

HER2-pozitív emlőtumorok célzott terápiájában alkalmazott szerek és a terápiás válasz előrejelzése

Mihály Zsuzsanna, Győrffy Balázs

Magyar Tudományos Akadémia Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatócsoport, Semmelweis Egyetem I. Gyermekklinika, Budapest

Az utóbbi évtizedben az emlőrák célzott terápiája világszerte a klinikai rutin részévé vált. A jelenleg elérhető célzott terápiás kezelések célpontjai a hormonreceptorok és az EGFR/HER útvonal. A négy HER receptor közül a HER2 alkalmazott terápiás célpont, mely a RAS, RAF és PI3K molekulákon keresztül aktiválja a sejten belüli jelátviteli útvonalakat. Összefoglaló írásunkban röviden ismertetjük a HER2-n ható, az emlőrák terápiájában már elfogadott monoklonális antitesteket (trastuzumab, pertuzumab) és tirozinkináz-gátlót (lapatinib), valamint az elfogadásukhoz vezető klinikai vizsgálatok eredményeit. A harmadik fázisban lévő klinikai vizsgálatokba bevont szerek (neratinib, afatinib) is bemutatásra kerülnek, illetve röviden bemutatjuk az első és második fázisban lévő, az mTOR, a PI3K, az IGF1R és a HSP90 molekulákon ható szereket is. Kitérünk a klinikai gyakorlatban alkalmazható negatív biomarkerekre (amelyek a terápiás válasz hiányát tudják előre jelezni). További klinikai áttöréshez új terápiás választ előre jelző pozitív biomarkerekre lesz szükség. Magyar Onkológia 57:147–156, 2013

Kulcsszavak: HER2, emlőrák, biomarkerek, trastuzumab, célzott terápia

In the last decade, the targeted therapy of breast cancer became part of routine clinical protocols all over the globe. Options in today's targeted therapy include hormonal therapy and the modulation of the EGFR/HER-pathway. Of the four HER receptors, HER2 is the target of currently used treatment strategies. HER2 activates multiple intracellular pathways via RAS, RAF and PI3K. We give a comprehensive summary of approved monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors acting over HER2, including trastuzumab, lapatinib and pertuzumab. We elaborate on their mechanism of action and on clinical trials behind their approval. Agents in third phase clinical studies (neratinib, afatinib) are also described. We give a brief overview of agents currently in phase I and phase II studies; these are acting over the PI3K pathway, over IGF1R and over HSP90. Furthermore, currently validated negative biomarkers (markers predicting lack of response) in clinical use are also summarized. Finally, the major bottlenecks of clinical application including tumor heterogeneity and the high diversity of clinical studies are discussed. For a breakthrough we will need to identify new positive biomarkers of therapy response.

Mihály Z, Győrffy B. HER2-positive breast cancer: available targeted agents and biomarkers of therapy response. Hungarian Oncology 57:147–156, 2013

Keywords: ERBB2, trastuzumab, breast cancer, biomarker, targeted therapy

Levelezési cím: Mihály Zsuzsanna, Semmelweis Egyetem I. Gyermekklinika, 1083. Budapest, Bókay u. 53–54.

Tel.: 459-1500/5277, fax: 303-6077, E-mail: zsuzsannamihaly@gmail.com

Közlésre érkezett: 2013. január 2. • Elfogadva: 2013. február 10.

BEVEZETÉS

A tumoros betegek kezelése során alkalmazott célzott terápia a tumorra ható növekedési faktorokat, a sejtek által kifejezett sejt felszíni receptorokat vagy a sejten belül aktiválódott jelátviteli útvonalakat gátolhatja. Az emlőrák kezelésében régóta használják a hormonreceptoron ható gyógyszerek mellett a HER2 receptort gátló trastuzumabot és lapatinibet. HER2-pozitív korai és előrehaladott stádiumú emlőrákos betegeknél alkalmazható az A1 panelben első vonalbeli kezelésként intravénás trastuzumab egy évig hetente (paclitaxellel kombináltan) vagy háromhetente (docetaxellel kombináltan). Lapatinib capecitabinnel együtt adva per os második vonalban alkalmazható HER2-pozitív, trastuzumabterápián már átesett emlőrákos betegek esetében (1). A pertuzumab és az everolimus az idén került az FDA által az emlőrák bizonyos típusaiban jóváhagyott szerek közé. Bár a korábban jóváhagyott bevacicumab 2012 nyara óta már nem ajánlott szer az USA-ban, Magyarországon EU-törzskönyv alapján paclitaxellel kombinálva továbbra is adható. A klinikai vizsgálatokba vont, valamint a Magyarországon jelenleg alkalmazott szerek listáját az 1. táblázatban foglaltuk össze.

A receptor-tirozinkinázok családjába számos különböző növekedési faktor receptora tartozik. Az EGFR (EGFR, ERBB, HER) család (EGFR1, EGFR2, EGFR3 és EGFR4) a másodlagos jelátviteli molekulákat aktiválja membrántranszlokáció, konformációváltozás és tirozinfoszforilálás révén. A családot képező négy tirozinkináz részegységeikben (sejten kívüli rész, alfa-helikális membránon átvivő rész, és sejten belüli fehérjekináz-egység) jelentős hasonlóságot mutatnak, azonban a hozzájuk kötődő növekedési faktorok eltérőek. Az EGFR1-hez (HER1, ERBB1) kötődő növekedési faktorok az EGF, az AR (amfiredulin) és a TGF- α (transzformáló növekedési faktor- α). Az EGFR3-at aktiválja a BTC (betacellulin) és a HB-EGF (heparinkötő EGF), míg az NRG (neuregulin) molekulacsalád hatására az EGFR3 és EGFR4 receptor is aktiválódik (2). Ezzel szemben az EGFR2-nek (HER2, neu, ERBB2) nincsen ismert liganduma. A receptor aktivált formája a család többi tagjával történő heterodimer

Rövidítések jegyzéke:

AR: amfiredulin, BTC: betacellulin, CEP17: 17-es kromoszóma centromer próba, EGF: epidermális növekedési faktor, EGFR: EGF-receptor (HER, ERBB), ER: ösztrogénreceptor, ERK/MAPK: extracelluláris szignál szabályozta kináz/mitogénaktivált proteinkináz, FDA: Federal Drug Administration, FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció, HSP: hőszokkfehérje, HB-EGF: heparinkötő EGF, IGFR: inzulinszerű növekedési faktor receptor, IHC: immunhisztokémia, mTOR: mammalian target of rapamycin, MEK: MAPK/ERK-kináz, MUC: mucin, NRG: neuregulin, PI3K: foszfatidilinozitol-3-kináz, PTEN: foszfatáz és tenzin homológ, TKI: tirozinkináz-gátló, VEGF: vaszkuláris endotheliális növekedési faktor

vagy egy másik HER2 receptorral való homodimer képződése révén jön létre. A PI3K útvonal vizsgálata alapján a homodimer forma gyengébb aktiváló hatással bír, míg legpotensebbnek a HER3-HER2 heterodimer számít (3).

