazione inibente il 50% della crescita cellulare). Il trattamento con alpelisib ha dimostrato un'inibizione dose-dipendente della crescita cellulare in tutte le

linee, sebbene l'entità della risposta al trattamento è risultata diversa nei singoli modelli (**Figura 6**). Nello specifico, la linea cellulare KPL4 ha mostrato la più alta sensibilità all'alpelisib, mentre le cellule JIMT1 non hanno dimostrato sensibilità. In considerazione della resistenza intrinseca dimostrata sia agli anticorpi anti-HER2 che all'alpelisib, il modello JIMT1 è stato escluso dai successivi esperimenti.

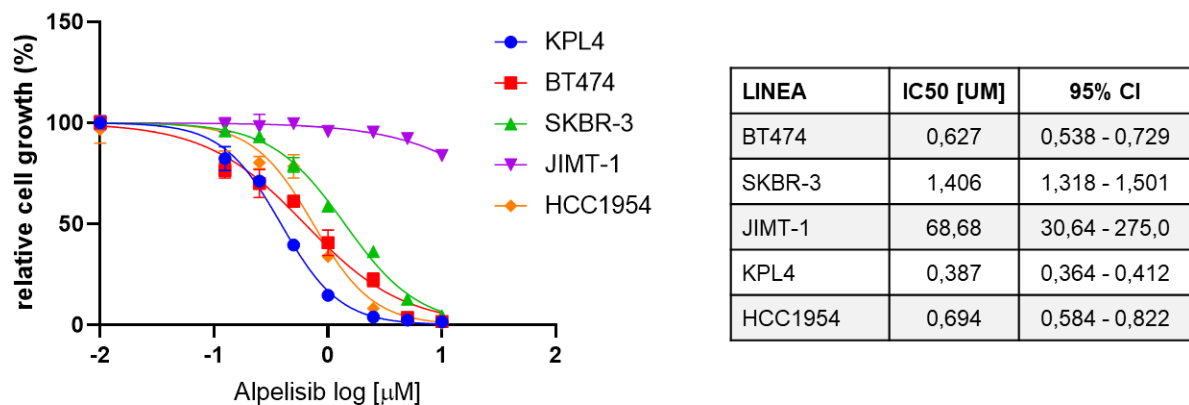


Figura 6. Curve dose-risposta *in vitro* e stima dell'IC₅₀ dell'alpelisib in linee cellulari di carcinoma mammario HER2+.

A questo punto, abbiamo testato l'effetto inibitorio sulla crescita tumorale dell'alpelisib da solo od in combinazione al singolo o doppio blocco anti-HER2. Nello specifico le linee cellulari KPL4, HCC1954, SKBR3 e BT474 sono state trattate con DMSO (controllo), 10μg/ml trastuzumab, 10μg/ml trastuzumab + 10μg/ml pertuzumab, 1μM alpelisib, 1μM alpelisib + 10μg/ml trastuzumab, e con la triplice combinazione di 1μM alpelisib + 10μg/ml trastuzumab + 10μg/ml pertuzumab (**Figura 7**). Il trattamento con alpelisib in monoterapia si è dimostrato più efficace della terapia con trastuzumab o trastuzumab più pertuzumab nei modelli *PIK3CA* mutati, ottenendo una inibizione della crescita cellulare superiore al 90% e al 70% nelle linee KPL4 e HCC1954, rispettivamente. Al contrario nei modelli *PIK3CA* *wild-type* nessuna differenza in termini di inibizione della crescita cellulare è stata osservata tra il trastuzumab o il trastuzumab + pertuzumab rispetto all'alpelisib nelle cellule BT474, mentre l'alpelisib ha dimostrato una più potente attività inibitoria rispetto al trastuzumab ma non alla combinazione

trastuzumab + pertuzumab nella linea cellulare SKBR3 (**Figura 7**). Infine, la combinazione alpelisib + terapia anti-HER2 (trastuzumab o trastuzumab + pertuzumab) è risultata significativamente più efficace rispetto ai singoli trattamenti nelle linee SKBR3, BT474 e HCC1954 ma non nel modello KPL4 (**Figura 7**).

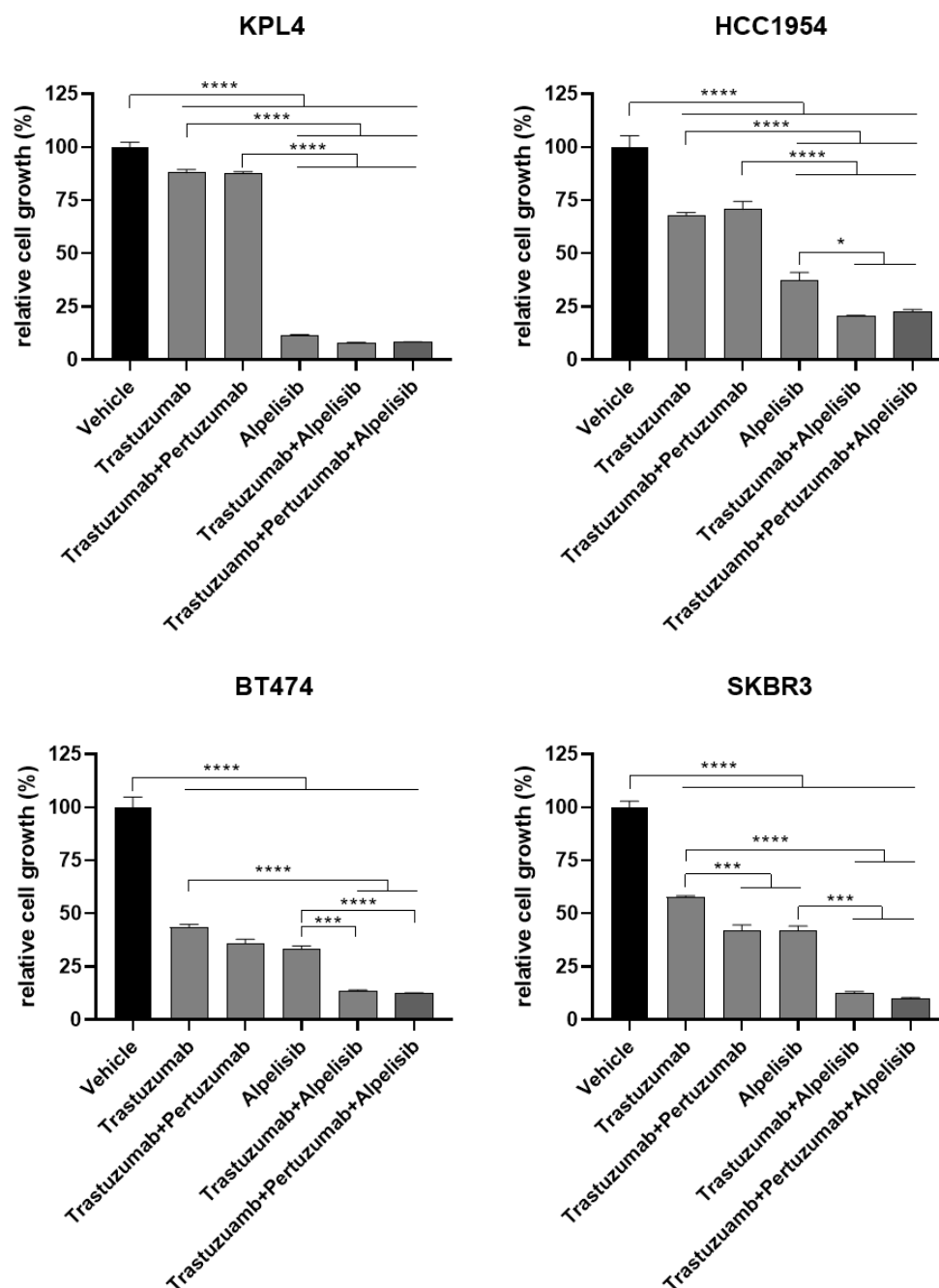


Figura 7. Inibizione *in vitro* della crescita cellulare di linee cellulari di carcinoma mammario HER2+ trattate con alpelisib, trastuzumab o trastuzumab + pertuzumab e loro combinazioni. *, p-value <0.05; **, p-value <0.01; ***, p-value <0.001; ****; p-value <0,0001; ns, not significant.

L'analisi dei livelli proteici delle principali componenti della via di segnale della PI3K/AKT/mTOR attraverso metodica di western blot è risultata in linea con i dati di crescita cellulare *in vitro*. Nelle linee cellulari SKBR3, BT474 e HCC1954, i livelli di AKT fosforilato (p-AKT) si riducono in seguito al trattamento con trastuzumab (31%, 45% e 31%, rispettivamente) e più marcatamente con la combinazione trastuzumab + pertuzumab (62%, 74%, e 38%, rispettivamente), tuttavia questa inibizione è assente nelle cellule KPL4. Inoltre, nelle linee cellulari *PIK3CA* mutate (HCC1954 e KPL4) il trattamento con alpelisib ha determinato una significativa riduzione dei livelli di p-S6K (37% e 77%, rispettivamente), downstream target di AKT, che invece non si osserva nelle linee cellulari *PIK3CA* *wild-type* suggerendo l'importante ruolo della mutazione *PIK3CA* nel sostenere l'attivazione della via di segnale della PI3K (**Figura 8**).

