

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



TESIS DOCTORAL

MECANISMOS DE RESISTENCIA A
TRATAMIENTO DIRIGIDO EN CÁNCER DE
MAMA HER2 POSITIVO METASTÁSICO

Doctorando:

Santiago Ignacio Escrivá de Romaní Muñoz

Directora:

Cristina Saura Manich

Tutora:

Judith Balmaña Gelpi

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universidad Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2025

AGRADECIMIENTOS:

Hace ahora 5 años en que acepte el reto de iniciar mi proyecto de tesis doctoral. Acepte este reto con la ilusión y motivación que suponía el formar parte de un equipo multidisciplinar excelente para el tratamiento integral del cáncer de mama en un Hospital Universitario como Vall d'Hebron. Los primeros años de especialidad los había dedicado al tratamiento de pacientes oncológicos en el ámbito de la atención asistencial. Primero en el Instituto Oncológico Baselga y después en los Hospitales de Granollers y Mollet del Vallés. Siempre estaré agradecido a la confianza que depositaron en mi mis jefes. En primer lugar, Pepe Baselga, con quien recién terminada la residencia y con la inexperiencia y ternura que caracterizaba aquella etapa, tuve el privilegio de aprender de su brillante inteligencia, metodología y rigor científico. Después los dos Migueles, primero Hernández-Bronchud que me dio la oportunidad de participar en un proyecto para mejorar la atención oncológica de toda una comarca y del que también aprendí de su inteligencia y constante inquietud científica. Después, Nogué a quien estoy agradecido por su confianza y reconocimiento, además de por permitir mi dedicación casi exclusiva al cáncer de mama que siempre había sido mi área de mayor interés. Recuerdo a menudo esta etapa con cariño y estoy agradecido por el buen ambiente y compañerismo entre todos los miembros del equipo que se fueron incorporando a lo largo de los más de 10 años que compartimos. En todos aquellos años, la idea de iniciar un proyecto de tesis doctoral siempre estuvo presente, aunque nunca llegó a tomar forma y concretarse.

Siempre recordaré aquella llamada que supuso un cambio en mi vida profesional inesperado. Durante los años que mencionaba previamente siempre fue prioritario en la medida de lo posible, conseguir que todas las pacientes a las que atendía tuvieran las mejores opciones terapéuticas disponibles. Así, inicié una excelente relación profesional con Cristina Saura, siempre disponible para valorar a nuestras pacientes, buscando las mejores opciones para ellas con su enfoque, manteniendo siempre el rigor de la evidencia científica, pero sobre todo con una gran humanidad. Pues bien, volviendo a esa llamada, era una propuesta para formar parte de su equipo en el Hospital Vall d'Hebron. No dudé en aceptar y agradecer la gran oportunidad que me ofrecía de pertenecer a su equipo. Nunca me había sentido tan ilusionado y motivado profesionalmente gracias al excelente ambiente, apoyo, nivel científico y calidad humana que me encontré en el equipo. Estaré eternamente agradecido a Cris por haber confiado en mi dándome la oportunidad de mi vida. Pues bien, gracias a este nuevo contexto profesional, la idea de iniciar un proyecto de tesis se pudo concretar y además con la buena fortuna de tener a Cris para dirigirla. Cris, tan agradecido de que lo hayas hecho posible, por tu apoyo, excelente dirección y paciencia. Uno de los aspectos que más ha despertado mi curiosidad como a la mayoría de quienes nos dedicamos al tratamiento del cáncer, es comprender mejor las grandes diferencias que nos encontramos en el beneficio a los tratamientos. Podemos encontrar tanta diferencia en pacientes con un mismo fenotipo de cáncer de mama tratadas con la misma terapia. Incluso, en el cáncer de mama HER2 positivo con una diana tan bien identificada y establecida, las diferencias pueden ser enormes. Surgió así la posibilidad de estudiar los mecanismos de resistencia a los tratamientos anti-HER2 en las pacientes que tratamos en el día a día de nuestra consulta. Agradezco a Cris su ayuda para definir el tema y diseñar el método científico para llevarlo a cabo. En el momento del inicio del estudio, la tecnología para determinar alteraciones genómicas en tejido estaba en constante y

rápida evolución, mientras que su determinación en plasma estaba en un desarrollo más inicial. Decidimos centrar nuestro proyecto en la búsqueda de mecanismos de resistencia genómicos mediante el estudio en biopsia líquida del ADN tumoral liberado en sangre (ctDNA). La obtención y procesamiento de todas estas muestras era esencial para la viabilidad del proyecto. Mi agradecimiento a todas las pacientes que de manera altruista han colaborado y contribuido para hacer posible el proyecto, porque son ellas quienes le dan sentido. En la recogida de muestras, desde el inicio, el papel de Anna Suñol ha sido crucial, tan agradecido por la disponibilidad siempre, por estar pendiente de que no se perdiera ninguna muestra, todos los cambios administrativos en las peticiones, todo siempre con mucha paciencia y su sonrisa. A lo largo de la duración del proyecto, han colaborado otras enfermeras que han estado también pendientes del perfecto funcionamiento para la recogida de cada una de las muestras, Ana McManus, Vero Rodríguez y ahora Ana Baizán, mi agradecimiento para cada una, un privilegio hacer equipo.

Mi agradecimiento al Oncology Data Science Group (ODysSey) en la identificación de las muestras de tejido pareadas disponibles, creación de bases de datos, formación en RedCap, análisis estadísticos descriptivos. Especialmente, mi enorme agradecimiento a Laia Joval por hacerlo todo posible, por su profesionalidad, disponibilidad y paciencia hasta el último momento. La base de datos que hemos ido completando Enric Álvarez y yo con nuestras pacientes, mi agradecimiento a Enric por este trabajo y por su actitud y solidaridad siempre en la parte común del trabajo de nuestras tesis.

Para la identificación, valoración de viabilidad, preparación de las muestras y todas las determinaciones de IHQ/ISH sobre tejido, mi agradecimiento al laboratorio de Paolo Nuciforo y en especial a José Jiménez, Roberta Fasani y Paola Martínez por todo su trabajo, interés en el proyecto y disponibilidad. Para los análisis genómicos en las muestras de tejido y plasma mi agradecimiento al laboratorio de Ana Vivancos por todo el trabajo y permitir el análisis de las muestras de plasma con la tecnología en ese momento recién incorporada al laboratorio. Muy agradecido a Judit Matito y Ester Castillo por su ayuda en los resultados y por ayudarnos en su interpretación.

Mi agradecimiento al Computational Cancer Biology Group, a José Antonio Seoane por aceptar realizar todos los análisis genómicos de los resultados de las muestras y por implicar a Laia Ollé en el proyecto. A Laia mi enorme agradecimiento por todo el aprendizaje a lo largo de estos meses, por su profesionalidad, capacidad, disponibilidad, flexibilidad y por su enorme paciencia conmigo.

Muy agradecido a Joaquín Arribas y su laboratorio por el aprendizaje derivado de los experimentos sobre PDX, y a Santi Duro por su ayuda para recopilar e interpretar los datos derivados de los PDX.

Muy agradecido a todas mis compañeras de la Unidad de Cáncer de mama por su apoyo, profesionalidad, compañerismo, sabiduría y paciencia y en especial a Míriam Arumí y Alejandra Rezqallah que me han ayudado a disponer de tiempo para dedicar a este proyecto.

Agradezco enormemente a VHIO y en especial a Josep Tabernero que me ha dado la oportunidad de que este proyecto se haga realidad.

No puedo olvidar y dejar de agradecer a mi madre, mi padre, Carmen y María que siempre han creído en mí y que todo es posible con su amor incondicional. A Isma, mi compañero a lo largo de ya tantos años, siempre conmigo apoyándome y motivándome para seguir adelante, para no temer a los cambios y creer en mí mismo.

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
1L	Primera Línea
2L, 3L, 4L...	Segunda línea, Tercera línea, Cuarta línea...
ADC	<i>Antibody-Drug Conjugate</i> : conjugado anticuerpo-fármaco <i>Antibody Dependent Celular Citotoxicity</i> : Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADCC	<i>Antibody Dependent Celular Phagocytosis</i> : Fagocitosis celular dependiente de anticuerpos
ADCP	dependiente de anticuerpos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AKT	Proteína quinasa B
AR	Anfiregulina
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ASCO/CAP	Asociación Americana de Oncología Clínica y Colegio de Patólogos Americanos
BET	Bromodomain and Extra-Terminal domain
BTC	Betacelulina
CAV1	Caveolina 1
CBR	Tasa de beneficio clínico: <i>Clinical Benefit Rate</i> <i>Complement Dependent Citotoxicity</i> : Citotoxicidad dependiente de complemento
CDC	
CEP17	Sonda de enumeración cromosómica 17
cfDNA	ADN libre circulante
CHI3L1	<i>Chitinase-3-like protein 1</i> : Proteína 1 de tipo quitinasa 3
Cleopatra group	Taxano- trastuzumab-pertuzumab
CM	Cáncer de mama
CMCM	Celulas Madre de Cáncer de Mama: <i>Breast Cancer Stem Cells</i>
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMM	Cáncer de mama metastásico
CNA	<i>Copy Number Alteration</i> : Alteración del Número de Copias
CTC	Células circulantes tumorales
ctDNA	ADN circulante tumoral en plasma
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> : Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos
DAR	<i>Drug-to-Antibody Ratio</i> : Ratio droga-anticuerpo
ddPCR	<i>digital droplet PCR</i> : PCR digital en gotas
DEC	Dominio ExtraCelular
dPCR	PCR digital
DS-8201	Trastuzumab deruxtecan
EE	Enfermedad Estable: <i>SD: Stable disease</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR o HER1	Receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico humano
EPG	Epigen

EPR	Epiregulina
ER α	Receptor Estrogénico citoplasmático α <i>ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets</i> : Escala
ESCAT	ESMO para la Accionabilidad de Dianas Moleculares <i>European Society of Medical Oncology</i> : Asociación Europea de Oncología
ESMO	Médica
EV-RNA	Vesículas extracelulares de ARN
FABP7	<i>Fatty acid-binding protein 7</i> : proteína de unión a ácidos grasos 7
FASN	<i>Fatty Acid Synthase</i> : Ácido grasa sintetasa
Fc	Fracción constante
FcR	Receptor de Fracción constante
HB-EGF	EGF de unión a heparina
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HER3	Receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano
HER4	Receptor 4 del factor de crecimiento epidérmico humano <i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i> : Receptor del factor de crecimiento
HGFR	de hepatocitos
HRG	Heregulina
HS	H-score
HSF-1	<i>Heat Shock Factor 1</i> : Factor de choque térmico 1
HUVH	Hospital Universitario Vall d'Hebron <i>Insulin Growth Factor Receptor 1</i> : Receptor del factor de crecimiento de
IGF-1R	la insulina 1
IHQ	Inmunohistoquímica
ILP	Intervalo Libre de Progresión
ISH	<i>In situ Hybridation</i> : Hibridación in situ
JAK	Quinasas Janus
LDH-A	Lactato Deshidrogenasa A
mAb	<i>Monoclonal antibody</i> : anticuerpo monoclonal
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
miARN	miroARN
MS	Mass Spectrometry: Espectrometría de masas <i>Mesenchymal Stem Cells</i> : células mesenquimales con propiedades de célula
MSCs	madre
MTOC	<i>Microtubule-Organizing Center</i> : Centro Organizador de Microtúbulos
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MUC4	Mucina 4
MV	Mimetismo Vascular
NF-kB	Factor nuclear kappa beta
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> : Secuenciación de Nueva Generación
NK	<i>Natural Killer</i>
NPA	<i>Negative Percentual Agreement</i> : Concordancia Porcentual Negativa
NRG	Neurogulinas
NRG1	Neurogulina-1

NSF	<i>Non Singleton Families:</i> Familias No Singleton
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells:</i> Células mononucleares de sangre periférica
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1:</i> Proteína de Muerte Celular Programada 1
PD-L1	<i>Programmed Death-Ligand 1:</i> Ligando de muerte programada 1
PDX	<i>Patient Derived Xenograft:</i> Xenoinjerto derivado de paciente
PE	Progresión de Enfermedad
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PPA	<i>Positive Percentual Agreement:</i> Concordancia Porcentual Positiva
PTK6	Proteína tirosina quinasa 6
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End-products:</i> Receptor de Productos Finales de Glicación Avanzada
RC	Respuesta Completa: <i>CR: Complete Response</i>
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
RP	Respuesta Parcial: <i>PR: Partial Response</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polimorphism:</i> Polimorfismo de un Nucleótido
SNV	<i>Single Nucleotide Variant:</i> Variación de un neucleótido
STAT	Transductores de señal y activadores de la transcripción
T-DM1	Aldo-trastuzumab emtansina
T-DXd	Trastuzumab deruxtecan
TEM	Transformación Epitelio Mesénquima
TF	<i>Tumor Fraction:</i> Fracción Tumoral
TG2	Transglutaminasa tisular 2
TGF-α	Factor de crecimiento transformador alfa
TGS	<i>Targeted Gene Sequencing:</i> Secuenciación Selectiva de Genes
TK	<i>Tyrosine Kinase:</i> Tirosina quinasa
TKI	<i>Tyrosine Kinase inhibitor:</i> Inhibidor tirosina quinasa
TMB	<i>Tumor Mutational Burden:</i> Carga Mutacional Tumoral
TS	<i>Tumor Shedding:</i> Liberación tumoral
TZ_iCDK	Trastuzumab -inhibidor de ciclinas-hormonoterapia
TZ_QT	Trastuzumab-quimioterapia
VAF	<i>Variant Allelic Fraction:</i> Fracción de Variante Alélica
VAFR	<i>Variant Allelic Fraction Ratio:</i> Proporción de la Variación de la Fracción Alélica
VHIO	Vall d'Hebron Institute of Oncology
VPP	Valor Predictivo Positivo
VUS	<i>Variant of Uncertain Significance:</i> Variante de Significado Incierto
WES	<i>Whole Exome Sequencing:</i> Secuenciación completa del exoma
WGS	<i>Whole Genome Sequencing:</i> Secuenciación completa del genoma

ÍNDICE

RESUMEN.....	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1. SUBTIPOS DE CÁNCER DE MAMA	16
1.2. EL CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO	17
1.3. FAMILIA DE RECEPTORES ErbB/HER	18
1.4. DETERMINACIÓN DE HER2.....	20
1.4.1. Métodos standard.....	20
1.4.1.1. IHQ/ISH.....	20
1.4.2. Métodos experimentales.....	24
1.4.2.1. PCR	24
1.4.2.2. Técnicas convencionales sobre células circulantes tumorales (CTC)	24
1.4.2.3. Inmunofluorescencia cuantitativa.....	25
1.4.2.4. Espectrometría de masas	25
1.4.2.5. NGS.....	26
1.4.2.6. Expresión ARNm.....	27
1.4.2.7. Secuenciación de la metilación del ADN del genoma	28
1.5. NGS EN BIOPSIA DE TEJIDO.....	28
1.5.1. Identificación de diferencias mutacionales entre cáncer de mama primario y metastásico..	29
1.5.2. Selección de pacientes para tratamientos dirigidos	29
1.5.3. Identificación de predictores de resistencia	30
1.6. NGS EN BIOPSIA LÍQUIDA.....	31
1.6.1. Correlación entre biopsia líquida y de tejido tumoral	31
1.6.2. Selección de pacientes para tratamientos dirigidos	33
1.6.3. Dinámica de ctDNA para predicción de respuesta a tratamiento	33
1.6.4. Identificación de predictores de resistencia	34
1.7. TERAPIAS ANTI-HER2: MECANISMOS DE ACCIÓN Y RESISTENCIA.....	34
1.7.1. Anticuerpos Monoclonales	35
1.7.1.1. Trastuzumab.....	35
1.7.1.2. Pertuzumab	48
1.7.1.3. Margetuximab.....	50
1.7.1.4. Zanidatamab	51
1.7.2. Inhibidores De Tirosina Quinasa (TKI).....	53
1.7.2.1. Lapatinib.....	53
1.7.2.2. Neratinib	57
1.7.2.3. Tucatinib.....	59
1.7.3. Conjugados Anticuerpo-Fármaco (Antibody-Drug-Conjugates, ADCs)	60
1.7.3.1. Trastuzumab Emtansina (T-DM1)	61
1.7.3.2. Trastuzumab Deruxtecan (T-DXd).....	67
1.7.3.3. Trastuzumab Duocarmacina (SYD985).....	70
1.8. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD HER2 POSITIVA METASTÁSICA.....	72
1.8.1. Primera línea.....	73
1.8.2. Segunda línea.....	73
1.8.3. Tercera línea	74
1.8.4. Líneas sucesivas	75
1.8.5. Tratamientos no aprobados.....	75
1.8.5.1. Anticuerpos de nueva generación.....	75
1.8.5.2. Otros TKIs	76
1.8.5.3. ADCs	77

1.8.5.4. Otras combinaciones.....	77
1.8.5.4.1. Inhibidores de CDK4/6.....	77
1.8.5.4.2. Inhibidores de la vía de PI3K/AKT.....	78
1.8.5.4.3. Inhibidores del punto de control inmunitario.....	79
2. HIPÓTESIS.....	80
3. OBJETIVOS.....	81
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	81
3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS	81
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	82
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	82
4.2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO Y SELECCIÓN DE MUESTRAS	83
4.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE TEJIDO	84
4.3.1. Determinación de HER2	84
4.3.2. Análisis moleculares.....	84
4.3.2.1. Panel Amplicon VHIO	84
4.3.2.2. Panel VHIO-300	85
4.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PLASMA	87
4.4.1. Análisis moleculares.....	88
4.4.1.1. Panel Guardant360 VHIO	88
4.5. GENERACIÓN DE MODELOS DE PDX	89
4.6. ESTADÍSTICA.....	89
4.6.1. Bases de datos	89
4.6.2. Variables clínicas y patológicas	90
4.6.3. Análisis estadístico descriptivo	91
4.6.4. Análisis estadístico genómico	92
5. RESULTADOS.....	93
5.1. FLUJO DE PACIENTES Y MUESTRAS.....	93
5.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES.....	95
5.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS DE TRATAMIENTO PARA ENFERMEDAD METASTÁSICA RECIBIDAS POR LAS PACIENTES	100
5.4. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA.....	104
5.5. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS	116
5.6. ANÁLISIS EN MUESTRAS DE TEJIDO	123
5.6.1. Determinación de HER2 por técnicas convencionales, IHQ y FISH	123
5.6.1.1. H-Score	123
5.6.2. Genómica	124
5.6.2.1. Determinación de alteraciones genómicas	124
5.7. ANÁLISIS EN MUESTRAS DE PLASMA, BIOPSIA LÍQUIDA:	127
5.7.1. Genómica.....	127
5.7.1.1. Determinación alteraciones genómicas.....	127
5.8. GENES MÁS FRECUENTEMENTE ALTERADOS	130
5.9. DETERMINADAS ALTERACIONES GENÓMICAS PODRÁN CONFERIR RESISTENCIA PRIMARIA A DETERMINADOS TRATAMIENTOS	133
5.9.1. Cleopatra group	135

5.9.2. Trastuzumab-quimioterapia	135
5.9.3. T-DM1	135
5.9.4. Trastuzumab deruxtecan	137
5.9.5. Trastuzumab duocarmacina.....	139
5.9.6. TKI	140
5.10. DETERMINADAS ALTERACIONES GENÓMICAS ADQUIRIDAS PODRÁN CONFERIR RESISTENCIA ADQUIRIDA A DETERMINADOS TRATAMIENTOS	142
5.10.1. Cleopatra group	142
5.10.2. Trastuzumab-quimioterapia	144
5.10.3. T-DM1	145
5.10.4. Trastuzumab deruxtecan	147
5.10.5. Trastuzumab duocarmacina.....	148
5.10.6. TKI	150
5.11. LAS ALTERACIONES GENÓMICAS DEL ADN SERÁN CONCORDANTES ENTRE EL TEJIDO TUMORAL Y EL ctDNA EXTRAÍDOS EN UN MISMO TIEMPO	151
5.11.1. Correlación y solapamiento de las variantes genómicas encontradas en las muestras pareadas de biopsia de tejido y biopsia de plasma o biopsia líquida	152
5.11.1.1. Total de alteraciones genómicas encontradas.....	155
5.11.1.2. Mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas	155
5.11.1.3. Variantes de significado incierto (VUS)	159
5.11.1.4. Amplificaciones	162
5.12. LAS ALTERACIONES GENÓMICAS DEL ADN PODRÁN SER DISCORDANTES ENTRE MUESTRAS DE ctDNA EXTRAÍDAS EN DISTINTAS LÍNEAS DE TRATAMIENTO.	165
5.12.1. Mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas	166
5.12.2. Variantes de significado incierto (VUS)	167
5.12.3. Amplificaciones	167
5.13. LA DETERMINACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE <i>ERBB2</i> EN ctDNA SERÁ FACTIBLE COMO PREDICTOR DE BENEFICIO A TRATAMIENTO ANTI-HER2.....	171
5.13.1. Amplificación gen <i>ERBB2</i> vs no amplificación en plasma	171
5.13.2. Número de copias del gen <i>ERBB2</i> en plasma.....	171
5.13.3. Amplificación gen <i>ERBB2</i> vs no amplificación en tejido	172
5.13.4. Número de copias del gen <i>ERBB2</i> en tejido.....	173
5.14. LA AMPLIFICACIÓN DE <i>ERBB2</i> PODRÁ SER DISCORDANTE ENTRE TEJIDO TUMORAL Y ctDNA.	173
5.14.1. Correlación entre amplificación de <i>ERBB2</i> en tejido por Panel VHIO-300 comparado con Guardant360 VHIO en plasma	174
5.14.2. Correlación entre amplificación de <i>ERBB2</i> en tejido por Panel VHIO-300 comparado con IHQ/ISH	175
5.14.3. Correlación entre la determinación de HER2 en tejido por H-Score con la amplificación de <i>ERBB2</i> por panel VHIO-300	176
5.14.4. Correlación entre la determinación de HER2 en tejido por IHQ/ISH con la amplificación de <i>ERBB2</i> por Guardant360 VHIO	177
5.14.5. Correlación entre la determinación de HER2 en tejido por H-Score con la amplificación de <i>ERBB2</i> por Guardant360 VHIO en plasma.....	178
5.15. LA GENERACIÓN DE MODELOS DE PDX DERIVADOS DE TUMOR PUEDE SER INFORMATIVA PARA ESTUDIOS DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS ANTI-HER2	179
5.15.1. Concordancia de respuesta obtenida por PDX tratado con el mismo tratamiento que la paciente de la que proviene	180
6. DISCUSIÓN	183
6.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES.....	183

6.2. GENES MÁS FRECUENTEMENTE ALTERADOS	193
6.3. DETERMINADAS ALTERACIONES GENÓMICAS PODRÁN CONFERIR RESISTENCIA PRIMARIA A DETERMINADOS TRATAMIENTOS	197
6.4. DETERMINADAS ALTERACIONES GENÓMICAS ADQUIRIDAS PODRÁN CONFERIR RESISTENCIA ADQUIRIDA A DETERMINADOS TRATAMIENTOS	201
6.5. LAS ALTERACIONES GENÓMICAS DEL ADN SERÁN CONCORDANTES ENTRE EL TEJIDO TUMORAL Y EL ctDNA EXTRAÍDOS EN UN MISMO TIEMPO	203
6.6. LAS ALTERACIONES GENÓMICAS DEL ADN PODRÁN SER DISCORDANTES ENTRE MUESTRAS DE ctDNA EXTRAÍDAS EN DISTINTAS LÍNEAS DE TRATAMIENTO	211
6.7. LA DETERMINACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE <i>ERBB2</i> EN ctDNA SERÁ FACTIBLE COMO PREDICTOR DE BENEFICIO A TRATAMIENTO ANTI-HER2.....	213
6.8. LA AMPLIFICACIÓN DE <i>ERBB2</i> PODRÁ SER DISCORDANTE ENTRE TEJIDO TUMORAL Y ctDNA	214
6.9. LA GENERACIÓN DE MODELOS DE PDX DERIVADOS DE TUMOR PUEDE SER INFORMATIVA PARA ESTUDIOS DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS ANTI-HER2	217
7. CONCLUSIONES.....	219
8. FUTURAS DIRECCIONES	220
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	221
10. APÉNDICES.....	249
10.1. ONCOPLOT DE TODAS LAS MUTACIONES PATOGENICAS Y PROBABLEMENTE PTOGÉNICAS DETECTADAS EN TEJIDO POR PANEL VHIO-300	249
10.2. ONCOPLOT DE TODAS LAS MUTACIONES TIPO VUS DETECTADAS EN TEJIDO POR PANEL VHIO-300.....	250
10.3. ONCOPLOT DE TODAS LAS CNV ENCONTRADAS EN TEJIDO POR PANEL VHIO-300	251
10.4. ONCOPLOT DE TODAS LAS MUTACIONES DETECTADAS EN PLASMA POR GUARDANT360 VHIO	252
10.5. ONCOPLOT DE TODAS LAS CNV ENCONTRADAS EN PLASMA POR GUARDANT360 VHIO	253
10.6. DOCUMENTO APROBACIÓN CEIM VALL D’HEBRON.....	254
10.7. CONSENTIMIENTOS INFORMADOS.....	256

RESUMEN

ANTECEDENTES:

El tratamiento del cáncer de mama metastásico (CMM) HER2 positivo incluye distintos fármacos anti-HER2 que en monoterapia o en combinación con quimioterapia, hormonoterapia o inhibidores de otras vías celulares, han demostrado mejorar el pronóstico de estas pacientes. No obstante, eventualmente, la mayoría de las pacientes progresan a estas terapias. El estudio del ADN circulante tumoral en plasma (ctDNA) es una herramienta útil en desarrollo para la identificación de alteraciones genómicas tumorales que pueden asociarse a mecanismos de sensibilidad o resistencia a los tratamientos.

OBJETIVOS:

El objetivo principal del proyecto es estudiar los mecanismos de resistencia primaria o adquirida a tratamientos anti-HER2, mediante el estudio de las alteraciones genómicas del ADN tanto en material de tejido tumoral como en ctDNA en plasma.

Otros objetivos secundarios incluyen el estudio de la concordancia entre las alteraciones identificadas en tejido tumoral y las de ctDNA, la evaluación de la amplificación de *ERBB2* en ctDNA como predictor de respuesta a tratamiento anti-HER2, su concordancia con la amplificación en tejido y la valoración de la rentabilidad de las biopsias para generar xenoinjertos derivados de tumores de pacientes (PDX: *Patient Derived Xenograft*) para el estudio de mecanismos de resistencia.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se trata de un estudio ambispectivo, correspondiente a una cohorte consecutiva de pacientes con diagnóstico de CMM HER2 positivo metastásico identificadas prospectivamente y de las que se dispone de muestra de tejido tumoral y plasma, tratadas con terapias anti-HER2 en el Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH).

Los datos clínicos de las pacientes incluidas se recogen de sus historias clínicas en una base de datos codificada en RedCap VHIO. Se incluye información demográfica, historial médico, características del tumor, estado vital, muestras de tejido y plasma disponibles, tratamientos anti-HER2 recibidos, así como respuesta obtenida, fecha de inicio y fin de cada tratamiento y fecha de último seguimiento o éxitus de la paciente. Se analizan de forma retrospectiva las alteraciones genómicas de los tumores, mediante secuenciación de Nueva Generación (NGS) con el panel VHIO-300 en tejido y el panel Guardant360 VHIO en plasma y se evalúa la expresión de HER2 en las muestras de tejido mediante técnicas de Inmunohistoquímica (IHQ), hibridación in situ (ISH) y determinación del H-score.

Para el análisis estadístico descriptivo se usan frecuencias y porcentajes para variables categóricas, y media, desviación estándar, mediana, rango y rango intercuartílico para variables continuas. El análisis de supervivencia emplea el método de Kaplan-Meier y modelos de riesgos proporcionales de Cox univariantes. El análisis estadístico genómico utiliza modelos lineales generales para correlacionar variables numéricas utilizando correlaciones de Pearson y Spearman, y pruebas de Wilcoxon para comparaciones entre grupos.

RESULTADOS:

Se incluyen 107 pacientes con 608 muestras de plasma recogidas de forma seriada y prospectiva. Para los análisis se seleccionan 39 pacientes de las que se dispone de muestras pareadas de tejido y plasma. Se analizan 51 muestras de tejido (expresión de HER2 (IHQ/ISH y H-score) en 45 muestras y análisis genómicos en 12 muestras con Amplicon y en 44 con el panel VHIO-300). Se analizan 116 muestras de plasma con el panel Guardant360 VHIO de las cuales 49 son pareadas y el resto recogidas en diferentes líneas de tratamiento de las 39 pacientes.

Las 39 pacientes con muestras pareadas son de sexo femenino con una mediana de edad al diagnóstico de 49 años (29-85). Trece pacientes (33%) presentaban enfermedad metastásica y a mediana de seguimiento desde su inclusión en el proyecto es de 35 meses (5.6 a 95).

La mediana de líneas de tratamiento recibidos en el ámbito metastásico es de 6 (1-14). Se administran un total de 244 tratamientos: trastuzumab (48%), pertuzumab (12%), zanidatamab (2%), margetuximab (0.4%), zenocutuzumab (0.4%), trastuzumab duocarmazina (4%), trastuzumab deruxtecan (10%), lapatinib (5%), neratinib (0.8%), tucatinib (4%), y dasatinib (0.4%). La mediana del tiempo hasta la progresión es de 5.7 meses (0-62.9), y la mediana de supervivencia global es de 61 meses desde el inicio de tratamiento para enfermedad metastásica.

Los análisis realizados no evidencian alteraciones genómicas específicas con resistencia primaria a la mayoría de los tratamientos anti-HER2 estudiados, y únicamente se identifica una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de mutaciones patogénicas en *PTEN* y amplificación de *RAF1* con resistencia a T-DM1. No se identifica ninguna mutación emergente con significación estadística asociada a la resistencia adquirida a los tratamientos anti-HER2 evaluados.

Se observa alta concordancia de genes compartidos entre tejido y ctDNA para mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas (78%), moderada para amplificaciones (61%) y baja para variantes de significado incierto (VUS) (32%).

No se ha observado que la amplificación de *ERBB2* determinada por NGS se correlacione con el beneficio a los tratamientos anti-HER2 estudiados.

Se encuentra discordancia entre la amplificación de *ERBB2* detectada por NGS en tejido y plasma en muestras pareadas. Sin embargo, en las mismas muestras de tejido se observa concordancia entre la amplificación de *ERBB2* por NGS y por métodos convencionales.

Se han generado modelos PDX con una tasa de éxito del 26.5%. Se observa discordancia en la única correlación de respuesta a tratamiento establecida entre paciente y PDX, ya que el PDX respondió a SYD985, a pesar de que la biopsia se obtuvo tras la progresión de la paciente a este tratamiento.

CONCLUSIONES:

El alcance de la biopsia líquida en la detección de alteraciones genómicas que pudieran identificar mecanismos de resistencia primarios o adquiridos a los tratamientos anti-HER2 evaluados ha sido limitado en nuestro estudio. Aunque la concordancia de las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas ha sido elevada entre tumor y plasma, la complejidad biológica subyacente a la aparición de resistencias a los tratamientos requiere una aproximación más integral incluyendo análisis adicionales como el estudio de la expresión de ARNm, la epigenética, la

proteómica, además de factores como el microambiente tumoral y la respuesta inmune para identificar futuros biomarcadores con utilidad clínica para esta población de pacientes. Sin embargo, la utilidad del análisis de ctDNA es fundamental para monitorizar alteraciones genómicas evitando realizar procedimientos invasivos y para identificar alteraciones accionables que pueden guiar decisiones terapéuticas en otros subtipos tumorales.

