



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

IDENTIFICACIÓN Y MODULACIÓN TERAPÉUTICA DE CÉLULAS INMUNO-EVASORAS EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

MEMORIA CIENTÍFICA

Centro de Investigación: Cancer Epigenetics Laboratory, Institut d'Investigació Sanitària Illes Balears (IdISBa), Hospital Universitari Son Espases (HUSE), Palma, España

Equipo de Investigación:

- Diego M. Marzese, Principal Investigator (Cancer Epigenetics Lab, IdISBa)
- Borja Sesé Ballesteros, Post-doctoral researcher (Cancer Epigenetics Lab, IdISBa)
- Pere Llinàs Arias, Post-doc researcher (Cancer Epigenetics Lab, IdISBa)
- Miquel Ensenyat Méndez, PhD Student/Bioinformatician (Cancer Epigenetics Lab, IdISBa)
- Sandra Iñiguez Muñoz, PhD Student/Lab technician (Cancer Epigenetics Lab, IdISBa)

Colaboradores del Proyecto:

- Maggie L. DiNome (Department of Surgery, Duke University School of Medicine, Durham, NC, USA).
- Javier I. J. Orozco, MD (Saint John's Cancer Institute, Los Angeles, CA, USA).
- Jennifer Baker, MD (Department of Surgery, University of California Los Angeles, CA, USA).
- Matthew Salomon, PhD (Computational Biology, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA USA).

1. ANTECEDENTES

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es una enfermedad sumamente heterogénea¹ que se caracteriza por la ausencia de expresión de receptores hormonales y la falta de sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)². Los pacientes con CMTN tienen una mayor probabilidad de recaída y muerte que otros subtipos de cáncer de mama³. A pesar del tratamiento sistémico con quimioterapia, los pacientes con CMTN avanzado generalmente progresan a metástasis, siendo su supervivencia general (OS) de 8 a 13 meses⁴. Debido a esta pobre respuesta, se están buscando nuevos agentes terapéuticos y protocolos de tratamiento más específicos, como es el suministro de inhibidores de PARP para pacientes con mutaciones germinales en los genes BRCA1/2 y, más recientemente, la inmunoterapia (IT). Los puntos de control inmunitarios comprenden sistemas ligando-receptor que controlan tanto la intensidad como la duración de las respuestas inmunitarias. Sin embargo, las células cancerosas aprovechan estas vías para evitar el efecto citotóxico del sistema inmunitario. Así, los inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI) evitan que esto suceda alterando la interacción entre PD-1 (Muerte celular programada 1) y PD-L1 (Ligando de muerte celular programada 1), entre otros⁵.

El ensayo clínico de fase 3 IMpassion130 puso de manifiesto que la combinación de nab-paclitaxel con atezolizumab, un inhibidor de PD-L1, aumenta la supervivencia libre de progresión (PFS) en pacientes con CMTN avanzado (CMTNa) en comparación con el suministro único de nab-paclitaxel, con una mejoría mayor en pacientes con tumores PD-L1+⁶. Este resultado llevó a la aprobación acelerada de atezolizumab por parte de la FDA, proponiendo a la IT como una de las vías terapéuticas más prometedoras para pacientes con CMTNa. Sin embargo, este estudio no logró demostrar una mejora estadísticamente significativa en la OS más allá de una mejora clínicamente significativa, lo que llevó a la FDA a retirar el atezolizumab y el nab-paclitaxel como tratamiento de primera línea. No obstante, el ensayo clínico de fase 3 KEYNOTE-355 demostró que agregar pembrolizumab, un inhibidor de PD-1, a la quimioterapia (que incluye paclitaxel, nab-paclitaxel o gemcitabina más carboplatino) mejora la PFS y la OS⁷. Sin embargo, los ensayos clínicos que incluyen cohortes "no seleccionadas" de pacientes con CMTN muestran una tasa de respuesta objetiva (ORR) de iRECIST⁶ por debajo del 15%⁸⁻¹⁰.

La respuesta inmunitaria antitumoral se ve afectada principalmente por determinantes moleculares específicos del tumor y del sistema inmunitario que influyen en la carga de neoantígenos, el procesamiento, la activación de células T, el reclutamiento de células inmunitarias mediado por quimiocinas, así como la infiltración de células inmunitarias^{11,12}. La presunción de que "más mutaciones genómicas generan más neoantígenos" llevó a la idea de que cuanto mayor sea la carga mutacional del tumor, mejor será la respuesta

a ICI. Sin embargo, ensayos clínicos recientes han demostrado un modesto potencial predictivo de la carga mutacional del tumor en respuesta a ICI y controversia sobre los métodos para evaluar en nivel de PD-L1 entre otros marcadores predictivos¹³. Además, mientras que las alteraciones genómicas parecen críticas para varios tumores sólidos, como el melanoma o los carcinomas de pulmón, el cáncer de mama esporádico muestra una frecuencia relativamente baja de mutaciones genómicas. De hecho, los tumores de cáncer de mama se clasifican según la expresión génica utilizando las plataformas Oncotype DX, PAM50 y MammaPrint en lugar de alteraciones genómicas¹⁴⁻¹⁶.