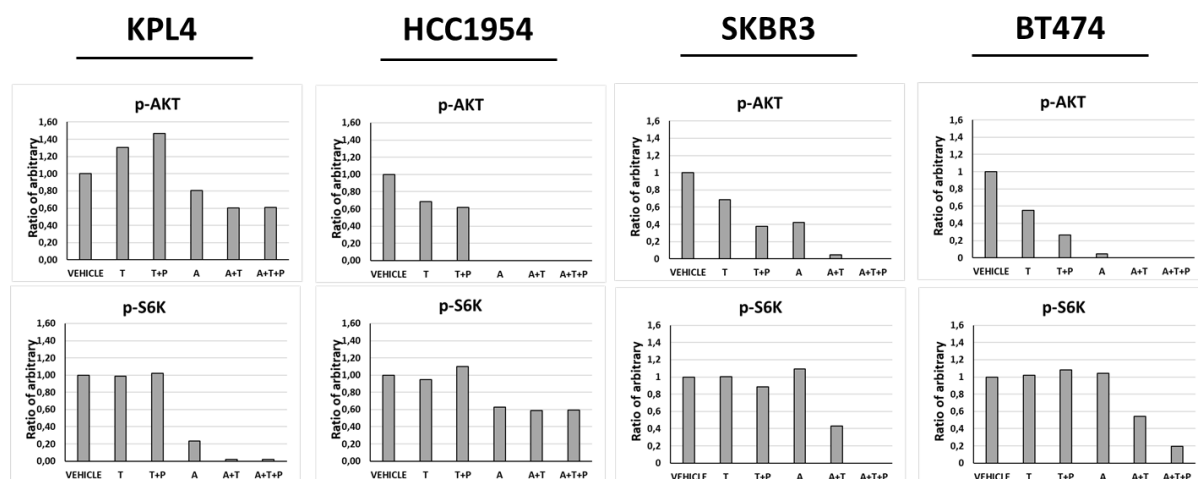


Figura 8. Analisi mediante western blot dei livelli proteici totali e fosforilati delle componenti della via di segnale della PI3K in modelli di carcinoma mammario HER2+.

Inibizione di HER2 e PI3K in modelli *xenografts* di carcinoma mammario HER2-positivo.

L'attività inibitoria dell'alpelisib sulla crescita tumorale è stata valutata *in vivo* utilizzando *xenotrapianti* di cellule HCC1954. Nel momento in cui i tumori avevano raggiunto un volume di circa 200 mm³, i topi (atimici, ovariectomizzati) venivano randomizzati nei seguenti gruppi di trattamento: controllo (n=10), trastuzumab (n=10), alpelisib (n=10) e trastuzumab + alpelisib (n=10). In assenza di trattamento (controllo) gli *xenografts* di cellule HCC1954 hanno mostrato un elevato tasso di crescita, raggiungendo in circa 15 giorni il massimo volume tumorale prestabilito dallo studio (1500 mm³). In linea con quanto osservato negli esperimenti *in vitro*, il trattamento con trastuzumab (10 mg/Kg, 2 somministrazioni intraperitoneali a settimana) ha rallentato solo moderatamente la crescita tumorale rispetto al controllo indicando che la mutazione *PIK3CA* conferisce resistenza agli anticorpi monoclonali anti-HER2. Una evidente inibizione della crescita tumorale è stata osservata nel braccio di trattamento con alpelisib (30 mg/Kg, 1 somministrazione orale tramite *gavage* al giorno) rispetto al controllo o al trattamento con il trastuzumab da solo. Infine, la combinazione alpelisib + trastuzumab ha ulteriormente ridotto la crescita rispetto ai singoli farmaci, sebbene la differenza con il braccio di trattamento con alpelisib non sia statisticamente significativa (**Figura 9**). È importante sottolineare che in nessuno dei bracci di trattamento è stata riscontrata una totale regressione della neoplasia. Questi risultati *in vivo* confermano il potenziale ruolo dell'alpelisib nel trattamento delle neoplasie mammarie HER2+/*PI3KCA* mutate.

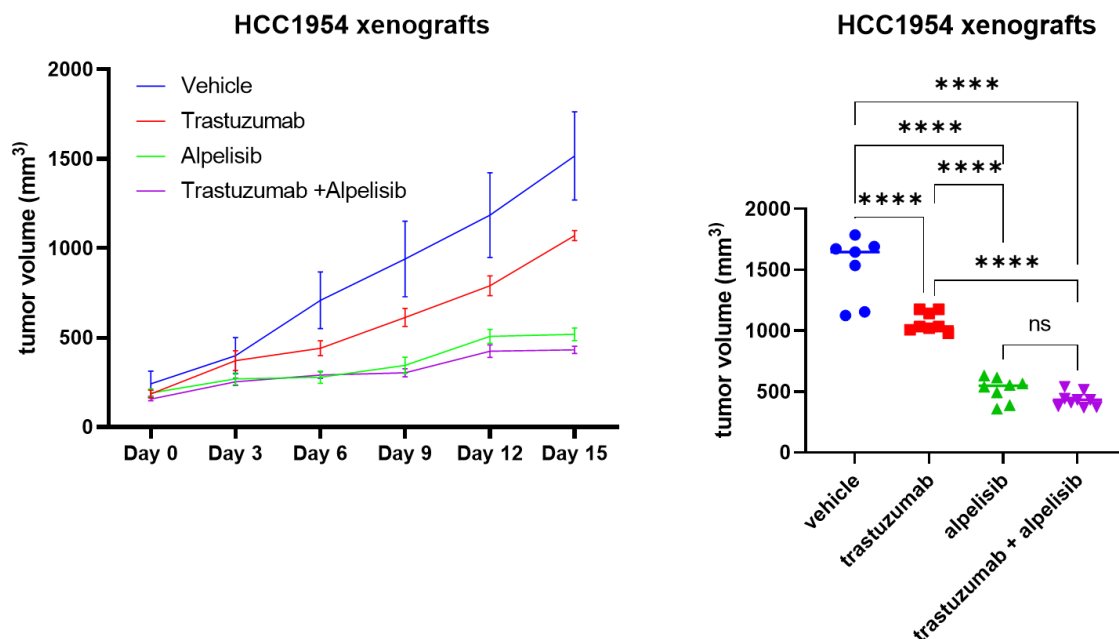


Figura 9. Inibizione in vivo della crescita tumorale di xenografts HCC1954 trattati con alpelisib, trastuzumab o alpelisib + trastuzumab. *, p-value <0.05; **, p-value <0.01; ***, p-value <0.001; ****, p-value <0.0001; ns, not significant.

Analisi comparativa dei profili molecolari di modelli di carcinoma mammario HER2-positivi/*PIK3CA*-mutati sensibili e resistenti ad alpelisib.

Allo scopo di identificare potenziali determinanti molecolari di risposta o resistenza all'alpelisib abbiamo generato linee cellulari resistenti all'alpelisib in monoterapia (*alpelisib-resistant*, AR) o alla combinazione alpelisib più trastuzumab (*alpelisib-trastuzumab-resistant*, ATR) (**Tabella 1**). Questi modelli sono stati successivamente caratterizzati da un punto di vista molecolare attraverso l'analisi dei loro profili trascrizionali (*RNA-sequencing*). Nello specifico sono state analizzate cellule HCC1954 e KPL4 trattate *short-term* (48 ore) con alpelisib o alpelisib + trastuzumab ed i loro corrispettivi modelli di resistenza acquisita a tali trattamenti (HCC1954 AR, HCC1954 ATR, KPL4 AR, KPL4 ATR). Il numero dei geni totali differenzialmente espressi (*differentially expressed genes*, DEG) è risultato pari a 6835 nel gruppo di confronto KPL4+A vs KPL4-AR, 1382 nel gruppo KPL4+AT vs KPL4-ATR, 5536

nel gruppo HCC1954+A vs HCC1954-AR e infine 1202 nel gruppo HCC1954+AT vs HCC1954-ATR. Le rappresentazioni grafiche dei geni up-regolati e down-regolati nei modelli resistenti ad alpelisib (AR) o ad alpelisib + trastuzumab (ATR) rispetto alle corrispondenti cellule sensibili e sono riportate nella **Figura 10**.

