

## **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

### **Regulación epigenética de la respuesta a inmunoterapia (IT) en Cáncer de mama Triple Negativo (TN)**

## **INVESTIGADORAS:**

**Dra. Elena Corral, Dra. María de Miguel**

## **INTRODUCCION**

El cancer de mama triple negativo (TN) se caracteriza por la falta de expresión de estrógenos, progesterona y HER2 [1]. Constituye aproximadamente el 10-20% de los tumores de mama y conforma una enfermedad muy heterogénea, que engloba tumores con diferentes características histopatológicas y moleculares, así como agresiva y de mal pronóstico, con escasas opciones de tratamiento [2,3]. Por tanto, es necesario caracterizar nuevos biomarcadores predictivos de respuesta y desarrollar nuevas terapias para mejorar la supervivencia de estas pacientes.

En los últimos años, ha habido avances prometedores en el tratamiento del cancer de mama TN, con el desarrollo de la inmunoterapia y los anticuerpos conjugados [4].

La FDA aprobó el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1, atezolizumab, en combinación con el agente quimioterapéutico nab-paclitaxel para el tratamiento del cancer de mama TN PD-L1  $\geq$  1% localmente avanzado o metastásico en base a los resultados del estudio fase III Impassion130. La mediana de la supervivencia global de las pacientes con cancer de mama TN PD-L1 positivo que recibieron atezolizumab más nab-paclitaxel se prolongó en casi 10 meses en comparación con las pacientes que recibieron placebo junto a nab-paclitaxel [5].

Sin embargo, a pesar de estos avances, las respuestas a estos agentes siguen siendo limitadas debido en parte a distintos mecanismos intrínsecos de evasión inmunitaria y a la falta de una activación adecuada del sistema inmunitario en el microambiente tumoral [6].

En los últimos años se ha descrito que las modificaciones epigenéticas pueden modular de forma dinámica la respuesta inmunitaria en el cancer de mama TN a través de diversos mecanismos, como la expresión de antígenos, disminuyendo la producción de quimiocinas, mediante el desarrollo de un microambiente tumoral (TME)

inmunosupresor o promoviendo la supervivencia del tumor a través de mecanismos inmuno-evasivos [7-9].

Por tanto, el desarrollo de fármacos dirigidos al microambiente tumoral y a las vías epigenéticas representan potenciales estrategias terapéuticas en el cancer de mama TN [7].

## **OBJETIVOS, CRITERIOS DE VALORACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS**

### **1. Diseño del estudio**

Estudio traslacional, unicéntrico, prospectivo y observacional.

### **2. Población del estudio y número total de sujetos**

El estudio se realizará en una cohorte de 25-30 pacientes con diagnóstico de cancer de mama TN avanzado o metastásico. Nuestro objetivo es incluir al menos 20 pacientes evaluables para el análisis epigenético.

#### Criterios de inclusión

- Pacientes  $\geq$  18 años con diagnóstico de cancer de mama TN estadio IV que vayan a iniciar tratamiento con inmunoterapia (antiPD1 o antiPDL-1).
- Posibilidad de llevar a cabo dos biopsias pareadas, obtenidas antes y después del tratamiento con inmunoterapia. Si presenta muestra reciente (menos de 6 meses) podría utilizarse como muestra basal.
- Todos los pacientes deben proporcionar consentimiento informado.

#### Criterios de exclusión

No aplica.

### **3. Hipótesis y objetivos**

Hipótesis:

Las modificaciones epigenéticas que se producen en el tumor, así como en su microambiente, podrían modular la respuesta a fármacos antiPD-1/PDL-1 en el cancer de mama TN avanzado.

Objetivos primarios

- Monitorizar la evolución de los cambios epigenéticos en las células tumorales en al menos dos muestras pareadas de cancer de mama TN avanzado, adquiridas en diferentes tiempos de la enfermedad, pre y post-tratamiento con inmunoterapia.

Objetivos secundarios

- Describir la evolución de los cambios epigenéticos en el sistema inmune en al menos dos muestras pareadas de cancer de mama TN avanzado, adquiridas en diferentes tiempos de la enfermedad, pre y post-tratamiento con inmunoterapia.
- Identificar firmas epigenómicas implicadas en el escape inmunológico en cancer de mama triple negativo.
- Conocer las interacciones epigenéticas entre las células tumorales y el microambiente tumoral en el cancer de mama TN avanzado.
- Identificar biomarcadores epigenéticos predictivos de respuesta a fármacos de inmunoterapia, así como su correlación con parámetros pronósticos como supervivencia global o supervivencia libre de progresión.

#### **4. Métodos**

Se obtendrán biopsias pareadas de 20-30 pacientes con cáncer de mama TN antes y después del tratamiento con antiPD1/PDL-1.