ABSTRACT

BACKGROUND:

The treatment of metastatic HER2-positive breast cancer (MBC) includes various anti-HER2 drugs that, either as monotherapy or in combination with chemotherapy, hormonal therapy, or inhibitors of other cellular pathways, have shown to improve the prognosis of these patients. However, eventually, most patients progress on these therapies. The study of circulating tumor DNA (ctDNA) in plasma is an emerging useful tool for identifying tumor genomic alterations that may be associated with mechanisms of sensitivity or resistance to treatments.

OBJECTIVES:

The main objective of the project is to study the mechanisms of primary or acquired resistance to anti-HER2 treatments by examining genomic alterations in both tumor tissue samples and circulating tumor DNA (ctDNA) in plasma. Secondary objectives include investigating the concordance between alterations identified in tumor tissue and those in ctDNA, evaluating the amplification of ERBB2 in ctDNA as a predictor of response to anti-HER2 treatment, assessing its concordance with tissue amplification, and evaluating the feasibility of biopsies to generate patient-derived xenografts (PDX) for the study of resistance mechanisms.

MATERIALS AND METHODS:

This is an ambispective study involving a consecutive cohort of HER2-positive MBC patients, identified prospectively, with available tumor tissue and plasma samples, treated with anti-HER2 therapies at Vall d'Hebron University Hospital (HUVH).

Clinical data for the included patients are collected from their medical records into a coded database in RedCap VHIO. The dataset includes demographic information, medical history, tumor characteristics, vital status, available tissue and plasma samples, anti-HER2 treatments received, along with the obtained response, start and end dates of each treatment, and date of last follow-up or patient death. Genomic alterations of tumors are analyzed retrospectively using Next Generation Sequencing (NGS) with the VHIO-300 panel for tissue and the Guardant360 VHIO panel for plasma. HER2 expression in tissue samples is evaluated using Immunohistochemistry (IHC), in situ hybridization (ISH), and determination of the H-score.

For descriptive statistical analysis, frequencies and percentages are used for categorical variables, and mean, standard deviation, median, range, and interquartile range for continuous variables. Survival analysis employs the Kaplan-Meier method and univariate Cox proportional hazards models. Genomic statistical analysis utilizes general linear models to correlate numerical variables using Pearson and Spearman correlations, as well as Wilcoxon tests for comparisons between groups.

RESULTS:

107 patients with 608 plasma samples collected serially and prospectively are included. For the analyses, 39 patients with paired tissue and plasma samples are selected. 51 tissue samples are analyzed (HER2 expression (IHC/ISH and H-score) in 45 samples and genomic analyses in 12 samples with Amplicon and in 44 with the VHIO-300 panel). Additionally, 116 plasma samples are analyzed with the Guardant360 VHIO panel, of which 49 are paired with tissue samples, and the rest collected in different treatment lines of the 39 patients. The 39 patients with paired samples are female, with a median age at diagnosis of 49 years (range 29-85). Thirteen patients (33%) presented de novo metastatic disease, and the median follow-up since inclusion in the project was 35 months (5.6 to 95). The median number of treatment lines received in the metastatic setting is 6 (1-14). A total of 244 treatments were administered: trastuzumab (48%), pertuzumab (12%), zanidatamab (2%), margetuximab (0.4%), zenocutuzumab (0.4%), trastuzumab duocarmazine (4%), trastuzumab deruxtecan (10%), lapatinib (5%), neratinib (0.8%), tucatinib (4%), and dasatinib (0.4%). The median time to progression is 5.7 months (0-62.9), and the median overall survival from the start of treatment for metastatic disease is 61 months.

The analyses performed do not reveal specific genomic alterations associated with primary resistance to the majority of the studied anti-HER2 treatments, with only one statistically significant association identified between the presence of pathogenic mutations in PTEN and amplification of RAF1 with resistance to T-DM1. No emerging mutations with statistical significance associated with acquired resistance to the evaluated anti-HER2 treatments were identified.

A high concordance of shared genes between tissue and ctDNA for pathogenic and likely pathogenic mutations (78%) is observed, moderate for amplifications (61%), and low for variants of uncertain significance (VUS) (32%). ERBB2 amplification determined by NGS has not been observed to correlate with benefit to the anti-HER2 treatments studied.

Discordance is found between ERBB2 amplification detected by NGS in tissue and plasma in paired samples. However, in the same tissue samples, concordance is observed between ERBB2 amplification by NGS and by conventional methods.

PDX models have been generated with a success rate of 26.5%. Discordance is observed in the only correlation of response to treatment established between patient and PDX, since the PDX responded to SYD985, even though the biopsy was obtained after the patient's progression to this treatment.

CONCLUSIONS:

The scope of liquid biopsy in detecting genomic alterations that could identify primary or acquired resistance mechanisms to the evaluated anti-HER2 treatments has been limited in our study. Although the concordance of pathogenic and probably pathogenic mutations has been high between tumor and plasma, the biological complexity underlying the emergence of resistance to treatments requires a more comprehensive approach including additional analyses such as the study of mRNA expression, epigenetics, proteomics, as well as factors such as tumor microenvironment and immune response to identify future biomarkers with clinical utility for this patient population. Nevertheless, the utility of ctDNA analysis is crucial for monitoring genomic alterations, avoiding invasive procedures, and for identifying actionable alterations that can guide therapeutic decisions in other tumor subtypes.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia más frecuentemente diagnosticada en las mujeres. Supone además la principal causa de muerte relacionada con el cáncer en mujeres. Los datos publicados por GLOBOCAN 2020 estiman que el CM supone el 11.7% de todos los cánceres diagnosticados con 2.3 millones de casos estimados a nivel mundial.¹ Los nuevos casos estimados en España para 2022 fueron de 34.750, mientras que su mortalidad fue muy inferior por lo que la prevalencia los 5 años fue de 144.233 en 2020. Por supuesto, esta prevalencia puede irse modificando en el tiempo con la incorporación progresiva de avances terapéuticos.²

1.1. SUBTIPOS DE CÁNCER DE MAMA

El CM es una enfermedad compleja cuya incidencia aumenta con la edad debido a la acumulación de mutaciones somáticas en las glándulas mamarias. Las neoplasias malignas del tejido mamario son heterogéneas y se dividen ampliamente en varios subtipos con diversas características clínicas y diferentes pronósticos en función de las aberraciones moleculares que presentan.³ Para clasificar los subtipos de CM se utilizan fundamentalmente marcadores inmunohistoquímicos (IHQ) y también es posible hacerlo mediante plataformas basadas en expresión génica. La discordancia entre ambos métodos puede ser de hasta el 30%.⁴ Según el consenso de St. Gallen de 2015 se estableció la correlación IHQ según la clasificación molecular que utilizamos actualmente para diferenciar los subtipos de CM.⁵

-Luminal A: En el subtipo luminal A, que representa aproximadamente el 50-60% de las pacientes con CM, considerando la IHQ, los tumores son positivos para el receptor de estrógeno (RE) con positividad del receptor de progesterona (RP) $\geq 20\%$ y negatividad de la proteína HER2. Además, debido a una expresión reducida de Ki67 $< 20\%$, una proteína correlacionada con la proliferación de células cancerosas, el subtipo luminal A se asocia generalmente con grados histológicos y agresividad bajos y un buen pronóstico. También se incluyen en este subtipo los tumores de los que se haya realizado una plataforma de expresión génica cuyo resultado haya sido de bajo riesgo.⁵ Las pacientes con CM luminal A tienen una tasa de recaída que es significativamente inferior a la de los demás subtipos. Las recidivas son más frecuentes a nivel óseo, mientras que las metástasis hepáticas, pulmonares y del sistema nervioso central se producen en menos del 10% de las pacientes. El tratamiento se basa principalmente en la hormonoterapia.^{6,7}

-Luminal B: En el subtipo luminal B, que comprende aproximadamente el 15-20% de los CM, considerando la IHQ podemos diferenciarlos acorde a la expresión de la proteína HER2 en luminal B HER2 negativos y luminal B HER2 positivos. En el primer caso, los tumores son positivos para el RE y negativos para la proteína HER2 y al menos deben presentar una de las siguientes características: Ki67 $\geq 20\%$, RP negativo o $< 20\%$, y, si está disponible, un resultado de alto riesgo en una plataforma de expresión genómica. Por tanto, son tumores que tienen un fenotipo más agresivo, mayor grado histológico, índice proliferativo y peor pronóstico con mayor tasa de recurrencia y menor supervivencia tras una recaída en comparación con el subtipo luminal A.⁸ En el segundo caso, los tumores se caracterizan por tener positividad tanto de RE como de HER2 con cualquier porcentaje de Ki 67 y/o de RP.⁵ Este subtipo de tumores luminal B HER2 positivos se puede incluir dentro de los tumores considerados HER2 positivos.

-*Triple negativo*: En este subtipo de CM los tumores se caracterizan por presentar negatividad a nivel de IHQ tanto de RE/RP como de la proteína HER2 e incluye un 10-15% de las pacientes diagnosticadas. Son tumores agresivos con alto índice mitótico y proliferativo con tendencia a la diseminación metastásica visceral, incluyendo como en los tumores HER2 positivos la localización cerebral con frecuencia, características que le confieren mal pronóstico. Puede encontrarse una discordancia de un 20-30% entre los tumores triples negativos y el subtipo intrínseco *basal-like* con el que se correlaciona a nivel IHQ.⁹

-*HER2 positivo*: En este subtipo que comprende aproximadamente un 15-20% de los CM, se incluyen todos los tumores que presentan positividad para la proteína HER2 por IHQ y/o técnicas de hibridación in situ (ISH) siguiendo los criterios de las guías de la Asociación Americana de Oncología Clínica y de Patólogos Americanos (ASCO/CAP).¹⁰ Además, alrededor del 50% pueden presentar expresión de receptores hormonales, el resto de tumores con ausencia de expresión se consideran como tumores de mama HER2 positivos no luminales.¹¹ En general, hay una correlación entre la IHQ/ISH con el subtipo intrínseco a nivel de expresión génica denominado *HER2 enriched* de un 70% aproximadamente, ya que hasta un 30% de pacientes con este subtipo pueden no tener positividad IHQ de la proteína HER2 en la membrana de las células tumorales.³ Estos tumores tienen un comportamiento agresivo con coeficientes de proliferación de ki67 habitualmente elevados, tendencia a metástasis viscerales incluyendo la localización cerebral, baja expresión de RE/RP con resistencia a terapias endocrinas y sensibilidad a terapias específicas contras HER2.¹²

1.2. EL CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO

Entre el 15-20% de todos los cánceres de mama tienen amplificación del gen *ERBB2* o sobreexpresión del receptor de factor crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), un receptor de tirosina quinasa (TK) transmembrana. La proteína HER 2 tiene implicación en el crecimiento y la diferenciación celular. El receptor HER2 está codificado por el protooncogén *ERBB2* o HER2/neu que se encuentra localizado en el cromosoma 17q21 y fue descrito en 1984 por Schechter et al.¹³ La amplificación de este receptor fue descrita en una línea celular de CM por primera vez en 1985 por King et al.¹⁴ En 1987 Slamon et al. investigaron las alteraciones de este gen en 189 cánceres primarios de pacientes. Observaron que el gen HER2/neu estaba amplificado entre 2 y más de 20 veces en el 30% de los tumores analizados. La amplificación del gen fue un factor pronóstico predictivo independiente con mayor significación que la mayoría de los factores pronósticos conocidos, incluido el estado de los receptores hormonales en el CM con ganglios linfáticos positivos.¹⁵ Posteriormente sucesivas investigaciones validaron el potencial oncogénico de HER2 que se puso de manifiesto en los inicios de la ingeniería genética de ratones, cuando varios modelos de tumorigénesis mamaria inducida por HER2 mostraron una biología de la enfermedad agresiva y metastásica.¹⁶ Se demostró que la activación de HER2 es necesaria a lo largo de todo el proceso de la enfermedad, desde el inicio hasta la enfermedad metastásica. Este hecho, ilustra muy bien el concepto de adicción oncogénica y el potencial de este oncogén como diana para el tratamiento del cáncer, ya que las metástasis retrocedían rápida y completamente tras la supresión de la expresión de HER2. Sin embargo, la mayoría de los animales cuyos

tumores habían respondido a la supresión de HER2 acababan desarrollando nuevas metástasis que progresaban independiente de la amplificación del gen.¹⁷ Todos estos descubrimientos realizados a finales de la década de 1980 coincidieron con el desarrollo de la tecnología para generar anticuerpos monoclonales y humanizarlos para su uso como agentes terapéuticos favoreciendo que HER2 fuera una de las primeras dianas exploradas por esta novedosa tecnología.¹⁸ Así, trastuzumab, el primer anticuerpo monoclonal (mAb) anti-HER2, entró en la investigación clínica en 1992. Inicialmente se estudió en pacientes con cáncer de mama metastásico (CMM) con HER2 amplificado, dando lugar a su aprobación tras un estudio de fase 3. Posteriormente se siguieron estudios pivotaes en estadios precoces, estableciendo el papel de los mAb en el tratamiento dirigido del cáncer.¹⁹⁻²¹ En la década de 1990, se desarrollaron otros mAbs guiados por la estructura del receptor, como es el caso de pertuzumab, que permitía interrumpir la dimerización de HER2 de forma más eficaz, con beneficios adicionales de bloqueo de la señalización, que fueron demostrados en ensayos clínicos.^{22,23} A finales de la década de 1990, evolucionaron las tecnologías para conjugar estos mAbs con agentes citotóxicos mejorando la química de los enlaces. Así se alcanzó el desarrollo del primer conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) aldo-trastuzumab emtansina (T-DM1).²⁴ Mientras que trastuzumab o pertuzumab mostraron eficacia limitada como agentes únicos, incrementada en combinación con quimioterápicos, T-DM1 resultó ser eficaz en monoterapia con un perfil de toxicidad más favorable.²⁵ Este avance impulsó los esfuerzos por seguir explorando los ADC, lo que condujo al desarrollo de trastuzumab deruxtecan (DS-8201 o T-DXd) que ha demostrado una eficacia sin precedentes en el CMM HER2 positivo.²⁶⁻²⁸ Otra estrategia diferente a la del bloqueo del receptor HER2 por anticuerpos, es mediante la inhibición de la señalización mediante inhibidores tirosina quinasa (TKIs). Estos TKIs tienen actividad modesta en monoterapia y se han desarrollado en combinación con quimioterapia y con mAb anti-HER2. Lapatinib, un TKI paninhibidor reversible de la familia de receptores HER fue el primero en demostrar actividad clínica en la población de pacientes con enfermedad avanzada HER2 positiva.²⁹ Posteriormente, se sintetizaron TKIs con acción irreversible de receptores de la familia HER, siendo destacable neratinib.³⁰ Más recientemente se ha desarrollado tucatinib, un TKI reversible con mayor selectividad para HER2 con interesante actividad clínica.³¹

1.3. FAMILIA DE RECEPTORES ErbB/HER

HER2/ErbB2 es un receptor de membrana con actividad tirosina quinasa (TK), miembro de una familia de cuatro receptores codificados por los genes de la familia HER/ErbB: receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o HER1), HER2, HER3 y HER4 (figura 1).³² Estos receptores son fundamentales para el desarrollo celular normal, pero su desregulación puede resultar en proliferación y supervivencia celular descontroladas, contribuyendo al desarrollo del cáncer.³³

Los receptores miembros de la familia HER/ErbB constan de un dominio extracelular, los dominios I-IV, y un dominio TK intracelular con una larga cola C-terminal. Los dominios extracelular e intracelular están conectados por una hélice transmembrana y un dominio yuxta membrana.³⁴ Las interacciones entre estos receptores son complejas, pudiéndose producir en presencia o ausencia de ligandos extracelulares, dando lugar a la activación de la cascada de señalización. Se activan las vías de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K/AKT/mTOR), la de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la

vía de señalización celular JAK/STAT que involucra las quinasas Janus (JAK) y los transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT).

Los péptidos de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) se unen a los receptores HER y, en función de su especificidad, se dividen en tres grupos. El primer grupo incluye EGF, el factor de crecimiento transformador alfa (TGF- α), la anfiregulina (AR) y el epigen (EPG), que se unen específicamente al EGFR. El segundo grupo incluye la betacelulina (BTC), el EGF de unión a heparina (HB-EGF) y la epiregulina (EPR), que presentan una especificidad dual, uniéndose tanto al EGFR como al HER4. El tercer grupo, las neurogulinas (NRG), forman dos subgrupos en función de su capacidad para unirse a HER3 y HER4 (NRG-1 y NRG-2) o sólo a HER4 (NRG-3 y NRG-4).³⁵

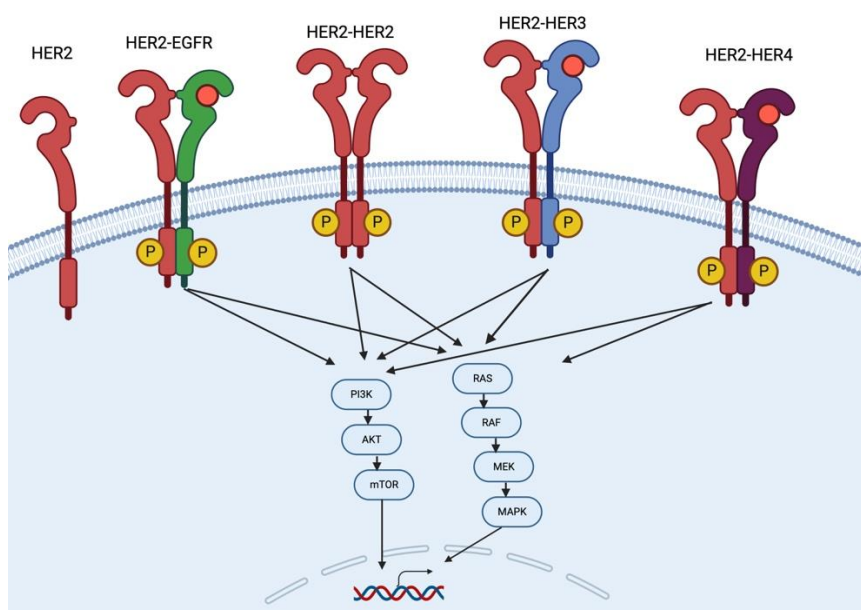


Figura 1. Los receptores ErbB/HER y vías de señalización. Hay cuatro miembros de la familia ErbB de RTK, EGFR, ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). Tras la unión del ligando, los receptores experimentan un cambio conformacional que permite la formación de homodímeros y heterodímeros. A continuación, los receptores se fosforilan en residuos de tirosina dentro de su dominio cinasa citoplasmático, iniciando la señalización por las vías PI3K/AKT/mTOR y RAS/RAF/MEK/MAPK. Estas vías participan en el crecimiento, diferenciación y supervivencia celular.³⁶ Figura creada en <https://BioRender.com>

La unión del ligando inicia la señalización provocando la formación específica de homodímeros o heterodímeros de los receptores que da lugar a la activación del dominio citoplasmático de la quinasa que fosforila las tirosinas en la región terminal intracelular de cada receptor. Cabe destacar que HER3 tiene actividad quinasa deficiente y solo se activa al dimerizarse con otro receptor. Además, una peculiaridad de HER2 es que no se une a ninguno de los ligandos Erb. Sin embargo, se activa a través de la heterodimerización con los otros receptores unidos al ligando.³⁶ De esta manera, las interacciones entre esta familia de proteínas de la superficie celular están muy interrelacionadas, formando una compleja red de señalización.³⁷ Así, la unión del ligando puede provocar una fosforilación cruzada de otros receptores. De este modo, se pueden formar a mayor escala agrupaciones de receptores homo y heteroméricos.³⁸ Sin embargo, los dominios extracelulares de los receptores también presentan características moleculares que permiten la asociación entre ellos independiente del ligando pudiendo asimismo dar lugar a la activación del receptor.^{39,40} Finalmente, una vez que se activa el receptor, se inducen las vías de señalización metabólica previamente

mencionadas, principalmente PI3K/AKT/mTOR, pero también otras como MAPK y JAK/STAT.³⁶ Las mutaciones o amplificaciones de los genes de la familia ErbB, pueden inducir una señalización aberrante que provoca un aumento de la homodimerización o heterodimerización de estos receptores. De esta manera, se conduce a una actividad quinasas constitutivamente activada, con el consiguiente incremento en las vías de señalización que favorece el desarrollo y proliferación de las células tumorales.³⁶

1.4. DETERMINACIÓN DE HER2

La correcta determinación de HER2 tiene un importante valor clínico, ya que es un biomarcador crucial para valorar el potencial beneficio de las terapias anti-HER2. El estudio de adyuvancia NRG B-47 confirmó la falta de beneficio de trastuzumab en pacientes cuyos tumores carecen de amplificación génica y presentan una inmunohistoquímica 1+ o 2+ para HER2.⁴¹ En el caso de pacientes con CM avanzado el desarrollo de terapias de nueva generación, en particular ADCs contra HER2, está cambiando este paradigma. Actualmente hay terapias con actividad clínicamente relevante en pacientes que siendo consideradas HER2 negativas, presentan alguna expresión de la proteína en sus células tumorales. Sin embargo, las pacientes cuyos tumores son HER2 positivos tienen más probabilidad de presentar un mayor beneficio a estas terapias que las HER2 negativas.⁴²

1.4.1. Métodos standard

1.4.1.1. IHQ/ISH

Los métodos validados para la determinación de la proteína del receptor del factor de crecimiento 2 (HER2) son la inmunohistoquímica (IHQ) y la hibridación in situ (ISH). Su valoración se basa en las recomendaciones de las guías ASCO/CAP más recientes actualizadas y publicadas en los años 2018 y 2023 respectivamente.^{10,43}

Las guías recomiendan que en todas las pacientes con diagnóstico reciente de CM debe realizarse un test para la evaluación de HER2. Las pacientes que desarrollen una enfermedad metastásica deberán someterse a una determinación de HER2 en una zona metastásica, si disponen de una muestra de tejido.⁴³

El algoritmo óptimo para la determinación de HER2 define los casos en que se debe reportar un resultado positivo o negativo para HER2. Se establece mediante el estudio del componente invasivo de una muestra de CM. Este se debe apreciar fácilmente utilizando un objetivo de baja potencia y se observa dentro de una población celular invasora homogénea y contigua. Para hacer el análisis se debe utilizar un test validado (figura 2):

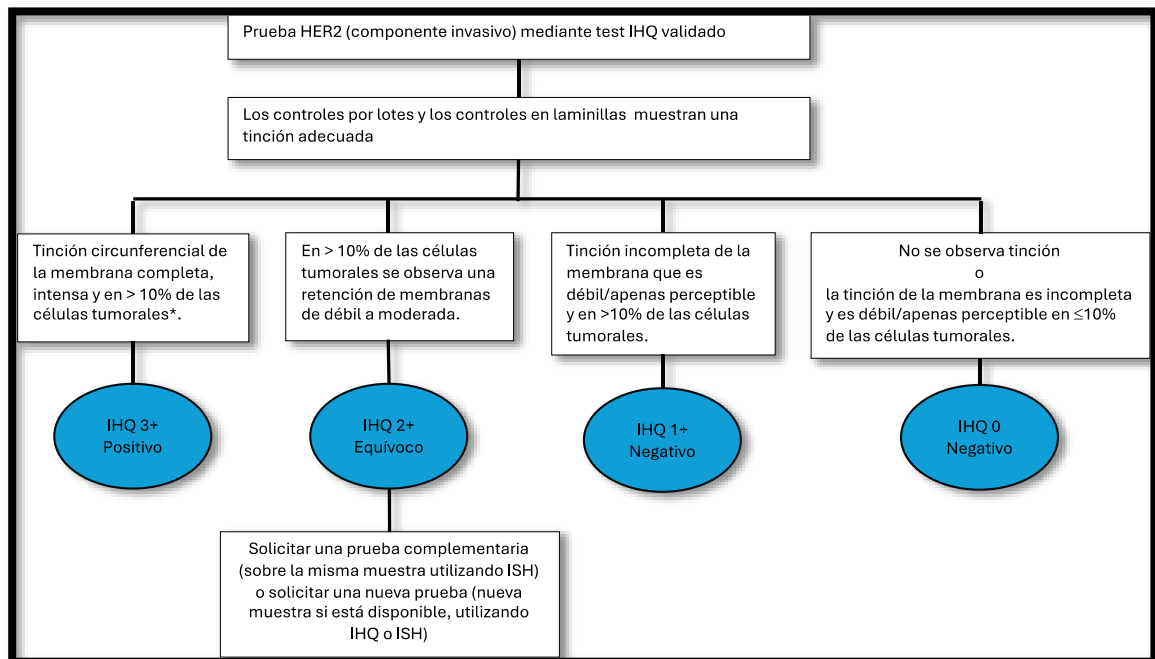


Figura 2. Algoritmo para la evaluación de la expresión de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) mediante inmunohistoquímica. Representación del algoritmo para la evaluación de la expresión de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) mediante inmunohistoquímica (IHC) del componente invasivo de una muestra de cáncer de mama (*) Se aprecia fácilmente utilizando un objetivo de baja potencia y se observa dentro de una población celular invasora homogénea y contigua. Adaptada de referencia.43

- El resultado de HER2 es positivo en los casos en que la IHQ es 3+ en > 10% de las células tumorales, considerando que está basada en la tinción circunferencial de la membrana que es completa e intensa.

- El resultado de HER2 se considera equívoco si el resultado por IHQ es 2+, definido por una tinción de membrana completa de débil a moderada observada en > 10% de las células tumorales. Se debe hacer test de ISH, con la recomendación de usar preferencialmente la hibridación basada en doble sonda en lugar de con sonda simple.

- Se considera ISH positiva con un test de sonda simple:

Número medio de copias de HER2 con una sonda simple ≥ 6.0 señales/célula

- Se considera ISH positiva con un test de doble señal del gen HER2, es decir de doble sonda según el algoritmo correspondiente para la evaluación de la amplificación de HER2 mediante un test de ISH del componente invasivo de una muestra de CM. Al comunicar los resultados finales se asume que no hay discordancia histopatológica aparente observada por el patólogo. Se establecen 5 posibles grupos (figura 3):

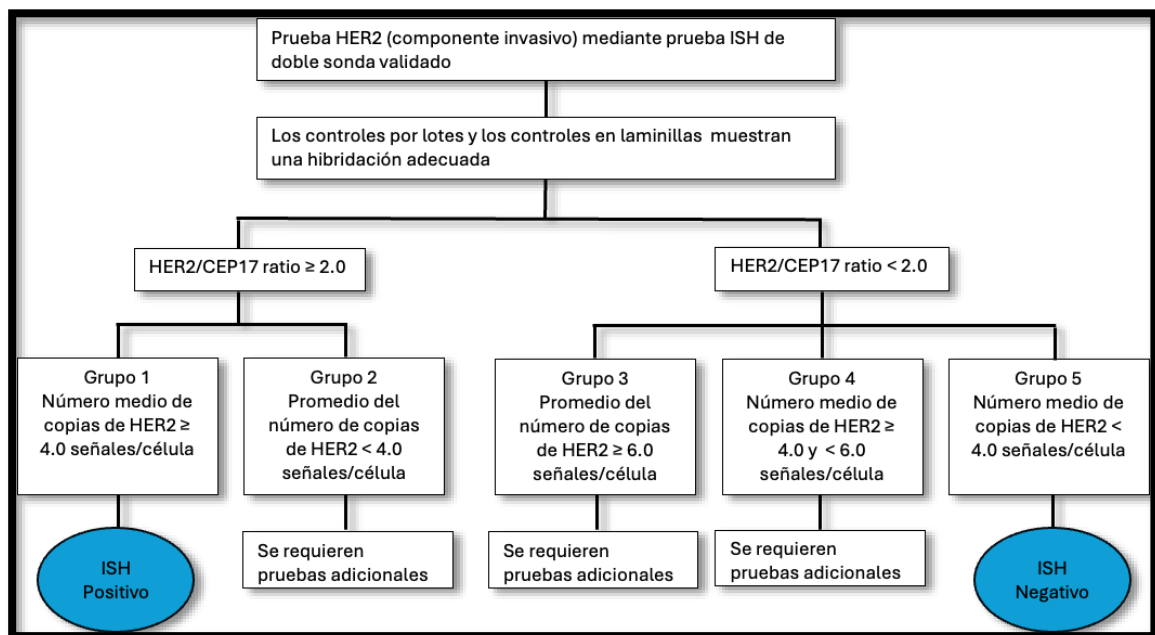


Figura 3. Algoritmo para la evaluación de la amplificación del gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) mediante un test de hibridación in situ (ISH) del componente invasivo de una muestra de cáncer de mama utilizando un test de doble señal (gen HER2) (ISH de doble sonda). Representación del algoritmo para la evaluación de la amplificación del gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) mediante un test de hibridación in situ (ISH) del componente invasivo de una muestra de cáncer de mama utilizando un test de doble señal (gen HER2) (ISH de doble sonda). Nota: Los resultados finales comunicados asumen que no hay discordancia histopatológica aparente observada por el patólogo. En lo que respecta a los grupos 2, 3 y 4, si la institución o el laboratorio que realiza la prueba ISH aún no la ha evaluado, la prueba de inmunohistoquímica (IHC) para HER2 debe realizarse utilizando secciones de la misma muestra de tejido utilizada para el ISH, y los portaobjetos tanto del ISH como de la IHC deben revisarse conjuntamente para orientar la selección de las áreas que deben puntuarse mediante ISH (las consideraciones prácticas locales dictarán el mejor procedimiento para realizar esta evaluación concomitante). CEP17, sonda de enumeración cromosómica 17. Adaptada de referencia⁴³

Grupo 1: Ratio HER2/CEP17 con doble sonda de ≥ 2.0 ; con un número medio de copias de HER2 de ≥ 4.0 señales/célula. Se considera como ISH positivo.

Grupo 2: Ratio HER2/CEP17 de doble sonda de ≥ 2.0 ; con un número medio de copias de HER2 < 4.0 .

En este caso se deben hacer pruebas adicionales para determinar la positividad. Se debe testar la IHQ para HER2 utilizando secciones de la misma muestra de tejido utilizada para determinar el ISH y revisar en conjunto las laminillas de IHQ e ISH para guiar la selección de las áreas en las que se determina el ISH:

- Si son áreas de IHQ 3+ se considera un resultado positivo.
- Si el resultado es IHQ 2+, se recomienda que otro observador determine el ISH.

Si el resultado se mantiene con una media de < 4.0 señales HER2/célula y el cociente HER2/CEP17 es de ≥ 2.0 , el diagnóstico final será HER2 negativo con un comentario en el informe de AP. Si hay cambios en la categorización del ISH por el segundo observador, los resultados se decidirán según los procedimientos internos del laboratorio para definir la categoría final.

- Si el resultado de la IHQ es 0 o 1+, el diagnóstico final se considera HER2 negativo con un comentario en el informe de AP. El comentario recomendado por el panel de expertos es: "La evidencia es limitada en cuanto a la eficacia de la terapia dirigida a HER2 en el pequeño subgrupo de casos con un cociente HER2/CEP17 de ≥ 2.0

y un número medio de copias de HER2 de < 4.0 por célula. En la primera generación de ensayos de trastuzumab adyuvante, las pacientes de este subgrupo que fueron asignadas aleatoriamente al brazo de trastuzumab no parecieron obtener una mejora de la supervivencia libre de enfermedad o global, pero hubo muy pocos casos como para extraer conclusiones definitivas. Si el resultado de la IHC no es 3+ positivo, se recomienda que la muestra se considere HER2 negativa debido al bajo número de copias de HER2 mediante ISH y a la ausencia de sobreexpresión de la proteína".⁴³

Grupo 3: Ratio HER2/CEP17 de doble sonda de < 2.0 con un número medio de copias HER2 de ≥ 6.0 señales/célula.

En este caso se deben hacer pruebas adicionales para determinar la positividad como en el grupo 2. Se debe testar la IHQ para HER2 utilizando secciones de la misma muestra de tejido utilizada para determinar el ISH y revisar en conjunto las laminillas de IHQ e ISH para guiar la selección de las áreas en las que se determina el ISH:

- Si el resultado de la IHQ es 3+ se considera un resultado HER2 positivo.
- Si el resultado es IHQ 2+, se recomienda que otro observador determine el ISH.