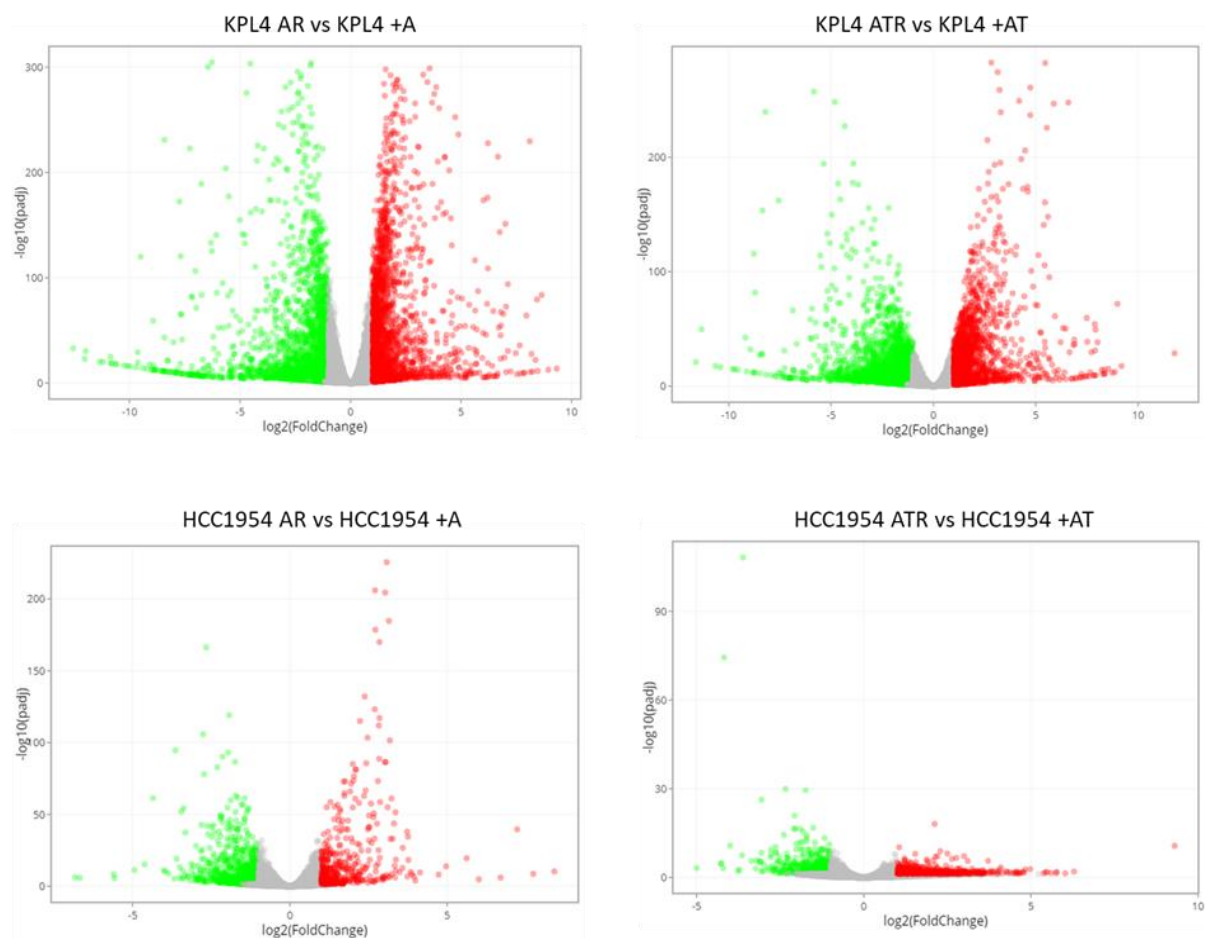


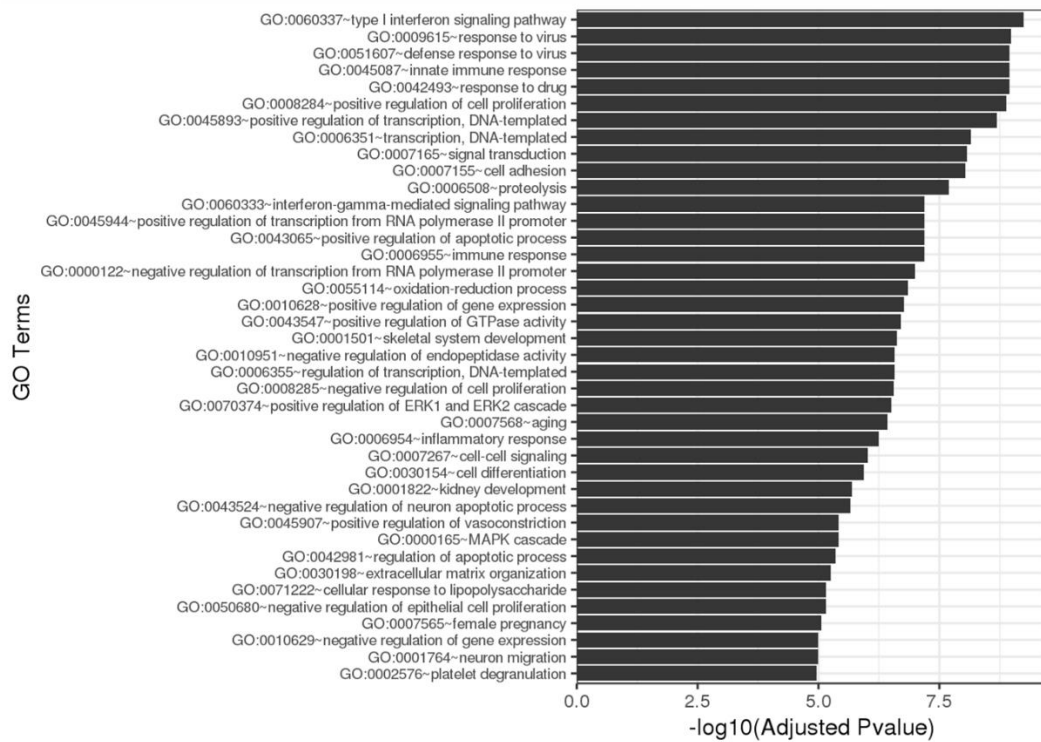
Figura 10. Volcano plots dei cambiamenti trascrizionali globali tra le cellule sensibili e resistenti ad alpelisib (AR) o ad alpelisib + trastuzumab (ATR). Ogni punto nel grafico a dispersione rappresenta un gene. I geni con un *p-value* aggiustato <0,05 ed una log2-fold change > 1 sono indicati dai punti rossi (geni up-regolati). I geni con un *p-value* aggiustato <0,05 e una log2 fold-change < -1 sono indicati da punti verdi (geni down-regolati).

I geni differenzialmente espressi nei diversi modelli sono stati analizzati per definire l'arricchimento dei termini di ontologia genica [*gene ontology (GO) enrichment*]. Questa analisi è stata condotta allo scopo di individuare i processi prevalentemente biologici coinvolti

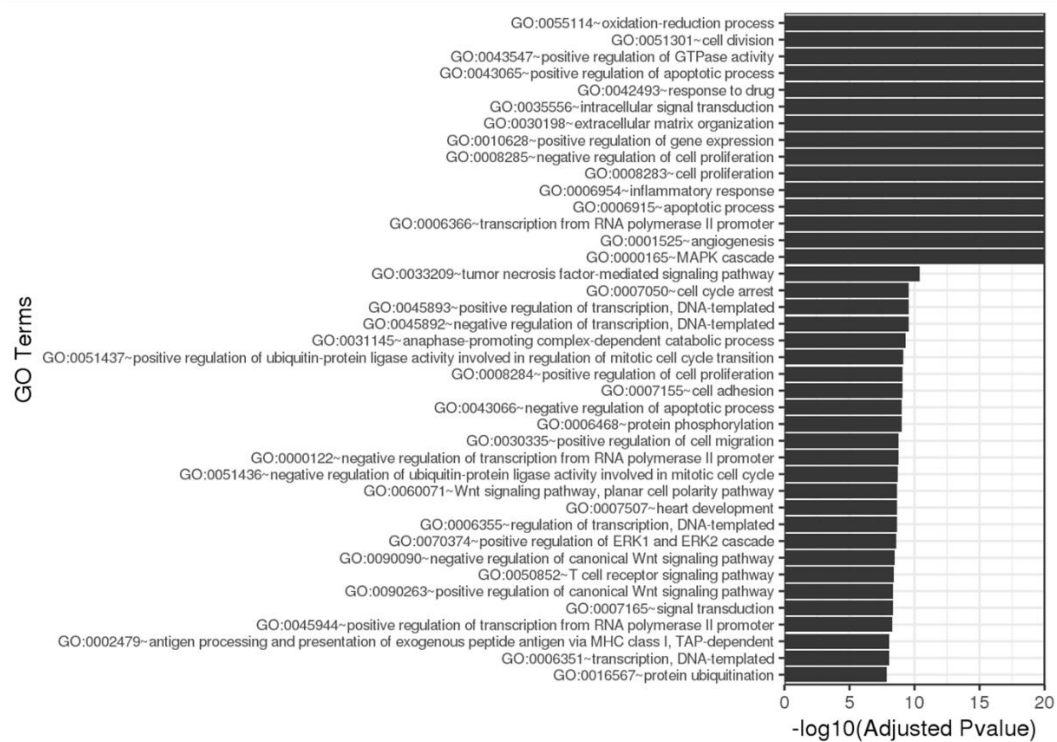
nella resistenza acquisita al trattamento con alpelisib o alla combinazione alpelisib + trastuzumab. Nel complesso, è stato riscontrato che modelli di resistenza AR e ATR presentano un comune arricchimento per i processi biologici di ossido-riduzione (“*oxidation reduction process*”), proliferazione e divisione cellulare (“*cell division*”, “*cell proliferation*”), risposta immunitaria (“*inflammatory response*”, “*innate immune response*”) e sintesi dell’RNA (“*positive regulation of transcription, DNA template*”) (**Figura 11**).

