



# MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN  
CÁNCER

## VALIDACIÓN DE UNA FIRMA MOLECULAR PREDICTIVA EN TUMORES NEUROENDOCRINOS

**Dr. Ramon Salazar Soler**

Institut Català d'Oncologia - IDIBELL Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

**Dr. Anguraj Sadanandam**

Royal Cancer Hospital - ICR London The Institute of Cancer Research, Anglaterra

**Dr. Aldo Scarpa**

ARC-NET Applied Research Centre, Verona University, Itàlia

## 1. Resumen

El tratamiento de los tumores neuroendocrinos pancreáticos avanzados (PanNET) plantea desafíos a pesar de que las tasas de supervivencia han mejorado durante la última década. Nuestro estudio tuvo como objetivo analizar la potencial identificación de biomarcadores predictivos y para ello evaluamos la capacidad predictiva de una clasificación molecular PanNET en pacientes que recibieron quimioterapia y tratamiento con everolimus, previamente incluidos en el ensayo clínico SEQTOR. Analizamos bloques tumorales incluidos en parafina de pacientes PanNET avanzados de grado 1 o 2 sometidos a quimioterapia con everolimus y estreptozocina/5FU (STZ/5FU), administrados por adelantado y tras la progresión, respectivamente.

Realizamos análisis mutacionales para un conjunto de genes específico mediante secuenciación de nueva generación en el Centro de Investigación Aplicada sobre el Cáncer de la Universidad de Verona. Posteriormente, realizamos TempOSeq para examinar la expresión genética en el Instituto de Investigación del Cáncer del Reino Unido.

Finalmente, analizamos datos clínicos y moleculares utilizando herramientas estadísticas y bioinformáticas para establecer correlaciones entre firmas moleculares y resultados clínicos.

El estudio tuvo como objetivo correlacionar los datos moleculares con la información obtenida del ensayo clínico, para identificar conexiones entre los patrones de expresión y resultados como la supervivencia libre de progresión, las tasas de respuesta y la supervivencia general. Anticipamos que esta clasificación molecular de PanNET podría ofrecer información predictiva sobre las respuestas al tratamiento con everolimus o quimioterapia STZ/5FU para pacientes con PanNET de grado 1 o 2.

### **Objetivos principales del proyecto**

Objetivo primario:

- Determinar la supervivencia libre de progresión según nuestra clasificación de subtipos moleculares para el tratamiento de primera línea con STZ-5FU o everolimus.

Objetivos secundarios:

- Determinar la supervivencia libre de progresión según nuestra clasificación de subtipos moleculares para el tratamiento de segunda línea con STZ-5FU o everolimus.
- Determinar la tasa de respuesta según nuestra clasificación de subtipo molecular para el tratamiento de primera o segunda línea con STZ-5FU o everolimus.

## 2. Resultados

### **Análisis de los resultados**

Las laminillas de cada bloque, un total de 50 del ensayo SEQTOR y 15 de otro estudio, se sometieron a análisis utilizando TempOSeq, una tecnología de secuenciación de ARN basada en sondas, en 2 lotes separados. TempOSeq perfila 22.533 genes, cubriendo casi todo el transcriptoma humano. Se realizó una evaluación de control de calidad para preparar la biblioteca, y las muestras con menos del 30% de genes con menos de 5 lecturas se consideraron de mala calidad y se excluyeron de análisis adicionales. En las muestras piloto, 2 de 15 muestras no cumplieron con este criterio, mientras que en nuestra cohorte, 16 muestras fallaron principalmente debido a material insuficiente en los bloques. Además, se marcaron 7 muestras para una evaluación de calidad adicional y una posible resecuenciación. Las 27 muestras restantes se sometieron a corrección por lotes.

Las 27 muestras que pasaron el control de calidad las clasificamos con éxito en 4 subtipos de PanNET: MLP-1 ( $n = 4$ ), MLP-2 ( $n = 9$ ), intermedio ( $n = 9$ ) e insulinoma ( $n = 5$ ).

Para clasificar nuestros datos en cuatro subtipos PanNET (MPL, tipo insulinoma e intermedio), se agruparon MLP-1 y MLP-2 en un análisis complementario. Esta agrupación se justifica por las similitudes biológicas compartidas por estos 2 grupos, como se describe en la clasificación de subtipos PanNET original (*Cancer Discovery*, 5; 1296-1313, 2015).

Se analizaron la supervivencia libre de progresión, la supervivencia general y la tasa de respuesta general para cada subtipo de PanNET junto con el tratamiento oncológico mediante estimaciones de Kaplan-Meier, pruebas de rango logarítmico y modelos de regresión de Cox. Se estableció un nivel de significancia de 0,05 para todas las pruebas

de hipótesis. Además, se ajustó un modelo de Hazard constante por partes como un enfoque bayesiano para estudiar las mismas variables.