Si la relación HER2/CEP17 se mantiene en < 2.0 con ≥ 6.0 señales HER2/célula, el diagnóstico es HER2 positivo. Si hay cambios en la categorización del ISH por el segundo observador, los resultados se decidirán según los procedimientos internos del laboratorio para definir la categoría final.

- Si el resultado de la IHQ es 0 o 1+, el diagnóstico final se considera HER2 negativo con un comentario en el informe de AP. El comentario recomendado por el panel de expertos es: "No hay datos suficientes sobre la eficacia de la terapia dirigida a HER2 en casos con un cociente HER2 de < 2.0 en ausencia de sobreexpresión de la proteína, porque estas pacientes no fueron elegibles para la primera generación de ensayos clínicos adyuvantes con trastuzumab. Cuando los resultados de IHC concurrentes son negativos (0 o 1+), se recomienda que la muestra se considere HER2 negativa".⁴³

Grupo 4: Ratio HER2/CEP17 de doble sonda de < 2.0 con un número medio de copias HER2 ≥ 4.0 y < 6.0 señales.

En este caso el diagnóstico definitivo se basará en pruebas adicionales. Se debe testar la IHQ para HER2 utilizando secciones de la misma muestra de tejido utilizada para determinar el ISH y revisar en conjunto las laminillas de IHQ e ISH para guiar la selección de las áreas en las que se determina el ISH:

- Si el resultado de la IHQ es 3+ se considera un resultado HER2 positivo.
- Si el resultado es IHQ 2+, se recomienda que otro observador determine el ISH.

Si la relación HER2/CEP17 es < 2.0 con ≥ 4.0 y < 6.0 señales HER2/célula, el diagnóstico es HER2 negativo con un comentario en el informe de AP. Si hay cambios en la categorización del ISH por el segundo observador, los resultados se decidirán según los procedimientos internos del laboratorio para definir la categoría final.

- Si el resultado de la IHQ es 0 o 1+, el diagnóstico final se considera HER2 negativo con un comentario en el informe de AP. El comentario recomendado por el panel de expertos es: "No está claro si las pacientes con una media de ≥ 4.0 y < 6.0 señales HER2 por célula y un cociente HER2/CEP17 < 2.0 se benefician de la terapia dirigida a HER2 en ausencia de sobreexpresión proteica (IHC 3+). Si el resultado de la prueba de la muestra se aproxima al umbral del cociente ISH para un resultado positivo,

existe una mayor probabilidad de que la repetición de la prueba produzca resultados diferentes por mera casualidad. Por lo tanto, cuando los resultados de IHC no son 3+ positivos, se recomienda que la muestra se considere HER2 negativa sin pruebas adicionales en la misma muestra".⁴³

Grupo 5: Ratio HER2/CEP17 de doble sonda de < 2.0 con un número medio de copias HER2 < 4.0. Se considera un resultado de ISH negativo.

El resultado de HER2 se considera negativo:

Si la IHQ es 1+, considerada por la tinción incompleta de la membrana que es débil/apenas perceptible en > 10% de las células tumorales.

Si la IHQ es 0, si no se observa tinción o la tinción de la membrana es incompleta y débil/apenas perceptible en ≤ 10% de las células tumorales.

1.4.2. Métodos experimentales

1.4.2.1. PCR

Un estudio realizado con 224 muestras pareadas de tejido y plasma en pacientes con CM estadio III/IV evaluó la sensibilidad y especificidad de un test de amplificación de HER2 en biopsia líquida mediante PCR digital (dPCR). La sensibilidad entre la dPCR en plasma y la IHQ/ISH en muestras de tejido fue del 43,75%, la especificidad del 84,38% y la concordancia global fue del 66,96%. En las pacientes con CMM, la especificidad bajó al 67,86%. Se atribuyó, en parte, a la heterogeneidad inter e intratumoral, ya que había pacientes en las que la amplificación de HER2 era negativa en tejido y positiva en biopsia líquida. Además, la representación de muestras pareadas en pacientes con estadio IV era significativamente menor que en el estadio III. Los resultados de este estudio sugieren que en las pacientes metastásicas con pérdida de expresión de HER2 en biopsias de tejido a la progresión de un tratamiento, la biopsia líquida podría ayudar a captar la heterogeneidad de expresión en distintas localizaciones y así guiar en la estrategia terapéutica más adecuada para cada paciente.⁴⁴

Otro estudio integró la determinación de ARN de vesículas extracelulares (EV-RNA) y ADN libre circulante (cfDNA) para validar la positividad de HER2 en muestras de plasma de pacientes con CM, tanto HER2 positivo como negativo, utilizando secuenciación de nueva generación (NGS) y PCR digital en gotas (ddPCR). La combinación de ambas técnicas mejoró la sensibilidad en la detección de HER2 en plasma, alcanzando niveles comparables a los obtenidos en muestras de tejido pareadas de las mismas pacientes. Asimismo, mediante citometría de flujo, se logró detectar la presencia de la proteína HER2 en vesículas extracelulares de muestras consideradas HER2 positivas, apoyando la doble determinación de ARN y ADN en biopsia líquida para evaluar el estatus de HER2.⁴⁵

1.4.2.2. Técnicas convencionales sobre células circulantes tumorales (CTC)

Un estudio con 21 pacientes con CM en estadios localizados y metastásicos comparó la determinación del estatus de HER2 mediante las técnicas convencionales de IHQ e ISH en tejido y células circulantes tumorales (CTC). El análisis de las CTC mostró una concordancia del 100% en la sobreexpresión de HER2 en las 6 pacientes cuyas biopsias tumorales eran HER2 positivas. Además, identificó que 4 pacientes presentaban amplificación de HER2 por análisis de CTC pero no en la biopsia de tejido.⁴⁶ Otro estudio de 30 pacientes con CMM, se compararon dos plataformas para la detección y

aislamiento de CTC. Una de las plataformas aisló las CTCs con mayor eficiencia y alcanzó una concordancia del 93.3% en el resultado de HER2 con respecto a las muestras pareadas de tejido. Asimismo, el aumento en CTCs después de 12 semanas de tratamiento anti-HER2 se correlacionó con un empeoramiento de la supervivencia de las pacientes, mientras que una disminución de la proporción de CTCs HER2 positivas se relacionó con la respuesta a tratamiento.⁴⁷

1.4.2.3. Inmunofluorescencia cuantitativa

En un estudio con biopsias líquidas de 457 pacientes con CMM en progresión y 25 donantes sanos usados como controles, se analizó la amplificación de HER2 tanto en CTCs como en ctDNA. Se utilizó una plataforma de inmunofluorescencia cuantitativa para evaluar la expresión de la proteína HER2 en CTCs, la amplificación de ERBB2 en ADN de CTCs y las alteraciones en ctDNA en plasma. Se encontraron CTCs en el 98% de las muestras de pacientes, se pudo analizar el ADN de CTCs en el 58% y se detectaron alteraciones en ctDNA en el 42%, no hubo alteraciones en los controles. La detección de la amplificación de ERBB2 en ADN fue más sensible en las CTCs que en ctDNA. Combinando los datos de las 3 plataformas, el 16% de las muestras presentaban amplificación de *ERBB2*, el 52% presentaban sobreexpresión de HER2 y el 27% eran HER2 negativas.⁴⁸

1.4.2.4. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) se ha utilizado para cuantificar los niveles absolutos de la proteína HER2 en muestras de tejido de CM. Un estudio correlacionó los resultados de MS con las técnicas validadas de IHQ e ISH en muestras de parafina clasificadas como positivas, negativas o equívocas. La tasa de correlación fue del 94% con un punto de corte de niveles de proteína de 740 amol/μg. Además, se observó que las pacientes con niveles más altos de expresión de HER2 por MS (> 2200 amol/μg) tenían mayor probabilidad de beneficiarse de las terapias anti-HER2, como trastuzumab, alcanzando una mayor supervivencia en comparación con aquellas con niveles más bajos. Sin embargo, una limitación de este estudio es que estos hallazgos no fueron validados en una cohorte independiente.⁴⁹

Un estudio más reciente empleó la MS con un método específico denominado enriquecimiento por inmunoadfinidad acoplado a espectrometría de masas con monitorización de reacciones múltiples (inmuno-MRM-MS) para cuantificar HER2 en muestras de tejido de CM, tanto de biopsias en parafina como congeladas. Esta técnica demostró una alta precisión en la cuantificación de los niveles de proteína tanto para muestras de parafina como congeladas con una fuerte correlación con los resultados de IHQ e ISH. Adicionalmente, la inmuno-MRM-MS fue capaz de determinar HER2 por encima del límite inferior de cuantificación en todos los tumores analizados, lo que sugiere su eficacia en la evaluación de la expresión de la proteína incluso a niveles bajos.⁵⁰

Estos estudios destacan el potencial de la MS para una cuantificación más precisa de HER2 que pudiera ayudar a una mejor selección de las pacientes para terapias anti-HER2. Sin embargo, presenta la limitación de requerir una mayor validación y optimización para garantizar la consistencia y fiabilidad en diferentes entornos de laboratorio que permitiera su estandarización

1.4.2.5. NGS

Las técnicas de NGS tanto en tejido como en plasma están actualmente en validación para determinar la positividad de HER2. Hay diversos estudios que contribuyen a valorar su potencial aportación.

Un estudio comparó la determinación del estatus de HER2 a partir del número de copias del gen *ERBB2* por NGS con los métodos estándar en 90 muestras de tejido de CM y 19 de otros tumores. Se evaluaron 160 genes asociados al cáncer, encontrando una concordancia del 98.4% en la positividad de HER2 en CM con IHQ/ISH, utilizando un umbral de 3.2 copias de *ERBB2* por NGS. Sin embargo, no se logró establecer esta correlación para otros tipos de tumores, sugiriendo la diferencia de comportamiento de HER2 según la localización del tumor primario.⁵¹

En otro estudio, se evaluó la positividad de HER2 mediante NGS en muestras de parafina de 213 pacientes con CM y 39 con cáncer gastroesofágico, analizando 410 genes. Para determinar el estado de *ERBB2*, se utilizó una plataforma informática personalizada que comparó los resultados de NGS con los obtenidos por IHQ/ISH, alcanzando una alta concordancia del 98.4%.⁵²

La plataforma de biopsia líquida Guardant360 validó la determinación de la amplificación de *ERBB2* utilizando líneas celulares bien caracterizadas, incluyendo algunas de CM. Se extrajo ADN libre circulante (cfDNA) de los medios de cultivo de estas líneas celulares y se secuenció con resultados que mostraron excelente correlación y precisión en la valoración del número de copias de *ERBB2* sin falsos positivos. Dado que el cfDNA proviene principalmente de leucocitos y en menor medida de procedencia tumoral, una leve elevación de número de copias en plasma puede reflejar una mucho mayor elevación en el tumor. Se consideró por tanto que para el panel de Guardant360 un número de copias >2.2 en plasma podría ser clínicamente significativo suponiendo amplificación del gen.⁵³

Otro estudio valoró la correlación entre la sobreexpresión de HER2 determinada IHQ/ISH con la ganancia en número de copias de *ERBB2* valorada por NGS en tejido y plasma. Para definir el valor predictivo positivo (VPP) de NGS comparada con la IHQ/ISH, se analizaron retrospectivamente muestras de 176 pacientes con distintos tipos tumorales incluyendo CM. Se habían obtenido previamente resultados de algún test comercial de NGS realizado en tejido (FoundationOne o TempusX) o plasma (Guardant360), en los que se informaba de ganancia de número de copias de *ERBB2*. Para las muestras de CM, el VPP para determinar la positividad de HER2 comparado con las técnicas convencionales alcanzó hasta el 97% para tejido. En muestras de plasma, que no estaban pareadas en el tiempo en todos los casos con un rango de variación de 0 a 25 meses, bajó al 93%. Para el resto de los tumores, el VPP fue menor, del 76% para tejido y 44% para plasma. Dado que se partía de muestras de NGS en las que se había informado de una ganancia en número de copias, no se pudo calcular la sensibilidad o el valor predictivo negativo de esta técnica frente a la convencional.⁵⁴

En un estudio retrospectivo se compararon las alteraciones genómicas en ADN tumoral circulante (ctDNA) y ADN tumoral (tdNA) de 100 pacientes con CM localmente avanzado o metastásico de las que se disponía de esta información procedente de distintos tests comerciales de secuenciación tumoral. Específicamente se comparó la incidencia de mutaciones y cambios en número de copias que se hubieran analizado por ambos métodos en cada paciente. Se determinó la correlación con las 4 alteraciones genómicas más frecuentes, la mutación de *TP53* y de *PIK3CA*, así como las amplificaciones de *ERBB2*

y *EGFR* en 23 pacientes que presentaban alguna de estas alteraciones. En 7 pacientes, un 13% de la población del estudio, se identificó una amplificación de ctDNA que se confirmó en tejido por IHQ/ISH con una alta concordancia (Cohen's Kappa 0.77, $p=0.01$) entre ambos métodos de detección. Se consideró que un número de copias de *ERBB2* ≥ 2.2 en ctDNA era clínicamente significativo. Las mutaciones de *PIK3CA*, a menudo detectadas junto con la amplificación de HER2, se relacionaron con una menor SLP en estas pacientes. Una limitación del estudio, además de ser retrospectivo y el número limitado de pacientes HER2 positivas incluidas, es que las muestras de tejido y plasma no se extrajeron al mismo tiempo y por tanto los resultados obtenidos no eran contemporáneos de muestras pareadas.⁵⁵

En otra cohorte retrospectiva de 91 pacientes con CM avanzado, se valoró el uso combinado del análisis de CTCs y ctDNA mediante Guardant360 para predecir pronóstico. De las pacientes incluidas, 25 eran HER2 positivas. El estudio identificó 32 alteraciones en *ERBB2* incluyendo mutaciones y amplificaciones. De las 12 pacientes con amplificaciones detectadas por ctDNA, 2 pacientes cuya enfermedad había sido considerada HER2 negativa, fueron tratadas como HER2 positivas con beneficio clínico. Las limitaciones de este estudio para la población de pacientes HER2 positivas son comparables a las del estudio previo por ser retrospectivo, número limitado de pacientes y no disponer de muestras pareadas de tejido y plasma.⁵⁶

Un estudio de validación de la utilidad clínica de Guardant360 que incluyó 222 muestras de pacientes con CMM encontró un límite de detección del 95% para la determinación de alteraciones en el número de copias de HER2 de 2.24 copias. Se estableció una alta concordancia con la PCR digital en gotas (ddPCR) con un porcentaje de acuerdo positivo (PPA) del 90% y un porcentaje de acuerdo negativo (NPA) del 100% entre las dos técnicas. La precisión cuantitativa del número de copias de HER2 fue también muy alta, el coeficiente de correlación para las alteraciones de número de copias (CNA) fue de 0,943.⁵⁷

Un estudio fase 1 de zanidatamab, un anticuerpo biparatópico contra HER2, evaluó la concordancia entre FISH y Guardant360 para detectar la amplificación de HER2 en tejido y plasma en distintos tumores metastásicos HER2 positivos de pacientes incluidos en el ensayo. Determinaron HER2 en muestras de tejido por IHQ/FISH conforme a las guías ASCO/CAP y también mediante Guardant360 de muestras de plasma recogidas antes del inicio de primer ciclo y durante el tratamiento. Se observó una concordancia del 82% en las amplificaciones *ERBB2* entre las 2 técnicas. Se desarrolló un método exploratorio para ajustar la proporción de ADN tumoral en las muestras de Guardant utilizando la fracción alélica mutante máxima (maxVAF) como sustituto del contenido tumoral. La mayoría de los pacientes mostró una disminución en las copias de HER2 tras el tratamiento, correlacionando esta disminución con la respuesta al mismo, especialmente en aquellos con mayor reducción en la fracción de ctDNA (maxVAF).⁵⁸

1.4.2.6. Expresión ARNm

Otro método utilizado para medir HER2 es mediante la expresión del ARNm de *ERBB2*. El estatus de HER2 se ha estandarizado mediante el score de *ERBB2* del test HER2DX categorizando tres grupos de expresión, baja, media y alta por puntos de corte preestablecidos. Estos tres grupos se han podido correlacionar con variables clínicas pronósticas para predecir la respuesta a tratamientos anti-HER2 con impacto en la supervivencia de las pacientes, incluso con mayor significación en los análisis

multivariados que la determinación clásica por IHQ. En un estudio retrospectivo de 87 pacientes tratadas con T-DM1, se observó que la tasa de respuesta global aumentaba significativamente con mayores niveles de expresión de ERBB2. No hubo respuesta con expresión baja, fue del 29% en intermedia y del 56% en alta. Además, se evidenció una correlación estadísticamente significativa entre niveles de ARNm de ERBB2 y una mejor SLP y SG. Estos hallazgos fueron independientes de los niveles IHQ de HER2, receptor hormonal, edad, presencia de metástasis cerebrales y la línea de tratamiento.⁵⁹ Además, el score de HER2DX de ARNm de *ERBB2* se ha validado para predecir la positividad de HER2 en 3 categorías, positivo (correlación con HER2 positivo por IHQ/ISH), bajo (HER2 1+ y 2+ con ISH no amplificado) y negativo (IHQ 0). Se utilizaron 1149 muestras de tejido HER2 positivas y 120 HER2 negativas y la AUC de la curva ROC de la expresión de ARNm de *ERBB2* para predecir el estado HER2 POSITIVO fue de 0,98. Solamente un 0.8% de casos HER2 negativos fueron clasificados como ERBB2 positivos por HER2DX y un 9.9% de casos HER2 positivos como *ERBB2* negativos con una sensibilidad del 90.1% y una especificidad del 99.2%. Estos resultados se validaron en una cohorte independiente de tumores HER2 negativos para discernir entre HER2 bajo y HER 2 negativo con una precisión del 65.5%.⁶⁰

1.4.2.7. Secuenciación de la metilación del ADN del genoma

Hay un estudio que propone determinar el estatus de HER2 mediante la identificación de un grupo de marcadores de metilación del ADN en ctDNA. En primer lugar, se llevó a cabo la secuenciación de la metilación del ADN en todo el genoma en muestras de tejido (25 HER2 positivas y 35 HER2 negativas por IHQ e ISH) y plasma (32 HER2 positivas y 107 HER2 negativas) para identificar marcadores de metilación específicos para el estado HER2. De 36 marcadores de metilación de ADN específicos del estatus de HER2, finalmente escogieron los 7 con mayor correlación en los modelos de regresión logística para el modelo de detección de HER2 que estaba pendiente de validación en una cohorte prospectiva.⁶¹

De momento, todos estos métodos experimentales en desarrollo para determinar la positividad de HER2 no han sido validados en CM como alternativa a las técnicas convencionales de IHQ/ISH para decidir sobre el potencial beneficio e indicación para las terapias anti-HER2.

1.5. NGS EN BIOPSIA DE TEJIDO

En los últimos años, la tecnología de NGS sobre muestras de tejido tumoral ha ido incrementando la capacidad de análisis de variantes genómicas al mismo tiempo que ha ido reduciendo su coste haciéndola más asequible. Actualmente la NGS permite la secuenciación masiva en paralelo de millones de moléculas de ADN, con lo que el rendimiento de los datos ha aumentado drásticamente. Así, permite secuenciar paneles de genes, la secuenciación completa del exoma (WES) y del genoma (WGS). Por tanto, mediante NGS es posible detectar diversas alteraciones genómicas que incluyen mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones de bases, variaciones en el número de copias y reordenamientos estructurales. Los secuenciadores actuales tienen capacidad para análisis genómicos con una elevada profundidad de cobertura, que corresponde al número de lecturas en una posición determinada. Es posible así detectar mutaciones tumorales subclonales o mutaciones en muestras con baja celularidad tumoral llegando incluso a detectar mutaciones con una baja fracción alélica.⁶²

1.5.1. Identificación de diferencias mutacionales entre cáncer de mama primario y metastásico

El análisis de alteraciones genómicas en el tejido de biopsias de CM primario y de lesiones metastásicas de las mismas pacientes, ha permitido valorar las diferencias en el perfil mutacional entre ambos estadios de la enfermedad.

En este contexto, el ensayo AURORA, un estudio académico internacional y multicéntrico, analizó biopsias de tumores primarios y metastásicos tomadas antes de cualquier tratamiento sistémico de 1157 pacientes utilizando secuenciación selectiva de genes (TGS). Se evidenció que las lesiones metastásicas presentaban una mayor carga mutacional tumoral (TMB) que las primarias, lo que sugiere una mayor acumulación de mutaciones somáticas. Se identificó un enriquecimiento en alteraciones de genes drivers en las metastásicas, incluyendo mutaciones en *ESR1*, *PTEN*, *CDH1*, *PIK3CA* y *RB1*, así como amplificaciones de *MDM4* y *MYC*, y deleciones de *ARID1A*. Hasta en un 36% hubo un cambio de fenotipo, más frecuentemente de luminal A/B en el tumor primario a *HER2 enriched* en las lesiones metastásicas que se asociaba a mutaciones en *TP53* y/o *PIK3CA*.⁶³ Además, en el CMM con RH positivo, los mecanismos de resistencia adquirida a la terapia endocrina previa se han relacionado con *ESR1*, mutaciones de la vía *MAPK* y mutaciones de factores de transcripción como, por ejemplo, *ARID1A*. De hecho, las mayores diferencias entre tumor primario y lesión metastásica se encontraron en tumores RH positivo/HER2 negativo. En cambio, en el CM triple negativo y HER2 positivo, no se evidenciaron diferencias genómicas importantes en los contextos primario frente al avanzado.⁶⁴

1.5.2. Selección de pacientes para tratamientos dirigidos

Una de las principales utilidades del análisis genómico de los tumores mediante NGS es la selección de estrategias terapéuticas específicas dirigidas a las alteraciones encontradas.

Para armonizar la notificación e interpretación de datos genómicos clínicos relevantes, la Asociación Europea de Oncología Médica (ESMO) ha propuesto la escala para la accionabilidad de dianas moleculares (ESCAT). Esta escala clasifica las dianas moleculares según la evidencia que respalda su valor terapéutico:

- *Nivel I*: Las alteraciones tienen evidencia de que el tratamiento farmacológico asociado proporciona un beneficio claro en ensayos clínicos, considerándose tratamiento estándar.
- *Nivel II*: El tratamiento está relacionado con actividad antitumoral, pero la magnitud del beneficio es incierta, considerándose un tratamiento preferente en ensayos clínicos.
- *Nivel III*: Se trata de una diana hipotética donde el tratamiento podría mostrar actividad basada en datos de estudios en otros tipos de tumor con alteraciones similares; se sugiere discutir ensayos clínicos con el paciente.
- *Nivel IV*: Hay evidencia preclínica de accionabilidad, pero el tratamiento solo debe considerarse en ensayos clínicos iniciales.
- *Nivel V*: El tratamiento de la alteración puede asociarse a respuesta, pero sin beneficios clínicos significativos, recomendando evaluar ensayos clínicos con estrategias de combinación.
- *Nivel X*: Sin evidencia de accionabilidad de la variante, no debe considerarse en la decisión terapéutica.

Esta escala permite una mejor orientación en la toma de decisiones clínicas basadas en datos genómicos.⁶⁵

Un ejemplo de la búsqueda de alteraciones genómicas para terapias diana es el programa AURORA previamente mencionado. Este estudio utilizó NGS dirigida para analizar tejido de tumores primarios y metastásicos antes del tratamiento. Adicionalmente se recogieron muestras de sangre al inicio y durante el tratamiento o a la progresión de la enfermedad. Se realizaron análisis prospectivos en tiempo real del ADN en tejido y plasma, mientras que el análisis de ARN fue retrospectivo. En el programa un Consejo Asesor Molecular evaluaba y validaba los resultados de los perfiles moleculares. Estos informes se proporcionaron a los facultativos, pudiendo influir en las decisiones terapéuticas mediante la identificación de posibles ensayos clínicos para las pacientes en función de las alteraciones moleculares específicas encontradas. Se encontraron alteraciones susceptibles de terapias dirigidas en un 51% de las pacientes, aunque solamente el 7% la recibió. Las limitaciones para acceder a estas terapias incluyeron la necesidad de confirmar algunas variantes con tests validados, disponibilidad de tratamientos, decisiones del médico tratante y cuestiones de accesibilidad y reembolso en los países participantes. Una limitación adicional del estudio fue el uso de secuenciación NGS dirigida basada en amplicon, en lugar de la secuenciación completa del exoma, que es más común en la actualidad.⁶⁶

1.5.3. Identificación de predictores de resistencia

Una utilidad importante de la NGS es el estudio e identificación de alteraciones genómicas que permitan predecir la resistencia a terapias dirigidas. De este modo es posible identificar a las pacientes que no tendrán beneficio para valorar priorizar opciones de tratamiento alternativas.

En este sentido, un estudio analizó 733 muestras de tumores de mama de 664 pacientes con CMM HER2 positivo utilizó el panel MSK-IMPACT para realizar NGS. Este panel evalúa los exones codificantes de proteínas y regiones intrónicas y reguladoras de entre 341 y 505 genes asociados al cáncer, permitiendo la identificación de mutaciones somáticas, alteraciones en el número de copias y reordenamientos estructurales. Se correlacionaron las alteraciones genómicas con la SLP a terapias anti-HER2. Encontraron mutaciones de la vía PI3K/AKT incluyendo *PIK3CA* (30%), *PTEN* (2.6%), y *AKT1* (0.3%), así como mutaciones asociadas a la activación de la vía RAS-MAPK, incluyendo la pérdida del RAS-GAP NF1 (8%) y mutaciones activadoras de ERBB2 (7%). Las alteraciones en la vía PI3K fueron similares en tumores primarios y metastásicos, mientras que las de MAPK se encontraron con mayor frecuencia en tumores metastásicos. No se observó asociación entre las mutaciones de ambas vías, que tampoco resultaron mutuamente excluyentes. Las pacientes con mutaciones somáticas que promovían la activación de la vía de señalización MEK/ERK presentaban una menor SLP a terapias anti-HER2. Así mutaciones activadoras de ERBB2 o la pérdida de NF1 favorecían resistencia a TKIs como tucatinib y neratinib. Los tumores resistentes manifestaron una transición de dependencia de señalización a través de AKT a una dependencia de la vía MEK/ERK, mediante la activación de CDK2. El tratamiento con inhibidores de MEK/ERK fue capaz de revertir la resistencia. Además, en el 20% de las pacientes cuyos tumores no presentaron amplificación de ERBB2 por NGS, se observó una peor SLP al tratamiento anti-HER2.⁶⁷ En pacientes tratadas con T-DM1 que presentan mutaciones en genes implicados en las vías de PI3K/AKT y MAPK no hubo diferencia en eficacia en

comparación con aquellas cuyos tumores no las presentaban. Esta observación podría ayudar a priorizar los ADCs frente a otras terapias anti-HER2 como anticuerpos y TKIs, en pacientes cuyos tumores presentan alteraciones de estas vías de señalización.⁶⁸

1.6. NGS EN BIOPSIA LÍQUIDA

El concepto de biopsia líquida es amplio, ya que abarca el análisis de ácidos nucleicos circulantes (ADN y ARN), células tumorales, vesículas extracelulares y plaquetas relacionadas con el tumor que son liberadas por lesiones tumorales primarias o metastásicas al torrente sanguíneo u otros fluidos corporales. Así pues, la biopsia líquida representa un método sencillo y mínimamente invasivo (basado en la toma de muestras de sangre) que proporciona una visión molecular de toda la entidad tumoral. No obstante, la biopsia tumoral (tejido) sigue siendo el método estándar para el diagnóstico, la clasificación y las decisiones de tratamiento en pacientes con CM. Sin embargo, en ocasiones, estas biopsias de tejido no son contemporáneas pudiendo no reflejar cambios en el subtipo tumoral después de la progresión a terapias antineoplásicas que podrían encontrarse hasta en hasta el 40% de los tumores. De hecho, tras el diagnóstico de enfermedad metastásica metacrónica, las pacientes suelen someterse a una biopsia de tejido confirmatoria que incluye la reevaluación del estado de los receptores hormonales y HER2. Además, el CMM podría mostrar diferencias genómicas importantes en comparación con el tumor primario, como se ha evidenciado en estudios de secuenciación de CMM con RH positivo.⁶⁴

De entre todas las determinaciones posibles en biopsia líquida, la más extendida en la actualidad es el análisis genómico del ADN circulante extracelular (cfDNA) y en particular del ADN circulante tumoral (ctDNA) que corresponde a la fracción de cfDNA que libera el tumor a la sangre. Hay distintas plataformas disponibles que permiten realizar estos análisis en pacientes con cáncer avanzado para identificar alteraciones potencialmente accionables que pasan de las células tumorales a la circulación. Estas herramientas tienen la ventaja de captar un panorama global de la heterogeneidad tumoral. El análisis del ctDNA plasmático puede proporcionar información genómica procedente de múltiples lesiones de un mismo paciente, pero este nivel más amplio de información puede introducir una complejidad añadida en su interpretación.⁶⁹

1.6.1. Correlación entre biopsia líquida y de tejido tumoral

Es importante la validación y correlación de la biopsia líquida con la procedente de tejido tumoral. Se realizó un estudio que analizó biopsias sincrónicas de tejido y plasma de 28 pacientes con CMM utilizando el panel MiSeq Amplicon NGS de VHIO para evaluar la concordancia de alteraciones genómicas. Se observó concordancia total en el 57% de los casos. La concordancia fue del 100% en las 5 pacientes con tumores HER2 positivos y en 2 con triple negativo, mientras que solo alcanzó el 43% en tumores con perfil luminal. Se encontraron mutaciones potencialmente accionables en el 71% de las pacientes, con una concordancia de 78% para PIK3CA, 0% para AKT1, 100% para ERBB2, 44% para ESR1 y 0% para PTEN. En un 25% hubo falsos negativos en los que no se detectaron alteraciones presentes en tejido en plasma, más frecuentemente en pacientes cuyos tumores no tenían afectación visceral. En el análisis de ctDNA se encontraron 6 mutaciones en ESR1 que no se habían detectado en tejido, sugiriendo el conocido mecanismo de resistencia emergente adquirida a tratamiento endocrino.⁷⁰

Un estudio de validación sobre la utilidad clínica de la biopsia líquida para secuenciación de ctDNA utilizando el test Guardant360 incluyó 543 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico con resultados genómicos de muestras de tejido y plasma. También se reportó experiencia clínica de 10,593 muestras de diferentes tipos tumorales, incluyendo CM. La tecnología de secuenciación digital en plasma permitió la detección de variantes con una fracción alélica muy baja, desde el 0.02% al 0.04%. Los límites de detección del 95% para alteraciones del número de copias fueron de 2.24 para ERBB2 y 2.76 para CCND2, con una alta especificidad y VPP >98%. La validación clínica en más de 750 pacientes mostró alta precisión y especificidad, con un VPP entre 92% y 100%, y una tasa de éxito técnico >99.6% para detección de ctDNA. La accionabilidad de los resultados fue de 16.7% de pacientes con opciones de tratamiento aprobadas por la FDA y un 72% con recomendaciones de tratamiento o ensayo clínico. Respecto a las pacientes con CM se incluyeron 222 muestras con una alta tasa de detección de ctDNA del 86,8%. La precisión cuantitativa de la determinación de alteraciones genómicas entre la secuenciación digital por Guardant360 y la ddPCR de las fracciones de variantes alélicas (VAF) y para detectar alteraciones del número de copias (CNA) fue muy alta con unos coeficientes de correlación para variaciones de un nucleótido (SNV), indels y CNA de 0.994, 0.995 y 0,943, respectivamente. En las muestras de CM HER2 positivo, la precisión cuantitativa fue también muy alta alcanzando un coeficiente de correlación para las alteraciones de número de copias, (CNA) de 0.943.⁵⁷

En un análisis de 21.807 pacientes afectados de más de 50 tipos diferentes de cáncer metastásico, incluyendo 3.301 con CM, se caracterizó el panorama mutacional somático de 70 genes relacionados con cáncer mediante el análisis de secuenciación profunda de cfDNA con Guardant360. Este estudio se centra en la identificación de mutaciones conductoras (*driver*) y en la clonalidad del ctDNA, estimada a partir de la fracción de variantes alélicas (VAF) y detección de CNA. La VAF se normalizó según el número de copias, especialmente para tumores con mutaciones driver amplificadas, y se aplicaron umbrales específicos para evaluar la clonalidad (≥ 0.9) o subclonalidad (≤ 0.1) de las mutaciones. Se detectaron alteraciones somáticas del ctDNA en el 85% de los pacientes con todos los tipos de cáncer, incluido el de mama. La mitad de las alteraciones somáticas del ctDNA notificadas tenían una VAF de 0.41, lo que indica una presencia significativa de estas alteraciones en la población de pacientes con cáncer metastásico. En el CM, las mutaciones de *ERBB2* mostraron tendencia a ser mutuamente excluyentes con las de *PIK3CA*. Las mutaciones de resistencia más comúnmente encontradas en el CM fueron en *ESR1*.⁶⁹

Otro estudio comparó la selección de tratamiento basado en el genotipado de tumores de 252 pacientes con CMM mediante tejido o basado en muestras de plasma. Utilizaron una plataforma institucional de 91 genes para el análisis de tejido y Guardant360 con 73 genes para el análisis del ctDNA. En el análisis de plasma, el 92% de los pacientes presentó mutaciones detectables, el 78% tenía mutaciones accionables y el 34% recibió tratamiento específico. En contraste, entre las 118 pacientes que se sometieron a genotipado tisular, 76% tenían mutaciones detectables, 50% tenían mutaciones accionables y 11% recibieron tratamiento específico. En 30 en las que se habían realizado análisis en tejido y plasma, de forma simultánea en un 83.3%, se encontraron más mutaciones accionables en ctDNA que en tejido. En total, un 40% de estas pacientes recibió terapia basada en resultados genómicos, con una mayor proporción de tratamiento específico derivado del análisis de biopsia líquida (50%) en comparación con

tejido (36.8%). En las pacientes tratadas según resultados de ctDNA se asoció con una mejora estadísticamente significativa en la SG (HR 0.41) en un análisis multivariable. La concordancia en al menos una mutación entre ambas técnicas fue del 36.7%. Sin embargo, hubo escasa representación de pacientes HER2 positivas en la cohorte. Se analizaron 22 muestras de plasma, encontrando mutaciones en 19 de ellas, de las cuales 12 eran accionables. En la cohorte de tejido, se identificaron 10 pacientes HER2 positivas, pero solo una tenía una mutación accionable. De las 3 pacientes HER2 negativas que presentaron mutaciones en *ERBB2*, todas recibieron tratamiento anti-HER2.⁷¹

1.6.2. Selección de pacientes para tratamientos dirigidos

Una utilidad fundamental del análisis de alteraciones genómicas en plasma es la selección de pacientes que se pueden beneficiar de terapias dirigidas a las alteraciones específicas encontradas.