Successivamente abbiamo focalizzato la nostra attenzione sui geni up-regolati nei modelli AR e ATR. Globalmente 8 geni (*ARL4A*, *SNRPG*, *ODC1*, *AKR1C1*, *TRIM16L*, *AKR1C2*, *GLB1L2*, *BDH1*) risultavano essere iperespressi ($\log_2 \text{fold-change} >1$, $p\text{-value adj} <0,05$) in tutti e quattro i nostri modelli di resistenza (**Figura 12, Tabella 3**). Per investigare il potenziale ruolo di questi geni nel determinare la sensibilità all’alpelisib abbiamo utilizzato i dati genomici e cellulari disponibili nel “*Cancer Dependency Map Portal*” del Broad Institute (<https://depmap.org/portal/achilles/>). In particolare abbiamo analizzato l’associazione tra i livelli di espressione dei singoli geni e la sensibilità all’alpelisib in 26 linee cellulari di neoplasia mammaria presenti nel database. Questa analisi ha rivelato che l’espressione di 6 geni (*AKR1C1*, *AKR1C2*, *TRIM16L*, *ODC1*, *ARL4A* e *SNRPG*) correla negativamente con la sensibilità all’alpelisib, ovvero maggiore è la loro espressione minore è l’inibizione della crescita cellulare *in vitro* ottenuta con il farmaco (**Figura 13**).

HCC1954 AR vs HCC1954 +A



KPL4 AR vs KPL4 +A



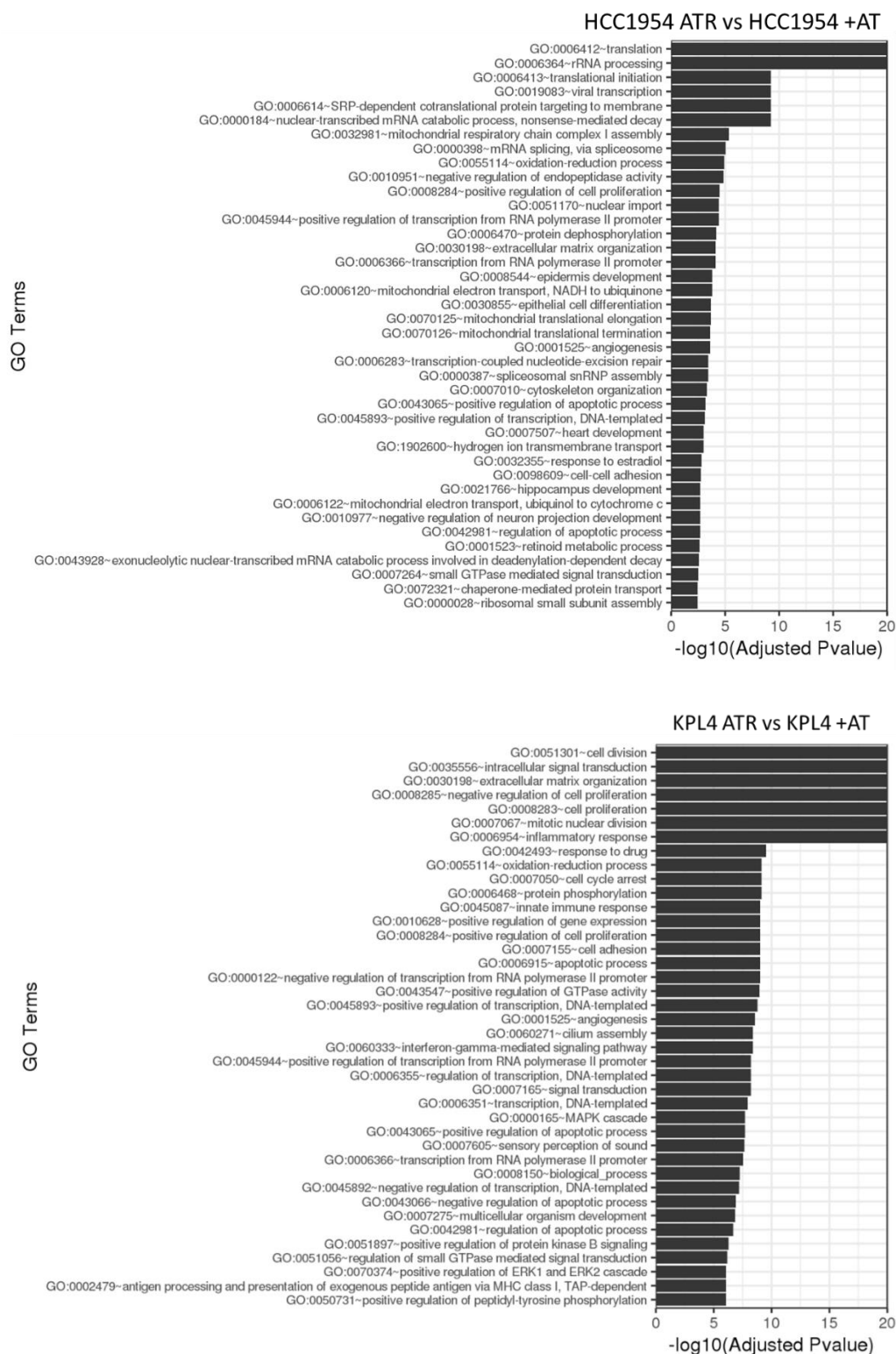


Figura 11. Analisi di arricchimento *Gene Ontology* nelle linee cellulari di carcinoma mammario HER2+/PIK3CA mutate resistenti ad alpelisib (AR) ed alpelisib + trastuzumab (ATR).

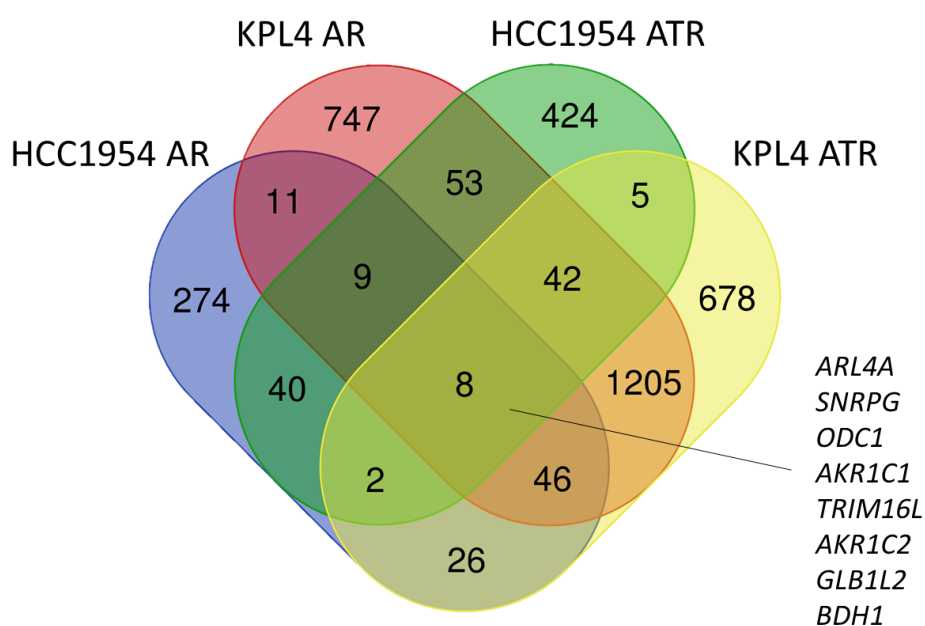


Figura 12. Diagramma di Venn dei geni up-regolati nelle linee cellulari di carcinoma mammario HER2+/PIK3CA mutate resistenti ad alpelisib (AR) ed alpelisib + trastuzumab (ATR).

Gene	KPL4 AR <i>log2 fold-change</i>	KPL4 ATR <i>log2 fold-change</i>	HCC1954 AR <i>log2 fold-change</i>	HCC1954 ATR <i>log2 fold-change</i>
<i>ARL4A</i>	1.62	1.32	1.27	1.54
<i>SNRPG</i>	1.96	1.16	1.01	1.42
<i>ODC1</i>	2.11	1.68	1.22	1.39
<i>AKR1C1</i>	1.12	3.02	1.20	2.45
<i>TRIM16L</i>	1.15	2.02	3.81	1.22
<i>AKR1C2</i>	2.27	2.16	2.08	2.12
<i>GLB1L2</i>	2.13	1.67	1.88	1.46
<i>BDH1</i>	1.51	1.51	1.99	1.23

Tabella 3. Geni comunemente up-regolati nelle linee cellulari di carcinoma mammario HER2+/PIK3CA mutate resistenti ad alpelisib (AR) ed alpelisib + trastuzumab (ATR).