### **Asignación de subtipo molecular y correlación clínica**

Hemos avanzado en la asignación de subtipos moleculares utilizando 77 de 228 genes que demostraron ser robustos al clasificar muestras de PanNET en cuatro subtipos moleculares (genes previamente identificados; Sadanandam *et al.*, *Cancer Discovery* 2015). Estos subtipos son: insulinoma (21%), *metastases-like primary* (MLP-1; 21%), MLP-2 (21%) e intermedio (37%).

Estamos realizando esfuerzos continuos para perfeccionar nuestra comprensión de los genes restantes de cara a poder obtener características específicas de los subtipos. Además, pretendemos incorporar muestras adicionales a nuestro estudio para reforzar nuestro análisis.

Examinamos la correlación de estos 4 subtipos moleculares de expresión de RNA con 3 criterios clínicos de respuesta clínica (*clinical outcomes*): supervivencia libre de progresión, supervivencia general y tasa de respuesta global, con ajustes realizados según el tipo de tratamiento. Debido a problemas de singularidad, no se incluyeron otras variables en el modelo.

El subtipo de insulinoma demostró un menor riesgo de eventos en comparación con otros subtipos de PanNET para el criterio de valoración de supervivencia libre de progresión. Sin embargo, para los criterios de valoración de supervivencia general y tasa de respuesta global, el análisis de los subtipos de PanNET no reveló diferencias significativas entre grupos.

Los resultados obtenidos mediante un enfoque bayesiano fueron consistentes con los obtenidos mediante métodos frecuentistas.

### **Análisis de mutación genética y correlación clínica**

Se analizó el cribado mutacional individual de un conjunto seleccionado de genes relevantes para esta enfermedad y se correlacionó con criterios de valoración clínicos. De las 56 muestras secuenciadas, todas excepto 2 con resultados dudosos exhibieron una carga mutacional tumoral (TMB) baja y eran estables en microsatélites (MSS). Se

observaron mutaciones clásicas en *ATRX*, *DAXX*, *MEN1* y *PTEN*. Las mutaciones en *ATRX*, *DAXX* y *PTEN* siempre estuvieron acompañadas de *MEN1*, excepto en 2 casos. Otras mutaciones ocurrieron en 1 o 2 muestras cada una. *MEN1* estaba mutado en el 63% y el 41% de las muestras en los brazos A/B, respectivamente; *ATRX* en el 26% y el 22%; *DAXX* en el 26% y el 19%, y *PTEN* en el 16% y el 11% de las muestras analizadas. Las variaciones en el número de copias incluyeron deleciones homocigotas en *CDKN2A* y *CDKN2B*, así como otras variaciones como la pérdida de heterocigosidad (LOH) en varios genes. En particular, se observó una amplificación de *TERT* y una gran eliminación en *WT1* en casos individuales.

Con respecto a las variaciones en el número de copias, se encontraron 15 muestras con deleciones homocigotas, 9 en *CDKN2A* y 8 en *CDKN2B*. Dos muestras exhibieron LOH, 1 en cada una de *CDKN2A* y *CDKN2B*. Un caso tenía una deleción homocigótica de *MEN1*. Además, se observó LOH en *MAP2K2*, *MEN1*, *MET*, *PMS2*, *RB1* y *SETD2* en 4 casos cada uno. En particular, un caso mostró amplificación de *TERT* y otro tuvo una gran eliminación en *WT1*.

Finalmente, en un caso se detectó una variación estructural que implicaba una gran deleción que abarcaba los exones 11-15.

En cuanto a las correlaciones con las variables clínicas de resultados (*clinical outcomes*), pudimos analizar estadísticamente mutaciones en solo 4 genes: *PTEN*, *MEN1*, *DAXX* y *ATRX*. Otras alteraciones genéticas ocurrieron con demasiada poca frecuencia para estudiarlas de manera efectiva.

En el análisis de la supervivencia libre de progresión, los pacientes con *DAXX* alterado mostraron un mayor riesgo de eventos (*hazard ratio*: 2,5 con un intervalo de confianza del 95% de 1,1-6). Sin embargo, en cuanto a la supervivencia general, no se detectaron diferencias significativas entre estas 4 mutaciones.

En cuanto al criterio de valoración de la tasa de respuesta, los pacientes con alteraciones de *ATRX* mostraron un *odds ratio* más alto (OR: 7,9 con un intervalo de confianza del 95% de 1,7-57) en comparación con aquellos sin alteraciones. Tanto el enfoque bayesiano como el frecuentista produjeron resultados consistentes.