Un estudio sobre resultados genómicos de Guardant360 en plasma de una cohorte de 481 pacientes incluye 42 pacientes HER2 positivas, de las cuales 13 tenían extracciones seriadas de ctDNA. Se analiza la incidencia y espectro genómico de las alteraciones accionables detectadas en los genes *ESR1*, *PIK3CA*, *ERBB2*, *AKT1*, *PTEN* o *BRCA1/2* en el análisis de ctDNA seriado. El número total de alteraciones encontradas fue aumentado a medida que se hacían determinaciones en las cohortes luminal y triple negativa en probable relación con evolución clonal tumoral, mientras que en la HER2 positiva no hubo cambios significativos. A pesar de este aumento de alteraciones, la proporción de variantes accionables fue siendo menor en las subsecuentes muestras en comparación con la basal. En la cohorte de pacientes HER2 positivas las alteraciones accionables, sin tener en cuenta la amplificación de *ERBB2*, descendieron del 38% al 15%. El gen accionable más frecuentemente mutado en las primeras muestras de pacientes HER2 positivas fue *PIK3CA* en el 21%, *ERBB2* sin tener en cuenta amplificaciones en el 7%, *ESR1* en el 5% y *BRCA2*, *AKT1* y *PTEN* en el 2%.⁷²

Otro ejemplo lo representa el ensayo multicéntrico fase 2a plasmaMATCH. Se incluyeron 1051 pacientes con CMM cuyos perfiles mutacionales no habían sido previamente testados. En las pacientes cuyos tumores presentaban mutaciones específicas en los genes *ESR1*, *HER2*, *AKT1* y *PTEN* podían ser incluidas en 4 posibles cohortes con terapias específicas contra estas alteraciones. Para la búsqueda de mutaciones, inicialmente se utilizó ddPCR y posteriormente Guardant360. En las pacientes que entraron en las cohortes de tratamiento se hizo secuenciación retrospectiva de muestras de tejido tumoral. La concordancia entre plasma y tejido fue del 93%. Un 34.5% de las pacientes tenían mutaciones seleccionables para alguna de las cohortes y de ellas un 38% fue elegible. El estudio demostró que las pacientes con mutaciones en *ERBB2* y *AKT* tratadas con neratinib y capivasertib respectivamente, fueron las que obtuvieron un mayor beneficio.⁷³

1.6.3. Dinámica de ctDNA para predicción de respuesta a tratamiento

Es importante tener también en cuenta que otra utilidad de la biopsia líquida es la valoración de la dinámica de los niveles de ctDNA en muestras seriadas de pacientes para predecir la respuesta al tratamiento.

En pacientes con CMM RH positivo/HER2 negativo el estudio de la dinámica del ctDNA mediante un panel multigénico como Guardant360 puede identificar pacientes con una

respuesta desfavorable del ctDNA que pudieran ser tributarias de un cambio precoz en la estrategia de tratamiento.⁷⁴

Esta utilidad de la biopsia líquida también se ha valorado en el cáncer metastásico HER2 positivo para predecir la respuesta al tratamiento con trastuzumab y pertuzumab. Así, en un estudio de 58 pacientes incluidos en un ensayo clínico se escogieron mutaciones conocidas encontradas en tejido. Posteriormente se detectaban y cuantificaban estas mutaciones personalizadas en ctDNA al inicio del tratamiento y después de tres ciclos mediante FoundationOne Tracker. Un descenso del ctDNA >90% durante el tratamiento se asoció de manera significativa con una mayor supervivencia en comparación con un descenso <90% o cualquier aumento de este. Además, el aumento de ctDNA tras el ciclo 3 precedió a la progresión radiológica en una mediana de 1.3 meses. En pacientes con enfermedad estable un descenso >90% de ctDNA se asoció a una supervivencia significativamente más prolongada.⁷⁵

1.6.4. Identificación de predictores de resistencia

Otra utilidad de la biopsia líquida es la identificación de predictores de resistencia a determinados tratamientos. Un ejemplo en CMM HER2 positivo es un estudio para investigar mecanismos de resistencia dinámicos a tratamiento con T-DM1. Utilizan NGS y dPCR en muestras de tejido y plasma para rastrear las alteraciones moleculares que surgen con la presión del tratamiento. Se incluyeron 20 pacientes de las que analizaron 28 muestras de tejido tumoral y 337 de biopsia líquida. Se valoró la amplificación de HER2 tanto por NGS como dPCR encontrando una alta concordancia entre ambas. En las muestras de tejido se encontró amplificación de HER2 en el 64% de los tumores primarios y 42% de lesiones metastásicas extraídas antes del tratamiento con T-DM1. En plasma, se encontró amplificación en el 35% de las muestras previas al tratamiento. A la progresión se había reducido al 10%, sugiriendo un mecanismo de selección con reducción de las células HER2 positivas con el tratamiento a expensas de un aumento de las HER2 negativas. En este estudio, la mediana de SLP no fue significativamente diferente en los tumores con amplificación basal de HER2 en plasma frente a los que no la presentaban. Además, en pacientes en las cuales de manera precoz se hicieron indetectables mutaciones conocidas como p.e. las de *PIK3CA* y *ERBB2*, se asoció a respuestas más duraderas al tratamiento. De manera contraria, las alteraciones que se incrementaron más de 1.5 veces su fracción alélica se correlacionaron con resistencia y progresión a T-DM1. Probablemente debido al escaso número de pacientes incluidas, no hubo correlación significativa en la SLP con ninguna de las mutaciones y variantes genómicas detectadas de inicio ni en tejido ni plasma. Sin embargo, si se encontraron tendencias con algunas variantes como *PIK3CA* pH1047R que aumentó en todas las pacientes en la que estaba presente. Con otras variantes como las mutaciones de *ERBB2* ocurría lo contrario y disminuyó con el tratamiento. En el caso de otras variantes como *TP53*, los resultados fueron variables con aumentos y disminuciones en distintas pacientes. Así, en este estudio como en el previo, la disminución en la detección de variantes conocidas en la biopsia líquida se correlaciona con respuesta al tratamiento y el aumento de la fracción alélica y/o aparición de nuevas alteraciones con progresión.⁷⁶

1.7. TERAPIAS ANTI-HER2: MECANISMOS DE ACCIÓN Y RESISTENCIA

El receptor HER2 y su vía de señalización se han estudiado como dianas terapéuticas del CM siendo el bloqueo de esta vía a cualquiera de sus niveles extra o intracelular

objetivos prometedores para inhibir el crecimiento tumoral. La investigación sobre agentes dirigidos a HER2 ha sido una de las áreas más productivas de desarrollo de fármacos oncológicos (Figura 4).

En general, los agentes terapéuticos para bloquear selectivamente el receptor HER2 se puede clasificar en dos categorías potencialmente superpuestas según su mecanismo de acción. La primera incluye fármacos que utilizan la sobreexpresión HER2 para la identificación de células tumorales para administrar agentes oncolíticos a estas células de manera selectiva. Estos incluyen anticuerpos HER2 y sus derivados como los ADCs. La segunda categoría incluye medicamentos que tratan la enfermedad al inhibir a nivel intracelular la función de señalización oncogénica de HER2 mediante la utilización de los inhibidores de la tirosina quinasa (TKI), (Figura 4).⁷⁷

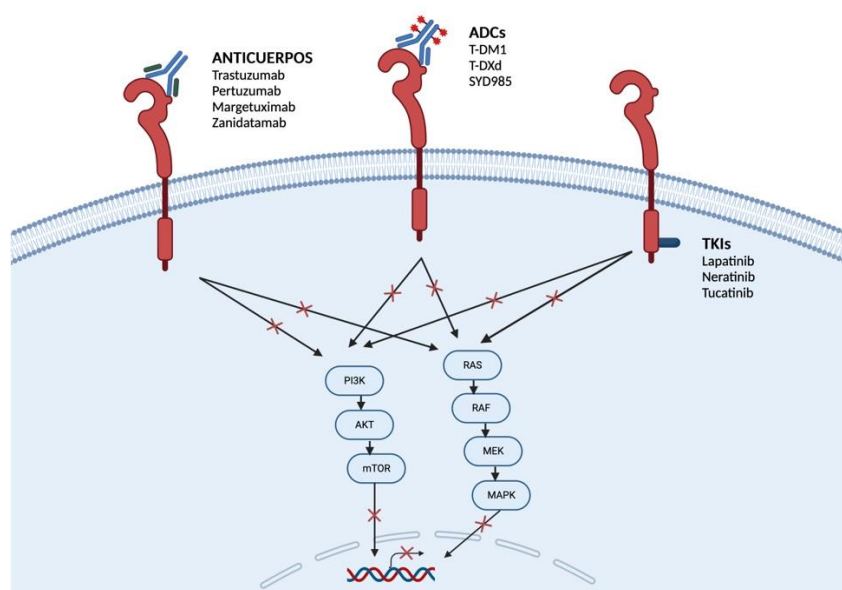


Figura 4. Esquema representando las terapias anti-HER2. Anticuerpos: trastuzumab, pertuzumab, margetuximab y zanidatamab. ADCs (Antibody Drug Conjugates, Conjugados anticuerpo-fármaco): T-DM1: trastuzumab emtansina, T-DXd: trastuzumab deruxtecan, SYD985: trastuzumab duocarmacina. TKIs (Inhibidores de tirosina quinasa): lapatinib, neratinib, tucatinib. Figura creada en <https://BioRender.com>.

1.7.1. Anticuerpos Monoclonales

1.7.1.1. Trastuzumab

Trastuzumab fue el primer anticuerpo monoclonal desarrollado para el tratamiento de la enfermedad HER2 positiva, siendo aprobado por la FDA en 1998. Este anticuerpo humanizado se diseñó para unirse a la subunidad IV de la porción extracelular del receptor HER2.⁷⁸

MECANISMOS DE ACCIÓN

Los mecanismos de acción que se le atribuyen al trastuzumab pueden ser derivados de su efecto tanto a nivel intracelular como extracelular.⁷⁹

Mecanismos de acción intracelulares:

-Alteración de la dimerización del receptor:

El principal mecanismo de acción atribuido a trastuzumab estaría mediado por la alteración de la dimerización del receptor HER2 y de su expresión en la superficie de la membrana celular. La actividad oncogénica de HER2 es mediada principalmente por homodímeros de HER2 y heterodímeros con HER1, HER3 o HER4, aunque también puede formar heterodímeros con otras quinasas, como el receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R).⁸⁰ Mientras que la actividad de los heterodímeros puede ser modulada por el ligando, los homodímeros muestran una activación constitutiva, ya que no hay ligandos conocidos que se unan al receptor HER2. El mecanismo exacto mediante el cual el trastuzumab modifica la señalización a través de HER2 no ha podido ser claramente dilucidado. Es aceptado que trastuzumab tiene un efecto limitado sobre la heterodimerización de HER2 inducida por ligando. Sin embargo, existe controversia sobre el mecanismo de disrupción de la señalización en la homo y heterodimerización independiente de ligando. Algunos estudios han mostrado que trastuzumab puede interrumpir complejos activados en líneas celulares HER2 positivas, mientras que otros no han encontrado tal evidencia.⁸¹⁻⁸³ Estas discrepancias podrían explicarse mediante simulaciones de dinámica molecular por modelización informática que analizan cómo trastuzumab afecta alostéricamente a los homo y heterodímeros de HER2. Se sugiere que trastuzumab actúa como un modulador, provocando cambios sutiles en la flexibilidad del dominio quinasa del receptor, funcionando como antagonista y agonista, pero sin disrupción completa del complejo. La unión de trastuzumab a HER2 induce un efecto alostérico tanto en el dominio TK como en el ectodominio. Según este modelo, trastuzumab bloquea la conformación receptora de HER2 sin impedir la conformación activadora, lo que imposibilita la completa inhibición del heterodímero EGFR-HER2. En el complejo HER2-HER3, donde HER2 actúa como receptor debido a la inactivación del dominio quinasa en HER3, la unión de trastuzumab hace que el complejo se vuelva inestable al impedir la conformación receptora de HER2.⁸⁴

-Bloqueo de la escisión del dominio extracelular de HER2:

La eficacia clínica de trastuzumab también se ha relacionado con el bloqueo de la escisión del dominio extracelular (DEC) de HER2. Se sabe que los DEC HER2 se pueden desprender del receptor mediante proteólisis, a partir de metaloproteinasas de escisión de HER2, como la ADAM10 y las metaloproteinasas de matriz, que están sobre expresadas en el microambiente tumoral, lo que puede dar lugar a la generación de la proteína HER2 truncada en su NH₂-terminal, denominada p95HER2.⁸⁵⁻⁸⁷ La p95HER2 se observa en el 20-50% de los tumores HER2 positivos, se caracteriza por tener una actividad quinasa constitutivamente activa, y su expresión elevada se asocia a peor pronóstico.^{88,89} Trastuzumab, pero no pertuzumab, que reconoce un epítipo distinto, es capaz de bloquear la escisión de HER2, probablemente debido al bloqueo estérico del sitio de escisión del receptor.⁸⁸ Además, en diversos estudios clínicos se ha observado una reducción del dominio extracelular de HER2 en muestras de suero de pacientes tratadas con trastuzumab.^{90,91}

-Regulación de la expresión de HER2 en la membrana celular:

A diferencia de otros miembros de su familia de receptores, HER2 resiste a la internalización y la degradación debido a la estabilidad que confiere la formación de

complejos de HER2 con Ezrin/NHERF1/PCMA2 en balsas lipídicas que contienen MAL2, formando protrusiones de membrana resistentes a la internalización.⁹²

A pesar de este mecanismo de acción de trastuzumab, el receptor HER2 se internaliza, ya sea de forma aislada o en complejo con trastuzumab. Este proceso es lento y la mayor parte del receptor se recicla rápidamente a la superficie celular a menos que esté densamente agrupado (reticulado). En condiciones de reticulación, que también se observa con HER3 pero no con EGFR (HER1), se favorece la endocitosis y el transporte lisosomal del complejo HER2-trastuzumab, lo que reduce la expresión del receptor en la membrana celular.⁹³ Sin embargo, existe debate sobre el efecto de trastuzumab en la regulación de la expresión de HER2, ya que algunos estudios sugieren una reducción, mientras que otros no confirman esta hipótesis.⁹⁴ Una posible explicación es que diferentes niveles de HER2 influyan en estos resultados condicionando la internalización y degradación dependiendo de la densidad de HER2 en la superficie celular. Las células con alta sobreexpresión de HER2 presentan un reciclaje más eficiente y menor reducción de niveles tras el tratamiento con trastuzumab, manteniendo altos niveles de anticuerpo en la membrana. Por el contrario, las células con baja expresión de HER2 experimentan una rápida eliminación del anticuerpo de la membrana y una reducción sustancial de los niveles de HER2, con reciclaje indetectable del receptor.⁹⁵

-Efectos sobre las vías de señalización del receptor HER2:

Otro mecanismo de acción atribuido a trastuzumab es su capacidad de atenuar y modificar la señalización de HER2. Se ha demostrado que trastuzumab suprime la señalización de HER2 en células de CM con amplificación de HER2 al bloquear las interacciones de la quinasa Src con HER2, reduciendo así la fosforilación y activación de Src-Y416.⁹⁶ Src es una proteína que aunque no es un receptor en sí mismo, interactúa con múltiples receptores TK como EGFR, HER2, MET, PDGFR, IGFR y FGFR, regulando procesos como proliferación, supervivencia, adhesión, invasión y migración celular. La reducción de la actividad Src se correlaciona con una menor fosforilación en tirosina y una mayor unión a la membrana de la fosfatasa PTEN, lo que provoca una rápida desfosforilación de AKT. Este mecanismo de trastuzumab está respaldado por estudios clínicos que demuestran que los tumores PTEN negativos no responden al trastuzumab, aunque no todos ellos han mostrado resultados concordantes.^{94,97} Aunque todavía es discutible, trastuzumab puede inhibir aún más la activación de AKT al impedir la fosforilación de HER3 mediada por HER2, eliminando así la unión de la subunidad p85 de PI3K, el ensamblaje de p85/p110 (p110 es la subunidad catalítica de PI3K) y la posterior fosforilación de AKT por PDK1 y mTORC2.⁹⁴

Además de la vía PI3K/AKT, el trastuzumab puede inhibir la vía MAPK que está mediada por el homodímero HER2 mediante la inactivación del adaptador SHC de la MAPK que es reclutado por HER2 para inducir la señalización a través de esta vía.⁹⁸ Sin embargo, persiste el debate sobre la efectividad de trastuzumab para inhibir significativamente la señalización de las vías activadas por HER2 en ciertos casos. En las células de tumores con una alta sobreexpresión de HER2, la activación del dominio TK HER2-HER3 podría ser independiente de la inhibición de las interacciones del dominio extracelular del receptor. En este caso, por tanto, el bloqueo del dominio extracelular por anticuerpos podría no ser capaz de bloquear la señalización.⁹⁹ No obstante, hay evidencia a favor del bloqueo directo de la señalización del receptor HER2 en las células tumorales que lo sobreexpresan que deriva en disminución de la proliferación tumoral.⁷⁹

-Detención del ciclo celular:

Se ha atribuido a trastuzumab el mecanismo de acción de alterar la fisiología celular de las células con sobreexpresión de HER2 mediante la detención del ciclo celular en la fase G1, impidiendo así la proliferación celular. Así, trastuzumab induce detención del ciclo celular en G1 en células HER2 positivas, a través de una rápida desfosforilación de HER2, con acumulación de p27Kip1, y la inactivación de los complejos ciclina-CDK2. Esto se correlaciona con la disminución de c-Myc, ciclinas D y la disociación de p27Kip1 de los complejos CDK4. La sobreexpresión de HER2 parece potenciar la actividad ciclina E-CDK2 mediante la regulación de proteínas que secuestran p27Kip1, desregulando la transición G1/S.¹⁰⁰ En este sentido, el estudio TransHERA mostró una interacción significativa entre los niveles de expresión de p27 por IHQ y la respuesta al trastuzumab adyuvante. Pacientes con baja expresión de p27 (<70% células tumorales p27-positivas) mostraron beneficio significativo con trastuzumab (HR 0.44), mientras que en pacientes con alta expresión de p27 no se observó beneficio (HR 0.97).¹⁰¹

Trastuzumab también influye en la regulación del ciclo celular mediante un aumento de la expresión de los microRNAs miR-26a y miR-30b, que a su vez disminuyen a la ciclina E2. Sobre todo, el incremento de miR-30b es capaz de inducir la parada del ciclo en G1 inhibiendo el crecimiento tumoral.¹⁰² La sobreexpresión de BAG-1, una chaperona frecuentemente encontrada en tumores HER2 positivos, se correlaciona con menor supervivencia. La combinación de trastuzumab e inhibidores de BAG-1 en líneas celulares con amplificación de HER2 atenuó la síntesis proteica, suprimió las vías ERK y AKT, e indujo la detención del ciclo celular en G1/S.¹⁰³

-Regulación de la apoptosis:

Las células con sobreexpresión de HER2 presentan adicionalmente desregulación en diversos mecanismos relacionados con la apoptosis celular tanto en las vías apoptóticas intrínsecas como extrínsecas, principalmente por activación de la vía PI3K/AKT. Así, la sobreexpresión de HER2 aumenta las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1. Adicionalmente, suprime la apoptosis mediada por p53 mediante el incremento de MDM2 por activación de AKT. Además, incrementa la expresión de survivina que conduce a la inhibición de la activación de caspasas y supresión de la respuesta a ligandos de muerte, especialmente TRAIL.¹⁰⁴ Trastuzumab además reduce los niveles de proteínas antiapoptóticas como Mcl-1.¹⁰⁵

La sobreexpresión de HER2 activa mecanismos de reparación del ADN en respuesta a agentes quimioterapéuticos como cisplatino y etopósido. La combinación de trastuzumab con estos agentes, o con radioterapia, inhibe la reparación del ADN, favoreciendo la apoptosis.^{106,107} Es bien conocida la interacción existente entre la vía de los estrógenos y la de HER2, habiéndose demostrado una sinergia en el bloqueo simultáneo de ambas vías con antiestrógenos y trastuzumab. Esta estrategia induce la apoptosis en modelos de CM tanto con sobreexpresión de HER2 como en ausencia de esta.¹⁰⁸

Mecanismos de acción extracelulares:

-Efecto sobre microambiente tumoral:

Trastuzumab también tiene efecto sobre el microambiente tumoral. La sobreexpresión de HER2 induce la liberación de neuregulina 1 (NRG1), factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1) y de factor de crecimiento dependiente de endotelio vascular (VEGF) que produce neovasos en el ambiente tumoral para favorecer la llegada de oxígeno y nutrientes al tumor. Sin embargo, la liberación de VEGF favorece la formación de una red vascular caótica que puede resultar en una selección de fenotipos celulares más agresivos y resistentes a tratamiento citotóxico. Mediante la supresión de la liberación de VEGF, trastuzumab mejora la perfusión.¹⁰⁹ Además puede bloquear otros mediadores de angiogénesis como Ang-1, PAI-1, y TGF- α .¹¹⁰

-Efectos sobre la respuesta inmune innata:

Además de los mecanismos de acción previamente descritos, trastuzumab tiene efectos sobre la respuesta inmune innata y adaptativa que le confieren su estructura de anticuerpo monoclonal humanizado. La fracción constante (Fc) con su región Fc γ permite su unión a distintos receptores Fc γ (Fc γ Rs) característicos de linfocitos B y T, natural killer (NK), células dendríticas, macrófagos y neutrófilos. El efecto de trastuzumab sobre estos receptores puede dar lugar a múltiples potenciales efectos inmunes con relevancia clínica incluyendo la ADCC y la citotoxicidad mediada por complemento.¹¹¹

La ADCC es un mecanismo de acción fundamental de trastuzumab. En la ADCC, el anticuerpo se une a las células tumorales y luego es captado por las células inmunes efectoras a través de sus receptores para IgG que produce una liberación dirigida de gránulos líticos o una inducción de la apoptosis mediada por receptores de muerte a través de la expresión del ligando Fas o TRAIL.¹¹² La ADCC puede estar mediada por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y NK. Se ha observado una mayor infiltración tumoral de NKs y macrófagos tras la exposición al tratamiento con trastuzumab.¹¹¹ Además, las pacientes con respuesta patológica completa tras la neoadyuvancia con paclitaxel y trastuzumab muestran una mayor activación de las células NK en la sangre periférica.¹¹³

Entre los receptores de Fc de IgG, los Fc γ R, se componen de tres clases distintas: Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, que pueden dividirse a su vez en Fc γ RIIa y Fc γ RIIb y Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb. El Fc γ RI muestra una gran afinidad por la IgG monomérica. En cambio, Fc γ RII y Fc γ RIII muestran afinidad menor, requiriendo complejos inmunes multiméricos. Algunas isoformas no desencadenan citotoxicidad, como Fc γ RIIIb, o inician señales inhibitorias, como Fc γ RIIb. Sin embargo, Fc γ RIIa y Fc γ RIIIa son Fc γ R activadores. Aunque la mayoría de las células inmunitarias coexpresan Fc γ R activadores e inhibidores, las células NK son únicas en el sentido de que expresan constitutivamente sólo el receptor activador de baja afinidad Fc γ RIIIa.¹¹⁴ Respecto a la afinidad de trastuzumab por los Fc γ Rs, podría tener especial interés el conocimiento de distintos polimorfismos de estos receptores, ya que pueden influir en la respuesta inmune asociada a la ADCC. Se sabe que el polimorfismo genómico correspondiente a la expresión del fenotipo de valina (V) o fenilalanina (F) en el aminoácido 158 del Fc γ RIIIa influye enormemente en la afinidad de la IgG1 por el receptor Fc γ . Así, las células efectoras inmunitarias con el alelo Fc γ RIIIa V tendrían mayor afinidad mediando la ADCC de variantes de IgG1 anti-HER2 mejor que las células que portan el alelo F que sería de baja afinidad.^{115,116} También se ha demostrado que el Fc γ RIIb inhibitor desempeña un papel en la acción del trastuzumab disminuyendo la ADCC.¹¹⁷ La relevancia clínica de estos hallazgos ha mostrado

resultados diferentes en el ámbito de pacientes con CM HER2 positivo. Estudios en pacientes con CMM HER2 positivo tratadas con trastuzumab y taxanos mostraron correlación entre polimorfismos FcγR y la respuesta al tratamiento. El genotipo FcγRIIIa-158 V/V se asoció con mejor tasa de respuesta objetiva (ORR) y SLP, al igual que el genotipo FcγRIIa-131 H/H. La combinación de ambos genotipos favorables se asoció independientemente con mejor ORR y SLP. Análisis de ADCC mostraron mayor citotoxicidad mediada por trastuzumab en PBMC con genotipos V/V y/o H/H, sugiriendo un rol importante de la ADCC mediada por FcγR en la eficacia clínica de trastuzumab.¹¹⁸ Otro estudio también valoró distintos polimorfismos asociados a FcγR en pacientes tratadas con quimioterapia y trastuzumab en el ámbito neoadyuvante y metastásico encontrando asociación del polimorfismo FcγR2A-131 H/H con incremento de la respuesta patológica completa y de la respuesta objetiva a trastuzumab en el CMM. Sin embargo, el genotipo FcγR3A-158 V/V no se correlacionó con la respuesta patológica, pero mostró una tendencia a correlacionarse con la respuesta objetiva.¹¹⁹ A diferencia de los estudios anteriores, no se encontró una correlación entre los distintos polimorfismos considerados de alta y baja afinidad del FcγR y la SLP en una cohorte de pacientes con CM precoz HER2 positivo tratadas con trastuzumab.¹²⁰ Esta hipótesis de la dependencia de la ADCC con la afinidad de trastuzumab por distintos polimorfismos de FcγR dio lugar al diseño y desarrollo clínico de margetuximab. Es un anticuerpo anti-HER2 que comparte la secuencia de su porción variable con trastuzumab, pero que ha sido modificado para optimizar la afinidad de la fracción constante buscando una mayor eficacia mediante la optimización de la ADCC.¹²¹

Recientemente se ha propuesto la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) por parte de los macrófagos como posible mecanismo de acción de trastuzumab. La mayor infiltración de macrófagos en el tumor se asocia a mayor eficacia de trastuzumab, mientras que su eliminación reduce la eficacia antitumoral. Trastuzumab activa la ADCP a través de FcγRIII.¹²² Además, la inhibición de CD47, que es un punto de control inmunitario innato de la ADCP, la potencia dando lugar a macrófagos hiperfagocíticos con una mejoría de las respuestas antitumorales.¹²³ Así, la combinación de magrolimab, un inhibidor de CD47 con trastuzumab, eliminó células tumorales HER2 positivas con mayor eficacia, incluso en aquellas que eran resistentes a la ADCC mediada por NKs. Existe otro proceso diferente a la ADCP, la trogocitosis, mediante el cual los macrófagos y otras células inmunes pueden dar muerte mediante una especie de mordisqueo e ingesta de material a células opsonizadas, es decir, marcadas por opsoninas para favorecer su reconocimiento y destrucción.¹²⁴ Este fenómeno se ha evidenciado asociado a trastuzumab, en células tumorales de CM con sobreexpresión de HER2 opsonizadas.¹²⁵ Así, se ha observado trogocitosis, donde macrófagos ingieren material de células opsonizadas con trastuzumab, transfiriendo HER2 a monocitos y células NK. Esta trogocitosis aumenta la expresión de CD107a en las células inmunes y se asocia a mayor probabilidad de respuesta completa patológica en pacientes con CM tratadas con trastuzumab.¹²⁶

Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 y, como tal, puede activar la vía clásica del complemento, lo que conduce a la generación local de mediadores inflamatorios que inducen la fagocitosis celular mediada por el complemento y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediada por el complejo de ataque de membrana. Se ha sugerido que este mecanismo de acción es más relevante en el doble bloqueo con la combinación con pertuzumab.¹²⁷

-Efectos sobre la respuesta inmune adquirida:

Además de los efectos descritos sobre la inmunidad innata, a trastuzumab también se le atribuyen mecanismos de acción mediados por la inmunidad adquirida, tanto a través de linfocitos T como B. En un estudio con 27 pacientes tratadas con trastuzumab y quimioterapia, se observó un aumento estadísticamente significativo en las respuestas humores anti HER2 con anticuerpos Igλ endógenos durante el tratamiento del 56% comparado con 29% antes del tratamiento. Asimismo, se detectaron respuestas de células T CD4 específicas de HER2. Las respuestas humores se correlacionaron con las respuestas objetivas al tratamiento.¹²⁸ En el ensayo NCCTG N9831, se analizó la generación de anticuerpos anti-HER2 en pacientes tratadas con diferentes regímenes de trastuzumab y quimioterapia o quimioterapia sola. Antes del tratamiento, los niveles de IgG anti-HER2 fueron similares en todos los grupos. Sin embargo, tras el tratamiento, los niveles aumentaron significativamente solo en los grupos que recibieron trastuzumab, correlacionándose con una mejor supervivencia libre de enfermedad (HR = 0.23; p = 0.04).¹²⁹ Se han obtenido resultados similares en otro estudio con pacientes tanto en contextos adyuvante como metastásico. Se confirmó la asociación entre el aumento de anticuerpos anti-HER2 tras tratamiento con quimioterapia y trastuzumab y una mejor SLP y SG. Además, este aumento se correlacionó con incrementos en anticuerpos contra CEA, IGFBP2 y p53, sugiriendo una respuesta inmune más amplia. Paradójicamente, pacientes con alta inmunidad preexistente contra HER2 mostraron peor pronóstico.¹³⁰ Este efecto vacunal de trastuzumab podría deberse a la presentación cruzada de HER2 unido a trastuzumab por células presentadoras de antígenos, o a la presentación directa vía complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I. Estudios con vacunas peptídicas de HER2 como la que presenta el epítipo E75 sugieren sinergia con trastuzumab. Posiblemente se deba a que trastuzumab facilita la captación de HER2 por células dendríticas mediada por FcR, incrementando la presentación cruzada del epítipo E75 y la expansión de células T citotóxicas específicas. Este mecanismo conecta la inmunidad innata y adaptativa, facilitando la activación de células T en presencia de la vacuna.¹³¹ Además, trastuzumab es capaz de activar las células T CD8+ mediante el aumento de los niveles del péptido HER2 unido al CMH de clase I en la superficie celular a través del aumento de la endocitosis y la degradación del proteasoma.¹³²

MECANISMOS DE RESISTENCIA

A pesar de los múltiples y variados mecanismos de acción atribuidos a trastuzumab, la mayoría de las pacientes presentan resistencia primaria o adaptativa al mismo, sobre todo en el ámbito metastásico cuyos mecanismos también pueden ser diferentes.