Se realizará una revisión anatomopatológica por parte de un patólogo, del aspecto morfológico del tumor con microscopio óptico y de la inmunohistoquímica con determinación de PD-L1 mediante inmunohistoquímica, así como el contenido de TILS.

Se analizaron sus mutaciones mediante FoundationOne<sup>®</sup>CDx liquid, así como su perfil epigenómico basado en una firma de metilación de ADN de microarrays (kit EPIC de metilación Infinium).

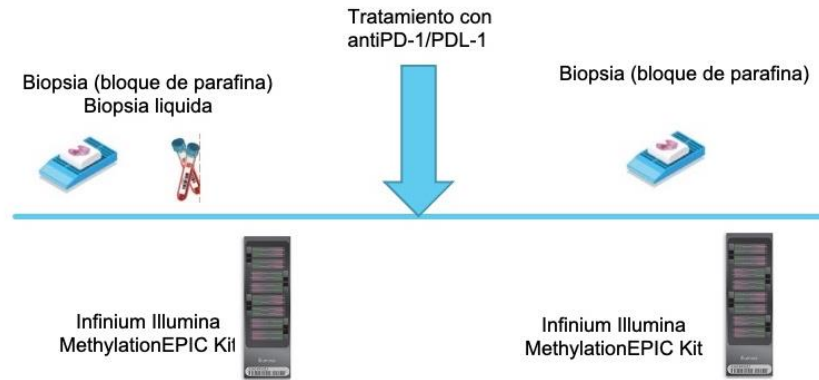
##### **Selección de muestras:**

Bloque de parafina:

Se utilizarán secciones de tejido de 4µm de espesor para los siguientes estudios:

1. Determinación inmunohistoquímica de la expresión de PDL-1 (clon SP-142, Ventana).
2. Determinación de TILS (%) en el compartimento estromal.

Estudio del perfil epigenómico basado en una firma de metilación de ADN de microarrays (kit EPIC de metilación Infinium<sup>®</sup>).



Muestra de sangre:

2 tubos de 8.5ml de cfDNA para realización de FoundationOne<sup>®</sup>CDx liquid.

Recogida de datos clínicos:

Los datos como las características demográficas y clínicas (edad, raza, ECOG, antecedentes ginecológicos, comorbilidades), datos específicos del tumor (fecha de diagnóstico, expresión de Ki67, expresión de PD-L1, expresión de receptor de andrógeno (RA), contenido de TILS, subtipo molecular de cancer de mama TN, perfil mutacional y TMB mediante FoundationOne<sup>®</sup>CDx liquid, estadificación inicial (cTNM), tratamiento recibido previo si recaída, intervalo libre de recaída (ILE), supervivencia libre de progresión (SLP) con inmunoterapia, supervivencia global (SG) con inmunoterapia, tasa objetiva de respuesta (ORR) acorde a criterios RECIST 1.1 etc.; serán recogidos en una base de datos por los investigadores designados, que serán los responsables de la revisión de las historias clínicas de los pacientes. La revisión y mantenimiento de esta base de datos es responsabilidad del investigador principal.

Análisis de datos:

Se llevará a cabo el procesamiento de los datos de metilación a través de un software para matrices de datos de 450K disponibles libremente como RnBeads.

El análisis estadístico final será llevado a cabo por el investigador principal con el apoyo de un equipo de Bioestadística.

Consideraciones éticas:

El estudio se llevará a cabo bajo estricto cumplimiento de, entre otros, el "Convenio para la Protección de los Derechos Humanos y las Libertades Fundamentales", la Declaración de Helsinki, y las Directrices de Buenas Prácticas Clínicas. Deberá contar con la aprobación del Comité Ético Independiente del hospital.

Todos los sujetos participantes firmarán un consentimiento informado para participar en el estudio.

Al no ser un estudio intervencionista, las pacientes serán tratadas acorde las guías clínicas de nuestra institución.

## **CRONOGRAMA Y PLAN DE TRABAJO**

### **1. Desarrollo del proyecto (2 meses)**

- Desarrollo administrativo del proyecto
- Presentación del proyecto al Comité de Ética

### **2. Reclutamiento e implementación (20 meses).**

El trabajo se llevará a cabo en el Hospital terciario HM Sanchinarro de la Comunidad de Madrid. Los pacientes elegibles serán identificados por los investigadores del centro.

### **3. Recogida de datos (2 meses).**

Se llevará a cabo por el investigador principal o subinvestigador asignados.

La revisión de la base de datos será llevada a cabo por el investigador principal.

#### **Análisis de las muestras tumorales. (5 meses)**

Revisión por anatomía patológica de las muestras y realización de inmunohistoquímica de PDL-1 y determinación de TILS.

El estudio de secuenciación de DNA mediante FoundationOne<sup>®</sup>CDx liquid se realizará en el marco de un ensayo clínico disponible en nuestra unidad.

