

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
EVALUACIÓN PROSPECTIVA DEL MICROBIOMA COMO FACTOR PREDICTIVO
POTENCIAL DE INMUNOTERAPIA EN CÁNCER DE MAMA LUMINAL EN EL MARCO DEL
ESTUDIO CLÍNICO KELLY (MEDOPP214 – SUBESTUDIO CALADRIO)

MEMORIA CIENTÍFICA

1. INFORMACIÓN GENERAL

En los últimos años, la FDA estadounidense ha aprobado una amplia gama de métodos de inmunoterapia que han demostrado proporcionar beneficios clínicos significativos en el tratamiento de casi 10 tipos diferentes de cáncer. Los anticuerpos monoclonales al antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) y la proteína PD-1, dos receptores inhibidores de control de células T con mecanismos de acción independientes, han demostrado restaurar la inmunidad antitumoral latente. Se ha observado un beneficio clínico significativo (incluyendo respuestas tumorales duraderas y ampliación de la PFS y OS) en diversos tipos de tumores como el melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga y enfermedad de Hodgkin (1–5).

Aunque el tratamiento anti-PD1/ PD-L1 es, hasta la fecha, el tratamiento en monoterapia más eficaz utilizado contra cánceres como el melanoma, se ha mostrado que hasta un 60 % de los pacientes que lo reciben muestra resistencia primaria. En un reciente estudio, aproximadamente el 25 % de los pacientes con melanoma que habían tenido una respuesta objetiva al tratamiento de bloqueo con PD-1 presentó progresión de la enfermedad a una mediana de seguimiento de 21 meses (6).

Por tanto, establecer biomarcadores predictivos para inmunoterapia de control es de suma importancia para optimizar los beneficios del paciente, minimizar el riesgo de toxicidad y guiar los métodos de combinación.

Aparte de algunas excepciones prometedoras (como carga de mutación tumoral y estrategias de inmunohistoquímica multiplex), por desgracia, existen muchos problemas con los actuales biomarcadores candidatos. Por lo tanto, tenemos que hacer todo lo posible para obtener biomarcadores que ayuden a definir mejor a los pacientes más propensos a responder y excluir a los pacientes que no reciban ningún beneficio con una toxicidad potencial añadida.

El microbioma representa una comunidad dinámica de bacterias, virus, arqueobacterias y eucariotas que colonizan los tejidos humanos. El intestino alberga el 99 % de la masa microbiana del organismo, razón por la cual es el más estudiado.

El desequilibrio en las comunidades microbianas – definido como disbiosis – se ha vinculado no solo a la enfermedad aguda, sino también a las enfermedades crónicas y los tumores malignos (p. ej., *Helicobacter pylori* en el adenocarcinoma gástrico y *Fusobacterium nucleatum* en el cáncer colorrectal). Además de modular las respuestas inmunitarias y celulares, se sabe que la microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en el metabolismo del estrógeno; se ha demostrado que la alteración de este «estroboloma» influye en los niveles sistémicos del estrógeno y sus metabolitos.

Se ha puesto de manifiesto que los factores, aparte de la genómica del tumor, influyen en el desarrollo del cáncer y las respuestas terapéuticas, incluidos los factores del huésped como el microbioma (intestinal) gastrointestinal (7,8).

Numerosos estudios han demostrado que el microbioma intestinal puede influir en las respuestas inmunitarias antitumorales a través de la inmunidad innata y adaptativa, y que las respuestas terapéuticas se pueden mejorar mediante su modulación (9,10); sin embargo, esto no se ha estudiado exhaustivamente en pacientes con cáncer.

Recientemente, dos equipos presentaron una serie de pruebas de pacientes con cáncer que indicaban que el microbioma intestinal ayuda a determinar si los tumores se encogen cuando se tratan con fármacos en inmunoterapia (11,12).

1.1. Justificación del subestudio

Los inhibidores del control de la inmunidad (ICI) dirigidos al eje PD-1/PD-L1 inducen respuestas clínicas sostenidas en una minoría considerable de pacientes con cáncer.

La toxicidad representa la causa principal de la disminución de la dosis, la demora en la administración de los fármacos y la discontinuación del tratamiento.

Los cambios que se producen en la composición de la microbiota intestinal se han propuesto como mecanismo para explicar la patogénesis de la toxicidad relacionada con el sistema inmunitario. Asimismo, los pacientes con cáncer que responden al tratamiento con ICI presentan una mejora de la inmunidad antitumoral con un microbioma intestinal «favorable».

Aquí presentamos el proyecto CALADRIO, como subestudio del ensayo KELLY (MedOPP127, N.º EudraCT: 2016-004513-27, NCT03222856) con el propósito de caracterizar el microbioma como factor predictivo potencial de respuesta a la inmunoterapia con anti-PD-1 pembrolizumab en pacientes con CMM RH positivo/HER2 negativo que hayan recibido tratamiento previo con antraciclinas y taxanos.