A CÉLZOTT TERÁPIA GYÓGYSZEREI

Az utóbbi évtizedben a célzott terápiás gyógyszerek betörték a klinikumba, és az onkológiában jelenleg szinte csak ilyen típusú új szereket vezetnek be. A tumorok progressziójában kulcsszerepet játszó molekulákhoz specifikusan kötődő gátlószerek magasabb hatékonyság mellett kevesebb mellékhatással járnak, mint a hagyományos citotoxikus kemoterapeutikumok. Hatásmechanizmus alapján a célzott gyógyszereket két fő alcsoportra lehet felosztani: míg a monoklonális antitestek a sejtek felszínén kifejeződő receptorokhoz kötődve gátolják a jelátviteli útvonalak aktiválódását, a kis molekulású szerek a sejtmembránon átjutva a jelátvitel egyes kulcsmolekuláihoz kötődve akadályozzák meg, hogy a jel a sejtbe jusson. A különböző HER2 receptorokon, valamint az általuk indukált jelátviteli útvonalakon ható szereket és célmolekulákat az 1. ábrán foglaltuk össze. Az alábbiakban elsőként a Magyarországon már jóváhagyott, a HER2 gátlásán keresztül ható szereket, majd a klinikai evidencia alapján előbb a harmadik fázisú vizsgálatokban, majd a második és első fázisú vizsgálatokban tesztelt szereket mutatjuk be.

HER2-GÁTLÓK

Trastuzumab

A trastuzumab a HER2 receptor sejten kívüli IV. egységéhez kötődve gátolja a receptor dimerizációját, így blokkolva a tirozinkináz-foszforiláció által beindított PI3K és MAPK jelátviteli útvonalakat. Tumorelles hatáshoz hozzájárul az érújdonképződést gátló hatása, valamint a szer által indukált antitestfüggő sejt közvetített citotoxicitás is.

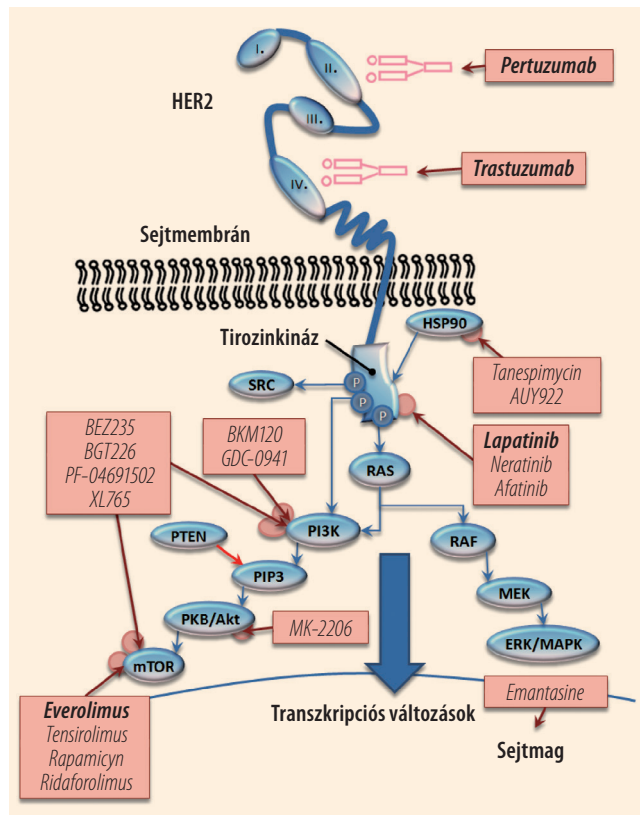
Az FDA az általa 1998-ban áttétes HER2-pozitív emlőrákos betegek kezelésére elsőként jóváhagyott célzott terápiás szer indikációját 2006-ban korai emlőrákos betegekre is kiterjesztette. Az emlőrákban való alkalmazásához a jóváhagyás alapjául egy randomizált, 469 betegen végzett III. fázisú tanulmány szolgált. Ebben a kemoterápiát trastuzumabbal kombinálva szignifikánsan hosszabb kiújulásmentes időtartamot (medián: 7,4 vs. 4,6 hónap), teljes túlélést (medián: 25,1 vs. 20,3 hónap), és magasabb objektív terápiás választ (50% vs. 30%) találtak áttétes emlőrákos betegeknél a 20%-kal csökkent halálozási arány mellett (4). Néhány évvel később két nagy esetszámú vizsgálat (NSABP31, NCCTG N9831) anyagának összevetése alapján a tumor kiújulásmentes időszakának jelentős megnövekedése (5) folytán kiterjesztették

1. táblázat. Az emlőtumor kezelésében Magyarországon klinikailag használt, az FDA által jóváhagyott (A), valamint klinikai vizsgálatokban részt vevő (B) célzott terápiás gyógyszerek

| A | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---|
| Gyógyszer | Típus | Futó vizsgálatok száma* | Megjegyzés |
| Magyarországon használt szerek | | | |
| Trastuzumab (Herceptin) | Monoklonális antitest | 461 | Mo.: A panel 1. vonal HER2+ FDA: 2006, HER2+ 1. vonal |
| Lapatinib (Tykerb) | Kis molekulásúlyú tirozinkináz-gátló | 176 | Mo.: A2 panel 2. vonal HER2+ FDA: 2007, HER2+ 2. vonal |
| Bevacizumab (Avastin) | Monoklonális antitest | 207 | Mo.: B1&C1 panel 1. vonal HER2- FDA: visszavonva, 2012 |
| FDA által jóváhagyott szerek | | | |
| Pertuzumab (Omnitarg) | Monoklonális antitest | 25 | FDA: 2012, HER2+ 1. vonal |
| Everolimus (Afinitor) | mTOR-gátló | 81 | FDA: 2012, HER2- ER+ pm 2. vonal |
| B | | | |
| Gyógyszer | Típus | Futó vizsgálatok száma* | |
| T-DM1 | Trastuzumab-DM1 konjugátum | 17 | |
| Afatinib | Kis molekulásúlyú tirozinkináz-gátlók | 13 | |
| Neratinib | | 17 | |
| Dovitinib | | 7 | |
| Temsirolimus | mTOR-gátlók | 15 | |
| Rapamicyn | | 3 | |
| Ridaforolimus | | 5 | |
| Tanespimycin | HSP90-gátlók | 5 | |
| AUY922 | | 4 | |
| Linsitinib | IGF-IR-gátlók | 2 | |
| Cixutumumab | | 3 | |
| Panabinostat | Hisztondeacetiláz-gátlók | 8 | |
| Vorinostat | | 19 | |
| BEZ235 | PI3K- és mTOR-gátlók | 10 | |
| BGT226 | | 1 | |
| PF-04691502 | | 2 | |
| XL765 | | 1 | |
| BKM120 | PI3K-gátlók | 19 | |
| GDC-0941 | | 3 | |
| MK-2206 | Akt-gátló | 12 | |

Mo.: magyarországi alkalmazás, FDA: www.fda.gov adatai alapján, pm: menopauza után, *www.clinicaltrials.gov adatai alapján

1. ábra. A HER2 receptor tirozinkináz egységének foszforilációja során aktivált jelátviteli utak, valamint az ezeken ható jóváhagyott (félkövér) és fejlesztés alatt álló célzott terápiás gyógyszerek. I., II., III., IV.: A HER2 sejten kívüli részegységei



az indikációját korai stádiumú betegekre is. Jelenleg még vita tárgyát képezi, hogy a kezelést követő kiújulás esetén a szer újbóli alkalmazása eredményes lehet-e. Eddig több prospektív tanulmányt közöltek, amelyek alátámasztották a korábbi retrospektív eredményeket, miszerint a trastuzumabkezelés folytatása szignifikánsan növelte a kiújulásmentes túlélést áttétes emlőrákos betegeknél (6). Bár ezek nyomán az NCCN felvette ajánlásai közé a trastuzumabterápia folytatását, a jelenleg érvényes protokollok alapján a trastuzumabterápiát követő kiújulás esetén lapatinib-capecitabin kombinációs kezelést kell kezdeni.