Datos recientes del ensayo clínico de fase 2 TONIC revelan que la inducción del sistema inmunitario con dosis bajas de doxorubicina mejora la respuesta a Nivolumab, un inhibidor de PD-1 en pacientes con CMTNa (ORR:35%)¹⁷. Esto sugiere que, además de la carga mutacional, la activación del microambiente tumoral y la modulación de los mecanismos tumorales son claves para la respuesta a IT.

Tanto nuestro laboratorio como otros han sugerido que la evasión inmune es un proceso determinado por variables genéticas específicas del tumor y del huésped y modificaciones epigenéticas^{11,18,19}. Las células de CMTN capaces de evadir al sistema inmunitario y generar metástasis en sitios regionales o distantes exhiben una extraordinaria plasticidad fenotípica para adaptarse a microambientes hostiles y sobrevivir a tratamientos agresivos. Esta plasticidad es, en parte, proporcionada por la variabilidad proteica como resultado de programas alternativos de splicing de ARN (AS) catalizados por factores de splicing (SF), donde un solo gen puede generar múltiples proteínas funcionalmente diversas denominadas variantes de splicing²⁰. Más del 95% de los genes multiexónicos humanos generan ARN con combinaciones alternativas de regiones exónicas e incluso intrónicas, dando lugar a una gran diversidad del proteoma humano²¹. Dado que AS afecta a casi todos los genes, no es de extrañar que sea un proceso involucrado en la iniciación y progresión del tumor²²⁻²⁴. Interesantemente, este mecanismo epistático aberrante se puede modular utilizando oligonucleótidos antisentido (OAS) específicos del sitio de empalme. Actualmente la terapia con OAS ha demostrado eficacia clínica en enfermedades como la distrofia muscular de Duchenne²⁵ y la atrofia muscular espinal²⁶, donde el splicing aberrante juega un papel importante.

Nuestros estudios previos demuestran que la expresión aberrante de SF genera células tumorales propensas a metastatizar selectivamente en órganos distantes^{21,27}. Los programas de AS específicos para tumores presentan una clase nueva de neoantígenos que pueden afectar la respuesta inmunitaria²³. Recientemente, hemos identificado subtipos del CMTN basados en la expresión de SF. Hemos identificado que grupo de pacientes, cuyos tumores están caracterizados por la alta expresión del SF cluster 2 (SFCL2), presentan tumores inmuno-evasivos y una menor supervivencia libre de enfermedad ($p < 0.01$). Nuestras

inferencias in silico y verificaciones utilizando CRISPR-Cas9 muestran que SFCL2 reduce la habilidad de las células tumorales de presentar antígenos.

2. DESAFÍO Y PROPUESTA

El desafío a resolver en esta propuesta es mejorar la eficiencia de la inmunoterapia en pacientes con cáncer de mama triple negativo mediante la modulación terapéutica de mecanismos epistáticos involucrados en la evasión inmune.

3. ALCANCE Y OBJETIVOS

Ciñéndonos a nuestros datos preliminares proponemos que la caracterización de los mecanismos de evasión inmune dirigidas por la expresión aberrante de los factores de splicing SFCL2 permitirá identificar métodos para mejorar la eficiencia de IT en pacientes con CMTN. Planteamos la **hipótesis** de que las pacientes CMTN con SFCL2^{alto} muestran una presentación antigénica deficiente resultante en una ORR a IT baja. Como consecuencia de nuestra hipótesis, proponemos que esta alteración específica de CMTN puede ser útil para *i-* mejorar la selección de pacientes CMTN candidatas a IT y *ii-* como una diana para desarrollar nuevas terapias coadyuvantes basadas en OAS para disminuir mecanismos inmuno-evasivos.

Objetivos: Para evaluar nuestros resultados preliminares, hemos diseñado este estudio con 3 objetivos específicos independientes, pero complementarios, que se llevarán a cabo en 2 años:

Objetivo 1 (Año 1): Evaluación de los patrones de expresión génica y respuesta a IT en pacientes de CMTN con expresión diferencial de SFCL2. Identificación de la interrelación de SFCL2 con genes relacionados con la evasión inmune y la respuesta a IT en CMTN.

Objetivo 2 (Años 1 y 2): Generación de una estrategia basada en terapia con OAS con el fin de mejorar la presentación de antígenos en CMTN. Identificar combinaciones óptimas de sondas OAS para mejorar la presentación de antígenos y evaluar la administración y la toxicidad.

Objetivo 3 (Año 2): Construcción de nomogramas predictivos de IT para pacientes CMTN. Evaluación de la evasión inmune inducida por SFCL2 y sus genes diana, firmas genéticas y marcadores del microambiente

tumoral en asociación con ORR en pacientes con CMTN que se someten a IT para construir nomogramas predictivos integradores.