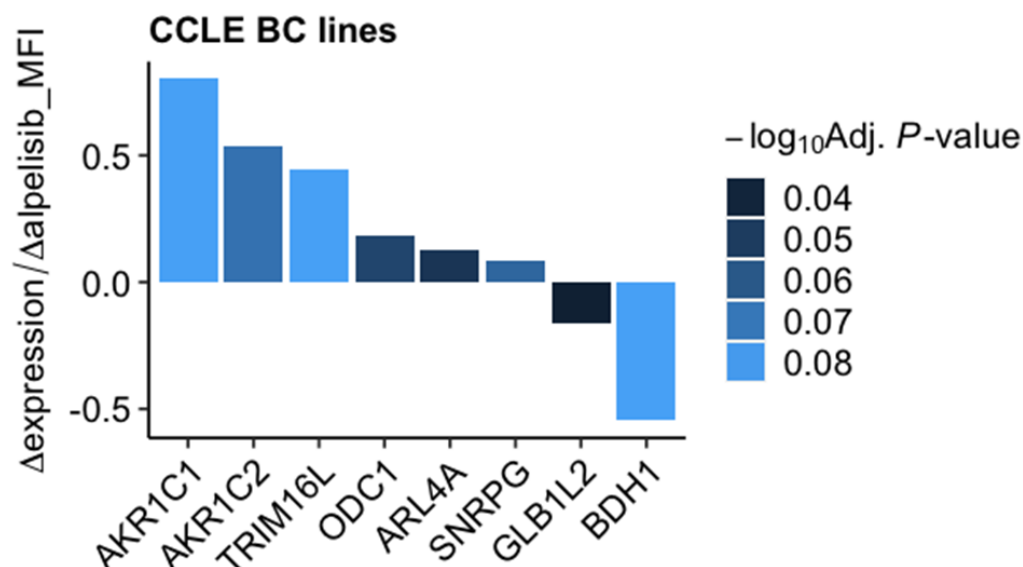


Figura 13. Correlazione dell'espressione genica e della sensibilità ad alpelisib in linee cellulari del cancro al seno. MFI, *Median Fluorescence Intensity*.

Inoltre abbiamo testato il potenziale valore prognostico di questi geni attraverso la valutazione della loro espressione in tumori primitivi della mammella HER2+. Per questa analisi abbiamo utilizzato i dati clinici e di espressione genica tumorale disponibili nel database “Kaplan-Meier Plotter” (<https://kmplot.com/analysis/>). Degli 8 geni analizzati, *AKR1C1* e *SNRPG* hanno mostrato un valore prognostico. In particolare, neoplasie mammarie HER2+ con elevati livelli di espressione di *AKR1C1* presentavano un maggiore rischio di recidiva rispetto alle neoplasie HER2+ con bassi livelli di *AKR1C1* (*Hazard Ratio* = 153, 95% CI 1.01-2.32, *p-value* = 0.043). Al contrario, nelle stesse pazienti, elevati livelli di espressione di *SNRPG* si associavano ad una prognosi migliore rispetto alle pazienti con bassa espressione di *SNRPG* (*Hazard Ratio* = 0.6, 95% CI 0.39-0.92, *p-value* = 0.018) (**Figura 14**).

Infine, per esaminare gli effetti della modulazione dell'espressione dell'mRNA di *AKR1C1* sulla crescita cellulare di linee sensibili e resistenti all'alpelisib (HCC1954, HCC1954 AR, KPL4 e KPL4 AR) abbiamo effettuato esperimenti di *knock-down* di *AKR1C1* attraverso siRNA. Risultati preliminari dimostrano una riduzione significativa della crescita cellulare

(range di inibizione 20-25%) nei modelli sensibili, e nei modelli resistenti, che mostravano livelli proteici più elevati di *AKR1C1*, tale inibizione è risultata essere più evidente (range di inibizione 70-75%). Nel complesso questi dati indicano il coinvolgimento di *AKR1C1* nei processi di proliferazione tumorale, ed al contempo un suo particolare ruolo funzionale nei modelli cellulari con resistenza acquisita ad alpelisib.

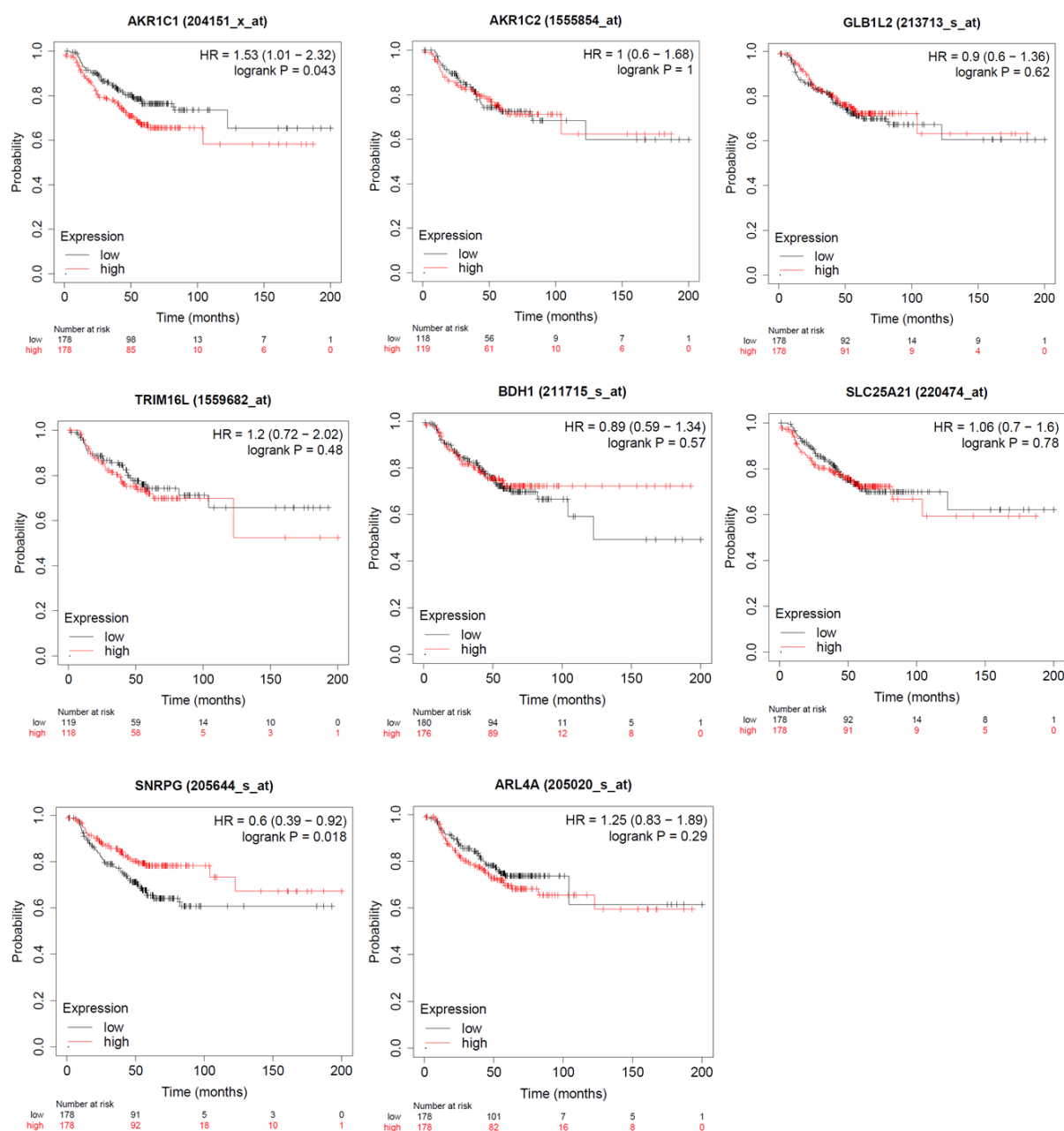


Figura 14. Curve di sopravvivenza (*relapse-free survival*) secondo il metodo di Kaplan-Meier in pazienti con neoplasia mammaria HER2+. Il *log-rank* test è stato utilizzato per comparare i gruppi con alta (rosso) e bassa (nera) espressione dei geni *ARL4A*, *SNRPG*, *ODC1*, *AKR1C1*, *TRIM16L*, *AKR1C2*, *GLB1L2*, *BDH1*.