-Resistencia por hipoxia o mimetismo vascular (MV) (vascular mimicry):

Se ha demostrado que la alteración de la angiogénesis está implicada en la resistencia adquirida a trastuzumab. El mimetismo vascular es una estrategia identificada recientemente en la que las células tumorales pasan de un fenotipo epitelial a un fenotipo más vascular, lo que permite generar una red de canales capaz de transportar sangre y células tumorales. A diferencia de la angiogénesis, el MV es realizado por las

propias células cancerosas, favoreciendo la metástasis, la resistencia a terapias antiangiogénicas, y asociándose a un fenotipo más maligno en cánceres de mama triple negativos y HER2 positivos. Factores como la hipoxia, TGF β , TWIST1, EPHA2, VEGF, metaloproteinasas de matriz, y otros del microambiente tumoral, inducen la transformación a un fenotipo mesenquimal con alta expresión de marcadores de células madre.¹³³ Además, este fenotipo se caracteriza por la formación de tubos en Matrigel y la expresión de antígenos de células endoteliales como PAS, pero sin expresión de CD31. Factores angiogénicos como EGF, FGF2, IGF1 o VEGF favorecen el MV. En CM HER2 positivo, se observó un aumento significativo de canales de MV en tumores de pacientes tratadas con trastuzumab neoadyuvante. La salinomicina, inhibidor de células madre de CM, suprimió el MV en líneas celulares resistentes a trastuzumab al alterar la integridad del citoesqueleto de actina.^{134,135}

-El papel de las Breast Cancer Stem Cells, Celulas Madre de Cáncer de Mama (CMCM), en la resistencia a trastuzumab:

La teoría de las CMCM células iniciadoras de cáncer de mama sugiere que el cáncer de mama podría derivar de una única célula con propiedades de célula madre. Estas CMCM han sido descritas como CD24 negativas o bajo y CD44 positivas (CD24-/bajo CD44+). Este fenotipo también puede surgir de la transformación epitelio mesénquima (TEM) inducida por linfocitos T CD8+, lo que se asocia a mayor agresividad y resistencia a tratamientos.¹³⁶ La adquisición de estas propiedades se ha atribuido a la activación de vías alternativas, como las vías Wnt, Notch, SHH, PI3K, Hippo o NF- κ B. Estas vías regulan mecanismos de detoxificación, aumentan el metabolismo celular, inducen resistencia a la apoptosis, autofagia y senescencia, promueven la sobreexpresión de transportadores de fármacos y activan factores de transcripción específicos de células madre.¹³⁷

Hay evidencia preclínica que sugiere que las CMCM en tumores HER2 positivos presentan mayores niveles de HER2, regulados por la vía Notch1. Trastuzumab inhibe esta vía en estas CMCM disminuyendo su tumorigenicidad.¹³⁸ Sin embargo, las CMCM también contribuyen a la resistencia a trastuzumab. Estudios con esferoides celulares muestran que un ambiente de hipoxia y autofagia modula la respuesta a trastuzumab, induciendo resistencia en células tumorales mediante aumento de CMCM y de la expresión de HER2. En cambio, disminuye las CMCM en células con baja expresión de HER2.^{139,140} Otras vías de señalización relacionada con CMCM y resistencia a trastuzumab incluyen EPHA5. La disminución de EPHA5 se asocia a resistencia y mal pronóstico, incrementando el fenotipo de CMCM, así como la activación de Notch1 y PTEN/AKT. La deficiencia de EPHA5 promueve la progresión tumoral en modelos murinos sensibles a trastuzumab.¹⁴¹

La ciclina dependiente de quinasa 12 (CDK12) cuyo gen *CDK12* está situado en el cromosoma 17 aproximadamente a 200 kb proximal al oncogén HER2 (*ERBB2*), con frecuencia está coamplificado en los cánceres de mama.¹⁴² Niveles altos de CDK12 y HER2 se correlacionan con resistencia a trastuzumab, recidiva y peor supervivencia.¹⁴³ CDK12 promueve la proliferación de CMCM y la resistencia a trastuzumab activando las vías Wnt y PI3K-AKT. Dinaciclib, un inhibidor de CDK12, muestra actividad antitumoral en células resistentes a trastuzumab.¹⁴⁴

La activación de la vía Wnt aumenta la expresión de β -catenina y EGFR induciendo a las células tumorales propiedades de CMCM mediante la transformación epitelio mesénquima que se traduce en resistencia a trastuzumab.¹⁴⁵

La amplificación de HER2 induce la secreción de IL-6 e IL-8, activando la vía autocrina JAK1-Stat3, crucial para la tumorigénesis mediada por HER2. La activación de Stat3 promueve el crecimiento y la supervivencia celular.¹⁴⁶ La vía IL6/JAK2/Stat3 se encuentra activada en las células con propiedades CD44+/ CD24-, confiriendo peor pronóstico. La inhibición de JAK2 redujo las células CD44+/ CD24- y el crecimiento de los xenografts.^{147,148}

La activación de la telomerasa en CMCM de tumores HER2 positivos contribuye a fenotipos más agresivos y resistencia a trastuzumab. La inhibición de la telomerasa con imetelstat reduce la población de CMCM y muestra sinergia con trastuzumab.¹⁴⁹

Las células del microambiente tumoral como las células endoteliales, fibroblastos, células inmunitarias o células mesenquimales con propiedades de célula madre pluripotencial (Mesengymal Stem Cells- MSCs) pueden promover la resistencia a trastuzumab. Las MSCs se acumulan en el microambiente tumoral en respuesta a reacciones locales inflamatorias y pueden incrementar el potencial metastásico de las células tumorales mediante la promoción de la transición epitelio-mesénquima.¹⁵⁰ El cocultivo poniendo en contacto físico las MSC con las células tumorales HER2 positivas activa Src y la vía PI3K/AKT por pérdida de PTEN, confiriendo resistencia a trastuzumab.¹⁵¹

El mejor conocimiento de estos mecanismos de resistencia relacionados con las CMCM presentes en cánceres de mama HER2 positivo que confieren resistencia a trastuzumab puede contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan superarla.¹⁵²

-Asociación entre resistencia a trastuzumab y cambios metabólicos:

La disregulación de las vías metabólicas celulares es otro factor que contribuye a la resistencia a trastuzumab. Alteraciones en el metabolismo de la glucosa pueden inducir resistencia a trastuzumab. Trastuzumab inhibe la glicolisis disminuyendo el factor de choque térmico 1 (heat shock factor-1, HSF-1) y de lactato deshidrogenasa A (LDH-A). Si en presencia de trastuzumab HSF-1 y LDH-A se encuentran sobreexpresadas y se combina con inhibidores de la glicolisis aumenta la sensibilidad al mismo, sugiriendo la resistencia asociada a esta vía metabólica.¹⁵³ La sobreexpresión de la proteína t-Darpp se asocia también a resistencia a trastuzumab. Estimula el crecimiento celular, inhibe la apoptosis, y activa vías alternativas como proteína quinasa A (PKA) y EGFR, además de aumentar la glucólisis vía IGF-1R.¹⁵⁴ Finalmente, la sobreexpresión de ATP sintasa también se asocia a resistencia, siendo reversible con la inhibición de esta enzima con oligomicina A combinada con trastuzumab.¹⁵⁵

Las vías de metabolismo de los ácidos grasos también desempeñan un papel importante en la oncogenicidad de HER2. La ácido grasa sintetasa (fatty acid synthase, FASN) es esencial para la actividad oncogénica de HER2. La inhibición de FASN suprime la sobreexpresión de HER2 al disminuir p185 HER2 y la actividad TK. La inhibición de FASN suprime la sobreexpresión de HER2 mediante la disminución en la expresión de p185 HER2 y de la actividad TK de la célula. El bloqueo de FASN aumenta PEA3 que es un represor transcripcional de HER2. La inhibición combinada de FASN y HER2 aumenta la apoptosis.¹⁵⁶ La sobreexpresión de FASN también ha mostrado aumentar la liberación de p95 HER2.¹⁵⁷

Los niveles elevados de la proteína de unión a ácidos grasos 7 (fatty acid-binding protein 7, FABP7) se han correlacionado con una mayor incidencia de metástasis cerebrales y

peor pronóstico. FABP7 promueve la glicolisis y la metastatización en el microambiente cerebral a través de la señalización de Src y de factores proangiogénicos.¹⁵⁸

El transportador de membrana de ácidos grasos CD36 es esencial en la supervivencia de las células de CM HER2 positivas durante la terapia anti-HER2 y puede contribuir al desarrollo de resistencias adquiridas. Los niveles elevados de CD36 se han asociado con peor pronóstico en pacientes con CM tratadas en neoadyuvancia con paclitaxel y trastuzumab.^{159,160}

Otra implicación del metabolismo lipídico en la patogénesis de tumores HER2 positivo está en relación con las balsas lipídicas. Son microdominios de membrana importantes para el tráfico y la señalización que contienen MAL2, una proteína sobreexpresada en células de CM HER2 positivo. MAL2 es crítica para la formación de heterodímeros HER2-EGFR, la señalización mediada por HER2 (incluyendo PI3K/AKT), y la prevención de la entrada de calcio. Las células resistentes a trastuzumab muestran una mayor interacción MAL2/HER2 en las balsas lipídicas.⁹² La combinación de trastuzumab e inhibidores de FASN podría superar la resistencia mediada por estos mecanismos lipídicos.¹⁵⁶

-Resistencia por activación de vías de señalización alternativas:

La resistencia a trastuzumab puede deberse a la desregulación de las vías mediadas por HER2, especialmente PI3K/Akt/mTOR y MAPK, a través de mecanismos que incluyen la señalización por otros receptores HER, aumento en la expresión de otros receptores, o activación de vías alternativas.¹⁶¹

En muestras de tumores de pacientes con CM HER2 positivo con recaída tras tratamiento con trastuzumab, se encontraron alteraciones en la vía PTEN/PI3K/AKT/mTOR y/o sobreexpresión de IGF-1R en hasta en un 25% de los casos).¹⁶² Otro estudio mostró que había coexpresión de HER2 y EGFR hasta en un 35% de cánceres HER2 positivos y que esta se asociaba a una peor supervivencia.¹⁶³ En células que coexpresan HER2 y EGFR, la modulación de las interacciones receptor-receptor y la presencia de EGF afectan el efecto inhibitorio de trastuzumab.¹⁶⁴ Así, los inhibidores biespecíficos de EGFR/HER2, como PKI166, muestran mayor eficacia que agentes monoespecíficos en la inhibición de la proliferación celular en estas células.¹⁶⁵ Hay otros receptores TK no HER como IGF-1R, que está sobreexpresado en hasta el 50% de los cánceres de mama, que también activan PI3K/Akt/mTOR y MAPK, contribuyendo a la resistencia a trastuzumab. IGF-1R activa PTEN/PI3K/Akt/mTOR independientemente del estatus hormonal, y MAPK/pERK1/2 en receptores hormonales positivos.¹⁶⁶ La heterodimerización IGF-1R/HER2, estimulada por IGF-1, induce la fosforilación de HER2 y la activación de señalización, contribuyendo a la resistencia. La inhibición de IGF-1R o el bloqueo con anticuerpos específicos interrumpen la heterodimerización y restablecen la sensibilidad a trastuzumab.¹⁶⁷ Asimismo, la señalización de IGF-1R modula el ciclo celular reduciendo el porcentaje de células en fase G1 revirtiendo la disminución de ciclina E por trastuzumab impidiendo así su efecto sobre el arresto celular. La adición de IGFBP-3, un inhibidor de IGF-1, restaura el efecto de trastuzumab.⁸⁰

El receptor MET y su ligando, factor de crecimiento de hepatocitos, puede inhibir la inducción de p27 por trastuzumab y mantener AKT constantemente activado, promoviendo así la resistencia.¹⁶⁸

La resistencia a trastuzumab se puede inducir a través de la activación de YES1 que es una proteína de la familia de SRC. La amplificación de YES1 en células resistentes a trastuzumab y lapatinib, fosforila y activa HER2, induciendo la señalización a través de

AKT y MAPK. La eliminación o inhibición de YES1 con dasatinib resensibiliza las células a trastuzumab y lapatinib.¹⁶⁹

La sobreexpresión de EphA2, otro receptor TK se correlacionó con un peor pronóstico en pacientes con sobreexpresión de HER2. Trastuzumab podría activar EphA2 vía Src, amplificando la señalización PI3K/Akt y MAPK en las células resistentes. La inhibición de EphA2 restablecía la sensibilidad al tratamiento in vivo.¹⁷⁰

La coexpresión del receptor de la eritropoyetina (EpoR) con HER2 junto con la exposición a eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO) reduce la respuesta de células tumorales a trastuzumab tanto in vitro como in vivo. La activación de Src mediada por Jak2 y la inactivación de PTEN son los mecanismos a través de los cuales rHuEPO antagoniza a trastuzumab. La administración simultánea de rHuEPO y trastuzumab se correlacionaba con peor pronóstico en pacientes con CM HER2 positivo.¹⁷¹

La vía de señalización de los receptores catecolaminérgicos y adrenérgicos (β 2-AR) facilita la resistencia al trastuzumab. La sobreexpresión de HER2 y la fosforilación de ERK inducen la liberación de epinefrina, aumentando la expresión de β 2-AR. Las catecolaminas incrementan la expresión de HER2 y activan STAT3, aumentando miR-21 y MUC-1 activando la vía PI3K/Akt/mTOR. La combinación de trastuzumab con el betabloqueante propanolol resensibilizó las células tumorales resistentes.¹⁷²

El receptor de estrógenos desempeña un papel crucial en la resistencia a trastuzumab debido a que es una vía de señalización clave para la supervivencia de células HER2 positivas que lo expresan. En células RE/HER2 positivas tratadas con trastuzumab hay un incremento de los productos de la vía estrogénica con mayor expresión de genes como PR, IGF1R, y Cav-1, pudiendo surgir como un mecanismo compensatorio al bloqueo de HER2 promoviendo la supervivencia celular a través de Bcl2. La combinación de tratamiento endocrino con trastuzumab y/o lapatinib aumentaba las respuestas y prevenía la resistencia en modelos animales de experimentación.¹⁷³ En un estudio en cultivos de tumores esferas con células quiescentes con propiedades de célula madre HER2 positivas para estudiar mecanismos de resistencia a trastuzumab, se evidenció que estas células mostraban un aumento en la señalización EGFR/HER2 que el trastuzumab inhibía de forma incompleta hasta hacerse finalmente resistentes. Se observó como en estas células, el receptor estrogénico citoplasmático α (ER α) se elevó notablemente en las esferas tumorales y se asoció a una mayor señalización EGFR/HER2. Al tratar estas células con tamoxifeno, se revirtió la resistencia a trastuzumab evidenciando la interacción entre ambas vías de señalización y la importancia de mantener ambas bloqueadas para prevenir la resistencia a trastuzumab.¹⁷⁴

El receptor de quimioquinas CXCR4 implicado en varios procesos celulares que incluyen la progresión del ciclo celular y la capacidad de metastatización también puede asociarse a resistencia a trastuzumab. La sobreexpresión de CXCR4 en células resistentes a trastuzumab promueve la progresión del ciclo celular en fase G2/M. La combinación de AMD3100, inhibidor de CXCR4 con trastuzumab y docetaxel revierte la resistencia.¹⁷⁵

Recientemente se ha descrito el papel de los ligandos endógenos en la resistencia a trastuzumab. El tratamiento con EGF induce resistencia activando la vía IRF1-STAT1 independientemente del interferón. Se produce un aumento en la expresión de genes como ISG15, IFI6, HDAC1, GBP2, CXCR4, y CASP8, afectando la respuesta inmune y la apoptosis, además de la bioenergética celular a través de la vía NF- κ B. La inhibición de EGFR podría restaurar la sensibilidad a trastuzumab reduciendo la activación de IRF1-STAT1.¹⁷⁶

La disminución en la expresión del gen supresor tumoral *ARID1A*, se relaciona con la resistencia a trastuzumab mediante la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR a través de la anexina A1 (ANXA1). Mediante la inhibición de AKT con MK2206, se reestableció la sensibilidad tanto al inhibidor de mTOR AZD8055 como a trastuzumab de células que tenían *ARID1A* suprimido.¹⁷⁷ Sin embargo, estudios posteriores no confirmaron una correlación consistente entre la supresión de *ARID1A* y el aumento de ANXA1 como biomarcadores predictivos de resistencia, aunque ANXA1 se asoció con mayor mortalidad y riesgo de recaída por CM.¹⁷⁸

-Variantes moleculares de HER2 que contribuyen a la resistencia a trastuzumab:

La proteína HER2 puede presentar distintas variantes que impiden la capacidad de unión a trastuzumab y por tanto contribuir a la generación de resistencias. Una de las más frecuentes es p95HER2, también conocida como Fragmento carboxiterminal de HER2, se caracteriza por su carencia del dominio extracelular que es imprescindible para la unión a trastuzumab. Se genera mediante la liberación del dominio extracelular (ADAM10) o por traducción alternativa del ARNm. Su hiperactividad se debe a la formación de homodímeros estables unidos por enlaces disulfuro.¹⁷⁹ Esta variante presente en aproximadamente el 30% de los casos, se asocia a peor pronóstico y menor supervivencia en pacientes con CMM HER2 positivo tratadas con trastuzumab.^{180,181}

Una variante de splicing de HER2, HER2 Δ 16, que carece del exón 16 y codifica una parte de la región extracelular puede representar entre el 2 y el 9% del total de HER2, también puede contribuir a la resistencia al trastuzumab. HER2 Δ 16 es capaz de inducir tumorigénesis incluso en concentraciones diez veces menores a las de la proteína completa de HER2 completo, teniendo por tanto un mayor poder oncogénico. Además, las células que expresan esta variante tienen baja sensibilidad a trastuzumab, pero podrían ser sensibles a TKIs. Forma homodímeros estables reforzados por enlaces disulfuro, dificultando la unión de trastuzumab.¹⁸² Además de PI3K/AKT y MAPK, HER2 Δ 16 activa vías de señalización no convencionales como Src y quinasa de adhesión focal (FAK).^{183,184} Asimismo induce la expresión de marcadores mesenquimales confiriendo propiedades de célula madre y favoreciendo la transición epitelio mesénquima.^{184,185} Además, aumenta la heterogeneidad tumoral, afecta el microambiente tumoral a través de la matriz extracelular induciendo factores inflamatorios e inmunosupresión por la vía Stat3.¹⁸⁶ HER2 Δ 16 tiene la capacidad de alterar la expresión de microARNs, como miR-7, contribuyendo a la resistencia al tratamiento endocrino. La restauración de miR-7 resensibiliza las células a trastuzumab.¹⁸⁷ Se encuentra presente en un alto porcentaje de pacientes con progresión ganglionar de CM.¹⁸⁸

Heterogeneidad tumoral y estabilidad en la expresión de HER2 limitan la respuesta a trastuzumab:

La heterogeneidad de la expresión de HER2 en los tumores con positividad para esta proteína se ha implicado en la resistencia a trastuzumab y sus derivados inmunoconjugados.¹⁸⁹ Un estudio de 96 tumores HER2 positivos definió dos tipos de heterogeneidad. Una heterogeneidad regional con patrones de amplificación/negativos o amplificación/equívocos en diferentes áreas del tumor, presente en 17 casos y otra genética con relación HER2/copias de HER2 >2.2 en el 5-50% de las células, presente en 11 casos, todos con heterogeneidad regional. La heterogeneidad intratumoral fue más

frecuente en casos con amplificación de HER2 de bajo grado y expresión equívoca, sugiriendo la necesidad de análisis más exhaustivos de HER2. La heterogeneidad fue un factor pronóstico independiente, asociándose a menor SLP e indicando una posible asociación entre inestabilidad genética y resistencia a terapias anti HER2.¹⁹⁰ Otro estudio de 112 pacientes con CMM HER2 positivo tratadas con trastuzumab, se encontró heterogeneidad regional en el 8.7% y genética en el 2.7% de los casos, asociándose ambas con peor SLP y SG.¹⁹¹ En pacientes con enfermedad HER2 positiva temprana tratadas con quimioterapia neoadyuvante asociada a trastuzumab, la pérdida de expresión de HER2 en la enfermedad residual se asoció a mayor riesgo de recaída, indicando que la heterogeneidad de HER2 contribuye a la resistencia y tiene un impacto pronóstico negativo.¹⁹²

La estabilidad de la proteína HER2 en el tumor también puede contribuir a generar resistencias a trastuzumab. La chaperona HSP90 mantiene la conformación y estabilidad de HER2 pudiendo influir en la resistencia a trastuzumab.¹⁹³

Mediante la inhibición de HSP90 con tanespimicina o NCT-547 se acelera la degradación de HER2, incluyendo p95HER2, resensibilizando las células a trastuzumab. NCT-547 también reduce la población de células madre CD24^{bajo}/CD44^{alto} e inhibe la angiogénesis en modelos preclínicos.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ Sin embargo, la aplicación clínica de inhibidores de HSP90 se ve limitada por problemas de solubilidad, biodisponibilidad y toxicidad.¹⁹⁷

Asimismo, la dopamina y la fosfoproteína regulada por AMP cíclico (DARPP-32) contribuyen a la resistencia a trastuzumab. DARPP-32 y su forma truncada, t-DARPP, se expresan en la mayoría de los tumores de mama primarios HER2 positivos, y los niveles elevados de DARPP32 se asocian a una peor supervivencia. Así, t-DARPP, asociada a HSP90 y HER2 en células resistentes, incrementa la señalización de HER2 a través de la vía AKT. Su supresión reduce dicha señalización y aumenta la apoptosis.^{198,199} t-DARPP también activa IGF-1R que puede formar heterodímeros con EGFR y HER2 estimulando la señalización y la glicólisis.¹⁵⁴

La glicoproteína MUC4 que se encuentra frecuentemente sobreexpresada en CM con afectación ganglionar puede enmascarar los sitios de unión de trastuzumab al receptor HER2. Además, MUC4 puede alterar las interacciones entre HER2 y sus ligandos habituales, provocando la activación de la señalización de MAPK y PI3K por vías alternativas.^{200,201} TNF α es capaz de inducir la resistencia a trastuzumab a través de la estimulación de MUC4 que reduce la unión de trastuzumab en el receptor. Los anticuerpos anti-TNF α pueden revertir la resistencia. Asimismo, la expresión de MUC4 en muestras de CM HER2 positivo fue un predictor independiente de peor SLP y podría ser un biomarcador predictor de eficacia a trastuzumab.²⁰² La hiperactivación de STAT3 también promueve la expresión de MUC1 y MUC4 dando lugar a resistencia a trastuzumab cuya inhibición es capaz de revertirla.²⁰³ Otra proteína implicada en el enmascaramiento del epítipo del receptor de HER2 es el hialuronano, ligando de CD44, cuya inhibición reduce la internalización del receptor y disminuye la proliferación celular.²⁰⁴

-Mecanismos de resistencia inmunomediados:

Los procesos de regulación inmune presentes antes o tras la exposición a tratamiento pueden influir en la resistencia a trastuzumab. El aumento del ligando de muerte programada 1 (PD-L1) es un mecanismo de resistencia adquirida al trastuzumab. El aumento de PD-L1 en el tumor, inducido por IFN γ que es liberado por células NK y

linfocitos T, inhibe la respuesta inmune a través de PD-1.^{205,206} Sin embargo, la combinación de trastuzumab y del anti-PD-L1 pembrolizumab mostró poca actividad en pacientes con CMM HER2 positivo, sugiriendo un papel menos crucial de PD-L1 en la resistencia.²⁰⁷

Otro mecanismo de resistencia inmunomediada es la supresión de la ADCC de las células NK. La quitinasa 3-like-1 (CHI3L1) puede mediar la evasión del sistema inmunitario mediante la parálisis de la maquinaria de degranulación citotóxica de las células NK al inhibir la señalización JNK mediada por RAGE. Se asocia a resistencia a trastuzumab, crecimiento tumoral, y cambio en el infiltrado inmunitario con aumento de macrófagos, disminución de células NK y linfocitos T). Los anticuerpos anti-CHI3L1 muestran sinergia con trastuzumab mejorando la respuesta citotóxica de las células NK.²⁰⁸

La exposición continua a trastuzumab induce la sobreexpresión de CCL5, que activa ERK y genera resistencia. La alta expresión de CCL5 se correlaciona con fosforilación de ERK, menor respuesta patológica completa tras neoadyuvancia con trastuzumab con peor SLP y SG.²⁰⁹ CCL5 atrae células T reguladoras, induciendo inmunotolerancia.²¹⁰

Por último, la resistencia a trastuzumab puede estar mediada por el aumento de las proteínas reguladoras del complemento, que se ha descrito sobre todo en el contexto del tratamiento de doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab. Estas proteínas aumentan la resistencia al inhibir la actividad mediada por el complemento. Su neutralización potencia la actividad de trastuzumab y pertuzumab.²¹¹ Altos niveles tumorales de CD55 y CD59 se asocian a peor supervivencia.¹²⁷

1.7.1.2. Pertuzumab

MECANISMOS DE ACCIÓN

Pertuzumab es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado contra HER2 que se une al dominio II extracelular de HER2 en un epítopo diferente a trastuzumab.

-Inhibición de la vía de señalización:

Su unión al receptor HER2 inhibe la dimerización mediada por ligando, sobre todo con los heterodímeros HER2-HER3. La combinación de pertuzumab y trastuzumab ha demostrado sinergia en la inhibición de la supervivencia de células de CM HER2 positivo, aumentando la apoptosis.²¹² La inhibición de la dimerización por pertuzumab resulta en la inactivación de las vías de señalización asociadas a HER, especialmente PI3K/AKT/mTOR y RAS/RAF/MEK/ERK, mientras que trastuzumab complementariamente inhibe la señalización independiente de ligando.²¹³

-Efectos inmunomediados:

Pertuzumab, dado que se une al dominio extracelular de HER2, también puede inducir efectos inmunes mediados por anticuerpos como trastuzumab, aunque no es capaz de bloquear el desprendimiento de HER2. Además, también aumenta la ADCC inducida por trastuzumab. En muestras de tumores previamente a tratamiento neoadyuvante basado en pertuzumab la mayor expresión de marcadores inmunes como IF γ o STAT1 se asociaron a mayor probabilidad de respuesta completa patológica, mientras que el aumento de PD1 y PDL1 producía el efecto contrario.²¹⁴

Trastuzumab y pertuzumab son anticuerpos monoclonales IgG1 y, como tal, pueden activar la vía clásica del complemento, lo que conduce a fagocitosis celular mediada por

el complemento y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Se ha sugerido que este mecanismo de acción es más relevante en el doble bloqueo. La expresión de C1q en tumores de una cohorte de CM HER2 positivo tratadas con trastuzumab y pertuzumab se correlacionó con una mejoría en la supervivencia, mientras que la expresión de los reguladores del complemento CD55 y CD59 se correlacionaron inversamente, evidenciando la importancia de la activación de la vía clásica del complemento como mecanismo de acción.¹²⁷

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Los mecanismos de resistencia a pertuzumab se han estudiado en monoterapia, pero sobre todo en el contexto de su uso clínico en doble bloqueo con trastuzumab.

