



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA
CÀNCER

VALIDACIÓ D'UNA FIRMA MOLECULAR PREDICTIVA EN TUMORS NEUROENDOCRINS

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. Resum

La gestió dels tumors neuroendocrins pancreàtics avançats (PanNET) planteja reptes malgrat que les taxes de supervivència han millorat durant l'última dècada. El nostre estudi tenia com a objectiu analitzar la identificació potencial de biomarcadors predictius i, per a això, vam avaluar la capacitat predictiva d'una classificació molecular PanNET en pacients que rebien tractament amb quimioteràpia i everolimús i que prèviament havien estat inclosos a l'assaig clínic SEQTOR. Es van analitzar els blocs tumorals incrustats en parafina de pacients PanNET avançats de grau 1 o 2 sotmesos a quimioteràpia amb everolimús i estreptozocina/5FU (STZ/5FU), administrats abans i després de la progressió respectivament.

Hem fet anàlisis mutacionals per a un conjunt de gens específics mitjançant la seqüenciació de nova generació al Centre de Recerca Aplicada sobre el Càncer de la Universitat de Verona. Posteriorment, TempOSeq va examinar l'expressió gènica a l'Institut de Recerca del Càncer, al Regne Unit.

Finalment, es van analitzar les dades clíniques i moleculars mitjançant eines estadístiques i bioinformàtiques per establir correlacions entre les signatures moleculars i els resultats clínics.

L'estudi tenia com a objectiu correlacionar les dades moleculars amb la informació obtinguda de l'assaig clínic, per identificar les connexions entre patrons d'expressió i resultats, com ara la supervivència sense progressió, les taxes de resposta i la supervivència global. Prevèiem que aquesta classificació molecular de PanNET ens podria oferir una visió predictiva de les respostes al tractament amb everolimús o quimioteràpia STZ/5FU per a pacients amb PanNET de grau 1 o 2.

Objectius principals del projecte

Objectiu principal:

- Determinar la supervivència lliure de progressió segons la nostra classificació de subtipus molecular per al tractament de primera línia amb STZ-5FU o everolimús.

Objectius secundaris:

- Determinar la supervivència lliure de progressió segons la nostra classificació de subtipus molecular per al tractament de segona línia amb STZ-5FU o everolimús.

- Determinar la taxa de resposta segons la nostra classificació de subtipus molecular per al tractament de primera o segona línia amb STZ-5FU o everolimús.

2. Resultats

Anàlisi dels resultats

Les làmines de cada bloc, amb un total de 50 de l'assaig SEQTOR i 15 d'un altre estudi, es van analitzar mitjançant TempOSeq, una tecnologia de captura i seqüenciació d'RNA basada en sondes, en 2 lots separats. TempOSeq perfila 22.533 gens, que cobreixen gairebé tot el transcriptoma humà. Es va fer una avaluació de control de qualitat per preparar la biblioteca, i les mostres amb menys del 30% de gens amb menys de 5 lectures es van considerar de mala qualitat i es van excloure de l'anàlisi posterior. A les mostres pilot, 2 mostres de 15 van fallar segons aquest criteri, mentre que a la nostra cohort, 16 mostres van fallar principalment a causa de la manca de material als blocs. A més, es van marcar 7 mostres per a una avaluació addicional de la qualitat i una possible reseqüenciació. Les 27 mostres restants es van corregir per lots.

Les 27 mostres que van passar el control de qualitat les vam classificar amb èxit en 4 subtipus de PanNET: MLP-1 ($n = 4$), MLP-2 ($n = 9$), intermedi ($n = 9$) i insulinoma ($n = 5$).

Per classificar les nostres dades en quatre subtipus PanNET (MPL, tipus insulinoma i intermedi), MLP-1 i MLP-2 es van agrupar en una anàlisi complementària. Aquesta agrupació es justifica per les similituds biològiques que comparteixen aquests 2 grups, tal com es descriu en la classificació dels subtipus PanNET original (*Cancer Discovery*, 5; 1296-1313, 2015).

La supervivència lliure de progressió, la supervivència global i la taxa de resposta global es van analitzar per a cada subtipus de PanNET juntament amb el tractament oncològic mitjançant estimacions de Kaplan-Meier, proves de rang de registre i models de regressió de Cox. Es va establir un nivell de significació de 0,05 per a totes les proves d'hipòtesi. A més, es va ajustar un model Hazard constant per trossos com a enfocament bayesià per estudiar les mateixes variables.

Assignació del subtipus molecular i correlació clínica

Hem avançat en l'assignació de subtipus moleculars utilitzant 77 dels 228 gens que s'han demostrat robustos en la classificació de mostres de PanNET en quatre subtipus moleculars (gens identificats prèviament; Sadanandam *et al.*, *Cancer Discovery* 2015). Aquests subtipus són: insulinoma (21%), *metastases-like primary* (MLP-1; 21%), MLP-2 (21%) i intermedi (37%).

S'estan fent esforços continuats per perfeccionar la nostra comprensió dels gens restants per revelar les característiques específiques dels subtipus. A més, pretenem incorporar mostres addicionals al nostre estudi per reforçar la nostra anàlisi.

Es va examinar la correlació d'aquests 4 subtipus moleculars d'expressió d'RNA amb 3 criteris clínics de resposta clínica (*clinical outcomes*): supervivència lliure de progressió, supervivència global i taxa de resposta global, amb ajustos fets en funció del tipus de tractament. A causa de problemes de singularitat, no es van incloure altres variables al model.

El subtipus insulinoma va demostrar un risc més baix d'esdeveniments en comparació amb altres subtipus PanNET per al punt final de supervivència lliure de progressió. Tanmateix, per als punts finals de supervivència global i taxa de resposta global, l'anàlisi dels subtipus PanNET no va revelar diferències significatives entre grups. Els resultats obtinguts mitjançant un enfocament bayesià van ser coherents amb els obtinguts mitjançant mètodes freqüentistes.