El estudio del perfil epigenómico mediante la firma de metilación de ADN de microarrays (kit EPIC de metilación Infinium<sup>®</sup>).

### **4. Análisis de los datos (3 meses).**

Una vez finalizada la recogida de datos, se llevará a cabo el análisis de los datos clínicos y patológicos. Se llevará a cabo el procesamiento de los datos de metilación a través de un software para matrices de datos de para matrices de datos de 450K disponibles libremente como RnBeads. El análisis estadístico final será llevado a cabo por el investigador principal con el apoyo de un equipo de Bioestadística.

### **5. Desarrollo de un plan de comunicación, y difusión y explotación de los resultados.**

Los resultados del estudio serán publicados en una revista de Oncología traslacional de ámbito internacional.

## **JUSTIFICACIÓN Y RELEVANCIA DEL PROYECTO**

El cáncer de mama TN es una enfermedad heterogénea, de mal pronóstico con escasas opciones de tratamiento. En los últimos años, se ha producido un gran avance en el

tratamiento de estas pacientes con el desarrollo la inmunoterapia y los anticuerpos conjugados. Sin embargo, a pesar de estos avances, la mayoría de las pacientes no obtendrán beneficio del tratamiento con antiPD-1/PDL-1.

El conocimiento de los cambios que se producen a nivel del epigenoma en el cancer de mama TN avanzado durante el tratamiento con antiPD-1/PDL-1 podrían suponer una nueva herramienta que identifique biomarcadores predictivos de respuesta a estos fármacos, así como otros mecanismos implicados en la resistencia intrínseca o adquirida a antiPD-1/PDL-1.

## **PRESUPUESTO**

<b>Concepto</b>	<b>Precio/Unidad</b>	<b>#Unidades</b>	<b>Total, Unidades</b>
IHC (PDL1)	260	30	7980
Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit (32 samples)	7,808	2 kits (16 test cada)	15,616
FoundationOne liquid	0	30	0
Análisis estadístico	N/A	N/A	1500
Presentación a congresos	2	2	3000
Gasto de publicación	N/A	1	2000
<b>Total, Euros</b>			<b>30.096</b>

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J, Cardoso F. Breast cancer. Nat Rev Dis Primers. 2019 Sep 23;5(1):66. doi: 10.1038/s41572-019-0111-2. PMID: 31548545.
2. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, Shi B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. Am J Cancer Res. 2015 Sep 15;5(10):2929-43. PMID: 26693050; PMCID: PMC4656721.
3. Russnes HG, Lingjærde OC, Børresen-Dale AL, Caldas C. Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. Am J Pathol. 2017 Oct;187(10):2152-2162. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.04.022. Epub 2017 Jul 19. PMID: 28733194.
4. Dees S, Ganesan R, Singh S, Grewal IS. Bispecific Antibodies for Triple Negative Breast Cancer. Trends Cancer. 2021 Feb;7(2):162-173. doi: 10.1016/j.trecan.2020.09.004. Epub 2020 Oct 8. PMID: 33041246.
5. Schmid P, Rugo HS, Adams S, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Henschel V, Molinero L, Chui SY, Maiya V, Husain A, Winer EP, Loi S, Emens LA; IMpassion130 Investigators. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2020 Jan;21(1):44-59. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30689-8. Epub 2019 Nov 27. PMID: 31786121.
6. Llinàs-Arias P, Íñiguez-Muñoz S, McCann K, Voorwerk L, Orozco JIJ, Ensenyat-Mendez M, Sesé B, DiNome ML, Marzese DM. Epigenetic Regulation of

- Immunotherapy Response in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 17;13(16):4139. doi: 10.3390/cancers13164139. PMID: 34439290; PMCID: PMC8394958.
7. Temian DC, Pop LA, Irimie AI, Berindan-Neagoe I. The Epigenetics of Triple-Negative and Basal-Like Breast Cancer: Current Knowledge. *J Breast Cancer*. 2018 Sep;21(3):233-243. doi: 10.4048/jbc.2018.21.e41. Epub 2018 Sep 20. PMID: 30275851; PMCID: PMC6158152.
  8. Su Y, Hopfinger NR, Nguyen TD, Pogash TJ, Santucci-Pereira J, Russo J. Epigenetic reprogramming of epithelial mesenchymal transition in triple negative breast cancer cells with DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Dec 14;37(1):314. doi: 10.1186/s13046-018-0988-8. PMID: 30547810; PMCID: PMC6295063.
  9. Zolota V, Tzelepi V, Piperigkou Z, Kourea H, Papakonstantinou E, Argentou MI, Karamanos NK. Epigenetic Alterations in Triple-Negative Breast Cancer-The Critical Role of Extracellular Matrix. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 9;13(4):713. doi: 10.3390/cancers13040713. PMID: 33572395; PMCID: PMC7916242.