2. OBJETIVOS Y VARIABLES DEL SUBESTUDIO

2.1. Objetivo principal

Este ensayo tiene un objetivo principal:

- Analizar la variación de la distribución del filo de la microbiota en muestras fecales y orales de pacientes con CMM RH positivo/HER2 negativo que hayan recibido tratamiento con pembrolizumab y eribulina en el EOT.

Variables principales

- La variación significativa en el EOT en la diversidad alfa y abundancia relativa del intestino y el filo oral entre pacientes con TBC (número total de respuestas objetivas más EE durante al menos 9 semanas según RECIST v.1.1) y pacientes sin TBC que hayan recibido tratamiento con anti-PD-1 pembrolizumab y eribulina.

2.2. Objetivos secundarios

- Analizar la variación de la distribución del filo de las microbiotas intestinal y oral en muestras bucales y fecales de pacientes con CMM RH positivo/HER2 negativo que hayan recibido tratamiento con pembrolizumab y eribulina en tres tiempos diferentes:
 - a) entrada en el estudio (basal);
 - b) 9 semanas después del inicio del tratamiento (coincidiendo con la primera evaluación del tumor);
 - c) EOT.
- Analizar la asociación entre las distintas microbiotas intestinales y orales, así como TBC, PFS, OS, ORR y DR según RECIST v.1.1.
- Evaluar si la pérdida de la distribución del filo de la microbiota intestinal (disbiosis) tras el uso de antibióticos está asociado al resultado de un tratamiento específico.
- Comparar la variación de la distribución del filo de las microbiotas intestinal y oral mediante características clinicopatológicas.
- Analizar la asociación entre la distribución del filo de las microbiotas intestinal y oral y la expresión relativa de PD-1.
- Comparar la seguridad y tolerabilidad de la combinación de pembrolizumab y eribulina mediante las diferencias en la distribución del filo de las microbiotas intestinal y oral.

Variables secundarias

- La variación significativa en la diversidad alfa y la abundancia relativa de los filios intestinal y oral entre pacientes respondedores (R) y no respondedores (NR) en distintos tiempos:
 - a) entrada en el estudio (basal);

- b) 9 semanas después del inicio del tratamiento (coincidiendo con la primera evaluación del tumor);
- c) EOT.
- La asociación entre las microbiotas intestinal y oral, así como TBC, PFS, OS (OS se determinará al final del estudio), ORR y DR según RECIST v.1.1.
- Evaluar si la pérdida de la distribución del filo de la microbiota intestinal (disbiosis) tras el uso de antibióticos está asociado al resultado de un tratamiento específico.
- Comparar la variación en la diversidad alfa y la abundancia relativa de la distribución del filo de las microbiotas intestinal y oral por grupos de tratamiento, estadio del tumor, estado del HR, subtipos intrínsecos de PAM50 y edad.
- La asociación entre la diversidad alfa y la abundancia relativa de la distribución del filo de las microbiotas intestinal y oral y la expresión de PD-1, evaluadas mediante análisis de inmunohistoquímica.
- La seguridad y AA de los pacientes se evaluarán según los CTCAE v.4.0.3 del NCI. Se evaluarán los AA de grados 3 y 4 y los AAG para determinar la seguridad y tolerabilidad mediante las diferencias en la diversidad alfa y la abundancia relativa de la distribución del filo de las microbiotas intestinal y oral.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material biológico disponible para el estudio KELLY

Los múltiples análisis del presente subestudio se realizarán con las muestras de heces y saliva obtenidas de los pacientes incluidos en el ensayo KELLY (MedOPP127, N.º EudraCT: 2016-004513-27, NCT03222856). Este último es un ensayo clínico de fase IIA, abierto, no aleatorizado, multicéntrico en el que se prevé reclutar a 44 pacientes y cuyo objetivo principal es evaluar la eficacia, según lo determinado por la TBC, de MK3475 (pembrolizumab, inhibidor anti-PD-1) en combinación con eribulina en pacientes con CMM RH positivo/HER2 negativo que hayan recibido tratamiento previo con antraciclina y taxanos. En general, las muestras de heces y saliva obtenidas durante este subestudio exploratorio se utilizarán para estudiar cómo afectan determinados taxones bacterianos en la respuesta del paciente al tratamiento con ICI.

Con motivo del rápido desarrollo de la identificación de nuevos marcadores que se correlacionan con la actividad de la enfermedad y la eficacia o seguridad del tratamiento, la lista definitiva de análisis todavía no se ha determinado, aunque puede incluir otras estrategias de biomarcadores tumorales para la inmunoterapia de control. Actualmente, el estudio está incluyendo a pacientes.

3.2. Población de referencia del subestudio

Se trata de un estudio de prueba de concepto en el que utilizaremos métodos basados en hipótesis y en descubrimientos. Prevemos que a medida que mejoren las tecnologías moleculares y genómicas, se aplicarán tecnologías que todavía no se han especificado. Todos los análisis son principalmente de carácter exploratorio y la lista definitiva de dianas moleculares se optimizará basándose en los resultados obtenidos del estudio KELLY.

El proyecto CALADRIO pretende recoger prospectivamente muestras de microbiomas intestinales (fecales) y orales (bucales) de los pacientes (n = 44) que participan en el estudio KELLY con CMM luminal (RH positivo/HER2 negativo) que hayan recibido tratamiento con pembrolizumab y eribulina.