Todavía estamos acabando de analizar estos resultados y sus correlaciones para poder profundizar en su potencial relevancia clínica.

### **3. Relevancia y posibles implicaciones futuras**

La importancia de nuestros esfuerzos actuales radica en desarrollar y validar una clasificación molecular capaz de distinguir el pronóstico y predecir la respuesta al tratamiento más allá de los biomarcadores clínicos y patológicos conocidos. Hemos confirmado que el subtipo similar al insulinoma produce consistentemente un pronóstico notablemente mejor independientemente de la selección del tratamiento. Este hallazgo es crucial cuando nos enfrentamos a dilemas clínicos, como decidir entre estrategias de espera vigilante frente a intervenciones más agresivas. Los médicos y los pacientes, particularmente en casos de bajo volumen de enfermedad y factores pronósticos atenuantes, pueden sentirse más seguros al optar por enfoques menos agresivos como los análogos de la somatostatina en lugar de la quimioterapia o terapias más tóxicas si el análisis molecular confirma la baja agresividad biológica asociada con el subtipo de insulinoma.

Sin embargo, la limitación del tamaño de nuestra muestra estadística final ha dificultado una mayor validación del potencial para discriminar los beneficios del tratamiento de las terapias individuales. Pese a ello, el hecho de que la tecnología y la plataforma utilizadas hayan sido validadas clínicamente para su potencial pronóstico abre la puerta a mejoras y a la confirmación de su potencial predictivo en futuras cohortes independientes.

La confirmación de que una clasificación molecular basada en perfiles de expresión génica contiene información de pronóstico en una cohorte independiente dentro de un ensayo clínico prospectivo aleatorizado valida su uso como herramienta de pronóstico. Complementa el conocimiento previo sobre otros marcadores de pronóstico, como el estadio de la enfermedad, la clasificación y el índice proliferativo Ki67. Además, valida el enfoque tecnológico y la plataforma utilizados, por lo que proporciona una base para desarrollar y perfeccionar firmas para predecir los beneficios del tratamiento diferencial con terapias individuales como la quimioterapia o agentes dirigidos como everolimus.

## 4. Bibliografía científica generada

### Artículos

Para la parte clínica del estudio (estudio SEQTOR), disponemos de un artículo listo para ser enviado:

Tipo de artículo: artículo original

Capdevila J, Tafuto S, Krogh M, Teulé A, Garcia-Carbonero R, Klümper HJ, Cremer B, Sevilla I, Eriksson B, Tabaksblat E, Metges JP, Reed NS, Schrader J, Navarro V, Valentí V, Hernando J, Colao AM, Vestermark L, Carnaghi C, Knigge UP, Jimenez-Fonseca P, Benavent M, de Voos-Geelen J, Venerito M, Von Werder A, Jann H, Rinke A, Smith D, Hörsch D, Starling N, Ruzsniwski P, Baudin E, Caroli-Bosc FX, Manzano JL, Martín M, Salazar R.

*A Randomized Study of Streptozotocin plus 5-Fluorouracil Followed by Everolimus or the Reverse Sequence in Patients with Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors (SEQTOR).*

Estamos acabando de realizar los últimos análisis del proyecto y ya hemos comenzado a redactar un artículo científico con los resultados del proyecto financiado por La Marató de TV3.

Recientemente se han enviado dos *abstracts* al Congreso ESMO 2024, uno basado en los resultados de biomarcadores y subtipos moleculares y otro con aspectos más clínicos.

### Presentaciones de conferencias

- Capdevila J, *et al.*

*Subgroup analysis of ORR and PFS of the SEQTOR study (GETNE 1206): Everolimus followed by Streptozotocin (STZ)-5FU upon progression or the reverse sequence, in advanced progressive panNETs.*

Anual ENETs Conference 2023, Viena (Austria).

- Salazar R, *et al.*

*Randomized open label phase III study comparing the efficacy and safety of everolimus followed by chemotherapy (CT) with Streptozotocin (STZ)-5FU upon progression or the reverse sequence, in advanced progressive panNETs: the SEQTOR study (GETNE 1206).*

Annals of Oncology, Vol 33(S7): S1412.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.08.044>.

ESMO Congress 2022, Suiza.

- Salazar R, *et al.*

*Randomized open label phase III study comparing the efficacy and safety of Everolimús followed by chemotherapy with Streptozotocin (STZ)-5FU upon progression or the reverse sequence, in advanced progressive panNETs: The SEQTOR study (GETNE 1206).*

Annual ENETs Conference 2022, París (Francia).