A trastuzumabkezelésre az áttétes betegek 50%-a reagál csak (7), és az első évben a betegek 15%-ában a betegség továbbhalad és áttétek jelennek meg (8), ezért az elsődleges, illetve a terápia indukálta rezisztencia kialakulásáért felelős molekuláris mechanizmusok megismerése kulcsfontosságú a betegek túlélésének javítása érdekében. Rezisztencia jöhet létre a sejten kívüli egység módosulása, a HER2 alternatív aktiválódása, valamint a sejten belül a párhuzamos útvonalak aktiválódása révén.

Rezisztencia jöhet létre a trastuzumabot kötő IV. egység megváltozása esetén, amilyen a kötőhely nélküli p95HER2 csonkított receptor (9). A p95 HER2-t kifejező esetekben nemcsak a trastuzumabkezelést követő szignifikánsan rövidebb kiújulásmentes túlélést és teljes túlélést mutatták ki, de a tüdőáttétek előfordulása is gyakoribb volt (10). A szérumba proteolitikus hasítást révén bekerülő sHER2 szintjét több munkacsoport is vizsgálta. Tsé és mtsai az eredményeket összegezve jutottak arra, hogy a sHER2 rutin mérése lehetővé teszi a trastuzumabtartalmú terápiára adott válasz és a progressziómentes túlélés korai előrejelzését (11). A MUC membránasszociált glikoproteinek szerepét igazolták a trastuzumabrezisztencia hátterében két in vitro vizsgálatban MUC4 (12), illetve MUC1 fehérje esetén (13).

A HER3 receptoron keresztüli PI3K/Akt-aktiválódás, mint a rezisztencia egyik fő tényezője (3) állhat amögött, hogy a HER3-HER2 heterodimerizációt és az általuk aktivált alternatív útvonalat sikeresen gátló pertuzumab klinikailag hatásos trastuzumabrezisztens esetekben is (14). Hollmen és munkatársai az ERBB4 (HER4) sejten kívüli egységének, mint biomarkernek szérumban mért megnövekedett szintjét ELISA-val mérve előre jelezték a HER4-gátló mAb1479 hatását (15). Egy másik aktiválható alternatív útvonal, a MET és ligandja, a heregulin (HRG) emelkedésével is létrejöhet általános EGFR-rezisztencia (16). Preklinikai vizsgálatokban az IGF1R és a HER2 együttes expressziója által létrehozott trastuzumabrezisztencia felfüggeszhető volt IGF1R gátlásával (17). Az EphA2 receptor-tirozinkináz megnövekedett kifejeződését azonosították sejtvonalmodellekben. HER2-pozitív, trastuzumabrezisztens betegmintákban a gén kifejeződése fordított összefüggést mutatott a betegségmentes- és a teljes túléléssel (18).

HER2-független jelátvitel aktiválható a RAS jelátviteli kaskád más mutációi révén. Ilyen a PTEN tumorszuppresszor gén elvesztése (19) vagy a PI3K-t aktiváló p110 katalitikus egységen létrejövő mutáció (20), amelyek jelenléte rossz prognózissal és rövidebb túléléssel párosult retrospektív vizsgálatok alapján (21). O'Brien és munkatársai trastuzumabrezisztencia esetén az Akt/mTOR útvonalak aktivitását észlelték, ami PI3K- és mTOR-gátlókkal akadályozható volt. Felvetették, hogy bár a trastuzumabrezisztenciát nem jelzi előre az AKT/mTOR aktivitása, az ilyen betegnél az everolimus hatékony lehet (22). Preklinikai és klinikai vizsgálatokban az SRC protoonkogén aktiváltsága és a trastuzumabrezisztencia között korrelációt mutattak ki (23). Nahta és munkatársai a lecsökkent p27-kifejeződést hozták összefüggésbe a trastuzumabrezisztenciával sejtvonalakban (24). A sejtciklusban szerepet játszó ciklin E génjének amplifikációját és magas kifejeződését mutatták ki a trastuzumabrezisztencia hátterében, ami szignifikánsan csökkent ciklinfüggő kináz (CDK) gátló hatására in vitro és in vivo kísérletekben (25).

2. táblázat. A trastuzumabrezisztencia főbb mechanizmusai, valamint az ezek lehetséges biomarkereiként azonosított gének és fehérjék összefoglalása

| Rezisztencia mechanizmusa | Biomarkerek | Referencia |
|--|---|------------|
| Kötődési hely megváltozása | p95 HER | 59 |
| | MUC4 magas kifejeződése | 40 |
| | MUC1 magas kifejeződése | 18 |
| | sHER2 magas szérum szintje | 61 |
| Útvonalak alternatív aktiválódása | HER3/HER2 heterodimer | 22 |
| | IGF-1R/HER2 heterodimer | 35 |
| | cMET/HER2 heterodimer | 66 |
| | EphA2 magas kifejeződése | 70 |
| HER2-független jelátvitel aktiválódása | pTEN-vesztés | 39, 50 |
| | PI3K aktiváló mutációja | 50 |
| | SRC fokozott aktivitása | 69 |
| | p27 csökkent szintje | 42 |
| | ciklin E amplifikációja, magas kifejeződése | 54 |

A trastuzumabrezisztenciával összefüggésbe hozott gének listáját a 2. táblázatban foglaltuk össze.

T-DM1 (trastuzumab emtansine)

Nagy reményeket fűznek a trastuzumabhoz konjugált DM1-hez (maytansine-származék). A rendkívül citotoxikus DM1 sejtsztódás gátló hatását a tubulinhoz kötődve a polimerizáció akadályozása révén fejt ki. HER2-ellenes monoklonális antitesthez kötve csak az internalizáció után fejt ki a hatását a célsejtben. Az eddigi kilenc lezárt I. és II. fázisú klinikai vizsgálat alapján a betegek 25,9–64%-a mutatott objektív választ a kezelésre 4,6–14,2 hónapos kiújulásmentes túlélés mellett (26). Jelenleg három III. fázisú vizsgálat van folyamatban a szerrel áttétes emlőtumoros betegeken mind első- (MARIANNE, EMILIA), mind másodvonalbeli kezelés-ként (TH3RESA) trastuzumab-, taxán- és lapatinibkezelést követően (www.clinicaltrials.gov).