7. Discussione

In questo studio, abbiamo esaminato l'impatto della mutazione del gene *PIK3CA* sulla efficacia delle terapie anti-HER2 ed il potenziale terapeutico della inibizione farmacologica dell'isoforma-alfa della PI3K nel carcinoma mammario HER2+ utilizzando modelli pre-clinici *in vitro* ed *in vivo*. Diversi studi clinici hanno esaminato il valore prognostico e predittivo di risposta alle terapie anti-HER2 delle mutazioni *PIK3CA* in pazienti con neoplasia mammaria HER2+ sia nel setting adiuvante che metastatico. Ad esempio, nello studio di fase III CLEOPATRA, è stato riscontrato che le pazienti con neoplasia mammaria avanzata HER2+ e mutazione *PIK3CA* presentavano una prognosi peggiore rispetto alle pazienti con *PIK3CA* *wild-type*, indipendentemente dal trattamento anti-HER2 ricevuto (trastuzumab o trastuzumab + pertuzumab) [110]. Nel tumore mammario HER2+ in fase iniziale, un recente studio ha combinato i dati dei singoli pazienti (*patient-level data*) arruolati in cinque trial clinici di terapia neoadiuvante con trastuzumab, lapatinib o la combinazione trastuzumab e lapatinib ed ha analizzato l'associazione tra le mutazioni *PIK3CA* e la risposta patologica completa (pCR) [103]. Questa analisi ha dimostrato che le pazienti con neoplasia mammaria HER2+/*PIK3CA* mutato ottenevano un tasso di pCR significativamente più basso rispetto alle pazienti con pazienti con neoplasia mammaria HER2+/*PIK3CA* *wild-type* [103]. Tuttavia, in altri studi (TRYPHAENA e NeoSphere) non è stata riscontrata una associazione significativa tra le mutazioni *PIK3CA* e la resistenza agli anticorpi anti-HER2 [104-111]. I risultati dei nostri esperimenti, condotti su diverse linee cellulari di carcinoma mammario HER2+, hanno confermato che la presenza di mutazioni attivanti il gene *PIK3CA* si associa ad una ridotta sensibilità sia alla monoterapia con trastuzumab che al doppio blocco anti-HER2 con trastuzumab e pertuzumab. Pertanto, la sola terapia anti-HER2 potrebbe non rappresentare un trattamento adeguato per quelle pazienti con neoplasia mammaria HER2+ e mutazione

attivante *PIK3CA*. Queste pazienti, invece, potrebbero potenzialmente beneficiare dall'impiego degli inibitori della via di segnale PI3K/AKT/mTOR.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi farmaci in grado di inibire una o più componenti della via di segnale della PI3K/AKT/mTOR inclusi gli inibitori pan-PI3K, gli inibitori PI3K isoforma-specifici, i doppi inibitori PI3K/mTOR, gli inibitori di mTORC1 o di mTORC1/2 e gli inibitori AKT [93,95,96]. Questi agenti sono stati valutati nei diversi sottotipi di neoplasia mammaria (tumori luminali, triplo-negativi, HER2-positivi) ottenendo i maggiori benefici quando combinati alle terapie standard e nelle neoplasie che presentavano una iperattivazione della via di segnale della PI3K/AKT/mTOR (mutazioni attivanti *PIK3CA* o *AKT*, mutazioni inattivanti o perdita di PTEN). Nel sottotipo HER2+, diverse evidenze precliniche hanno dimostrato che gli inibitori della via PI3K/AKT/mTOR sono in grado di potenziare l'attività antiproliferativa delle terapie anti-HER2 e di superare la resistenza acquisita a questi trattamenti [112-118]. Tra questi, i pan-inibitori della PI3K si sono dimostrati particolarmente attivi nei modelli di carcinoma mammario HER2+ con mutazioni attivanti il gene *PIK3CA* tuttavia il loro trasferimento nel setting clinico è stato precluso dalla loro tossicità dovuta in parte alla mancanza di selettività verso le diverse isoforme di PI3K (α , β , γ e δ).

L'alpelisib è un inibitore della PI3K di classe I α -specifico (PI3K α) che ha dimostrato di inibire *in vitro* ed *in vivo* la fosforilazione delle proteine target a valle della PI3K, compreso AKT, e la crescita di cellule di carcinoma mammario positive alla mutazione del gene *PIK3CA*. Nel setting clinico, l'efficacia ed il profilo di tossicità dell'alpelisib sono stati valutati nell'ambito del SOLAR-1, uno studio di fase III, randomizzato, in doppio cieco, che ha valutato l'alpelisib o placebo in associazione a fulvestrant in pazienti in post-menopausa con carcinoma mammario HR+/HER2- avanzato, la cui malattia era progredita o recidivata durante o dopo un trattamento con un inibitore dell'aromatasi. Lo studio SOLAR-1 ha dimostrato che, nelle pazienti con mutazione *PIK3CA*, l'aggiunta di alpelisib a fulvestrant prolunga in modo

significativo la sopravvivenza libera da progressione (riduzione stimata del 35% del rischio di progressione della malattia o di morte) mantenendo un profilo di tossicità accettabile [119]. Sulla base di questi risultati l'alpelisib ha ricevuto l'approvazione da parte della *Food and Drug Administration* (FDA) e della *European Medicines Agency* (EMA) per il trattamento di pazienti con neoplasia mammaria avanzata HR+/HER2- con mutazione *PIK3CA* e rappresenta ad oggi l'unico inibitore PI3K disponibile nella pratica clinica.

Sulla base di queste evidenze, abbiamo scelto di utilizzare nel nostro studio l'alpelisib, per valutarne l'efficacia in monoterapia od in combinazione con farmaci anti-HER2 in modelli preclinici di neoplasia mammaria HER2+. In linea con i risultati ottenuti da altri inibitori PI3K [112,116], l'alpelisib ha dimostrato inibire in maniera significativa la crescita cellulare e di potenziare l'effetto degli anticorpi monoclonali anti-HER2 trastuzumab e pertuzumab. Nelle linee cellulari di carcinoma mammario HER2+/PIK3CA mutate, l'alpelisib si è dimostrato più potente del trastuzumab o della combinazione trastuzumab + pertuzumab nell'inibire la crescita *in vitro* e la fosforilazione dei downstream della PI3K (Akt e S6). Tali risultati sono stati confermati *in vivo*, dove l'alpelisib ha incrementato significativamente l'efficacia del trastuzumab nel rallentare la crescita di *xenografts* di cellule HCC1954.

Nel complesso i nostri dati supportano lo sviluppo clinico dell'alpelisib nell'ambito delle strategie terapeutiche per le pazienti con neoplasia mammaria HER2+ e mutazioni *PIK3CA*. A questo proposito è importante sottolineare che due studi clinici sono in corso di attivazione a livello globale: l'EPIK-B2, uno studio di fase III, multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, che valuterà l'efficacia e la sicurezza dell'alpelisib in combinazione con trastuzumab e pertuzumab come trattamento di mantenimento successivo ad una terapia di induzione con un taxano + trastuzumab + pertuzumab in pazienti con carcinoma mammario avanzato HER2+/PIK3CA-mutato (NCT04208178); l'ALPHABET, uno studio di fase III, multicentrico, randomizzato, che valuterà l'efficacia e la sicurezza

dell'alpelisib + trastuzumab ± fulvestrant rispetto a trastuzumab + chemioterapia in pazienti con carcinoma mammario avanzato HER2+/PIK3CA-mutato in progressione ad un precedente trattamento anti-HER2 (NCT05063786).

Uno dei limiti principali della efficacia delle terapie a bersaglio molecolare è rappresentato dai fenomeni di resistenza intrinseca ed acquisita. Lo studio dei determinanti molecolari responsabili dello sviluppo della resistenza offre la possibilità di sviluppare fattori prognostici e predittivi di risposta/resistenza al trattamento ed al tempo stesso di individuare nuovi bersagli terapeutici. Per tale motivo, nell'ambito di questo lavoro, abbiamo generato modelli di resistenza acquisita alla monoterapia con alpelisib (AR) ed alla combinazione alpelisib + trastuzumab (ATR) che sono stati successivamente caratterizzati attraverso lo studio dei loro trascrittomici (*RNA-sequencing*). L'analisi di questi dati ha permesso di identificare alcuni processi biologici comunemente iperattivati nei modelli resistenti (ossido-riduzione, proliferazione e divisione cellulare, risposta immunitaria, sintesi dell'RNA) e *gene candidates* potenzialmente responsabili della insorgenza di resistenza all'alpelisib. Tra questi, i geni *AKR1C1* e *AKR1C2*, che appartengono alla famiglia delle aldo-cheto reduttasi *AKR1C* [120]. Questa famiglia composta da quattro enzimi (*AKR1C1-4*) catalizza riduzioni NADPH-dipendenti e svolge importanti funzioni nei processi di biosintesi, del metabolismo intermedio e della detossicazione [120]. Recenti studi hanno evidenziato una forte correlazione tra livelli di espressione dei membri della famiglia *AKR1C* e la trasformazione neoplastica, l'invasione tumorale e la resistenza alle terapie oncologiche [121-123]. Attraverso l'analisi di database disponibili pubblicamente, abbiamo riscontrato che l'espressione dei geni *AKR1C1* e *AKR1C2* risulta essere inversamente correlata con la sensibilità *in vitro* ad alpelisib in un ampio panel di cellule di carcinoma mammario. Inoltre una elevata espressione di *AKR1C1*, ma non di *AKR1C2*, nei tumori della mammella HER2+ ha un valore prognostico negativo.