Entre los mecanismos descritos en monoterapia se encuentran las mutaciones de activadoras del dominio extracelular de HER2. La mutación más frecuente encontrada en el receptor HER2 es la S310F que demostró conferir resistencia a pertuzumab en células tumorales HER2 positivas. Esta mutación que está localizada en el subdominio II del dominio extracelular de HER2, podría impedir la interacción entre el receptor y pertuzumab por un cambio significativo en el residuo S310 que es crítico para la unión.²¹⁵

En líneas celulares HER2 positivas resistentes a Tamoxifeno, pertuzumab fue capaz de inhibir eficazmente la señalización y crecimiento celular mediado por los heterodímeros EGFR/HER2. Sin embargo, promovió la formación rápida de heterodímeros entre EGFR/HER3 que se propone como mecanismo de resistencia a pertuzumab.²¹⁶

La resistencia a pertuzumab se ha relacionado también con la regulación de miARN. En líneas celulares de cáncer de ovario HER2 positivas, pertuzumab indujo inicialmente la expresión de miARN-150. La supresión posterior de miARN-150 en las células, provocaba una disminución de la sensibilidad a pertuzumab induciendo menor apoptosis celular mediante la activación de la vía PI3K/AKT. La exposición al inhibidor de PI3K, LY294002, revirtió el efecto de la supresión de miARN-150, apoyando el mecanismo de resistencia.²¹⁷

Hay algunos estudios que han propuesto posibles mecanismos para el doble bloqueo con trastuzumab. Entre ellos se encuentra resistencia adquirida por la activación de la señalización mediante heterodímeros HER2/HER3 que pudo ser revertida in vitro mediante TAS0728, un TKI irreversible.²¹⁸ Las mutaciones de *PIK3CA* se han estudiado en modelos murinos transgénicos como mecanismo de resistencia a diversas terapias anti-HER2, incluyendo el doble bloqueo que pueden ser revertidas con inhibidores de PI3K como buparlisib. Si además se inducía resistencia a buparlisib, se encontraba un incremento en la expresión de genes relacionados con la adhesión celular y matriz extracelular como el colágeno II (Col2a1) y la integrina β 1/Src. La inhibición de integrina β 1/Src revertía la resistencia inducida por colágeno II, resensibilizando las células a doble bloqueo y buparlisip apoyando el aumento de la señalización colágeno/integrina/Src como mecanismo de resistencia.²¹⁹

Otro estudio en líneas celulares con resistencia adquirida mediante exposición prolongada a trastuzumab y pertuzumab no encontró cambios en la expresión receptores hormonales y HER2, pero evidenció alteraciones de HER4 y reducción en niveles de pHER3. La vía MAPK estaba activada como mecanismo compensatorio a la inhibición de la vía PI3K/AKT por el doble bloqueo. Las células resistentes tenían incremento en niveles de ERK y P38 fosforilado en comparación con las que mantenían

sensibilidad al tratamiento. Adicionalmente se realizó un análisis proteómico que confirmó el aumento de proteínas implicadas en la vía MAPK y en procesos como la formación ribosómica, actividad mitocondrial y metabolismo asociado a estrés oxidativo. Entre las proteínas con disminución de su expresión destacaba HEXIM1 que tiene función conocida como supresora tumoral.²²⁰

La amplificación del gen FGFR1 en el CM HER2 positivo puede influir en la respuesta a tratamientos anti-HER2. El receptor FGFR que está codificado por el gen FGFR1 es responsable de la activación de esta vía. Un estudio determinó por técnicas de PCR cuantitativa las alteraciones del número de copias de varios genes relacionados con la vía PI3K/AKT, incluyendo FGFR1. Relacionó los resultados con la respuesta a tratamiento neoadyuvante con trastuzumab y pertuzumab, encontrando sobre todo una significativa menor probabilidad de obtener una respuesta completa patológica en presencia de la amplificación de FGFR1.²²¹ Actualmente, se encuentran en desarrollo proteínas biespecíficas capaz de unirse a los receptores HER2 y FGFR1 en la superficie de la célula tumoral, inhibiendo la señalización de ambas vías, además de aumentar la penetración celular. Al combinar esta proteína con el agente citotóxico monometil auristatina E (MMAE), se demostró la eliminación de células tumorales con expresión de HER2, FGFR o ambos receptores.²²²

Entre los mecanismos de resistencia inmunomediados descritos previamente para trastuzumab, se encuentra la mediada por el aumento de las proteínas reguladoras del complemento. Este mecanismo tiene especial relevancia en el contexto del tratamiento de doble bloqueo con pertuzumab. Así, el aumento de las proteínas reguladoras del complemento CD55 y CD59 en tumores HER2 positivos tratados con trastuzumab y pertuzumab se relaciona con peor supervivencia.^{127,211}

1.7.1.3. Margetuximab

MECANISMOS DE ACCIÓN

Margetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico humano/ratón contra HER2 similar a trastuzumab, ya que comparte la misma región variable y por tanto se une al mismo epítipo del receptor. Se modificó la región constante Fc del anticuerpo para aumentar los efectos inmunomediados, especialmente la ADCC. Por tanto, la principal diferencia con trastuzumab consiste en la sustitución de 5 aminoácidos del dominio Fc de margetuximab (L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L).²²³

-Efectos sobre las vías de señalización mediadas por HER2:

Dado que margetuximab y trastuzumab comparten la misma región variable del anticuerpo y por tanto se unen con la misma afinidad y especificidad a HER2, los efectos anteriormente descritos para trastuzumab sobre el receptor serían comunes.²²³

-Efectos inmunomediados:

Tal y como se ha descrito previamente para trastuzumab, los anticuerpos monoclonales ejercen sus acciones citotóxicas entre otros mecanismos, mediante la interacción entre su Fc y los receptores FcγR de las células de inmunidad como NKs, monocitos y macrófagos. De esta manera se produce una activación de la respuesta inmunitaria innata activando tanto la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), como de la fagocitosis (ADCP) y anticuerpos (ADCC). La familia FcγR comprende receptores

activadores y receptores inhibidores que se expresan en las células efectoras regulando los procesos de activación inmunitaria. Así, los receptores activadores son FcγRI (CD64, un receptor de alta afinidad), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIIa (CD16A) y FcγRIIIb ligado a GPI (baja afinidad). Los receptores inhibidores incluyen FcγRIIb (CD32B).²²³

Margetuximab tiene mayor afinidad que trastuzumab por el FcγR activador CD16A y menor capacidad de unión al FcγR inhibidor CD32 con el objetivo de optimizar la ADCC. Se han descrito distintos polimorfismos de un nucleótido (SNP) de estos receptores que impactan en la capacidad de los mismos para inducir la ADCC por las células inmunitarias. CD16A está codificado por dos alelos que cuya influencia en la afinidad de la unión a las IgG es conocida. Así, en el dominio extracelular de C16 puede expresarse una variante de valina de alta afinidad (V158) y una variante de fenilalanina de menor afinidad (F158) pudiendo afectar la presencia de una u otra a la capacidad de unión. Es relevante destacar que alrededor del 85% de la población es portadora de F158, la variante de menor afinidad. Otro ejemplo es el dominio extracelular de C32A, en el que la variante de histidina (H131) confiere mayor afinidad que la variante de arginina (R131). De este modo, los alelos homocigotos V/V de valina de alta afinidad serían responsables de una mayor citólisis mediada por ADCC que los alelos V/F o F/F. De hecho, trastuzumab había demostrado tanto in vitro como por datos clínicos, aumentar la ADCC y mejorar la respuesta de pacientes portadoras de la variante V/V. En cambio, margetuximab, al tener una mayor afinidad por las variantes V/F y F/F a diferencia de trastuzumab y menor afinidad por el receptor inhibidor CD32, ha mostrado tener un mayor efecto antitumoral tanto in vitro como in vivo.²²⁴ En un análisis exploratorio del ensayo clínico fase 3 comparando la combinación de distintas quimioterapias con trastuzumab o margetuximab, las pacientes que presentaban la presencia del alelo F158 presentaron mejores resultados con margetuximab. Sin embargo, las pacientes con la variante V158 no presentaron un mayor beneficio con margetuximab e incluso los resultados fueron numéricamente desfavorables posiblemente debido a la menor proporción de pacientes con estas variantes y a un desbalance en las características clínicas de los dos grupos.¹²¹

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Los mecanismos de resistencia de margetuximab no han sido estudiados en profundidad. En gran parte es probable que coincidan con los de trastuzumab dada la similitud de ambos anticuerpos. Es probable también, como se ha expuesto anteriormente que margetuximab pueda contribuir a superar en parte el mecanismo de resistencia inmunológico constitutivo de las pacientes con variantes de baja afinidad por los FcγR.

1.7.1.4. Zanidatamab

Zanidatamab (ZW25) es un anticuerpo biespecífico anti-HER2 con unión biparatópica, que se une simultáneamente a dos dominios extracelulares (ECD) del receptor HER2, incluidos los dominios ECD4 (yuxta membrana) y ECD2 (dimerización) que coinciden con los epítopos de unión de trastuzumab y pertuzumab respectivamente.²²⁵

MECANISMOS DE ACCIÓN

-Unión al receptor HER2:

La unión al receptor por zanidatamab está determinada por su estructura de anticuerpo biparatópico, que puede unirse a dos epítomos diferentes del receptor HER2, en particular, a los dominios extracelulares ECD2 y ECD4. A diferencia de otros anticuerpos anti-HER2, zanidatamab tiene la propiedad de unirse a HER2 en trans, de modo que una sola molécula del anticuerpo puede unir a dos moléculas distintas de HER2 uniéndose a ECD2 en una molécula de HER2 y a ECD4 en otra. Así, a su vez forma complejos multiméricos con HER2, que pueden incluir complejos 2:1 (HER2:Ab) e incluso de orden superior. Esta unión multimérica se ve facilitada por su capacidad para unirse en trans, lo que conduce a una amplia agrupación (clusters) de receptores de HER2 en la superficie celular. De hecho, esta agrupación es más pronunciada que la inducida por trastuzumab, pertuzumab o su combinación, lo que da lugar a grandes agrupaciones de HER2 en la superficie de la célula tumoral. Además, estudios estructurales demuestran que la geometría de unión de zanidatamab le impide unirse a HER2 en cis, es decir, en la misma molécula de HER2, lo cual es crucial para su capacidad de formar grandes complejos HER2 multiméricos.²²⁵

En comparación con otros anticuerpos anti-HER2, zanidatamab produce un aumento de la internalización de HER2 mediada por su unión al receptor en líneas celulares de CM HER2 positivo. Tras la internalización, se produce una reducción significativa de los niveles de HER2 en la superficie celular más pronunciada que la inducida por trastuzumab o pertuzumab.²²⁵

-Señalización:

Al promover la internalización y reducción de la expresión del receptor en la membrana, zanidatamab también bloquea las vías de señalización a través de HER2. Las células expuestas a zanidatamab presentaban menor fosforilación en las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK. Además, reduce la formación de heterodímeros de HER2-EGFR y así dificulta la activación de la vía a través de ligando que supone un mecanismo de resistencia con trastuzumab.²²⁵

-Efectos inmunomediados:

La amplia agrupación de HER2 inducida por el zanidatamab aumenta su capacidad para promover la citotoxicidad dependiente del complemento CDC. Esto se consigue mediante el aumento del depósito de componentes del complemento como los fragmentos C1q y C3 en las células tumorales con expresión HER2, lo que conduce a mayores tasas de muerte celular.

La propiedad de unión biparatópica de zanidatamab ha mostrado adicionalmente potenciar la ADCC en células HER2 positivas, ya que al agrupar más eficazmente las moléculas HER2 en la superficie celular se potencia el reclutamiento y la activación de células efectoras inmunitarias en comparación con trastuzumab y pertuzumab.²²⁵

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Recientemente se han sugerido algunos posibles mecanismos de resistencia de zanidatamab en un ensayo clínico simultáneo con pacientes y con modelos murinos derivados de los pacientes (PDX).²²⁶

Como con otras terapias anti-HER2, se han encontrado cambios en la expresión de HER2 tras la progresión a zanidatamab con menores niveles de expresión de HER2 respecto a

muestras al inicio del tratamiento. Esta pérdida de expresión podría contribuir como mecanismo de resistencia.²²⁶

Otro posible mecanismo de acción es por la activación de vías alternativas de señalización celular. En modelos de células tumorales HER2 positivas con sobreexpresión de MET no había respuesta a zanidatamab, así como en modelos de PDX generados a la progresión a tratamiento en que se identificaba una amplificación en la vía. La combinación de zanidatamab con inhibidores de MET fue capaz de reestablecer la sensibilidad a tratamiento tanto in vivo como in vitro, apoyando este mecanismo de resistencia resistencia primaria y adquirida a zanidatamab.²²⁶

1.7.2. Inhibidores De Tirosina Quinasa (TKI)

1.7.2.1. Lapatinib

MECANISMOS DE ACCIÓN

Lapatinib es un TKI oral contra dos miembros de la familia de receptores HER, EGFR (HER1) y HER2 cuya estructura química es un derivado 4-anilinoquinazolina. Este TKI interacciona de manera reversible con la porción citoplasmática del receptor en el dominio de unión a ATP del dominio TK actuando como un inhibidor competitivo del ATP. De esta manera bloquea la fosforilación y por tanto la activación del receptor resultando en la inhibición de sus vías de señalización MAPK, ERK1/2 y PI3K/AKT, ambas implicadas en la proliferación y apoptosis.²²⁷

Lapatinib, al unirse a la conformación inactiva del EGFR, difiere de otros TKI como erlotinib o gefitinib. Además, lapatinib tiene una tasa de disociación de HER1 y HER2 más lenta que otros TKI. Ambas propiedades podrían contribuir a una mayor duración del efecto en la zona diana.²²⁸ Su mecanismo de acción a diferencia de los de los anticuerpos monoclonales como trastuzumab puede favorecer su actividad no solamente en los receptores íntegros, sino también en las formas truncadas de HER1 y HER2 como p95HER2 manteniendo su eficacia.²²⁹ Otra característica distintiva de lapatinib en comparación con los anticuerpos anti-HER2 es su biodistribución, ya que tiene capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, lo que favorece su actividad para tratar metástasis cerebrales.²³⁰

La inhibición de una sola TK de la familia HER, produce un aumento compensatorio de la regulación de otros miembros. Por tanto, la inhibición simultánea de HER1 y HER2 puede contribuir a superar los mecanismos de escape mediados por la redundancia en las vías de señalización celular.²³¹ Esta inhibición sinérgica de ambos receptores, provoca una supresión más potente del crecimiento celular y un mayor efecto apoptótico probablemente también por el impacto en la menor heterodimerización de los receptores.²³²

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Se han descrito diversos mecanismos de resistencia asociados a lapatinib, como la activación de vías de señalización alternativas, mutaciones en el dominio de unión TK y amplificaciones génicas.²³³

Activación de vías de señalización alternativas:

Al igual que en otras terapias anti-HER2, la activación de vías de señalización alternativas implica mecanismos de resistencia fundamentales a lapatinib.

-Por otros receptores tirosina quinasa:

La señalización a través de otros receptores de la familia HER puede activar a HER2 y amplificar la transducción de señales en porciones más distales de la vía de señalización, eludiendo así el efecto inhibitorio de lapatinib. En este contexto, los heterodímeros HER2/HER3 son cruciales en la resistencia.²³⁴ La inhibición de HER2 con lapatinib induce la expresión de HER3 dependiente de PI3K/AKT y FoxO3A, reactivando la vía PI3K/AKT y limitando el efecto antitumoral de lapatinib.²³⁵ La inhibición de HER3 con siRNA o anticuerpos resensibiliza las células a lapatinib. El bloqueo combinado de HER2 y HER3 es más efectivo que la inhibición individual.²³⁶

La activación de otros receptores TK puede contribuir a la resistencia a lapatinib. Entre ellos se encuentran c-Met y AXL. La supresión mantenida de HER2 puede inducir la activación de c-Met, aumentando la señalización PI3K/AKT y la resistencia a lapatinib y trastuzumab.²³⁷ La inhibición de c-Met restaura la sensibilidad a lapatinib.²³⁸

Otra vía que se puede activar como vía alternativa al bloqueo de HER2 es AXL que es un receptor relacionado con MET. La sobreexpresión de AXL confiere resistencia a lapatinib y trastuzumab al reactivar PI3K al unirse a la subunidad p85 y está asociada a mal pronóstico.²³⁹ La combinación con un inhibidor multiquinasa con actividad contra AXL restauraba la sensibilidad a los antagonistas de HER2.²⁴⁰

-Por otras quinasas intracelulares:

La resistencia a las terapias anti-HER2 se ha relacionado con alteraciones de las quinasas intracelulares. En la mayoría de los estudios se ha descrito que las alteraciones relacionadas con la resistencia a lapatinib afectan a las vías PI3K/AKT/mTOR y a vías TK no dependientes de receptor de la familia Src.²³³

Las células de CM sensibles a lapatinib muestran inhibición de la vía AKT y activación del gen proapoptótico FoxO3A, promoviendo la muerte celular. Sin embargo, en células resistentes, lapatinib inhibe parcialmente la vía AKT, resultando en una escasa inducción de FoxO3A y ausencia de muerte celular, además de impulsar la expresión de receptores de estrógeno y progesterona.²⁴¹ La combinación de un inhibidor selectivo de la isoforma alfa/delta de PI3K con anti-HER2 mostró eficacia en restaurar la sensibilidad a lapatinib.²⁴² En modelos de células con resistencia adquirida a lapatinib se evidenció activación de mTOR independiente de PI3K, con niveles elevados de inhibidores de apoptosis como survivina y c-IAP-2. Inhibidores de mTOR o HSP90 revirtieron esta resistencia, sugiriendo que el aumento en inhibidores de apoptosis promueve la resistencia a lapatinib. En algunos cánceres en los que inhibidores de PI3K son ineficaces, los inhibidores de mTOR o HSP90 podrían ser beneficiosos.²⁴³

En otro estudio, se identificó que la serina-treonina quinasa p70S6K1 está hiperactivada en células resistentes a lapatinib, implicando que la vía mTOR elude el bloqueo a HER2. La rapamicina, un inhibidor de mTOR, suprimió esta hiperactivación, restaurando la sensibilidad a lapatinib.²⁴⁴

Entre las quinasas intracelulares, Src también se ha asociado a la resistencia a lapatinib.²⁴⁵ En líneas celulares resistentes, se observó una mayor fosforilación de las quinasas Src. El uso de inhibidores de Src bloqueó parcialmente la señalización PI3K/AKT, restaurando la sensibilidad al lapatinib.²⁴⁶ En modelos celulares resistentes a

lapatinib se silenció la vía Src y se implantaron estas células en modelos murinos. La reactivación de Src fue más pronunciada en células resistentes, y el inhibidor selectivo saracatinib, al combinarse con lapatinib, disminuyó la proliferación y migración celular, así como la formación de metástasis pulmonares. Sorprendentemente, Src interactuó más con EGFR que con HER2 en células resistentes. La inhibición de EGFR con cetuximab, junto a saracatinib y lapatinib, logró reducir sinérgicamente la supervivencia y migración celular.²⁴⁷ Adicionalmente, la activación de YES1, un miembro de la familia de Src, también contribuyó a la resistencia al lapatinib, y su eliminación suprimió la fosforilación de Src, re-sensibilizando a las células resistentes. Este efecto también se replicó al inhibir YES1 con dasatinib, lo que redujo la señalización a través de HER2, AKT y MAPK.¹⁶⁹

La proteína tirosina quinasa 6 (PTK6), también conocida como BRK, es un regulador citoplasmático, no receptor de membrana, que se coexpresa y coamplifica con HER2 en cánceres de mama HER2 positivos. La interacción de HER2 con PTK6 incrementa su actividad quinasa, potenciando la señalización Ras/MAPK y la actividad ciclina E/CDK2. La amplificación del gen CCNE1, que codifica la ciclina E/CDK2, se ha asociado con una mayor inestabilidad genómica y peor pronóstico, presentándose en un 7.6% de los cánceres HER2 positivos.²⁴⁸ En un modelo murino de CM, se observó que la expresión de PTK6 acortaba la latencia de los tumores inducidos por HER2 e inducía resistencia a lapatinib.²⁴⁹ Parece que PTK6 impulsa la proliferación debido a la formación de un complejo de señalización HER2/PTK6/Src activo, ya que la depleción de PTK6 interrumpe la asociación de Src con el receptor ErbB2 condicionando una menor activación de las vías Src y MAPK/ERK.²⁵⁰ Las células sensibles a lapatinib inducen la apoptosis aumentando los niveles de Bim, una proteína proapoptótica de la familia Bcl2, mientras que en células resistentes no se inducía. La disminución de PTK6 incrementó la expresión de Bim reactivándose la apoptosis mediante la activación de p38.²⁵¹ En conjunto, estos estudios sugieren que PTK6 es un regulador crítico de la tumorigénesis mediada por HER2 y que por tanto podría ser una diana en el CM ErbB2-positivo.

-Por activación de quinasas múltiples:

La resistencia adquirida a lapatinib puede también estar ligada a la activación de múltiples TK comprometiendo así la eficacia de los TKIs específicos.

Un estudio que utilizó "multiplexed inhibitor beads" acopladas a espectrometría de masas (MIB/MS) reveló una heterogeneidad considerable en la respuesta del quinoma a lapatinib. Se evidenció que células resistentes exhiben una unión significativa a receptores quinasas, como DDR1, EPHB3 y FGFR2, y quinasas no receptoras como JAK1, FAK1, FRK y YES. Adicionalmente había quinasas implicadas en la regulación del citoesqueleto: MYLK3, NEK9, MARK2, MRCKB, LIMK2. Ya que no es posible todas las quinasas, se propone una estrategia que se dirige factores epigenéticos, como las proteínas *Bromodomain and Extra-Terminal domain* (BET), que modulan la estructura de la cromatina y regulan la expresión génica. Así, la combinación de inhibidores de BET con lapatinib, inhibía la transcripción de las quinasas implicadas en la resistencia como HER3, IGF1R, DDR1, MET y FGFR, entre otras, impidiendo la reactivación de AKT y el crecimiento en células de CM HER2 positivo.²⁵²

Otro mecanismo de resistencia a trastuzumab y lapatinib es la sobreexpresión de las quinasas de supervivencia PRKACA y PIM1. PRKACA y PIM1 inactivan la proteína proapoptótica BAD, permitiendo así la supervivencia de las células a través de BCL-XL. El bloqueo farmacológico de BCL-XL/BCL-2 revirtió parcialmente el efecto de PRKACA y

PIM1 y resensibilizó a las células al tratamiento con lapatinib sugiriendo una posible nueva vía para superar la resistencia a tratamiento anti-HER2.²⁵³

-Restitución de la vía asociada a ligando:

Las células tumorales suelen expresar múltiples receptores TK (RTK) cuya señalización converge en efectores críticos comunes de supervivencia celular como PI3K y MAPK. La producción autocrina de ligandos como la neuregulina-1 (NRG1) y la heregulina (HRG) puede contribuir a la resistencia a los TKIs.²⁵⁴ En líneas celulares de CM con amplificación de HER2, la neuregulina-1 (NRG1, que es el principal ligando de HER3) confiere resistencia completa a lapatinib, mientras que la heregulina (HRG) confiere una resistencia parcial. La reducción de HER3 resensibiliza a las células a lapatinib, indicando que la resistencia está relacionada con la activación de AKT por HER3.²⁵⁵ Otro estudio evidenció que la presión del tratamiento favorecía que a través de la HRG las células inicialmente sensibles se hacían resistentes a lapatinib por un cambio en las vías de señalización HER2-HER3-PI3K en las células sensibles a HER3-EGFR-PI3K-PDK1 en las resistentes. Además, el aumento de la expresión de HRG fue un factor independiente de mal pronóstico pacientes *con* CM HER2 positivo.²⁵⁶

-Por la vía de los estrógenos:

Otro mecanismo de resistencia a lapatinib está relacionado con el cruce (*cross-talk*) de señalización entre HER2 y la vía del receptor de estrógenos (RE). El RE actúa principalmente como factor de transcripción activado por ligando. La unión del ligando activa el RE, que se homodimeriza y se une a secuencias específicas de ADN, regulando la expresión de genes implicados en la proliferación, la inhibición de la apoptosis, la invasión y la metastatización.²⁵⁷ Se ha descrito un aumento de la señalización a través del RE en tumores HER2+/ER+ tratadas únicamente con lapatinib, lo que sugiere una transición de dependencia de la vía HER2 a una codependencia en ambas vías, generando insensibilidad a lapatinib. La activación de ER implica la activación de FOXO3A y caveolina-1, como resultado de la inhibición de PI3K/Akt. La combinación de antiestrógenos con lapatinib previene el desarrollo de resistencias en líneas celulares.²⁵⁸ Este mecanismo de adaptación se asocia con un aumento de la proteína antiapoptótica Bcl-2, contribuyendo a la resistencia celular. Incluso, se encontró en un 18% de tumores inicialmente RE negativos una positivización del RE tras el tratamiento con lapatinib.²⁵⁹ Estos estudios confirman la estrategia de la combinación de lapatinib con la inhibición de la señalización del RE para evitar el desarrollo de la resistencia adquirida por este relevante mecanismo.

Resistencia asociada a mutaciones del dominio TK de HER2:

Se han identificado mutaciones en el dominio de la quinasa HER2 en aproximadamente el 2-3% cánceres de mama tanto HER2 positivos como negativos que principalmente incluyen sustituciones de aminoácidos individuales en las regiones estructurales responsables de la activación de la quinasa HER2.^{260,261} En un estudio se descubrieron hasta 15 nuevas mutaciones de HER2, incluyendo L768S y V773L que se encontraron exclusivamente en tumores HER2 negativos, y K753E presente en muestras HER2 positivas. Las mutaciones L768S y V773L se consideran como activadoras al igual que las mutaciones D769Y y D769H que aumentan la dimerización HER2-HER3. Las mutaciones K753E y L755S se identificaron como inductoras de resistencia a lapatinib por dificultar

su unión al receptor. Las líneas celulares con expresión de la mutación K753E eran resistentes a lapatinib pero podían ser inhibidas por neratinib, lo que sugería un mecanismo específico de resistencia superado por neratinib debido a su diferente estructura y su unión irreversible al receptor.²⁶² Otras mutación en el dominio TK de HER2 identificadas con asociación a resistencia a lapatinib son T798I y con menos frecuencia L726F, caracterizada por la sustitución de leucina por fenilalanina.²⁶¹

Amplificación génica:

La amplificación de otros genes distintos a HER2 puede constituir otro mecanismo de resistencia a lapatinib. Se ha identificado como la amplificación y sobreexpresión de NIBP (TRAPPC9, complejo de tráfico de partículas proteicas 9) y TP53INP1, puede estar presente en hasta el 11% de cánceres de mama HER2 positivos confiriendo resistencia a lapatinib a través de la vía NF-κB. Al inhibir el NIBP, las líneas celulares resistentes se sensibilizaron al lapatinib.²⁶³

Activación de ciclo celular:

La alteración de la regulación del ciclo celular se ha descrito como un mecanismo de resistencia a lapatinib. El incremento de un microARN implicado en la regulación del ciclo celular, miR-221, se ha relacionado con la resistencia a lapatinib. En respuesta a lapatinib se incrementan los niveles de miR-221 a través del eje de señalización Src/NF-κB suprimiendo la expresión de p27^{kip1} que a su vez induce el arresto del ciclo celular impidiendo la apoptosis celular como mecanismo de resistencia. La inhibición de miR-221 reestablecía la sensibilidad a lapatinib.²⁶⁴

Otra proteína implicada en el ciclo celular y la resistencia a lapatinib es CDK12 cuya inhibición puede resensibilizar a tumores resistentes.¹⁴³

Resistencia por cambios metabólicos:

El transportador de ácidos grasos CD36 es esencial para la supervivencia de células de CM HER2 positivas y puede contribuir a la resistencia a lapatinib. Su sobreexpresión en células resistentes promueve la entrada de ácidos grasos exógenos y un reordenamiento metabólico. La inhibición de CD36 resensibiliza a lapatinib y su expresión se asocia con mal pronóstico clínico, reforzando su papel como mecanismo de resistencia.¹⁵⁹

1.7.2.2. Neratinib

MECANISMOS DE ACCIÓN

Neratinib (HKI-272), es un TKI irreversible de HER1, HER2 y HER4. Inhibe la fosforilación de los receptores de la familia HER, así como las vías de señalización dependientes de ellos, incluyendo ERK y PI3K/AKT, mediante la unión covalente con los residuos de cisteína Cys-773 y Cys-805 del dominio de unión a ATP intracelular de HER1, HER2 y HER4. La inhibición de la transducción de la señal de la vía tras el tratamiento con neratinib provoca una reducción de la expresión de la proteína retinoblastoma fosforilada y de la ciclina D1, así como un aumento del nivel de p27, y a continuación detiene la transición de fase G1-S, lo que finalmente da lugar a una disminución de la proliferación celular. Además, puede disminuir la expresión de HER2 mediante la disociación de HSP90 y la posterior inducción de la ubiquitinación y la degradación endocítica del receptor. Por otra parte, puede inhibir el transportador de casetes de

unión ATP ("*ATP-binding cassette transporter*") implicado en la bombas de expulsión de fármacos y, por tanto, en teoría podría revertir la resistencia a múltiples fármacos antitumorales.²⁶⁵

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Se han descrito diversos mecanismos de resistencia a neratinib. Un estudio funcional del genoma de células de CM HER2 positivas mediante un cribado con ARNi, tratándolas con dosis letales de neratinib, identificó grupos de genes asociados a resistencia. Encontraron múltiples genes, entre ellos genes implicados en la oncogénesis (p. ej., *RAB33A*, *RAB6A* y *BCL2L14*), factores de transcripción (p. ej., *FOXP4*, *TFEC*, *ZNF*), transporte iónico celular (p. ej. *CLIC3*, *TRAPPC2P1*, *P2RX2*), ubiquitinación de proteínas (p. ej. *UBL5*), ciclo celular (p. ej. *CCNF*), y genes conocidos por interactuar con genes asociados al CM (p. ej. *CCNF*, *FOXP4*, *TFEC*, varios factores *ZNF*, *GNA13*, *IGFBP1*, *PMEPA1*, *SOX5*, *RAB33A*, *RAB6A*, *FXR1*, *DDO*, *TFEC*, *OLFM2*). Este análisis tan amplio permite establecer hipótesis de posibles mecanismos de resistencia, pero no identifica ningún biomarcador que permita la selección de pacientes que pueden beneficiarse o no del tratamiento con neratinib.²⁶⁶

Aumento del metabolismo:

En modelos de líneas de celulares de CM con resistencia inducida a neratinib, se evidenció resistencia cruzada a trastuzumab, lapatinib y afatinib. Las células resistentes a neratinib presentaban una mayor agresividad en su crecimiento con un incremento significativo en la actividad enzimática del citocromo CYP3A4 en comparación a las células sensibles. Además, el uso de ketoconazol, un inhibidor del CYP3A4, restauró parcialmente la sensibilidad a neratinib en células resistentes.²⁶⁷

Mutaciones de resistencia:

Las mutaciones secundarias en el receptor de HER2 pueden suponer un mecanismo de resistencia adquirido a neratinib. Así, la adquisición de la mutación T798I en una paciente que presentaba inicialmente la mutación L869R que había respondido a neratinib, reducía la capacidad de unión al receptor como mecanismo de resistencia y podía ser revertida con otros inhibidores irreversibles como afatinib.²⁶⁸ A través de estudios de secuenciación genómica y modelos estructurales, se identificaron mutaciones de resistencia adicionales como T862A y L755S, que también dificultan la unión de neratinib, activando HER2. Además, se encontraron mutaciones dobles como T862A y L755S en células con señalización MEK/ERK reforzada, las cuales fueron sensibles a otros TKIs, como poziotinib.²⁶⁹

Redundancia de vías de señalización:

El escape del bloqueo de la vía de señalización es un mecanismo de resistencia a neratinib como en otras terapias anti-HER2. Un estudio sobre células y PDX con resistencia inducida a neratinib identificó la señalización mTORC1 como mecanismo de resistencia. Se relacionó el incremento de RAS con la hiperactividad de mTORC1. La supresión genética de RAPTOR o RHEB que son componentes críticos en el complejo de señalización de mTOR1 y la combinación del inhibidor de mTORC1 everolimus y neratinib detuvo el crecimiento de modelos resistentes.²⁷⁰

La expresión de SorLA, un receptor transmembrana de tipo 1 con un papel crucial en el tráfico intracelular de proteínas, se ha asociado a la resistencia a neratinib, en particular en las metástasis cerebrales. SorLA favorece el tráfico del receptor HER2 a la membrana plasmática, aumentando la señalización. Además, interactúa con HER3, formando un complejo trimérico con HER2 y HER3, que atenúa la degradación lisosomal del dímero HER2-HER3, favoreciendo la señalización a través de la vía MAPK. Mediante el silenciamiento de SorLA se resensibilizaron a neratinib modelos in vitro como in vivo.²⁷¹

Activación de otras vías de señalización alternativas:

Se ha descrito la activación de otras vías alternativas como mecanismo de resistencia a neratinib.

La activación de la vía de la transglutaminasa tisular 2 (TG2) se ha identificado como un mecanismo de resistencia adquirida. La vía de TG2 desempeña varias funciones en la biología tumoral, estabilizando la matriz extracelular y favoreciendo la creación de nichos premetastásicos. La inhibición de la vía HER2 por neratinib induce el aumento de TG2 que activa el factor nuclear kappa-B (NF-kB) mediante la reticulación de IκBα, lo que impide su secuestro citoplasmático. Se produce así un aumento de la señalización proinflamatoria NF-kB que contribuye a inducir cambios en el microentorno tumoral. Además, el aumento de TG2 en células metastásicas induce la producción de interleucina-6 (IL-6), lo que conduce a la activación constitutiva de la señalización JAK-STAT3 y a una retroalimentación que mantiene los niveles elevados de TG2. De este modo se favorece la resistencia y la progresión tumoral mediante el establecimiento de un fenotipo similar al de las células madre. En modelos animales, la combinación de ruxolitinib, un inhibidor de JAK-STAT3, con neratinib impidió el desarrollo de este mecanismo de resistencia.²⁷²

Asimismo, la resistencia a neratinib también puede ser inducida por la activación de YES1, una TK no receptora de la familia Src. Se ha observado amplificación de YES1 en células resistentes, que se une y activa HER2, induciendo la señalización a través de AKT y MAPK. La eliminación o inhibición de YES1 mediante dasatinib suprime esta señalización y restablece la sensibilidad a neratinib.²⁷³

Resistencia asociada a inhibición de vías apoptóticas:

En distintos modelos de células tumorales HER2 positivas, el aumento de MCL1 y la disminución de BIM y PUMA mediaron la resistencia a neratinib en unas, mientras que el aumento de las proteínas antiapoptóticas BCL-XL y BCL-2 y la disminución de BIM y PUMA promovieron la resistencia en otras. Los mecanismos de resistencia adquirida diferían entre las distintas células tumorales. La reactivación de ERK1/2 fue la principal responsable en las que presentaron aumento de MCL1, que respondieron a la adición de un inhibidor específico de ERK1/2 a neratinib o dacomitinib. Sin embargo, resultó insuficiente en las otras células en las que se había detectado aumento de BCL-2/BCL-XL. En este caso fue necesario añadir a la inhibición de ERK1/2 y neratinib un inhibidor selectivo de estas proteínas antiapoptóticas.²⁷⁴

1.7.2.3. Tucatinib

MECANISMOS DE ACCIÓN

Tucatinib es un TKI oral de HER2, potente, selectivo, reversible, que compite en el lugar de unión a ATP del receptor. Ha demostrado una selectividad >50 veces mayor para HER2 que para EGFR y atraviesa la barrera hematoencefálica. Es capaz de producir una potente inhibición de la transducción de señales de HER2 y HER3 a través de las vías PI3K/AKT y MAPK. Además, produce una citotoxicidad selectiva in vitro en líneas celulares de CM con amplificación de HER2. In vivo, tucatinib ha mostrado actividad en múltiples modelos tumorales HER2 positivos como agente único, pero muestra una mayor actividad antitumoral en combinación con otras terapias anti-HER2 como trastuzumab o con quimioterapia como docetaxel.²⁷⁵

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Los mecanismos de resistencia a tucatinib no han sido estudiados en tanta profundidad como los de lapatinib y neratinib, debido al desarrollo más tardío de esta molécula.