Lapatinib

A lapatinib kis molekulású, szájon át adható tirozinkináz-gátló, amely mind az EGFR, mind a HER2 esetén gátolja a jelátviteli folyamatok beindulását. Egy III. fázisú, 399 betegen végzett klinikai vizsgálat eredményei alapján hagyta jóvá a szer capecitabinnal kombinált alkalmazását az FDA. A capecitabinnal kombinált terápia hosszabb medián progressziómentes időt (27,1 vs. 16,8 hét) és nagyobb válaszarányt (23,7% vs. 13,9%) eredményezett capecitabin-monoterápiával szemben (27). Néhány évvel

később az FDA jóváhagyta a lapatinib-letrozol kombináció terápiai összeállítását is HER2- és ösztrogénreceptor-pozitív, előrehaladott emlőrákos betegek számára (28). Bár egy 62 vizsgálat eredményeit összevető tanulmány jobbnak találta a letrozol-lapatinib kombinációt a teljes és a kiújulásmentes túlélés, valamint a válaszadási arány tekintetében a letrozol-monoterápiához képest, a vizsgálatok jelentős heterogenitása miatt arra figyelmeztettek, hogy további összehasonlító klinikai vizsgálatok elvégzéséig fenntartásokkal kezelendők ezek az eredmények (29).

Klinikai vizsgálatok igazolták, hogy a lapatinib és a trastuzumab együttes alkalmazásukkor szinergista hatást fejtenek ki (30). Azonban több pozitív eredménnyel záruló klinikai vizsgálat eredményei alapján a kombinált célzott terápiai kezelés az életminőségben nem hozott mérhető változást, miközben e kezelés költségei igen magasak (31).

Sejtvonalon végzett kísérletek kimutatták, hogy az ösztrogénreceptor indukálta útvonal felelős lehet a lapatinibbel szemben kialakuló rezisztenciáért (32). Szintén in vitro kísérletek mutattak rá az AXL receptor-tirozinkináz magas szintjének összefüggésére a lapatinibrezisztenciával, amit specifikusan gátolva vagy a gént siRNS-sel csendesítve meg lehetett szüntetni (33). Egy kísérlet felvetette, hogy az mTOR szubsztrátjának foszforilációja sokkal megbízhatóbban jelzi előre a lapatinibrezisztencia esetén az mTOR-gátlók hatékonyságát, mint a PI3K-mutáció, PTEN-vesztés vagy a p-AKT szintje (34).

Pertuzumab

A HER2 II. sejten kívüli egységéhez kötve gátolja a ligandfüggő HER2 és HER3 receptor heterodimerizációt, így gátolva a PI3K/Akt útvonal aktiválódását. A trastuzumabhoz hasonlóan az antitestfüggő sejt közvetített citotoxicitás is hozzájárul tumorelles hatáshoz. Az FDA ez év júniusában hagyta jóvá a pertuzumab használatát trastuzumabbal és docetaxellel kombinációban az áttétes, HER2-pozitív emlőrák első vonalbeli terápiajaként. Ezt a döntést a 808 fős CLEOPATRA klinikai vizsgálat kedvező eredményeire (pertuzumabmentes összeállításához viszonyítva a kiújulásmentes túlélés: 18,5 hónap vs. 12,4 hónap) alapozták (14). Vizsgálatok folynak (BO17929, neoALTTO, NeoSphere) kemoterápia nélküli kettős célzott HER2-ellenes terápiai összeállításokkal, biztató kezdeti eredményekkel.

Neratinib

A második generációs, irreverzibilis pan-EGFR-gátló neratinib a célmolekulához közvetlenül, kovalensen kötődik. A HER2-t gátolja a leghatékonyabban (HER2 IC50: 59 nM), de az EGFR1-hez (EGFR1 IC50: 92 nM) és az EGFR4-hez is kötődik, korábbi vizsgálatok alapján klinikailag aktív, jól tolerálható szer. Hatékonyságát III. fázisú klinikai vizsgálá-

latban kezdték tanulmányozni adjuváns trastuzumabkezelést követően korai emlőrákos betegeken, azonban eddig még részeredményeket sem hoztak nyilvánosságra. A trastuzumabmal nem kezelt és az előzetes kezelést kapott betegeket összehasonlítva mind a medián kiújulásmentes idő, mind az objektív válaszadási arány tekintetében a trastuzumabmal nem kezelt csoport teljesített jobban (35). Áttétes HER2-pozitív betegeken a neratinibet vinorelbinnel kombináló kezelést alkalmazva a lapatinibbel előkezelt csoportban 8%-kal kisebb objektív válaszadási arányt találtak, mint a neratinibes kombinációval kezelt csoportban (41%) (36).

Afatinib

A neratinibhez hasonlóan szintén második generációs kis molekulású pan-EGFR-gátló molekula, amely az EGFR1, a HER2 és a HER4 irreverzibilis gátlása mellett akadályozza a HER3 HRG általi transzfoszforilációját is (IC50: EGFR vad típus 0,5 nM, HER2 14 nM). Mivel az EGF erlotinibrezisztens (EGFR exon 20 inszerció és T790M) mutáns receptorok esetében is hatékonyan gátolja a receptort, így erlotinibrezisztens NSCLC esetekben is alkalmazható (37). Már III. fázisú vizsgálat folyik áttétes emlőrákos betegeken afatinibbel, amelyben vinorelbinnel kombinálva másodvonalszerű trastuzumabkezelést követő terápiaként vizsgálják (www.clinicaltrials.gov). Jelenleg csak a II. fázisú vizsgálatok eredményei elérhetők, melyek alapján HER2-negatív emlőtumor esetében korlátozott a szer hatékonysága (38). Ezzel szemben HER2-pozitív, trastuzumabkezelést követően kiújulást mutató betegek esetében reménykeltő 11,5 hetes medián progressziómentes túlélést és 61 hetes medián teljes túlélést mértek (39).

A HER2-TŐL FÜGGETLEN, HARMADIK FÁZISÚ VIZSGÁLATOK

Bevacizumab

A bevacizumab monoklonális antitest a VEGF-hez kötődve gátolja az érújdonképződést. A szert paclitaxellel kombinálva HER2-negatív áttétes emlőrákos betegek első vonalszerű kezelésére 2002-ben hagyta jóvá az FDA. Ez az E2100 vizsgálat eredményein alapult, ahol a paclitaxel-monoterápiával összevetve a medián progressziómentes túlélés 5,9 hónappal volt hosszabb (40). Azonban a nem eléggé meggyőző hatékonyságra és a kiegészítő terápia során megnövekedett halálási rizikóra hivatkozva 2012 júniusában visszavonták a szer jóváhagyását. Hazánkban a bevacizumab paclitaxellel kombinálva az EU-törzskönyv alapján adható.