In conclusione, i risultati del nostro lavoro confermano l'impatto negativo delle mutazioni di *PIK3CA* sulla efficacia degli anticorpi monoclonali anti-HER2, trastuzumab e pertuzumab, utilizzati per il trattamento delle pazienti con neoplasie mammarie HER2+ e supportano l'impiego dell'inibitore alfa-selettivo di PI3K alpelisib al fine di potenziare la loro attività antitumorale. L'integrazione dei dati omici provenienti dai nostri modelli preclinici di resistenza ad alpelisib e future sperimentazioni chiariranno gli aspetti meccanicistici alla base della resistenza. Ciò consentirà di definire biomarcatori per una appropriata selezione delle pazienti con neoplasia mammaria HER2+ che maggiormente beneficiano del trattamento con alpelisib e di identificare nuovi bersagli terapeutici per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Bibliografia

1. Globocan, 2020. Estimated Cancer Incidence, Mortality et Prevalence worldwide in 2020. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
2. I numeri del cancro in Italia 2019. AIOM-AIRTUM-Fondazione AIOM. www.aiom.it.
3. Ravdin Pm, Cronin Ka, Howlader N et al. The decrease in breast cancer incidence in 2003 in Unites States. N Engl J med 2007; 356:1670-1674.
4. Crocetti E, Buzzoni C, Falcini F, et al. Disentangling the roles of mammographic screening and HRT in recent breast cancer trends in Italy by analyses based on calendar time and time since screening activation. Breast J 2010;16: 350-355.
5. Siegel RL, Miller KD, and Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017; 67: 7-30.
6. Speirs V, Shaaban AM (2009). The rising incidence of male breast cancer. Breast Cancer Res Treatment 115: 429-430.
7. ACS, American Cancer Society (2021) Breast cancer facts & figures, 2021. American Cancer Society, Atlanta.
8. Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, et al. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. Breast Cancer Res Treat. 2017; 165: 193-200.
9. Chen S, Parmigiani G. Meta-Analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. J Clin Oncol 2007; 25:1329-1333.
10. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. The Lancet, Volume 362, Issue 9382, 2003, Pages 419-427, ISSN 0140-6736, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14065-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14065-2).
11. Berrino F, Micheli A. Ormoni, fattori costituzionali, dieta e carcinoma mammario. Attualità in Senologia 2005; 44:12-21.
12. Ng AK, Travis LB. Radiation therapy and breast cancer risk. J Natl Compr Canc Netw. 2009 Nov;7(10):1121-8. doi: 10.6004/jnccn.2009.0073. PMID: 19930978.
13. Cuzick J, Sestak I, Bonanni B et al. Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data. Lancet. 2013; 381:1827-1834.
14. Goss PE, Ingle JN, Alès-Martinez JE et al. Exemestane for breast cancer prevention in postmenopausal women. N Engl J Med 2011; 364: 2381-2391.
15. Cuzick J, Sestak I, Forbes JF, et al. Anastrozole for prevention of breast cancer in high-risk postmenopausal women (IBIS-II): an international, double-blind, randomized placebo-controlled trial. Lancet. 2014 ;383:1041- 1048
16. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. Stat Med 2004;23:1111-1130. Erratum in: Stat Med 2005;24:156.
17. Sardanelli F, Aase HS, Álvarez M, et al. Position paper on screening for breast cancer by the European Society of Breast Imaging (EUSOBI) and 30 national breast radiology bodies. Eur Radiol. 2017 Jul;27(7):2737-2743.

18. Saslow D, Boetes C, Burke W, et al. American Cancer Society guide- lines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. *CA Cancer J Clin* 2007;57:75-89.
19. Phi XA, Saadatmand S, De Bock GH et al. Contribution of mammography to MRI screening in BRCA mutation carriers by BRCA status and age: individual patient data meta-analysis. *Br J Cancer*. 2016 Mar 15;114(6):631-7.
20. Libson, S, Lippman M. (2014). A review of clinical aspects of breast cancer. *International Review of Psychiatry*, 26(1), 4–15. doi:10.3109/09540261.2013.852971.
21. Funke, M. (2016). Bildgebende Diagnostik des Mammakarzinoms. *Der Radiologe*, 56(10), 921–938. doi:10.1007/s00117-016-0134-6.
22. Classificazione anatomo-patologica WHO tumori della mammella <https://tumourclassification.iarc.who.int/>
23. Amin B, Edge SB, editors. American Joint Committee on cancer (AJCC). *Cancer Staging manual*. Eighth edition. New York, Springer 2017.
24. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer *J Natl Cancer Inst* 2009;101:736–750.
25. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:262-272
26. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
27. Prat A, Parker JS, Karginova O, Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12R68.
28. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One*. 2016 Jun 16;11(6): e0157368. doi: 10.1371/journal.pone.0157368.
29. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple- negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121:2750-2067.
30. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:966-978.
31. Yerushalmi R , Hayes MM, Gelmon KA. Breast carcinoma-rare types: review of the literature. *Ann Oncol* 2009;20:1763-1770.
32. Ejlertsen B, Jensen M-B, Rank F, et al. Population-based study of peritumoral lymphovascular invasion and outcome among patients with operable breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:729-735.
33. Meattini I, Desideri I, Saieva C, et al. Impact of sentinel node tumor burden on outcome of invasive breast cancer patients. *European Journal of Surgical Oncology*, 40 (2014) 1195-1202

34. Dowsett M, Cuzick J, Ingle J, et al. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J Clin Oncol* 2010;28:509-518.
35. De Placido S, De Laurentiis M et al. Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9:1039- 1046.
36. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer *J Clin Oncol* 2010;28:2784-2795.
37. Dieci MV, Mathieu MC et al. Prognostic and predictive value of tumor- infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Ann Oncol*. 2015 Aug;26(8):1698-704. doi: 10.1093/annonc/mdv239.
38. Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol*. 2016 Oct 1;2(10):1354-1360. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.1061.
39. Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor- infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015 Feb;26(2):259- 71. doi: 10.1093/annonc/mdu450. Epub 2014 Sep 11.
40. Adaniel C, Jhaveri K, Heguy A, et al. Genome-based risk prediction for early stage breast cancer. *Oncologist*. 2014 Oct;19(10):1019-1027.
41. Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1233-1241.
42. Litiere S, Werutsky G, Fentiman IS et al: Breast conserving therapy versus mastectomy for stage I-II breast cancer: 20 years follow up of EORTC 10801 phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2012; 13:412-419.
43. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, et al. Twenty-year follow-up of a randomised study comparing breast- conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1227-1232.
44. Esserman L, Gallant E et al. The Evolving Surgical Approach to Breast Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016;35:e5–e10. doi:10.1200/EDBK.
45. De Lorenzi F, Loschi P, Bagnardi V, et al. Oncoplastic Breast-Conserving Surgery for Tumors Larger than 2 Centimeters: Is it Oncologically Safe? A Matched-Cohort Analysis. *Ann Surg Oncol*. 2016;23:1852-9.
46. Canavese G, Catturich A, Vecchio C, et al. Sentinel lymph node biopsy compared to complete axillary dissection for staging early breast cancer: results of a randomized trial. *Ann Oncol* 2009;20:1001-1007.
47. Lyman GH, Temin S et al. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2014 ;32:1365-1383.

48. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med* 2003;349:546-553.
49. Veronesi U et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer. Ten year results of a randomized controlled study. *Ann Surg* 2010;251:595-600.
50. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomized trials. *Lancet* 2011;378:1707-1716.
51. START Trialists' Group, Bentzen SM, Agrawal RK, et al. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) Trial A of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: a randomised trial. *Lancet Oncol* 2008;9:331-341.
52. Hershman DL, Wang X, McBride R, et al. Delay on initiation adjuvant radiotherapy following breast conservation surgery and its impact on survival. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 2006 65:1353–1360.
53. Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, et al. Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. *J Clin Oncol* 2008; 26:814.
54. Mamtani A et al. How Often Does Neoadjuvant Chemotherapy Avoid Axillary Dissection in Patients With Histologically Confirmed Nodal Metastases? Results of a Prospective Study. *Ann Surg Oncol* 2016; 23:3467.
55. Minghao Wang, Lingmi Hou et al. Neoadjuvant Chemotherapy Creates Surgery Opportunities For Inoperable Locally Advanced Breast Cancer *Sci Rep.* 2017; 7: 44673. Published online 2017 Mar 22. doi: 10.1038/srep44673 PMCID: PMC5361098.
56. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Peto R, Davies C et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet.* 2012 Feb 4;379(9814):432-44.
57. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2011 Aug 27;378(9793):771-84.
58. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet* 2015386;1341-52.
59. Moja L, Tagliabue L et al. Trastuzumab containing regimens for earlybreast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Apr 18;(4):CD006243.
60. Gradishar WJ, Krasnojon D et al. Significantly longer progression-free survival with nab- paclitaxel compared with docetaxel as first-line therapy for metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009; 27(22): 3611-9.

61. Cortes J, O'Shaughnessy J, Loesch D, et al. Eribulin monotherapy versus treatment of physician's choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): a phase 3 open-label randomised study. *Lancet* 2011; 377(9769): 914-23.
62. Puglisi F, Rea D, Kroes MA, Pronzato P. Second-line single-agent chemotherapy in human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer: A systematic review. *Cancer treatment reviews* 2016; 43: 36-49.
63. Dear RF, McGeechan K, Jenkins MC, Barratt A et al. Combination versus sequential single agent chemotherapy for metastatic breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews* 2013; (12): CD008792.
64. Mouabbi JA, Osborne CK, Schiff R, Rimawi MF. Management of hormone receptor-positive, human epidermal growth factor 2-negative metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2021 Nov;190(2):189-201. doi: 10.1007/s10549-021-06383-5.
65. Berger ER, Park T, Saridakis A, Golshan M, Greenup RA, Ahuja N. Immunotherapy Treatment for Triple Negative Breast Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Aug 4;14(8):763. doi: 10.3390/ph14080763.
66. Watanabe S, Yonesaka K et al. Targeting of the HER2/HER3 signaling axis overcomes ligand-mediated resistance to trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *Cancer Med.* 2019;8(3):1258–1268. doi:10.1002/cam4.1995.
67. Scheuer, W. et al. Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer Res.* 69, 9330–9336 (2009)
68. Yamashita-Kashima et al. Pertuzumab in combination with trastuzumab shows significantly enhanced antitumor activity in HER2+ human gastric cancer xenograft models. *Clin. Cancer Res.* 17, 5060–5070 (2011).
69. Schlam I, Swain SM. HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors: the time is now. *NPJ Breast Cancer.* 2021 May 20;7(1):56. doi: 10.1038/s41523-021-00265-1.
70. Ferraro, E., Drago, J.Z. & Modi, S. Implementing antibody-drug conjugates (ADCs) in HER2-positive breast cancer: state of the art and future directions. *Breast Cancer Res* 23, 84 (2021).
71. Slamon, D. J. et al. Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707–712 (1989).
72. Gutierrez, C. & Schiff, R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135, 55–62 (2011).
73. Rimawi, M. F., Schiff, R. & Osborne, C. K. Targeting HER2 for the treatment of breast cancer. *Annu. Rev. Med.* 66, 111–128 (2015).
74. Wolff, A. C. et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J. Clin. Oncol.* 36, 2105–2122 (2018).
75. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, et al. Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *J Clin Oncol* 2011;29:3366-3373.