4. PRESUPUESTO

Concepto:	Año 1	Año 2
Fungibles y similares	8.600,00 €	9.560,00 €
Servicios	4.220,00 €	3.530,00 €
Personal	26.878,25 €	26.878,25 €
Publicaciones	0 €	4.500,00 €
Overheads	7.939,65 €	8.893,65 €
Total por año	47.637,90 €	53.361,90 €
TOTAL PROYECTO	100.999,80 €	

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Prat A, Adamo B, Cheang MCU, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *The oncologist*. 2013;18(2):123-133. doi:10.1634/theoncologist.2012-0397
2. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;363(20):1938-1948. doi:10.1056/NEJMra1001389
3. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(15 Pt 1):4429-4434. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-3045
4. Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, et al. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(15):1879-1887. doi:10.1200/JCO.2011.38.2010
5. Li B, Chan HL, Chen P. Immune Checkpoint Inhibitors: Basics and Challenges. *Current medicinal chemistry*. 2019;26(17):3009-3025. doi:10.2174/0929867324666170804143706

6. Schmid P, Adams S, Rugo HS, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *The New England journal of medicine*. 2018;379(22):2108-2121. doi:10.1056/NEJMoa1809615
7. Cortés J, Lipatov O, Im SA, et al. LBA21 - KEYNOTE-119: Phase III study of pembrolizumab (pembro) versus single-agent chemotherapy (chemo) for metastatic triple negative breast cancer (mTNBC). *Annals of Oncology*. 2019;30:v859-v860. doi:https://doi.org/10.1093/annonc/mdz394.010
8. Dirix LY, Takacs I, Jerusalem G, et al. Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study. *Breast cancer research and treatment*. 2018;167(3):671-686. doi:10.1007/s10549-017-4537-5
9. Emens LA, Cruz C, Eder JP, et al. Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. *JAMA oncology*. 2019;5(1):74-82. doi:10.1001/jamaoncol.2018.4224
10. Adams S, Schmid P, Rugo HS, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2019;30(3):397-404. doi:10.1093/annonc/mdy517
11. Llinàs-Arias P, Íñiguez-Muñoz S, McCann K, et al. Epigenetic Regulation of Immunotherapy Response in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*. 2021;13(16). doi:10.3390/cancers13164139
12. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *The Lancet Oncology*. 2016;17(12):e542-e551. doi:10.1016/S1470-2045(16)30406-5
13. Budczies J, Allgäuer M, Litchfield K, et al. Optimizing panel-based tumor mutational burden (TMB) measurement. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2019;30(9):1496-1506. doi:10.1093/annonc/mdz205
14. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;351(27):2817-2826. doi:10.1056/NEJMoa041588
15. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-536. doi:10.1038/415530a
16. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *The New England journal of medicine*. 2016;375(8):717-729. doi:10.1056/NEJMoa1602253
17. Voorwerk L, Slagter M, Horlings HM, et al. Immune induction strategies in metastatic triple-negative breast cancer to enhance the sensitivity to PD-1 blockade: the TONIC trial. *Nature medicine*. 2019;25(6):920-928. doi:10.1038/s41591-019-0432-4

18. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*. 2017;168(4):707-723. doi:10.1016/j.cell.2017.01.017
19. Orozco JIJ, Marzese DM, Hoon DSB. Cancer Epigenomics on Precision Medicine and Immunotherapy BT - Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics. In: Patel V, Preedy V, eds. Springer International Publishing; 2017:1-21. doi:10.1007/978-3-319-31143-2_68-1
20. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(2):108-121. doi:10.1038/nrm3742
21. Marzese DM, Manughian-Peter AO, Orozco JIJ, Hoon DSB. Alternative splicing and cancer metastasis: prognostic and therapeutic applications. *Clinical & experimental metastasis*. 2018;35(5-6):393-402. doi:10.1007/s10585-018-9905-y
22. Climente-González H, Porta-Pardo E, Godzik A, Eyras E. The Functional Impact of Alternative Splicing in Cancer. *Cell reports*. 2017;20(9):2215-2226. doi:10.1016/j.celrep.2017.08.012
23. Kahles A, Lehmann KV, Toussaint NC, et al. Comprehensive Analysis of Alternative Splicing Across Tumors from 8,705 Patients. *Cancer cell*. 2018;34(2):211-224.e6. doi:10.1016/j.ccell.2018.07.001
24. Jayasinghe RG, Cao S, Gao Q, et al. Systematic Analysis of Splice-Site-Creating Mutations in Cancer. *Cell reports*. 2018;23(1):270-281.e3. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.052
25. Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet (London, England)*. 2011;378(9791):595-605. doi:10.1016/S0140-6736(11)60756-3
26. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, et al. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *The New England journal of medicine*. 2017;377(18):1723-1732. doi:10.1056/NEJMoa1702752
27. Marzese DM, Liu M, Huynh JL, et al. Brain metastasis is predetermined in early stages of cutaneous melanoma by CD44v6 expression through epigenetic regulation of the spliceosome. *Pigment cell & melanoma research*. 2015;28(1):82-93. doi:10.1111/pcmr.12307