Entre los mecanismos de resistencia descritos hasta el momento destaca la hiperactivación de la vía de EGFR tanto por aumento de ligando como por amplificación del receptor. Mediante la estimulación de células inicialmente sensibles a tucatinib con EGF o TGF α , ligandos de EGFR, se inducía la resistencia al mismo. Sin embargo, los TKIs panHER que inhiben también EGFR o inhibidores específicos de EGFR, eran capaces de revertir esta resistencia. De manera similar al mecanismo de resistencia descrito con otras terapias anti-HER2, las células resistentes a tucatinib además presentaron ganancia de YES1, proteína con propiedades TK de la familia de proteínas Src. En cambio, a diferencia de con otros TKIs la eliminación de YES1 con siARN no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento y proliferación celular de las células resistentes, poniendo en duda en este caso su influencia en la resistencia.²⁷⁶

Del mismo modo que con lapatinib y neratinib, la mutación de HER2 L755S se ha relacionado con resistencia a tucatinib y por tanto puede conferir resistencia cruzada a estos TKIs. Se estudió la eficacia de tucatinib en células de CM HER2 positivas que presentaban la mutación sin que fuera capaz de inhibir el crecimiento de estas células, sugiriendo la resistencia al mismo. De hecho, estas células se mostraron resistentes también a trastuzumab.²⁷⁷

1.7.3. Conjugados Anticuerpo-Fármaco (Antibody-Drug-Conjugates, ADCs)

Los conjugados anticuerpo-fármaco o anticuerpos inmunoconjugados suponen un grupo de terapias innovadoras en el tratamiento del CM HER2 positivo que gracias a su especial estructura permiten hacer llegar de forma más eficiente los citotóxicos a las células tumorales (figura 5).²⁷⁸

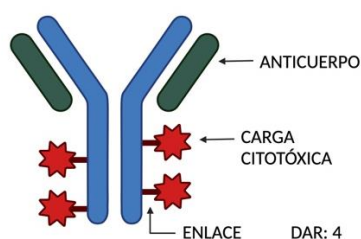


Figura 5. Estructura de un ADC (Antibody Drug Conjugate: conjugado anticuerpo-fármaco). Anticuerpo contra un epítipo tumoral, contra la proteína HER2 en terapias anti-HER2. Carga citotóxica generalmente muy potente. Enlace específico que puede ser más o menos estable. Cada ADC se caracteriza por tener un determinado número de cargas

citotóxicas por anticuerpo que se denomina *ratio droga-anticuerpo* (*Drug-to-antibody ratio: DAR*), en este caso sería de 4.²⁷⁸ Creado en <https://BioRender.com>.

Se caracterizan por sus tres componentes fundamentales. En primer lugar, poseen un anticuerpo contra un epítipo tumoral que idealmente sea lo más específico posible del tumor, principalmente contra la proteína HER2 en el caso de tumores HER2 positivos. A él se une un segundo componente que consiste en un citotóxico generalmente muy potente mediante el último constituyente, un enlace específico. Dependiendo del ADC, este enlace puede ser más o menos estable con unas propiedades que permitirán su escisión y la liberación de la carga citotóxica en unas circunstancias determinadas dentro de la célula o microambiente tumoral. Cada ADC se caracteriza por tener un determinado número de cargas citotóxicas por anticuerpo que se denomina *ratio droga-anticuerpo* (DAR).²⁷⁸ En la figura 6 se representa el mecanismo de acción de los ADCs.

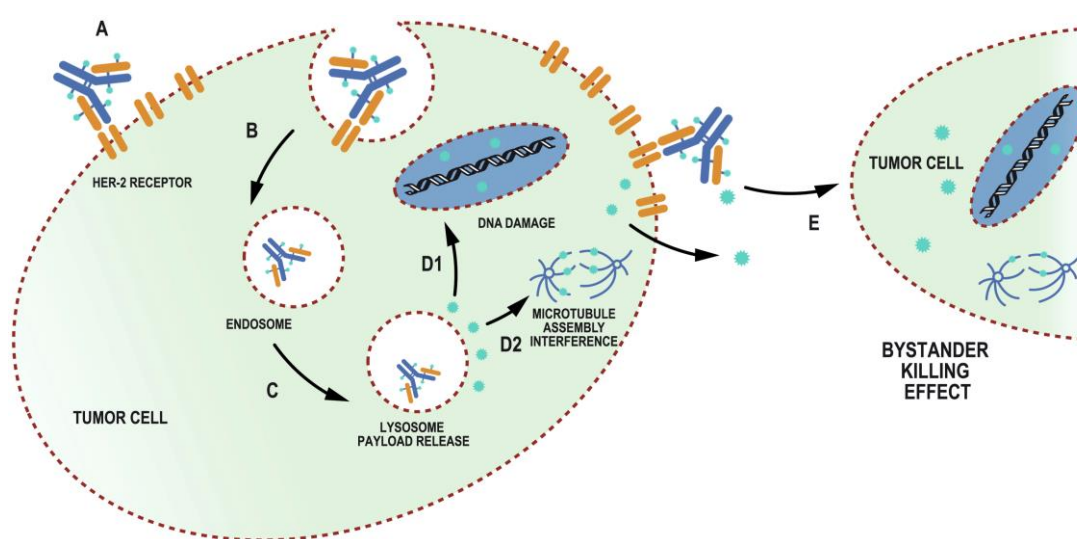


Figura 6. Mecanismo general de acción de un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). A: El anticuerpo se une al receptor HER2 (RT) en la célula tumoral e inicia el proceso de internalización. B: Endosome: El complejo ADC-RT forma un endosoma. C: Lysosome payload release: La degradación lisosomal del endosoma libera la carga citotóxica en el citoplasma. D: La carga citotóxica produce diversos efectos citotóxicos, como los siguientes: D1, DNA damage: daño en el ADN, como ocurre con el inhibidor de la topoisomerasa I en el trastuzumab deruxtecan; D2, Microtubule assembly interference: interferencia en el ensamblaje de los microtúbulos, como ocurre con el DM1 en el trastuzumab emtansina; y E, Bystander killing effect: efecto de muerte indirecta en células tumorales vecinas que no expresan el antígeno. Tras la liberación de la carga citotóxica en el microambiente tumoral por las proteasas, la carga citotóxica, con permeabilidad de la membrana celular, exhibe efectos citotóxicos en las células tumorales vecinas. Tumor cell: Célula tumoral.⁴²

1.7.3.1. Trastuzumab Emtansina (T-DM1)

Trastuzumab emtansina es un ADC de primera generación compuesto por el anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2 trastuzumab conjugado mediante un enlace tioéter de maleimidometil ciclohexano-1-carboxilato (MCC) no escindible a DM1, una citotoxina altamente potente. DM1 es un derivado de la toxina maytansinoide de origen natural, que inhibe la polimerización de la tubulina e induce la muerte de células en proliferación. DM1 tiene una ventana terapéutica estrecha como agente único, pero su combinación con trastuzumab, con una media de 3,5 moléculas por anticuerpo (DAR de 3,5), amplía considerablemente esta ventana, ya que dirige selectivamente la carga citotóxica a las células tumorales HER2 positivas.²⁴

MECANISMOS DE ACCIÓN

La estructura de T-DM1 le confiere unas propiedades que dan lugar a múltiples mecanismos de acción. Se relacionan con la administración selectiva de DM1 a las células tumorales HER2 positivas, la inhibición de la señalización HER2 mediada por trastuzumab, la inhibición de la liberación del dominio extracelular de HER2 e incluyen los mecanismos asociados a la respuesta inmune como la ADCC.

Administración selectiva y citotoxicidad por DM1:

La selectividad tumoral de T-DM1 viene conferida por la especificidad de trastuzumab al subdominio IV del receptor HER2 en la superficie de las células tumorales. Tras la unión a este epítipo extracelular, el complejo ADC-receptor se internaliza en endosomas por endocitosis mediada por el receptor. Las vesículas endocíticas maduran y se fusionan con el lisosoma o se reciclan para transportar el complejo ADC-receptor de vuelta a la membrana plasmática. La degradación de T-DM1 en el lisosoma provoca la liberación de lisina-MCC-DM1, que es impermeable a la membrana debido a que, al ser derivado de la lisina, el complejo está cargado positivamente. Por este motivo, la lisina-MCC-DM1 requiere un transporte activo para atravesar la membrana del lisosoma antes de que pueda ejercer su efecto citotóxico en el citoplasma. Además, del mismo modo tiene una capacidad limitada para inducir un efecto citotóxico secundario en células tumorales adyacentes que sean negativas al antígeno por la dificultad de difusión del complejo citotóxico a través de la membrana celular. El complejo lisina-MCC-DM1 liberado por los lisosomas se une a la tubulina para impedir la polimerización de los microtúbulos por DM1. Así, DM1 impide el ensamblaje de un huso mitótico funcional, lo que provoca la separación de los cinetocoros, la detención del ciclo celular en metafase formándose células multinucleadas y figuras mitóticas aberrantes, y la catástrofe mitótica final.²⁷⁹

Mecanismos de acción mediados por trastuzumab:

Se ha demostrado que T-DM1 mantiene los mecanismos de acción del trastuzumab ampliamente descritos en el apartado correspondiente del manuscrito. Entre ellos destacan el bloqueo de las vías de señalización de HER2, la inhibición del desprendimiento del ectodominio de HER2 y la activación de la inmunidad antitumoral innata y adaptativa.

Las acciones antitumorales de T-DM1 dependiente de trastuzumab podrían ser más relevantes si las concentraciones intracelulares de lisina-MCC-DM1 son insuficientes para inducir directamente la citotoxicidad. Sin embargo, al considerar la contribución relativa de trastuzumab a la actividad antitumoral de T-DM1, es importante tener en cuenta que es probable que la exposición a trastuzumab en pacientes tratadas con T-DM1 sea inferior a las de las pacientes tratadas con trastuzumab, ya que la dosis clínica de T-DM1 es inferior a la de trastuzumab (3,6 mg/kg en comparación con 6 mg/kg cada 3 semanas), aunque no se ha establecido la influencia que pueda tener en la eficacia de T-DM1.²⁷⁹

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Tal y como se refleja en los mecanismos de acción, T-DM1 ejerce su actividad tanto a través de trastuzumab como de DM1. Así, la resistencia primaria y adquirida observada

a T-DM1 podría deberse a la interferencia con la acción de uno o ambos componentes de este ADC. Se han investigado experimentalmente varios mecanismos potenciales de resistencia a T-DM1, relacionados con la alteración de los efectos mediados por trastuzumab, el tráfico intracelular y el metabolismo de T-DM1 y la alteración de la citotoxicidad mediada por DM1.

Supresión de los efectos mediados por trastuzumab:

-Por pérdida de expresión del receptor HER2:

La eficacia y seguridad de trastuzumab y T-DM1 dependen de una mayor expresión de HER2 en las células tumorales en comparación con los tejidos periféricos. La pérdida de expresión de HER2 en células tumorales se considera un mecanismo de resistencia a trastuzumab. Esta reducción también podría comprometer la unión e internalización de T-DM1, limitando su actividad y citotoxicidad.¹⁹² En este sentido, se ha observado una disminución de la expresión de HER2 en relación con las células parentales en una amplia gama de líneas celulares seleccionadas para la inducción de resistencia a T-DM1 mediante una exposición prolongada al mismo. En una de estas líneas celulares de CM con resistencia inducida a T-DM1, la restauración de la expresión de HER2 mediante transfección fue capaz de revertir la resistencia, apoyando la importancia de los niveles de expresión de HER2 en la sensibilidad a T-DM1.²⁸⁰ Este mecanismo también se ha evidenciado en un estudio de ADN tumoral circulante en pacientes con CM HER2 positivo metastásico, donde la pérdida de amplificación de HER2 en ADN circulante se correlacionó con la resistencia primaria a T-DM1.²⁸¹

-Por disminución de la unión de T-DM1 al receptor:

La actividad de T-DM1 depende de la unión a HER2 en la membrana de la célula tumoral. Esta afinidad podría verse comprometida si la proteína HER2 se encuentra truncada como en el caso de la variante p95 del receptor, aunque no está claro su participación fundamental como mecanismo de resistencia en el caso de T-DM1.²⁸²

La sobreexpresión de la glicoproteína de membrana MUC4 es otro mecanismo de resistencia descrito con trastuzumab, pero no confirmado con T-DM1.²⁰⁰

T-DM1 se caracteriza por tener un enlace no escindible, por lo que la endocitosis es fundamental para la escisión de la carga citotóxica en la célula tumoral y la alteración en los mecanismos de internalización puede promover la resistencia. Así, el aumento en los niveles de caveolina-1 (CAV1), una proteína que es crucial para la endocitosis puede interferir con el transporte intracelular de T-DM1. La internalización de T-DM1 en compartimentos caveolares impediría su procesamiento por el lisosoma y la liberación de su carga citotóxica DM1. Al tratar estas células con ADCs también basados en trastuzumab, pero con enlaces escindibles, se reestablecía la sensibilidad.²⁸³

-Por alteración en la vía de señalización PI3K:

Las mutaciones activadoras de la vía de PI3K en el gen PIK3CA y la pérdida de la función reguladora de PTEN son frecuentes en el CM HER2 positivo, pudiendo estar presentes en el 42 y 19% de los casos respectivamente impactando en la eficacia de trastuzumab y lapatinib.²⁸⁴ Sin embargo, no está clara su influencia como mecanismo de resistencia a T-DM1, ya que a nivel clínico no se asociaron con peor pronóstico en cuanto a SLP y SG en las pacientes con CMM HER2 positivo tratadas en los estudios pivotaes EMILIA y TH3RESA.^{285,286} Además, no se ha demostrado en modelos preclínicos la influencia de

estas mutaciones, sugiriendo la mayor importancia de la citotoxicidad mediada por DM1 que del bloqueo de la señalización de la vía.²⁸⁰

-Por señalización de vías alternativas de otros receptores tirosina quinasa:

Trastuzumab bloquea la homodimerización de HER2 sin inhibir la heterodimerización de HER2 inducida por ligandos.⁹⁸ Así, permite que se restablezca la señalización a través de las vías de PI3K y MAPK mediante la heterodimerización con EGFR y HER3, que puede inhibirse con la adición de pertuzumab. Aunque la administración exógena del ligando de HER3 neuregulina-1 β puede suprimir la citotoxicidad mediada por T-DM1 en líneas celulares HER2-positivas, y este efecto puede invertirse añadiendo pertuzumab, no se ha confirmado que estas estrategias de combinación aumenten significativamente el efecto de T-DM1 en ensayos clínicos.²⁸⁷⁻²⁸⁹

La señalización a través de EGFR no ha demostrado tener influencia en la resistencia a T-DM1 en modelos preclínicos. De hecho, ni la silenciación del receptor, ni el uso de cetuximab revertieron la resistencia a T-DM1 en células con sobreexpresión de EGFR. Tampoco indujo resistencia a T-DM1 la adición de TGF α , un ligando de EGFR. Sin embargo, en el ensayo EMILIA, el aumento en la expresión de ARNm de EGFR se asoció a menor SLP y SG en las pacientes tratadas con T-DM1. Por lo tanto, no se puede descartar que EGFR pueda tener algún papel en la resistencia a T-DM1.²⁸⁵

-Por alteración de los efectos inmunomediados:

Los datos clínicos demuestran que el estado inmunológico de los tumores influye en la actividad del trastuzumab. Se observó una menor respuesta a trastuzumab en pacientes con CM HER2 positivo con altos niveles de células T reguladoras infiltrantes inmunosupresoras y expresión de proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) y su ligando PD-L1.²⁹⁰

Aunque la evidencia sobre T-DM1 es limitada, estudios preclínicos indican que su combinación con anticuerpos anti-PD-L1 y CTLA-4 mejora significativamente la eficacia y puede inducir memoria de células T por un mecanismo diferente a trastuzumab.²⁹¹ A nivel clínico, la combinación de T-DM1 con atezolizumab, un anticuerpo inhibidor de PD-L1, aumento la SLP en pacientes con CMM HER2 positivo que además presentaban positividad para PD-L1.²⁹² T-DM1 se ha combinado también con pembrolizumab sin que en este caso se pudiera correlacionar la expresión de PD-L1 o de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) con la respuesta. Por tanto, aún está por definir el papel de la combinación de T-DM1 con inhibidores de los puntos de control inmunitario en el tratamiento de las pacientes con CM HER2 positivo.²⁹³

Heterogeneidad intratumoral en la expresión y accesibilidad de HER2:

La heterogeneidad intratumoral en la expresión de HER2 puede impactar sobre la eficacia de T-DM1.²⁹⁴ El impacto de la heterogeneidad se investigó prospectivamente en un estudio de fase 2 neoadyuvante de un solo brazo de T-DM1 más pertuzumab. Se definió como la positividad HER2 por FISH en el 5-50% de las células tumorales en al menos uno de los seis cilindros de biopsia obtenidos por tumor, o presencia de un área tumoral HER2 negativa. De 157 pacientes evaluables, solamente diez cumplieron criterios de heterogeneidad HER2 intratumoral, de ellas ninguna mostró respuesta

patológica completa (pCR).¹⁴ Además, se exploró la heterogeneidad intra e interpaciente en el contexto metastásico antes de iniciar T-DM1 mediante PET-TAC con el trazador 89Zr-trastuzumab. De 56 pacientes evaluadas, el 46% mostró patrones de captación que sugerían heterogeneidad, con una captación de 89Zr-trastuzumab en menos de la mitad de su volumen tumoral. Este grupo presentó un tiempo al fallo del tratamiento con T-DM1 significativamente menor en comparación con pacientes con captación más homogénea.²⁹⁵

Por alteración en el tráfico intracelular:

-Alteración de la internalización de los complejos HER2-T-DM1:

Para poder ejercer correctamente su efecto antitumoral, una vez que T-DM1 se ha unido al receptor HER2, el complejo debe internalizarse en los endosomas antes de pasar a los lisosomas. Alteraciones en este proceso pueden suponer un mecanismo de resistencia. Un mayor reciclaje de los endosomas que contienen el complejo HER2-T-DM1 hacia la membrana plasmática, sin llegar al lisosoma, podría reducir su actividad antitumoral. Este efecto de reciclaje rápido ha sido observado tras la unión de trastuzumab y se evidenció en líneas celulares resistentes a T-DM1, donde también se evidenció una disminución en los niveles globales de HER2 que pudo contribuir a la resistencia.^{280,296}

La endofilina A2 es una proteína de andamiaje endocítico que promueve la internalización y degradación de los complejos HER2-trastuzumab fuera del lisoma, facilitando la liberación de DM1 y la inducción de muerte celular. Su sobreexpresión se asocia con una menor supervivencia en CM HER2 positivo. El silenciamiento de esta proteína aumenta los niveles de HER2 en la superficie celular, reduciendo la señalización y la migración por compromiso en su internalización, disminuyendo así la citotoxicidad de T-DM1. Por lo tanto, la endofilina A2 podría marcar resistencia a trastuzumab, pero indicar sensibilidad intrínseca a T-DM1, aunque se requieren más estudios para determinar la relevancia de este mecanismo.²⁹⁷

Otro posible mecanismo de resistencia es la endocitosis mediada por caveolina (CAV-1), que podría facilitar la internalización de T-DM1 y limitar su transporte a los lisosomas. En células resistentes a T-DM1, se observó sobreexpresión de CAV-1 y cavina-1, con una mayor colocalización de CAV-1 y T-DM1 y un menor secuestro lisosomal en comparación con células sensibles. Sin embargo, eliminar CAV-1 no logró resensibilizar a las células resistentes, sugiriendo otros mecanismos adicionales implicados.²⁹⁸ Contrariamente, otros estudios indican que la sobreexpresión de CAV-1 puede aumentar la sensibilidad a T-DM1.²⁹⁹ Esta disparidad evidencia la necesidad de seguir investigando el papel de la endocitosis mediada por caveolina en la resistencia clínica a T-DM1.

- Tránsito anormal de HER2-T-DM1 a través de la vía de maduración endosomal:

La maquinaria celular que media en la internalización y transporte de los complejos HER2-T-DM1 es poco conocida. Hay proteínas implicadas en el transporte de vesículas o la remodelación del citoesqueleto, como la proteína 1 activadora de la GTPasa RAB (RABGAP1), la quinasa 4 activada por p21 (PAK4) y la proteína ligasa 1 de ubiquitina E3 con dominio HECT (HECTD1), cuya sobreexpresión se evidencia en modelos celulares de resistencia a T-DM1. No está claro si estos cambios son la causa o la consecuencia de la resistencia al fármaco.²⁸⁰

Por trastorno en el metabolismo de T-DM1:

- Trastorno del catabolismo lisosómico de los complejos HER2-T-DM1:

Los lisosomas, que dependen de la bomba de protones V-ATPasa para mantener un pH ácido, son cruciales para la actividad de T-DM1, ya que este fármaco requiere un entorno ácido para liberar el DM1 y ejercer su citotoxicidad. En células HER2 positivas de carcinoma gástrico resistentes a T-DM1, se observó menor acidificación lisosomal y concentraciones reducidas de lisina-MCC-DM1. La inhibición de V-ATPasa con bafilomicina A1 indujo resistencia a T-DM1 que fue revertida con un ADC con un enlace escindible, sugiriendo que la alteración de esta actividad contribuye a la resistencia.³⁰⁰ Asimismo, en modelos celulares de CM resistentes a T-DM1 se encontró un acúmulo de T-DM1 en lisosomas con elevado pH, así como una menor actividad de cathepsina B que es un enzima proteolítico del lisosoma cuya actividad depende del pH.³⁰¹

-Alteración de la liberación lisosomal de lisina-MCC-DM1:

La lisina-MCC-DM1 requiere transporte activo para entrar en el citoplasma y ejercer su función, ya que no puede difundir pasivamente a través de la membrana lisosomal.³⁰² En un estudio se identificó el gen SLC46A3 que codifica una proteína de la membrana del lisosoma capaz de transportar catabolitos de fármacos basados en la maytansina. Su supresión redujo la potencia de TDM1 y otros ADCs cuya carga citotóxica era DM1 sin afectar a otros ADCs cargados con citotóxicos alternativos, lo que indica que es probable que el propio DM1 sea un sustrato para SLC46A3.³⁰³ Otros estudios revelaron la pérdida de expresión de SLC46A3 en células resistentes a T-DM1, en las que pudo restaurarse la sensibilidad forzando la expresión de SLC46A3.^{304,305} El bloqueo de SLC46A3, cuya expresión suele ser alta en células de CM, redujo notablemente la sensibilidad a T-DM1. Por lo tanto, SLC46A3 podría ser un biomarcador para predecir la sensibilidad a T-DM1, donde niveles bajos sugieren un uso más adecuado de ADCs con citotóxicos alternativos a DM1 que no dependan de este transporte.³⁰⁴

Por alteración de la citotoxicidad mediada por DM1.

- Reducción de la citotoxicidad mediada por DM1, aumento de la expresión de transportadores de membrana de expulsión de fármacos:

DM1 y otros maytansinoides son sustratos de los transportadores de membrana de expulsión de fármacos que pueden conferir resistencia a múltiples fármacos. En líneas celulares resistentes a T-DM1 se ha observado un incremento de la expresión de *ABCC1* (que codifica la proteína 1 asociada a la multirresistencia a fármacos [MRP1]), *ABCC2* (MRP2), *ABCC4* (MRP4), *ABCB1* (glicoproteína 1 de multirresistencia a fármacos [MDR1]) y *ABCG2* (proteína de resistencia al CM [BCRP]), lo que favorece la expulsión de DM1 impidiendo su acción citotóxica intracelular.^{280,305} La inhibición farmacológica de MRP1, MRP2 y MDR1 fue capaz de revertir la resistencia de T-DM1, mientras que la inhibición de BCRP y la supresión de ABCC4 no lo hicieron. Para evadir esta resistencia, se desarrolló un ADC sustituyendo el enlace SMMC de T-DM1 por PEG4Mal, que aumenta la retención de DM1 en células con MDR1 y aumenta su efecto citotóxico. Estos ADCs resultaron más eficaces que T-DM1 en modelos murinos.³⁰⁶ No obstante, no parece que este mecanismo de resistencia se encuentre entre los principales.^{279,301}

- Alteración de la citotoxicidad mediada por DM1: escape de la catástrofe mitótica y la apoptosis:

La citotoxicidad de DM1 depende de la formación incompleta del huso mitótico en la célula tumoral en mitosis (fase M), lo que provoca una catástrofe mitótica y apoptosis. Las células que adquieren la capacidad de evitar este proceso podrían adquirir resistencia a T-DM1. Un mecanismo es la reducción de la inducción de ciclina B1, esencial para la activación de CDK1, lo que permite la progresión del ciclo celular a pesar de un huso defectuoso y evita la catástrofe mitótica, promoviendo inestabilidad genética y un fenotipo más maligno.²⁷⁹

En dos estudios, el tratamiento con T-DM1 aumentó la fracción de células que se detuvieron en la fase G2/M mediante una expresión elevada de ciclina B1. En cambio, en clones resistentes de las mismas líneas celulares no se observó un aumento de la expresión de ciclina B1 ni de la actividad de CDK1, con una detención mínima en la fase G2/M que conllevó a una atenuación de la catástrofe mitótica y la apoptosis. La supresión de CDC20 para aumentar la expresión de ciclina B1 revirtió la resistencia en células resistentes, mientras que su supresión en células sensibles indujo resistencia. Se ha observado un aumento significativo de la expresión de la quinasa mitótica *polo-like quinasa 1* (PLK1) en células resistentes a T-DM1. Se ha sugerido que PLK1 desempeña un papel en la finalización de la mitosis a pesar de la presencia de un huso mitótico anormal al impedir la activación de CDK1. La inhibición de PLK1 con volasertib revirtió la resistencia a T-DM1.^{307,308}

1.7.3.2. Trastuzumab Deruxtecan (T-DXd)

Trastuzumab deruxtecan es un ADC de tercera generación dirigido a HER2. Está compuesto por un anticuerpo anti-HER2 con la misma estructura que trastuzumab y un derivado del DX-8951 (DXd), un inhibidor de la topoisomerasa I, que están unidos por un enlace peptídico maleimídico de glicilenglicina-fenilalanina-glicina (GGFG). La carga citotóxica DXd se conjuga con el anticuerpo a través de los residuos de cisteína, tras reducir los enlaces disulfuro entre cadenas con un agente reductor, el clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP HCl). Dado que el tetrapéptido es descompuesto por enzimas lisosomales como las catepsinas B y L, que están altamente expresadas en las células tumorales, el T-DXd es procesado por las enzimas lisosomales y libera DXd que ejerce su efecto citotóxico. De este modo ataca a las moléculas diana específicamente en las células tumorales después de unirse a los receptores HER2 y es internalizado en las células tumorales. Se determinó que el DAR del T-DXd era de aproximadamente 8, que es el número máximo teórico de carga de fármaco por molécula de ADC para la conjugación convencional de cisteína entre cadenas.²⁶

MECANISMOS DE ACCIÓN

Los mecanismos de acción descritos para trastuzumab deruxtecan son diversos y no han sido estudiados en tanta profundidad como los de T-DM1.

Unión al receptor, internalización de trastuzumab deruxtecan e inducción de daño al ADN:

De manera similar al T-DM1, T-DXd está diseñado para dirigirse a los receptores HER2 de las células tumorales mediante la unión de trastuzumab al dominio extracelular de la proteína. Al unirse a HER2, el ADC se internaliza en las células tumorales mediante endocitosis mediada por el receptor. Una vez dentro de las células tumorales, el T-DXd es transportado a los lisosomas, donde el enlace peptídico GGFG que conecta la carga

citotóxica (DXd) con el anticuerpo es escindido por enzimas lisosomales como las catepsinas B y L, diferencialmente más expresadas en células tumorales. Así, mediante esta escisión, se libera el DXd selectivamente dentro de las células tumorales. El DXd es inhibidor de la topoisomerasa I que es una enzima que relaja la tensión de la torsión del ADN induciendo una rotura transitoria de una sola hebra, al escindir una hebra de la hélice de ADN. Esto permite que el ADN gire y alivie la tensión de superenrollamiento que se acumula delante de la horquilla de replicación o de la maquinaria de transcripción. Una vez aliviada la tensión, la topoisomerasa I vuelve a ligar la hebra de ADN rota, restaurando la integridad de la molécula de ADN. Al gestionar el superenrollamiento del ADN, la topoisomerasa I facilita la progresión fluida de la replicación y la transcripción del ADN. Esto es esencial para la duplicación exacta del genoma y la expresión adecuada de los genes que confieren la estabilidad genómica necesaria. La inhibición de la topoisomerasa I provoca la formación de roturas de la doble cadena del ADN durante la replicación del ADN que se evidencian por la fosforilación de Chk1 y de la histona H2A.X, que son marcadores de daño del ADN. Esta acumulación de lesiones en el ADN desencadena la activación de vías apoptóticas en las células tumorales, como indica la ruptura de la PARP (poli ADP-ribosa polimerasa), que facilita la desintegración de la célula, lo que conduce a la muerte celular programada.²⁶ A diferencia de T-DM1, el DXd demuestra actividad antitumoral incluso en modelos con expresión de MDR1 (proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos) sugiriendo que DXd es un sustrato con baja afinidad para MDR1.²⁶

Inhibición de la señalización del receptor HER2:

T-DXd también ha mostrado conservar el mecanismo de acción de inhibición de la vía de señalización de HER2 a través de la acción de trastuzumab. Así, de manera similar a trastuzumab, T-DXd disminuye en la fosforilación de AKT en la vía PI3K/AKT/mTOR que a su vez aumenta la expresión de p27 produciendo una inhibición de la proliferación celular.²⁶

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC):

T-DXd también conserva este mecanismo de acción de trastuzumab y es capaz de inducir ADCC mediante la unión a FcγRIII de las células de inmunidad innata como las NKs. La actividad ADCC se midió mediante la detección de la lisis de células SK-BR-3 mediada por células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMC). T-DXd mostró actividad ADCC, con una citotoxicidad máxima del 48.6% cuyo efecto fue similar al del trastuzumab.²⁶

Eficacia en células con baja expresión de HER2:

T-DXd demostró eficacia a nivel preclínico en distintos modelos con baja expresión de HER2, a diferencia de T-DM1 que no presenta una actividad significativa en estos modelos. En parte, esta actividad diferencial en estos modelos puede deberse al elevado DAR de 8 que caracteriza a T-DXd, ya que un modelo de ADC similar a T-DXd, pero con un DAR de 3.4 no tuvo citotoxicidad significativa con expresión baja de HER2, pero sí con niveles altos. Por tanto, la actividad de T-DXd es en parte dependiente de los niveles de HER2 que presenten las células tumorales, pero su alto índice de cargas citotóxicas permite que tenga actividad incluso con niveles bajos considerados HER2-negativos.²⁶ También se confirmó la especificidad de T-DXd sobre HER2 como mecanismo de acción

en modelos de baja expresión de HER2. En un estudio de inhibición competitiva, la eficacia de T-DXd en un modelo con baja expresión de HER2 quedó anulada por el tratamiento previo con un anticuerpo anti-HER2 que al ocupar el receptor no permitió la unión de T-DXd.²⁶

Eficacia en modelos resistentes a T-DM1:

T-DXd presentó actividad antitumoral significativa en PDX resistentes a T-DM1, demostrando su capacidad para superar las potenciales resistencias al mismo.²⁶

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Los mecanismos de resistencia a T-DXd no son aún bien conocidos, aunque se han podido estudiar y evidenciar en algunas cohortes de pacientes con un distinto rango de expresión de HER2 en sus tumores.³⁰⁹

Captación intratumoral de T-DXd:

La captación y distribución de T-DXd depende de los niveles de expresión de HER2. Así, las células tumorales con elevada expresión de HER2 tenían una tinción de T-DXd más intensa sugiriendo una mayor captación. En cambio, las muestras con muy baja expresión de HER2 (IHC 0) tenían una tinción mínima de T-DXd.