Harmadik fázisban van 2 vizsgálat is bevacizumab-trastuzumab kombinációs terápiával HER2-pozitív betegeken (www.clinicaltrials.gov), azonban eredmények még nem elérhetőek. A második fázisú BEVERLY-2 vizsgálat eredm-

neyi alapján a neoadjuváns bevacizumab, trastuzumab és kemoterápia kombináció jól tolerálható, hatékony terápiának bizonyult inflammatorikus emlőrákos betegeken (41).

Pazopanib

A pan-VEGF-gátló pazopanibot jelenleg lapatinibbel kombinálva vizsgálják fázis II vizsgálatban, ahol a lapatinibbel összehasonlítva magasabb objektív válaszarányt találtak, azonban a toxicitás is magasabbnak bizonyult (42).

Everolimus és mTOR-gátlók

A BOLERO-2 harmadik fázisú vizsgálat eredményei alapján az mTOR-gátló everolimust az exemestannal kombinációban ez év júniusában hagyta jóvá az FDA. Az indikáció a HER2-negatív, hormonreceptor-pozitív posztmenopauzális emlőtumoros betegekre vonatkozik, akik a korábbi letrozol vagy anastrozoterápiára nem reagáltak (43). Egy nagy összehasonlító tanulmány az emlőrákban alkalmazott mTOR-gátlókkal kapcsolatos 28 közleményt vizsgált. Ezek között három I. és II. fázisú vizsgálatot írtak le (44), amelyekben kizárólag HER2-pozitív betegcsoportokat vizsgálva trastuzumab-everolimus kombinációval kezelt áttétes emlőrákos betegeknél 15–44%-os válaszadási arányt és 4,5–8,5 hónapos progressziómentes túlélést találtak (45–47).

További mTOR-gátló szereket, a temsirolimust, a rapamycint és a ridaflorolimust jelenleg tesztelik emlőrákos betegeken, ezek azonban eddig csak I. és II. fázisú vizsgálatokig jutottak.

Dovitinib

Az FGFR és VEGFR receptorokon ható tirozinkináz-gátló dovitinibbel 7 klinikai vizsgálat van folyamatban, melyből az egyik (NCT01528345) HER2-pozitív posztmenopauzális betegeken is vizsgálja hatását (www.clinicaltrials.gov). Egérxenograft-kísérletekben bizonyították a hatásosságát bevacizumabmal kombinálva, ahol HER2-pozitív tumorok esetében még jobb eredményeket közöltek (48).

ÚJ MOLEKULÁKAT CÉLZÓ SZEREK ELSŐ ÉS MÁSODIK FÁZISÚ VIZSGÁLATAI

PI3K- és Akt-gátlók

A PI3K gátlásában nagy lehetőségek rejlenek, bár e szerek klinikai vizsgálatai gyerekcipőben járnak még. A PI3K négy izoformájára specifikus, általánosan gátló, valamint egyidejűleg az mTOR-t is gátló szereket fejlesztenek. A BKM120-at trastuzumabmal kombinálva az első vonalszerű trastuzumab-terápia kudarcát követően vizsgálják II. fázisú vizsgálatban (NCT01132664). A MK-2206-tal szintén több II. fázisú vizsgálat van folyamatban, az egyikben célzottan a PTEN-vesztett vagy a PI3K aktiváló mutációját hordozó betegeken vizsgálják a szer hatékonyságát (www.clinicaltrials.gov).

IGFR-gátlók

Az IGFR (inzulinszerű növekedési faktor receptor) egy tirozinkináz receptor, aktiválódását követően a MAPK és a PI3K útvonalakon keresztül sejtproliferációt és érújdonképződést indít el, valamint apoptózisgátlást is eredményez. Az ösztrogénreceptorral keresztaktivációt indukálhat, ezért az IGFR-gátló szereket elsősorban az ER-pozitív hormonterápia-rezisztens betegek körében vizsgálják (49). Két vizsgálatban (NCT00699491 és NCT00728949) kombinációban alkalmazzák a szert emlőrákos betegeknél. Szintén kombinációkban vizsgálják az egyik IGF-IR-t gátló szert lapatinibbel: metasztatikus emlőrákos betegek másodvonalbeli kezelésében a cixutumumabbal kombináló vizsgálat jelenleg a II. fázisnál tart (NCT00684983).

Más támadáspontú szerek

A HSP90 (hőszokkfehérje 90) felügyleti több jelátviteli folyamatban részt vevő fehérje (köztük a HER2) konformációját és szerkezeti felépítését. A HSP90-gátlószerek hatására a megcsontított p95HER2 receptorok okozta trastuzumabrezisztencia preklinikai modellen a receptorok csökkent kifejeződését hozta létre, miközben gátolta a sejtproliferációt is (50). Mivel a HSP90 mind a HER2, mind az ER működését befolyásolja (51), valamint a terápia-rezisztens emlőrákokban gyakran aktiválódó Akt-ot is modulálja (52), így nagy reményeket fűznek ezekhez a szerekhez. Több molekulával is folynak vizsgálatok előrehaladott HER2-pozitív emlőtumoros betegeken (www.clinicaltrials.gov). A májtoxicitása miatt nem alkalmazott geldamycin-nel analóg tanespimycin intravénásan, míg a szintetikus AU922 szájon át adható, ezekkel azonban még csak I. és II. fázisban futnak trastuzumabbal kombináltan vizsgálatok.

A hisztondeacetiláz-gátlókat (HDAI) jelenleg hematológiai malignus betegségek kezelésében alkalmazzák, és emlőtumor esetében elsőként az endokrin terápiára rezisztens betegeknél merült fel alkalmazásuk. Ugyanakkor a sejtvonalakon megfigyelt, trastuzumabérzékenységet fokozó hatásuk (53) nyomán a HER2-pozitív betegek trastuzumabterápiájának kiegészítéseként vizsgálják alkalmazásukat. Két klinikai vizsgálat is folyamatban van HER2-ellenes protokollok részeként (54).

Az emlőrákban vizsgált szereket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

BIOMARKEREK

A különböző diagnosztikus, metabolikus, prognosztikus és prediktív biomarkerek klinikai alkalmazása lehetővé teszi az egyénre szabott, hatékonyabb terápiák használatát. Diagnosztikus markerek alkalmazásával korai felfedezés és a be-

tegség osztályozása válik lehetővé, a prognosztikus markerek a túlélés és tumorkiújulás megbízhatóbb előrejelzését segítik, a prediktív markerek segítségével pedig elkülöníthetjük azokat a betegeket, akiknél az adott terápia várhatóan hatástalan lesz, és ez által ők alternatív terápiában részesülhetnek.

Sajnos azonban mind a mai napig kevés olyan valóban igazolt és specifikus biomarkert azonosítottak, amely a klinikumban is alkalmazható. Az elsőként bevezetett és még ma is a legelterjedtebb klinikailag alkalmazott biomarker az emlőtumorok endokrin terápiájának hatásosságát előrejelző ösztrogénreceptor.