Se clasificará a los pacientes elegibles como R y NR basándose en la evaluación radiográfica según los criterios RECIST v.1.1, 9 semanas después de iniciar el tratamiento. Los pacientes fueron clasificados como R si alcanzaron una respuesta objetiva (RC, RP o EE durante al menos 9 semanas) frente a NR si fallecieron, progresaron con el tratamiento o presentaron EE durante menos de 9 semanas. La PFS a las 9 semanas también se definió variable según los criterios RECIST v.1.1.

3.3. Recogida de muestras de microbiomas bucales y fecales

Todos los pacientes que hayan otorgado su consentimiento para participar en el presente subestudio recibirán la formación apropiada; el promotor les entregará kits específicos para la recogida de muestras bucales y fecales. Los pacientes también recibirán la hoja de información para el paciente, un documento independiente que contiene instrucciones de uso y recomendaciones de los kits.

Los pacientes recogerán las muestras de heces en casa, de acuerdo con las guías International Human MicrobiomeStandards (IHMS) (SOP 03 V1).

Las muestras de microbiomas bucales y fecales se recogerán en estos tres tiempos: a) entrada en el estudio (basal); b) 9 semanas después del inicio del tratamiento (coincidiendo con la primera evaluación del tumor); c) EOT. Las muestras se recogerán durante las visitas clínicas previas al tratamiento del estudio KELLY.

3.4. Extracción de ADN y secuenciación de ARNr 16S bacteriano

La preparación y secuenciación de las muestras se realizará en colaboración con un laboratorio central experimentado. Los métodos de secuenciación genética de ARNr 16S se adaptarán a partir de los métodos desarrollados para el Proyecto Microbioma Humano del NIH (13,14,15).

El procesamiento de ambas muestras se realizará de acuerdo con el manual de laboratorio del estudio.

Bibliografía

1. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2517–26.
2. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cellung cancer. *N Engl J Med*. 2015 May 21;372(21):2018–28.
3. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Redman BG, Kuzel TM, Harrison MR, et al. Nivolumab For Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial. *J ClinOncol*. 2015 May 1;33(13):1430–7.
4. Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinicalactivity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 2014 Nov 27;515(7528):558–62.
5. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade withnivolumab in relapsedorrefractoryHodgkin'slymphoma. *N Engl J Med*. 2015 Jan 22;372(4):311–9.
6. Ribas A, Hamid O, Daud A, Hodi FS, Wolchok JD, Kefford R, et al. Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA*. 2016 Apr 19;315(15):1600–9.
7. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumorimmunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015 Nov 27;350(6264):1084–9.
8. Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillère R, Hannani D, et al. The intestinal Microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*. 2013 Nov 22;342(6161):971–6.
9. Garrett WS. Cancer and themicrobiota. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):80–6.
10. Drewes JL, Housseau F, Sears CL. Sporadiccolorectal cancer: microbial contributors to Disease prevention, development and therapy. *Br J Cancer*. 2016 Jul 26;115(3):273–80.
11. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, et al. Gut microbiomemodulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2017 Nov 2.
12. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gutmicrobiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. 2017
13. Human Microbiome Project Consortium. A frameworkfor human microbiomeresearch. *Nature*. 2012 Jun 13;486(7402):215–21.
14. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 13;486(7402):207–14.
15. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high through putmicrobial community analysis on the IlluminaHiSeq and MiSeqplatforms. *ISME J*. 2012 Aug;6(8):1621–4.

4. EQUIPO

Los proyectos de investigación que coordinan oncólogos médicos desde el Servicio de Oncología del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid) y el Instituto Oncológico IOB (Madrid y Barcelona), bajo el liderazgo del Doctor Cortés y con el apoyo e implicación de un equipo médico-sanitario de primer nivel y reconocido a nivel nacional e internacional. Numerosos centros nacionales e internacionales colaboran en estos proyectos.

Contamos con el soporte de dos hospitales de referencia en España, que disponen de infraestructuras, equipos científicos y equipamientos de última generación. Nuestra misión y prioridad es poder realizar un diagnóstico precoz, ofrecer un tratamiento multidisciplinar y atender de forma personalizada a nuestras pacientes con cáncer.

5.- PRESUPUESTO

BUDGET ESTUDIO CALADRIO

Inversión financiera:	
1. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN FILOGENÉTICA DE BACTERIAS:	100.320 €
ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN ENTRE FILOGENIA Y PARÁMETROS DE RESPUESTA CLÍNICA:	
<ul style="list-style-type: none">• Plan Analítico• Colección de muestras• Procesamiento de muestra• Análisis de muestra• Análisis estadístico	
2. MEDICAL WRITING:	15.400 €
<ul style="list-style-type: none">• Protocolo y documentos de estudio• Informe de estudio clínico y publicación	
3. PRESENTACIÓN A REGULATORY	6.700 €
4. CENTROS Y PROJECT MANAGEMENT	39.650 €
5. OVERHEADS	28.600 €
TOTAL	190.670 €