76. Perez EA, Suman VJ et al. Sequential versus concurrent trastuzumab in adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29:4491-4497.
77. Von Minckwitz G, Procter M, de Azambuja E, et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2- Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2017 Jun 5. doi: 10.1056/NEJMoa1703643.
78. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V et al. Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2- positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet Oncol*. 2014;15:640-647.
79. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, et al. NeoALTTO Study Team. Lapatinib with trastuzumab for HER2- positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet* 2012;379:633-640.
80. Guarneri V, Frassoldati A et al. Preoperative chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib, or both in human epidermal growth factor receptor 2- positive operable breast cancer: results of the randomized phase II CHER-LOB study. *J Clin Oncol*. 2012 Jun 1;30(16):1989-95.
81. Gianni L, Pienkowski T et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:25-32.
82. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T et al. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2- positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol*. 2013 ;24:2278-2284.
83. Swain, S. M. et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2- positive metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med*. 372, 724–734 (2015).
84. Diéras V, Miles D, Verma S, Pegram M, et al. Trastuzumab emtansine versus capecitabine plus lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer (EMILIA): a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Jun;18(6):732-742. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30312-1.
85. Rimawi, M.F., C. De Angelis, and R. Schiff, Resistance to Anti-HER2 Therapies in Breast Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2015: p. e157-64.
86. Xu, X. et al. HER2 reactivation through acquisition of the HER2 L755S mutation as a mechanism of acquired resistance to HER2-targeted therapy in HER2(+) breast cancer. *Clin. Cancer Res*. 23, 5123–5134 (2017).
87. Mitra, D. et al. An oncogenic isoform of HER2 associated with locally disseminated breast cancer and trastuzumab resistance. *Mol. Cancer Ther*. 8, 2152–2162 (2009).
88. Bender, L. M. & Nahta, R. Her2 cross talk and therapeutic resistance in breast cancer. *Front. Biosci*. 13, 3906–3912 (2008).
89. Arpino, G. et al. Treatment of human epidermal growth factor receptor 2- overexpressing breast cancer xenografts with multiagent HER-targeted therapy. *J. Natl. Cancer Inst*. 99, 694–705 (2007).

90. Wang, Y. C. et al. Different mechanisms for resistance to trastuzumab versus lapatinib in HER2-positive breast cancers—role of estrogen receptor and HER2 reactivation. *Breast Cancer Res.* 13, R121 (2011).
91. Giuliano, M. et al. Upregulation of ER signaling as an adaptive mechanism of cell survival in HER2-positive breast tumors treated with anti- HER2 therapy. *Clin. Cancer Res.* 21, 3995–4003 (2015).
92. Huang, C. et al. β 1 integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast Cancer Res.* 13, R84 (2011).
93. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 489–501.
94. Carrera AC, Anderson R. The cell biology behind the oncogenic PIP3 lipids. *J Cell Sci* 2019; 132: jcs228395.
95. Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2020; 20: 74–88.
96. Ortega MA, et al. Signal Transduction pathways in breast cancer: The important role of PI3K/Akt/mTOR. *J Oncol* 2020; 9258396.
97. Karakas B, et al. Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer* 2006; 94: 455–459.
98. Vasan N, et al. Overview of the relevance of PI3K pathway in HR-positive breast cancer. *Ann Oncol* 2019b; 30 (Suppl_10): x3–x11.
99. Huang CH, et al. The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science* 2007; 318: 1744–1748.
100. Burke JE, et al. Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110alpha (PIK3CA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 15259–15264.
101. Tang Y, et al. PIK3CA gene mutations in the helical domain correlate with high tumor mutation burden and poor prognosis in metastatic breast carcinomas with late-line therapies. *Aging (Albany NY)* 2020; 12: 1577–1590.
102. Martínez-Sáez O, et al. Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2020;22: 45.
103. Loibl, S et al. “PIK3CA mutations are associated with reduced pathological complete response rates in primary HER2-positive breast cancer: pooled analysis of 967 patients from five prospective trials investigating lapatinib and trastuzumab.” *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* vol. 27,8 (2016): 1519-25. doi:10.1093/annonc/mdw197.
104. Bianchini, G. et al. Biomarker analysis of the NeoSphere study: pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel versus trastuzumab plus docetaxel, pertuzumab plus trastuzumab, or pertuzumab plus docetaxel for the neoadjuvant treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res.* 19, 16. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0806-9> (2017).
105. Baselga, J. et al. Biomarker analyses in CLEOPATRA: a phase III, placebo-controlled study of pertuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive, first-line metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 32, 3753–3761. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.5384> (2014).

106. Rexer BN, Chanthaphaychith S, Dahlman K, Arteaga CL. Direct inhibition of PI3K in combination with dual HER2 inhibitors is required for optimal antitumor activity in HER2+ breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2014 Jan 23;16(1):R9. doi: 10.1186/bcr3601. PMID: 24451154; PMCID: PMC3978602.
107. Hanker A.B, Pfefferle A.D., Balko J.M., et al. Mutant PIK3CA accelerates HER2-driven transgenic mammary tumors and induces resistance to combinations of anti-HER2 therapies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110: 14372-14377
108. FDA approves alpelisib for metastatic breast cancer <https://www.fda.gov/>
109. Young, M.D., Wakefield, M.J., Smyth, G.K. et al. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol* 11, R14 (2010). <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-2-r14>
110. Baselga, J. et al. Biomarker analyses in CLEOPATRA: a phase III, placebo-controlled study of pertuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive, first-line metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 32, 3753–3761. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.5384> (2014).
111. Loibl, S. et al. PIK3CA mutations are associated with lower rates of pathologic complete response to anti-human epidermal growth factor receptor 2 (her2) therapy in primary HER2-overexpressing breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 32, 3212–3220. <https://doi.org/10.1200/jco.2014.55.7876> (2014).
112. Eichhorn, P. J. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res.* 68, 9221–9230. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1740> (2008).
113. Garcia-Garcia, C. et al. Dual mTORC1/2 and HER2 blockade results in antitumor activity in preclinical models of breast cancer resistant to anti-HER2 therapy. *Clin. Cancer Res.* 18, 2603–2612. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2750> (2012).
114. Chakrabarty, A., Sanchez, V., Kuba, M. G., Rinehart, C. & Arteaga, C. L. Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2718–2723. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018001108> (2012).
115. Serra, V. et al. PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene* 30, 2547–2557. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.626> (2011).
116. Rexer, B. N., Chanthaphaychith, S., Dahlman, K. & Arteaga, C. L. Direct inhibition of PI3K in combination with dual HER2 inhibitors is required for optimal antitumor activity in HER2+ breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 16, R9. <https://doi.org/10.1186/bcr3601> (2014).
117. Berns, K. et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 12, 395–402 (2007).
118. O'Brien, N. A. et al. Activated phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling confers resistance to trastuzumab but not lapatinib. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1489–1502 (2010).

119. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2019 May 16;380(20):1929-1940. doi: 10.1056/NEJMoa1813904. PMID: 31091374.
120. Zeng CM, Chang LL, Ying MD, et al. Aldo-Keto Reductase AKR1C1-AKR1C4: Functions, Regulation, and Intervention for Anti-cancer Therapy. *Front Pharmacol*. 2017;8:119. Published 2017 Mar 14. doi:10.3389/fphar.2017.00119
121. Shirato, A. et al. Cisplatin resistance by induction of aldo-keto reductase family 1 member C2 in human bladder cancer cells. *Oncology letters* 7, 674–678 (2014).
122. Bortolozzi, R., Bresolin, S., Rampazzo, E. et al. AKR1C enzymes sustain therapy resistance in paediatric T-ALL. *Br J Cancer* 118, 985–994 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0014-0>
123. Matsumoto, R., Tsuda, M., Yoshida, K. et al. Aldo-keto reductase 1C1 induced by interleukin-1 β mediates the invasive potential and drug resistance of metastatic bladder cancer cells. *Sci Rep* 6, 34625 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep34625>