A legismertebb mutációs alapú biomarker a vastagbél-tumorokban mért KRAS. Amando és munkatársainak vizsgálatai rámutattak, hogy a KRAS-mutációt hordozó áttétes vastagbél-tumoros betegek közül senki sem reagált a panitumumabkezelésre, miközben a gén vad típusát hordozó betegek jelentős arányánál az EGFR-ellenes monoklonális antitest-terápia hatásos volt (55). Egy esettanulmány szerint a KRAS rs61764370 variánsa is állhat a HER2 túlzott kifejeződésének és a rossz prognózisnak a hátterében posztmenopauzás, hormonreceptoron ható szerekkel kezelt emlőrákos betegek esetében (56). Egy másik tanulmányban ugyanezt a KRAS-variánst a tripla-negatív (ösztrogénreceptor-, progesteronreceptor-, HER2-negatív) emlőrák kialakulásának lehetséges genetikai markereként írták le premenopauzás nőkben (57). Az alábbiakban az alkalmazott technológia alapján csoportosítva áttekintjük az emlőtumor célzott terápia kezelésében alkalmazható biomarkereket.

Génamplifikáció mérésén alapuló markerek

A trastuzumabterápia azokban a betegekben eredményezett mérhető terápiás választ, ahol a HER2 gén amplifikációját is ki tudták mutatni. Génamplifikáció mérésére alkalmas az in situ hibridizációs (ISH) módszer, amely lehet fluoreszcenciaalapú (FISH), kromogén (CISH) vagy ezüst-kiváláson alapuló (SISH). Egy egészen új módszer a HER2-amplifikáció kimutatására a 4 óra alatt elvégezhető RNS in situ hibridizáció, amely FISH-sel összehasonlítva 95%-ban azonos eredményt ad (58).

A HER2 kifejeződésének rutinszerű mérésére az immunhisztokémia (IHC) mellett a FISH módszer alkalmazása a legelterjedtebb. A HER2-amplifikáció mérésére alkalmazható módszer a HER2-kópiaszám mérése, valamint a 17-es centromert számoló próba (CEP17) is (ASCO – American Society of Clinical Oncology, CAP – College of American Pathologists). Az amerikai patológusok és klinikai onkológusok ajánlása szerint pozitívnak fogadható el a FISH-reakció, ha 6 HER2-génkópia van sejtmagonként, vagy ha az úgynevezett FISH-arány – a HER2 gén jel/17. kromoszóma jel aránya – 2,2 feletti, és negatív a receptorstátusz, ha 4 kópia van sejtmagonként vagy 1,8 alatti a FISH-arány (59).

Egy tanulmány 152, helyileg előrehaladott emlőrákos beteg mintáit vizsgálva jutott arra a következtetésre, hogy a HER2-státusz előrejelzi a neoadjuváns kemoterápia (paclitaxel és karboplatin) hatékonyságát. Módszertől függetlenül a HER2-kópiaszám mérése sokkal hatékonyabb előrejelzést ad a HER2/CEP17 próbával szemben (60).

Fehérjeszint mérésén alapú markerek

Az immunhisztokémia az emlőrák-receptorstátusz meghatározására legelterjedtebben alkalmazott módszer. Magyarországon a szakmai irányelvek a szteroidreceptorok meghatározására az immunhisztokémiát ajánlják. Azonban egy 200 klinikai laboratóriumot összehasonlító vizsgálat szerint az ER-státusz meghatározása akár 30-60%-ban is hibás eredményt adhat (61).

A HER2-státusz rutin meghatározása kétlépcsős módszerrel történik. Az IHC-val score 3+ eseteket veszik pozitívnak, a score 0 és 1+ eseteket negatívnak. A score 2+ esetekben az IHC-t FISH-vizsgálattal egészítik ki a receptorstátusz eldöntéséhez. Egy tanulmány rámutatott, hogy az IHC-val 2+ esetek 24%-ában FISH-sel génamplifikáció mutatható ki, míg a 0, 1+ és 3+ esetekben 97%, 93% és 89%-os egyezés áll fenn (62). Ma hazánkban 2+ esetekben FISH-sel való újratelést kell végezni a terápiás döntés meghozatalához (Egészségügyi Közlöny, 10. szám 2059–2083).

Génexpresszió mérésén alapuló markerek

A génexpresszió-alapú markerek mérése magas szinten standardizálható eljárásokon, az RT-PCR és a DNS-microarray vizsgálatok eredményén alapul (63). Egy új, a klinikumban még nem használt módszer a Droplet Digital™, mely PCR-technikát felhasználva kvalitatívan méri a HER2-gén expresszióját és a kópiaszám-változást is megadja a CEP17 referenciagénhez viszonyítva paraffinos metszeteken (64).

Az emlőrákos betegek részére ma már több microarray- vagy RT-PCR-alapú, génexpresszió mérésén alapuló prognosztikus teszt is elérhető, amelyek közül a recurrence score (65) magát a HER2 gént is tartalmazza – ráadásul a számítás során alkalmazott panelek közül a HER2-panel kapja a legnagyobb súlyt (HER2-panel súlya: 0,47, ER-panel súlya: 0,085, proliferációs panel súlya: 0,21, inváziós panel súlya: 0,05), amely alapján a recurrence score-t a HER2-státusz pontosabb meghatározásaként is lehet értelmezni. A többgénes, microarray-alapú tesztek igazoltsága és elfogadottsága különböző, minta-előkészítési igényűk, valamint az árak is jelentősen eltér egymástól. Az emlőtumorban alkalmazott többgénes tesztek részletes áttekintését lásd korábbi összefoglaló tanulmányunkban (63).

A HER2- és az ER-státusz microarray-alapú meghatározása megbízható és jól reprodukálható (66), ezen alapul az általunk kifejlesztett, a világhálón keresztül elérhető RecurrenceOnline alkalmazás, amely emlőtumorok microarray-adatbázisa alap-

ján hormonreceptor-státuszt, HER2-státuszt, Oncotype DX recurrence score-t (tumorkiújulási valószínűséget), túlélést és gyógyszerre adott választ tud előre jelezni a felhasználó által feltöltött beteg tumormintájának microarray-adatai alapján (www.recurrenceonline.com) (67).

Génmutáció-alapú markerek

Jelenleg az emlőrákban még rutinszerűen nem alkalmaznak szekvenálást. Azonban egy vizsgálatban 108 beteg friss fagyasztott mintáján végzett, 97%-ban sikeres HER2-státusz-meghatározás és PI3KCA-, illetve AKT1-szekvenálás alapján 17 mutációt hordozó betegnél molekuláris profil alapján indítottak célzott kezelést (68).

A szekvenálás teljes áttörését a mindennapi rutinban megnehezíti, hogy igen nehéz elkülöníteni az ép és a tumoros szövetet (és ez által a szekvenálás eredményében megtalálni a tumorra legspecifikusabb eltérést), valamint hogy az azonosított mutációk funkcionális szerepéről lényegében semmit sem tudunk. Ez utóbbi azt eredményezi, hogy azon betegek is kizáródnak egy célzott terápiás kezelésből, akiknél a génben csak véletlenszerűen megjelenő mutációnak nincsen tényleges kóreltani szerepe. A szekvenálás gyakorlati felhasználását tovább gátolja, hogy a tumorok létrejöttében nagyon sok gén játszhat szerepet, amelyek közül jelenleg még nem tudjuk kiválasztani, hogy melyek azok, amelyek a tumor létrejötte szempontjából valóban relevánsak.