Anàlisi de mutació gènica i correlació clínica

Es va analitzar el cribratge mutacional individual d'un conjunt seleccionat de gens rellevants per a aquesta malaltia i es va correlacionar amb els criteris clínics.

Entre les 56 mostres seqüenciades, totes excepte 2 amb resultats límit presentaven una baixa càrrega mutacional del tumor (TMB) i eren estables als microsatèl·lits (MSS). Es van observar mutacions clàssiques a *ATRX*, *DAXX*, *MEN1* i *PTEN*. Les mutacions a *ATRX*, *DAXX* i *PTEN* sempre van anar acompanyades de *MEN1*, excepte en dos casos. Es van produir altres mutacions diferents en 1 o 2 mostres cadascuna. *MEN1* va mutar en el 63% i el 41% de les mostres en els braços A/B, respectivament; *ATRX* en el 26% i el 22%; *DAXX* en el 26% i el 19%, i *PTEN* en el 16% i l'11% de les mostres analitzades. Les variacions del nombre de còpies incloïen supressions homozigotes en *CDKN2A* i *CDKN2B*, així com altres variacions com la pèrdua d'heterozigotat (LOH) en

diversos gens. En particular, es va observar una amplificació TERT i una gran supressió en WT1 en casos individuals.

Pel que fa a les variacions del nombre de còpies, es van trobar 15 mostres amb supressions homozigotes, 9 a CDKN2A i 8 a CDKN2B. Dues mostres van mostrar LOH, 1 en cadascuna de CDKN2A i CDKN2B. Un cas va tenir una supressió homozigota MEN1. A més, es va observar LOH a *MAP2K2*, *MEN1*, *MET*, *PMS2*, *RB1* i *SETD2* en 4 casos cadascun. En particular, un cas va mostrar una amplificació TERT i un altre va tenir una gran supressió a WT1.

Finalment, en un cas es va detectar una variació estructural que implicava una gran supressió que abastava l'exó 11-15.

Quant a les correlacions amb les variables clíniques de resultats (*clinical outcomes*), vam poder analitzar estadísticament mutacions en només quatre gens: *PTEN*, *MEN1*, *DAXX* i *ATRX*. Altres alteracions gèniques es van produir amb massa poca freqüència per estudiar-les amb eficàcia.

En l'anàlisi de la supervivència sense progressió, els pacients amb *DAXX* alterat van presentar un risc més elevat d'esdeveniments (ràtio de risc: 2,5 amb un interval de confiança del 95% d'1,1 a 6). Tanmateix, per a la supervivència global no es van detectar diferències significatives entre aquestes 4 mutacions.

Pel que fa al punt final de la taxa de resposta, els pacients amb alteracions d'*ATRX* van mostrar una relació de probabilitats més alta (OR: 7,9 amb un interval de confiança del 95% d'1,7 a 57) en comparació amb aquells sense alteracions. Tant els enfocaments bayesians com els freqüentistes van donar resultats consistents.

Encara estem analitzant els resultats i les seves correlacions per poder aprofundir en la seva potencial rellevància clínica.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Els nostres esforços actuals tenen importància perquè poden permetre desenvolupar i validar una classificació molecular capaç de distingir el pronòstic i predir la resposta al tractament més enllà dels biomarcadors clínics i patològics coneguts. Hem confirmat que el subtipus semblant a l'insulinoma produeix constantment un pronòstic notablement millor independentment de la selecció del tractament. Aquesta troballa és crucial quan ens enfrontem a dilemes clínics, com ara decidir entre estratègies d'espera vigilant i intervencions més agressives. Els metges i pacients, especialment en casos de baix volum de malaltia i factors pronòstics mitigants, poden sentir-se més segurs a l'hora d'optar per enfocaments menys agressius com els anàlegs de la somatostatina en lloc de la quimioteràpia o teràpies més tòxiques si l'anàlisi molecular confirma la baixa agressivitat biològica associada al subtipus d'insulinoma.

Tanmateix, la limitació de la mida de la mostra estadística final ha dificultat una validació addicional del potencial de discriminar els beneficis del tractament de les teràpies individuals. No obstant això, el fet que la tecnologia i la plataforma utilitzades s'hagin validat clínicament per al potencial pronòstic obre la porta a més perfeccionaments i a la confirmació del seu potencial predictiu en futures cohorts independents.

La confirmació que una classificació molecular basada en el perfil de l'expressió gènica conté informació pronòstica en una cohort independent dins d'un assaig clínic aleatori prospectiu valida el seu ús com a eina de pronòstic. Complementa el coneixement previ sobre altres marcadors pronòstics com ara l'estadi de la malaltia, la classificació i l'índex Ki67 proliferatiu. A més, valida l'enfocament tecnològic i la plataforma utilitzats, de manera que proporciona una base per desenvolupar i refinar signatures per predir els beneficis del tractament diferencial amb teràpies individuals com la quimioteràpia o agents dirigits com l'everolimús.

4. Bibliografia científica generada

Articles

Per a la part clínica de l'estudi (estudi SEQTOR), tenim un treball a punt per ser enviat:

Tipus d'article: article 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).

Encara estem acabant d'analitzar els resultats del projecte per preparar una segona publicació manuscrita.

Recentment s'han enviat dos resums al Congrés ESMO 2024: un es basa en els resultats d'aquest projecte i un altre tracta d'aspectes més clínics.

Presentacions de conferències

- 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 (Àustria).
- 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, Suïssa.

- Salazar R, et al.

Randomized open label phase III study comparing the efficacy and safety of Everolimus 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 (França).