KITEKINTÉS

A klinikai empirikus gyógyszerválasztásban paradigmaváltást jelentő hormonreceptor- és HER2-expresszió alapján alkalmazott hormon- és trastuzumabterápia korai és áttétes emlőrákos betegeknél mára már rutinná vált. Meg kell jegyeznünk, hogy egyes vizsgálatok eredményei megkérdőjelezzik a jelenlegi gyakorlatot, és felvetik a receptorstátusz folyamatos figyelésének szükségességét. A primer tumor hormonreceptor- és HER2-státusza 11,3–39%-ban eltérhet kiújuló tumorban vagy a progresszió során (22,7%), illetve a kemo- és hormonterápiás, valamint a trastuzumabkezelést követően is megváltozhat. A HER2-pozitivitás elvesztése rosszabb túléléssel társul (69), és érdekes módon a csak kemoterápiában részesülőknél gyakrabban fordul elő (70).

Az utóbbi években egyre több célzott terápiás szert vizsgálnak emlőrákban, azonban a különböző szerek hatékonyságának pontos összevetése szinte lehetetlen a vizsgálatok sokszínűsége miatt. Sem a felépítésük, sem a betegcsoportok nem azonosak, sőt a különböző végpontok alkalmazása (kiújulásmentes túlélés, teljes túlélés) sem könnyíti meg az összehasonlítást és a valóban potens új szer(ek) kiszűrését. Az elsődleges kiértékelés e problémája megnehezíti a klinikai vizsgálatok hatékony keresztelmezését is.

Bár a célzott terápiás szerek nem citotoxikusak, a citosztatikus hatásuk miatt kialakuló rezisztencia és tumorkiújulás elkerülhetetlen. Emiatt kiemelt fontosságú az alternatív útvonalak feltérképezése és ezek célzott gátlásának kifejlesztése, ami megakadályozhatja a betegség progresszióját, továbbá az e mechanizmusok aktiválódását előrejelző biomarkerek azonosítása. Igazi áttörést a jelenlegi „negatív”, a terápiás válasz hiányát előrejelző biomarkerek helyett olyan „pozitív” molekuláris markerek jelenthetnének, amelyeknek jelenléte biztos terápiás választ jelezne előre.

Közleményünkben összefoglaltuk a HER2-pozitív emlőrákos betegek kezelésében hazánkban és nemzetközileg alkalmazott és rendelkezésre álló célzott terápiás lehetőségeket. A trastuzumabrezisztencia lehetséges mechanizmusainak bemutatásával az új, fejlesztés alatt álló gyógyszerek várható célpontjaira is rávilágítottunk. Kitértünk a folyamatban lévő klinikai vizsgálatok eredményeire, amelyek a jövő új, hatékonyabb gyógyszereit rejthetik, melyek lehetővé teszik a trastuzumabrezisztens betegek kezelésének optimalizálását.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Munkánkhöz az alábbi pályázatok forrásait használtuk: OTKA PD 83154 és a PREDICT projekt (pályázat száma: 259303 a Health.2010.2.4.1.-8.-as felhíváson belül).

IRODALOM

- Láng I, Kahán Z, Hitre E, et al. Az emlőrák korszerű gyógyszeres kezelése. *Orv Hetil* 153:56–65, 2012
- Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 18:977–984, 2007
- Holbro T, Beerli RR, Maurer F, et al. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8933–8938, 2003
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783–792, 2001
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1673–1684, 2005
- Pegram M, Liao J. Trastuzumab treatment in multiple lines: current data and future directions. *Clin Breast Cancer* 12:10–18, 2012
- Brufsky A. Trastuzumab-based therapy for patients with HER2-positive breast cancer: from early scientific development to foundation of care. *Am J Clin Oncol* 33:186–195, 2010
- Nahta R, Esteva FJ. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res* 8:215, 2006
- Scaltriti M, Rojo F, Ocana A, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 99:628–638, 2007
- Sperinde J, Jin X, Banerjee J, et al. Quantitation of p95HER2 in paraffin sections by using a p95-specific antibody and correlation with outcome in a cohort of trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 16:4226–4235, 2010
- Tsé C, Gauchez AS, Jacot W, Lamy PJ. HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: biology and clinical utility in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 38:133–142, 2012
- Nagy P, Friedlander E, Tanner M, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 65:473–482, 2005
- Fessler SP, Wotkowicz MT, Mahanta SK, Bamdad C. MUC1* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 118:113–124, 2009
- Baselga J, Cortes J, Kim SB, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 366:109–119, 2012
- Hollmén M, Wildiers LP, Reinvall I, et al. ErbB4 ectodomain as a biomarker and a potential therapeutic target for breast cancer. *Mol Cancer Ther* 10(Suppl 1):B187, 2011
- Yamashita J, Ogawa M, Yamashita S, et al. Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res* 54:1630–1633, 1994
- Lu Y, Zi X, Zhao Y, et al. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 93:1852–1857, 2001
- Zhuang G, Brantley-Sieders DM, Vaught D, et al. Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy. *Cancer Res* 70:299–308, 2010
- Nagata Y, Lan KH, Zhou X, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6:117–127, 2004
- Serra V, Markman B, Scaltriti M, et al. NVP-BE235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res* 68:8022–8030, 2008
- Razis E, Bobos M, Kotoula V, et al. Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 128:447–456, 2011
- O'Brien NA, McDonald K, Von Euw E, et al. Combined targeting of the PI3K pathway and HER2 overcomes acquired and de novo trastuzumab resistance. *Cancer Res* 71(Suppl 3):P21-12-03, 2011
- Zhang S, Huang WC, Li P, et al. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med* 17:461–469, 2011
- Nahta R, Takahashi T, Ueno NT, et al. P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* 64:3981–3986, 2004
- Scaltriti M, Eichhorn PJ, Cortes J, et al. Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:3761–3766, 2011
- Hurvitz S, Kakkar AR. The potential for trastuzumab emtansine in human epidermal growth factor receptor 2 positive metastatic breast cancer: latest evidence and ongoing studies. *Ther Adv Med Oncol* 4:235–245, 2012
- Cameron D, Casey M, Press M, et al. A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. *Breast Cancer Res Treat* 112:533–543, 2008
- Johnston S, Pippin J, Pivot JRX, et al. Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 27:5538–5546, 2009
- Riemsma R, Forbes CA, Amonkar MM, et al. Systematic review of lapatinib in combination with letrozole compared with other first-line treatments for hormone receptor positive (HR+) and HER2+ advanced or metastatic breast cancer (MBC). *Curr Med Res Opin* 28:1263–1279, 2012
- Storniolo AM, Pegram MD, Overmoyer B, et al. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of lapatinib in combination with trastuzumab in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 26:3317–3323, 2008
- Rana P, Sridhar SS. Efficacy and tolerability of lapatinib in the management of breast cancer. *Breast Cancer (Auckl)* 6:67–77, 2012

32. Xia W, Bacus S, Hegde P, et al. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7795–7800, 2006
33. Liu L, Greger J, Shi H, et al. Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Res* 69:6871–6878, 2009
34. Jegg AM, Ward TM, Iorns E, et al. PI3K independent activation of mTORC1 as a target in lapatinib-resistant ERBB2+ breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 136:683–692, 2012
35. Burstein HJ, Sun Y, Dirix LY, et al. Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 28:1301–1307, 2010
36. Awada A, Dirix L, Manso Sanchez L, et al. Safety and efficacy of neratinib (HKI-272) plus vinorelbine in the treatment of patients with ErbB2-positive metastatic breast cancer pretreated with anti-HER2 therapy. *Ann Oncol* 24:109–116, 2012
37. Li D, Ambrogio L, Shimamura T, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 27:4702–4711, 2008
38. Schuler M, Awada A, Harter P, et al. A phase II trial to assess efficacy and safety of afatinib in extensively pretreated patients with HER2-negative metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 134:1149–1159, 2012
39. Lin NU, Winer EP, Wheatley D, et al. A phase II study of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker, in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing after trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat* 133:1057–1065, 2012
40. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 357:2666–2676, 2007
41. Pierga JY, Petit T, Delozier T, et al. Neoadjuvant bevacizumab, trastuzumab, and chemotherapy for primary inflammatory HER2-positive breast cancer (BEVERLY-2): an open-label, single-arm phase 2 study. *Lancet Oncol* 13:375–384, 2012
42. Johnston SR, Gomez H, Stemmer SM, et al. A randomized and open-label trial evaluating the addition of pazopanib to lapatinib as first-line therapy in patients with HER2-positive advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 137:755–766, 2013
43. Beaver JA, Park BH. The BOLERO-2 trial: the addition of everolimus to exemestane in the treatment of postmenopausal hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Future Oncol* 8:651–657, 2012
44. Zagouri F, Sergentanis TN, Chrysikos D, et al. mTOR inhibitors in breast cancer: A systematic review. *Gynecol Oncol* 127:662–672, 2012
45. Andre F, Campone M, O'Regan R, et al. Phase I study of everolimus plus weekly paclitaxel and trastuzumab in patients with metastatic breast cancer pretreated with trastuzumab. *J Clin Oncol* 28:5110–5115, 2010
46. Jerusalem G, Fasolo A, Dieras V, et al. Phase I trial of oral mTOR inhibitor everolimus in combination with trastuzumab and vinorelbine in pretreated patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 125:447–455, 2011
47. Morrow PK, Wulf GM, Ensor J, et al. Phase I/II study of trastuzumab in combination with everolimus (RAD001) in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer who progressed on trastuzumab-based therapy. *J Clin Oncol* 29:3126–3132, 2011
48. Shi MM, Linnartz R, Versace R, et al. Dovitinib (TKI258), a dual inhibitor of FGFR and VEGFR, induces tumor growth suppression in xenograft models of primary human breast cancer. *Cancer Res* 71(Suppl 1):3575, 2011
49. Hou X, Huang F, Macedo LF, et al. Dual IGF-1R/InsR inhibitor BMS-754807 synergizes with hormonal agents in treatment of estrogen-dependent breast cancer. *Cancer Res* 71:7597–7607, 2011
50. Chandarlapaty S, Scaltriti M, Angelini P, et al. Inhibitors of HSP90 block p95-HER2 signaling in Trastuzumab-resistant tumors and suppress their growth. *Oncogene* 29:325–334, 2010
51. Basso AD, Solit DB, Munster PN, et al. Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene* 21:1159–1166, 2002
52. Xing H, Weng D, Chen G, et al. Activation of fibronectin/PI-3K/Akt2 leads to chemoresistance to docetaxel by regulating survivin protein expression in ovarian and breast cancer cells. *Cancer Lett* 261:108–119, 2008
53. Huang X, Wang S, Lee CK, et al. HDAC inhibitor SNDX-275 enhances efficacy of trastuzumab in erbB2-overexpressing breast cancer cells and exhibits potential to overcome trastuzumab resistance. *Cancer Lett* 307:72–79, 2011
54. Connolly R, Stearns V. Epigenetics as a therapeutic target in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 17:191–204, 2012
55. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:1626–1634, 2008
56. Cerne JZ, Stegel V, Gersak K, et al. KRAS rs61764370 is associated with HER2-overexpressed and poorly-differentiated breast cancer in hormone replacement therapy users: a case control study. *BMC Cancer* 12:105, 2012
57. Paranjape T, Heneghan H, Lindner R, et al. A 3'-untranslated region KRAS variant and triple-negative breast cancer: a case-control and genetic analysis. *Lancet Oncol* 12:377–386, 2011
58. Alba J, Gutierrez J, Coupe VM, et al. HER2 status determination using RNA-ISH—a rapid and simple technique showing high correlation with FISH and IHC in 141 cases of breast cancer. *Histol Histopathol* 27:1021–1027, 2012
59. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:118–145, 2007
60. Yu KD, Liu GY, Zhou XY, et al. Association of HER-2 copy number and HER-2/CEP-17 ratio with neoadjuvant taxane-containing chemotherapy sensitivity in locally advanced breast cancer. *Oncologist* 17:792–800, 2012
61. Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, et al. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol* 53:125–130, 2000
62. Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, et al. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat* 93:3–11, 2005
63. Péntzváltó Zs, Mihály Zs, Györffy B. Génexpresszió mérésén alapuló multigénes prognosztikai és prediktív előjelzés emlőtumorokban. *Magy Onkol* 53:351–359, 2009
64. Heredia NJ, Belgrader P, Wang S, et al. Droplet digital PCR quantitation of HER2 expression in FFPE breast cancer samples. *Methods* 59:183–186, 2013
65. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351:2817–2826, 2004
66. Gong Y, Yan K, Lin F, et al. Determination of oestrogen-receptor status and ERBB2 status of breast carcinoma: a gene-expression profiling study. *Lancet Oncol* 8:203–211, 2007
67. Györffy B, Benke Z, Lanczky A, et al. RecurrenceOnline: an online analysis tool to determine breast cancer recurrence and hormone receptor status using microarray data. *Breast Cancer Res Treat* 132:1025–1034, 2012
68. Arnedos M, Scott V, Job B, et al. Array CGH and PIK3CA/AKT1 mutations to drive patients to specific targeted agents: A clinical experience in 108 patients with metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 48:2293–2299, 2012
69. Dieci MV, Barbieri E, Piacentini F, et al. Discordance in receptor status between primary and recurrent breast cancer has a prognostic impact: a single-institution analysis. *Ann Oncol* 24:101–108, 2012
70. Barbieri E, Piacentini F, Dieci M, et al. Change in HER2 status in HER2 positive operable breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy with or without anti-HER2 therapy: analysis of two consecutive cohorts. *Cancer Res* 71(Suppl 3):P1-12-18, 2011