Uno de los mecanismos de resistencia más frecuentemente identificado en un número significativo de pacientes tratadas con T-DXd fue la disminución de la expresión de HER2 tras desarrollar la resistencia. Esta reducción de los niveles de HER2 podría conducir a una disminución de la unión y captación de T-DXd, contribuyendo a la resistencia. Sin embargo, a pesar de presentar resistencia a T-DXd, algunas pacientes seguían mostrando captación intratumoral, sugiriendo en este caso mecanismos de resistencia independientes de la captación del fármaco que podrían ser diversos. Se observó además una actividad antitumoral modesta en pacientes con HER2 IHC 0, lo que sugiere que la eficacia de T-DXd también podría estar mediada en parte por mecanismos independientes de HER2. Esto podría deberse a la presencia de carga citotóxica libre tras la escisión del enlace del T-DXd en células que presentan el antígeno HER2 en su superficie. DXd, que es permeable a la membrana plasmática puede entrar en otras células vecinas que no presentan el antígeno, lo que permitiría al fármaco ejercer sus efectos incluso en ausencia de una expresión elevada de HER2. A este efecto se le denomina efecto espectador (*bystander effect*).³⁰⁹

Otro posible mecanismo de resistencia a trastuzumab deruxtecan se relaciona con la expresión de mucina 4 (MUC4). En el caso del trastuzumab, la expresión de MUC4 es un predictor independiente de mala respuesta en pacientes con CM HER2 positivo. MUC4 está regulada por el TNF soluble (sTNF) secretado por el tumor, que confiere resistencia a trastuzumab al ocultar el epítipo de reconocimiento a trastuzumab en el receptor HER2, reduciendo así su unión y disminuyendo la función fagocítica antitumoral. En estudios con T-DXd en modelos murinos resistentes con expresión de MUC4, la combinación de T-DXd con un inhibidor de sTNF aumentó la respuesta tumoral comparado con T-DXd en monoterapia. Además, in vitro, las células tratadas con la combinación internalizaban hasta un 40% más el T-DXd comparado con las tratadas sin el inhibidor de sTNF.³¹⁰

El microambiente tumoral:

Aunque no se ha podido definir en profundidad, es posible que el microambiente tumoral pueda influir en la distribución y eficacia de T-DXd en las células tumorales contribuyendo a su resistencia. En modelos murinos inmunocompetentes T-DXd aumentaba las células dendríticas y T CD8 infiltrantes de tumor, sugiriendo su potencial impacto en el microambiente inmune.³¹¹ Sin embargo, este hecho no se ha confirmado en muestras de pacientes. En general, la población de células inmunitarias del microambiente tumoral permaneció prácticamente inalterada tras 3 y 6 semanas de tratamiento con T-DXd que no demostró ninguna modulación cuantitativa de las células inmunitarias tras la administración del fármaco. A diferencia de la quimioterapia sistémica, T-DXd no disminuyó los niveles de linfocitos T CD8 en el microambiente celular sugiriendo que el impacto de los ADCs sobre el microambiente inmune pueda ser diferente. Sin embargo, sí que redujo los macrófagos localizados cerca del tumor que pueden estar implicados en la progresión tumoral y resistencia. Adicionalmente, se observó una disminución significativa de la expresión de PD-L1 en las pacientes, presumiblemente debido al efecto citotóxico de T-DXd sobre las células tumorales, hecho que sugiere que T-DXd podría modular el microambiente tumoral.³⁰⁹

Alteraciones genómicas y mutaciones:

Mediante secuenciación total del genoma de biopsias pareadas de pacientes con distintos niveles de expresión de HER2 antes y después de recibir tratamiento con trastuzumab deruxtecan se identificaron posibles mecanismos de resistencia primaria y secundaria. La amplificación de HER2 se relacionó con sensibilidad a T-DXd, mientras que las deleciones hemigóticas del gen *ERBB2* se asociaron con resistencia, lo que indica que la pérdida de copias en el gen *ERBB2* influye significativamente en la eficacia. Además, se identificaron mutaciones adquiridas en el gen *SLX4* en pacientes con resistencia adquirida a T-DXd. *SLX4* codifica una proteína de reparación del ADN que regula endonucleasas específicas que podría influir en la resistencia a la inhibición de topoisomerasa I. En otros estudios con inhibidores de topoisomerasa I se habían detectado mutaciones en *TOP1* como mecanismo de resistencia, a diferencia de este estudio, en el que no se encontraron dichas mutaciones. Se identificaron otras mutaciones somáticas y alteraciones en número de copias diferentes a *ERBB2* de inicio que no se asociaron de manera significativa con la resistencia a tratamiento.³⁰⁹

1.7.3.3. Trastuzumab Duocarmicina (SYD985)

Trastuzumab duocarmicina (también conocido como SYD985) es un ADC contra HER2 compuesto por el anticuerpo monoclonal IgG1 trastuzumab unido covalentemente a un fármaco enlazador que contiene un enlace escindible unido a la carga citotóxica, duocarmicina. Este ADC tiene una proporción fármaco-anticuerpo (DAR) de 2-8:1, más baja que T-DM1 y T-DXd. Trastuzumab duocarmicina, por tanto, contiene el profármaco seco-duocarmicina-hidroxibenzamida-azaindol (seco-DUBA) que tras unirse a HER2 e internalizarse, el enlace se escinde en el lisosoma por proteasas que liberan la toxina activa (DUBA). La toxina activa es alquilante del ADN, con la propiedad de producir daños en el ADN tanto en las células en división como en las que no lo están y, en última instancia da lugar a la muerte celular. Además, también se puede activar por proteasas como la cathepsina B que pueden estar presentes en el microambiente tumoral extracelularmente a través de la secreción por parte de las células tumorales y que podría inducir un efecto de destrucción celular no mediado directamente por HER2.

Trastuzumab duocarmacina demostró actividad antitumoral preclínica en modelos de CM, ovario y otros tipos de cáncer con expresión variable (de baja a alta) de HER2 mostrando mayor actividad que T-DM1 y eficacia en modelos resistentes.^{312,313}

MECANISMOS DE ACCIÓN

Como en otros ADCs con trastuzumab en su estructura, trastuzumab duocarmacina comparte los mecanismos de acción derivados de este anticuerpo discutidos anteriormente.

El efecto citotóxico de SYD985 se produce fundamentalmente por la duocarmacina activada una vez unida a la hendidura menor del ADN. En esta localización ejerce su efecto alquilante sobre residuos de adenina en la posición N3 causando una alteración irreversible en la estructura del ADN que induce muerte celular.

Comparado con T-DM1, en células con expresión de HER2 3+, SYD985 tiene similar actividad, mientras que en células con menor expresión de HER2 mantiene un mayor poder citotóxico que T-DM1. Estas diferencias pueden explicarse por las distintas propiedades del enlace de ambos ADCs. Así como el de SYD985 es escindible y permite la liberación de su citotoxina permeable a la membrana de las células tumorales en el espacio extracelular, el enlace de T-DM1 no tiene esta propiedad siendo impermeable a la membrana. Esta sensibilidad del enlace a proteasas extracelulares y el efecto bystander de SYD985 se ha comprobado tanto in vitro como in vivo en modelos de PDX. Adicionalmente se descartó que el efecto citotóxico fuera debido a la liberación prematura de la toxina en sangre periférica.³¹³ Este ADC de segunda generación es capaz de superar otros mecanismos de resistencia relacionados con T-DM1 además de la disminución de la expresión de HER2. Tras la inhibición de la función lisosomal con cloroquina, se mantuvo la citotoxicidad de SYD985 sugiriendo que puede tener actividad en ausencia de procesamiento lisosomal a diferencia de T-DM1. El efecto citotóxico se mantuvo a pesar de la estimulación de las bombas de expulsión de fármaco que es otro mecanismo de resistencia de T-DM1.³¹⁴ Recientemente se ha relacionado la senescencia celular con una mayor eficacia de los ADCs, en particular de SYD985. Tratamientos que inducen senescencia celular, como los inhibidores de CDK4/6, al ser combinados con SYD985 aumentaron su efecto especialmente en tumores heterogéneos o con baja expresión de HER2. La actividad lisosomal en las células senescentes potenciaba el efecto *bystander* debido a la estimulación de CTSB, enzima de escisión de enlaces valina-citrulina de SYD985.³¹⁵

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Respecto a los mecanismos de resistencia específicos, de momento no han sido descritos. Hay modelos de PDX con resistencia primaria a SYD985 de los que se desconoce el mecanismo de esta que tras tratamiento con inhibidores de CDK4/6 fueron sensibilizados a SYD985. Otros modelos de PDX con resistencia a SYD985 presentaban heterogeneidad con niveles bajos de HER2 que podrían contribuir a la misma, aunque no se ha confirmado dicha hipótesis. Así, hay modelos establecidos de resistencia de los cuales se desconoce el mecanismo.³¹⁵

1.8. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD HER2 POSITIVA METASTÁSICA

Los avances terapéuticos en el tratamiento del CMM HER2 positivo han mejorado notablemente la historia natural de la enfermedad y la supervivencia de las pacientes. De manera progresiva se han ido desarrollando nuevas opciones terapéuticas con mayor actividad clínica. Sin embargo, con el tiempo, la mayoría de las pacientes progresan. Por tanto, es crucial estudiar los mecanismos de resistencia que se desarrollan en cada caso para decidir las opciones más adecuadas en cada paciente en líneas posteriores de tratamiento. La terapia sistémica para el CM HER2 positivo es un tema de gran interés para la comunidad científica por lo que ha sido recientemente revisado por nuestro grupo de investigación en CM en el Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH) y Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO).³¹⁶

A continuación, se detallan los tratamientos anti-HER2 aprobados para su uso por las agencias reguladoras, así como tratamientos anti-HER2 en experimentación y no aprobados que las pacientes incluidas en nuestro estudio han podido recibir en formato de tabla (tabla 1).

Tratamiento	Aprobación FDA	Aprobación EMA	Aprobación AEMPS	Indicación	Ensayo Pivotal
Trastuzumab	09/1998	08/2000	Tras EMA	CMM HER2+	H0648g ¹⁹
Pertuzumab	06/2012	03/2013	Tras EMA	CMM HER2+, en combinación con trastuzumab y docetaxel	CLEOPATRA ³¹⁷
Lapatinib	03/2007	06/2008	Tras EMA	CMM HER2+, en combinación con capecitabina	EGF100151 ²⁹
Trastuzumab emtansina (T-DM1)	02/2013	11/2013	Tras EMA	CMM HER2+, que haya recibido previamente trastuzumab y un taxano	EMILIA ²⁵
Trastuzumab deruxtecan (T-DXd)	12/2019	01/2021	Tras EMA	CMM HER2+, que haya recibido previamente ≥ 2 regímenes anti-HER2	DESTINY-Breast01 ²⁷
Trastuzumab deruxtecan (T-DXd)	05/2022	09/2022	Tras EMA	CMM HER2+, que haya recibido previamente ≥ 1 regímenes anti-HER2	DESTINY-Breast03 ²⁸
Tucatinib	04/2020	02/2021	Tras EMA	CMM HER2+, que haya recibido previamente ≥ 1 regímenes anti-HER2, incluyendo pacientes con metástasis cerebrales.	HER2CLIMB ³¹
Neratinib	02/2020 (ampliado a enfermedad metastásica)	08/2018 (solo aprobado en adyuvancia)	Tras EMA (solo aprobado en adyuvancia)	Tratamiento adyuvante extendido en cancer de mama temprano HER2+ tras tratamiento basado en trastuzumab.	ExteNET ³¹⁸
Margetuximab	16/12/2020	N/A	N/A	CMM HER2+, que haya recibido previamente ≥ 2 regímenes anti-HER2	SOPHIA ³¹⁹
Zanidatamab	N/A	N/A	N/A	N/A	En ensayo
Trastuzumab duocarmazine (SYD985)	N/A	N/A	N/A	N/A	TULIP ³²⁰

Tabla 1. Tabla de aprobación de terapias anti-HER2 por las agencias reguladoras. FDA: U.S. Food and Drug Administration. EMA: European Medicines Agency. AEMPS - Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. N/A: No aprobado. CMM: Cáncer de mama metastásico.

1.8.1. Primera línea

En la actualidad, en el contexto de primera línea, independientemente del estatus de receptores hormonales de estrógenos y progesterona, el tratamiento estándar con doble bloqueo anti-HER2 fue establecido por el ensayo CLEOPATRA. Este estudio pivotal de fase III demostró que añadir pertuzumab a docetaxel y trastuzumab aumentaba significativamente la mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) (18.5 frente a 12.4 meses con y sin pertuzumab, respectivamente, HR 0.62; IC 95% 0.51-0.75 meses; $p < 0.001$). Asimismo, con una mediana de seguimiento de más de 8 años, se evidenció una significativa mejora de 16.3 meses en la mediana de supervivencia global (SG) (57.1 meses frente a 40.8 meses, HR 0.69; IC 95% 0.58-0.82) a favor del doble bloqueo anti-HER2. En caso de presentar una adecuada tolerancia, se recomienda mantener el tratamiento con docetaxel o paclitaxel entre seis y ocho ciclos para posteriormente continuar con trastuzumab-pertuzumab de mantenimiento hasta la progresión o toxicidad inaceptable. En el caso de los tumores HER2 positivos y RH positivo, debe añadirse tratamiento endocrino (TE) a la terapia de mantenimiento.³²¹

1.8.2. Segunda línea

Tras la progresión a doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab, el tratamiento estándar de segunda línea había sido el ADC trastuzumab emtansina (T-DM1) basado en los resultados del estudio EMILIA. Este ensayo clínico fase III comparó T-DM1 frente a lapatinib más capecitabina en pacientes tratadas previamente con trastuzumab y un taxano. T-DM1 demostró una mejora de la mediana de SLP de 3.6 meses (HR 0.65; IC 95%: 0.55-0.77; $p < 0.001$) y de la SG de 5.8 meses (HR 0.68; IC 95%: 0.55-0.85; $p < 0.001$).³²²

Más recientemente, con el desarrollo de ADCs de nueva generación, el estándar de tratamiento en segunda línea es en la actualidad trastuzumab deruxtecan (T-DXd). La comparación frente a frente con T-DM1 en el ensayo de fase III DESTINY-Breast 03 demostró la gran superioridad de trastuzumab deruxtecan en pacientes que habían progresado a tratamiento con trastuzumab y un taxano que no hubieran sido previamente tratadas con T-DM1.²⁸ Así, cuando se reportaron los resultados del estudio se constató una eficacia considerable con T-DXd. La tasa de SLP a los 12 meses fue del 75.8% con T-DXd frente al 34.1% con T-DM1 (HR 0.28; IC del 95%: 0.22-0.37). La mediana de SLP no se había alcanzado en el grupo T-DXd (IC 95%, 18.5 a NE) y era de 6.8 meses en el grupo TDM1 (IC 95%, 5.6 a 8,2). Con un mayor seguimiento, la mediana de SLP llegó a 28.8 meses (IC 95%: 22.4-37.9) con T-DXd frente a 6.8 meses con T-DM1 (HR 0.33 [IC 95%: 0.26-0.43]; $p < 0.0001$).³²³ En el momento del primer análisis se apreció una fuerte tendencia a favor de T-DXd de beneficio en SG, la tasa de SG a los 12 meses para T-DXd era del 94,1% frente al 85,9% para T-DM1 (HR 0.56; $p 0.007172$). Inicialmente no alcanzó la significación estadística, ya que los resultados aún no eran maduros, pero se confirmó en los análisis posteriores sin haber alcanzado la mediana, con una diferencia muy clínicamente significativa (HR 0.64 [IC 95% 0.47-0.87]; $p=0.0037$).³²³ La tasa de respuesta fue también más favorable en el brazo de T-DXd de 79.7% frente a 34.2% en el brazo control ($p < 0.0001$). El 16% de los pacientes del brazo experimental alcanzaron una respuesta completa, y se observaron respuestas parciales en el 63.6% de los casos.²⁸

1.8.3. Tercera línea

En la tercera línea de tratamiento se ha posicionado la combinación de capecitabina con tucatinib y trastuzumab basado en los resultados del ensayo de fase II randomizado HER2CLIMB. Este estudio compara capecitabina y trastuzumab añadiendo tucatinib, inhibidor reversible de la TK altamente selectivo de HER2, o placebo. La población de pacientes incluidas había sido necesariamente tratada previamente con trastuzumab, pertuzumab y T-DM1 que eran los tratamientos estándar de primera y segunda línea en el momento que se diseñó el estudio. Las pacientes fueron aleatorizadas 2:1 a favor de tucatinib. Este ensayo demostró una mejoría en SLP estadísticamente significativa a favor del grupo de combinación con tucatinib, en el que la mediana de SLP fue de 7.6 meses frente a 4.9 meses para el grupo de combinación con placebo (HR: 0.57; IC del 95%: 0.47-0.70; $P < 0.00001$). La SLP a 1 año fue del 29% y del 14%, respectivamente a favor de tucatinib. Adicionalmente, tucatinib demostró mejorar la SG de manera significativa respecto a placebo. Con una mediana de seguimiento de 29.6 meses, la mediana de SG fue de 24.7 meses para el grupo de tucatinib frente a 19.2 meses para el grupo placebo (HR: 0.73; IC del 95%: 0.59-0.90; $P = 0.004$) y la SG a los 2 años fue del 51% y el 40%, respectivamente (HR: 0.73; IC del 95%: 0.59-0.90; $p = 0.004$).

Probablemente, lo más destacable es que a diferencia de otros estudios, los criterios de inclusión para las pacientes con enfermedad cerebral fueron más permisivos teniendo en cuenta la actividad esperada de tucatinib en el sistema nervioso central (SNC). Así, se permitió la inclusión de pacientes con metástasis cerebrales tratadas y no tratadas que no necesitaran tratamiento local inmediato. Las metástasis cerebrales tratadas previamente podían estar estables desde el tratamiento o haber progresado desde la terapia local previa del SNC, siempre que no hubiera indicación clínica para un nuevo tratamiento inmediato local. Gracias a estos criterios hasta un 48% de pacientes incluidas presentaban metástasis cerebrales. Los resultados en SLP estimada a 1 año en el SNC para esta población de pacientes fue del 40% en el grupo de tucatinib y del 0% en el grupo control. Para las pacientes con metástasis cerebrales activas, es decir, no tratadas o tratadas y en progresión, la SLP en SNC a 1 año fue del 35% en el brazo de tucatinib y del 0% en el brazo de control, mientras que las pacientes con lesiones estables en SNC presentaron una SLP a 1 año del 53% en el brazo de tucatinib y del 0% en el brazo de placebo respectivamente. Otro objetivo del estudio era el tiempo hasta la segunda progresión o muerte entre las pacientes que experimentaron una progresión aislada en el cerebro, con posibilidad de ser tratada a nivel local y continuar con la combinación de tratamiento sistémico. Para estas pacientes, la mediana de tiempo hasta la segunda progresión o muerte fue de 16 meses en el brazo de tucatinib y de 10 meses en el brazo de control. Todas estas diferencias además de clínicamente relevantes fueron estadísticamente significativas y han contribuido a posicionar esta combinación tras la progresión a trastuzumab deruxtecan.^{31,324} En el caso de pacientes con metástasis cerebrales activas, en el momento actual hay menor evidencia de la actividad de trastuzumab deruxtecan en esta población. Por este motivo, de manera excepcional, las guías internacionales como la de la ESMO contemplan la posibilidad de anteponer en estas pacientes, tras la progresión a primera línea, la combinación con tucatinib a trastuzumab deruxtecan.³²⁴ Otro aspecto importante a considerar es la diferencia entre la población de pacientes que en la actualidad reciben tucatinib tras T-DXd con la del estudio HER2CLIMB que habían recibido necesariamente T-DM1, pero no T-DXd. Para

describir mejor la actividad de tucatinib en esta población se están recogiendo datos de vida real obteniendo resultados similares a los reportados en HER2CLIMB. Un estudio en el que 61 pacientes (12% de la cohorte total) recibieron tucatinib después de T-DXd con una mediana de cuatro líneas previas, la mediana del tiempo hasta el siguiente tratamiento (TTNT) y del tiempo hasta la discontinuación (TTD) de estas pacientes fue de 7.5 meses y 7.3 meses, respectivamente.³²⁵

1.8.4. Líneas sucesivas

En el caso de que una paciente hubiera llegado a líneas más avanzadas sin haber recibido tratamiento con T-DXd previamente y a la progresión con el triplete con tucatinib, serían los tratamientos indicados a la progresión a la última línea recibida.³²⁴

Dado que no hay evidencia en la actualidad para recomendar un tratamiento preferentemente sobre otro en pacientes previamente tratadas con T-DXd y tucatinib, se deben valorar las opciones disponibles, características y preferencias de las pacientes para tomar la decisión terapéutica.

Entre las opciones posibles más aceptadas está T-DM1, aunque no hay datos prospectivos de su actividad tras T-DXd.³²⁴ Como se ha comentado previamente, el ensayo pivotal EMILIA comparó T-DM1 en segunda línea con capecitabina y lapatinib en pacientes que habían progresado a tratamiento con trastuzumab y un taxano y demostró una mejoría significativa de la mediana de SLP y de SG.³²²

Otras opciones de tratamiento aprobadas serían distintas combinaciones de quimioterapia y anti-HER2, habitualmente trastuzumab o TKIs como lapatinib. Para pacientes con positividad de receptores hormonales se podrían considerar combinaciones de tratamiento endocrino y anti-HER2 como trastuzumab y lapatinib.³²⁴ Lapatinib fue el primer TKI desarrollado y aprobado para el CMM HER2 positivo. La combinación más utilizada es con capecitabina que se comparó con capecitabina en monoterapia en el ensayo de fase III EGF100151. Se cumplió el objetivo primario del estudio con una mejoría en la mediana de SLP a favor de la combinación de 4.3 a 6.2 meses (HR 0.55; IC del 95%: 0.40-0.74; $p < 0.001$). Asimismo, se observó una tendencia a la mejora de la SG, que no fue confirmada, ya que el ensayo se interrumpió prematuramente tras el análisis primario dadas las diferencias encontradas en la SLP entre los dos brazos de tratamiento.²⁹

Dado que hay nuevas terapias y combinaciones anti-HER2 en desarrollo, se deben valorar además las posibilidades terapéuticas disponibles dentro de un ensayo clínico en cada momento y sopesarlas con la paciente.

1.8.5. Tratamientos no aprobados

Hay diversas opciones terapéuticas que no han llegado a ser aprobadas, cuya mención es importante, ya que forman parte de los tratamientos recibidos por algunas de las pacientes incluidas en este proyecto.

1.8.5.1. Anticuerpos de nueva generación

Entre los anticuerpos de nueva generación destacan margetuximab y zanidatamab.

Margetuximab es un anticuerpo que comparte la misma fracción variable que el trastuzumab y, por tanto, se une en el mismo epítipo del receptor HER2. Sin embargo, se diferencian en que incorpora una región Fc diseñada para aumentar la activación inmunitaria con el fin de mejorar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

(ADCC) favoreciendo un mejor reconocimiento del tumor por parte de las células natural killer (NK).

El ensayo de fase III SOPHIA comparó margetuximab frente a trastuzumab, cada uno combinado con la quimioterapia a elección del investigador entre opciones predefinidas (capecitabina, vinorelbina, eribulina o gemcitabina). Se incluyó una población de pacientes con CMM HER2 positivo pretratado con trastuzumab, pertuzumab y en más del 90% también con T-DM1. La mediana de SLP fue estadísticamente significativa a favor del brazo de margetuximab de 5.8 meses en comparación con 4.9 meses en el brazo de control (HR 0.76; IC 95%: 0.59-0.98; $p = 0.033$). Los resultados finales de SG no demostraron una ventaja estadísticamente significativa de margetuximab frente a trastuzumab (HR 0.95; IC 95%: 0.77-1.17; $p = 0.62$); la mediana de SG fue de 21.6 frente a 21.9 meses para las pacientes tratadas con margetuximab frente a trastuzumab más quimioterapia, respectivamente.¹²¹ Dada la discreta diferencia en SLP entre los dos tratamientos, actualmente no está disponible para su uso en Europa, aunque fue aprobado para su uso por la FDA.

Zanidatamab es un anticuerpo humanizado, biespecífico que se une simultáneamente a dos sitios distintos en HER2, el dominio de membrana (ECD4) y el dominio de dimerización (ECD2) de HER2 que coinciden con los de trastuzumab y pertuzumab respectivamente. Este diseño da lugar a diversos mecanismos de acción, como el bloqueo dual de la señalización de HER2, el aumento de la unión anticuerpo al receptor, la clusterización de receptores y la eliminación de HER2 de la superficie celular. Se han reportado distintos estudios incluyendo un ensayo fase Ib/II de primera línea en combinación con taxanos con tasas de respuesta del 86.4% y tasa de SLP a 6 meses fue del 90.9%.³²⁶ Otro estudio fase II de combinación de zanidatamab con fulvestrant y palbociclib en pacientes HER2 positivas con receptores hormonales positivos pretratadas con trastuzumab, pertuzumab y T-DM1. Su objetivo primario, la tasa de pacientes con SLP a los 6 meses (SLP6) fue del 67%, con una mediana de SLP de 11.7 meses. Se estudió el subtipo intrínseco de un 57% de las pacientes por PAM50 encontrando que las pacientes con perfil luminal frente al HER2-enriched tenían una mediana de SLP de 11.7 frente a 9.3 meses respectivamente que no fue estadísticamente significativa.³²⁷ El inhibidor de ciclinas, palbociclib, también fue estudiado en una población de pacientes HER2 positivas metastásicas en el ensayo clínico PATRICIA en combinación con letrozol y trastuzumab. En este caso, hubo resultados dispares en cuanto al análisis por PAM50 con una mayor PFS de 10.6 meses en las pacientes con tumores de perfil luminal frente a los no luminales de 4.2 meses (HR= 0.40; $p = 0.003$).³²⁸

1.8.5.2. Otros TKIs

Entre los TKIs no aprobados por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en el contexto de pacientes con CMM HER2 positivo se encuentra neratinib. Es un inhibidor irreversible panHER de HER1 (EGFR), HER2 y HER4. Los resultados más relevantes provienen del ensayo clínico de fase III NALA. Este estudio comparó neratinib con otro TKI, lapatinib, ambos en combinación con capecitabina en pacientes con CMM HER2 positivo que habían recibido al menos dos regímenes anti-HER2 previos. El estudio incluyó a pacientes con metástasis asintomáticas o estables en el SNC, permitiendo a pacientes que hubieran recibido o no tratamiento local. Se cumplieron los objetivos primarios con resultados que demostraron una mejora estadísticamente significativa de

la mediana de SLP (HR 0.76; IC 95%: 0.63, 0.93; $p = 0.0059$) a favor de la combinación de neratinib más capecitabina. La diferencia en la mediana de SG de 21 meses frente a 18.7 meses a favor de neratinib, no fue estadísticamente significativa. La tasa de respuestas fue similar entre ambos tratamientos, del 32.8% frente al 26.7% a favor del brazo experimental. La diarrea, que es un efecto secundario de clase de los TKIs que inhiben EGFR, fue el efecto adverso más frecuente en ambos brazos. En el brazo de neratinib, se produjo en el 83% de las pacientes, llegando a ser severa (grado 3) en el 24.4%. La incidencia fue menor en la combinación con lapatinib, se presentó en el 66% de pacientes de las cuales 12.5% fueron de grado 3. Para mitigar esta toxicidad, la medicación antidiarreica con loperamida se ha convertido en un apoyo importante para la profilaxis con este tipo de agentes.³²⁹

1.8.5.3. ADCs

Otro tratamiento que no ha sido aprobado por el momento es el ADC, trastuzumab duocarmacina (SYD985). Este ADC de segunda generación tiene en su composición a trastuzumab que se encuentra unido por un enlace escindible a una prodroga del citotóxico alquilante duocarmacina (vc-seco-DUBA). La escisión mediante proteólisis del enlace en el microambiente tumoral conduce a la activación de la toxina efectiva de la duocarmacina (DUBA). Este ADC fue comparado en el ensayo clínico de fase III, TULIP (SYD985.002), con el tratamiento de elección del investigador entre combinaciones predefinidas de quimioterapia y trastuzumab. El estudio se dirigió a una población de pacientes con CMM HER2 positivo que habían recibido al menos 2 líneas de QT o T-DM1. El objetivo primario era la mediana de SLP con revisión ciega a nivel central que fue de 7.0 meses para SYD985 y de 4.9 meses para el brazo control (HR 0.64 [0.49-0.84], $p = 0.002$). La mediana de SG fue de 20.4 meses con trastuzumab duocarmacina y de 16.3 meses con el tratamiento de elección del investigador, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. La tasa de respuesta global fue similar y cercana al 30% tanto en el brazo de trastuzumab duocarmacina como en el de las combinaciones de quimioterapia con trastuzumab. La toxicidad ocular sobre todo en forma de queratitis ha sido la más limitante dificultando su aprobación por las agencias reguladoras.³²⁰

1.8.5.4. Otras combinaciones

1.8.5.4.1. Inhibidores de CDK4/6

Como se mencionó anteriormente en las combinaciones con zanidatamab, las combinaciones de terapias anti-HER2 con inhibidores de CDK4/6 a pesar de que han mostrado actividad, no han sido aprobadas por la EMA para su uso en esta población. El ensayo clínico de fase II PATRICIA, mencionado previamente, examinó la actividad antitumoral de palbociclib en combinación con trastuzumab con o sin terapia endocrina en pacientes con CMM HER2 positivo pretratadas con trastuzumab. Se establecieron tres cohortes: receptor de estrógeno (RE) negativo (cohorte A), RE positivo (cohorte B1) y RE positivo con letrozol (cohorte B2). El objetivo primario fue la SLP6, que en las cohortes A, B1 y B2 fue del 33.3%, 42.8% y 46.4% de pacientes libres de progresión a los 6 meses respectivamente. Dada la superioridad en SLP que presentaron las pacientes con un subtipo intrínseco luminal definido mediante PAM50 en comparación con la enfermedad no luminal (10.6 meses frente a 4.2 meses) se enmendó el protocolo. Así se definió una nueva cohorte C randomizada de pacientes para probar la hipótesis de que en las pacientes con CM HER2 positivo, receptor hormonal positivo y que además

presentan un subtipo intrínseco luminal por PAM50, el tratamiento combinado con palbociclib será superior al tratamiento de elección del investigador.³²⁸

Otro ensayo relevante con inhibidores de ciclinas para esta población de pacientes con CMM HER2 positivo previamente tratado, es MonarchHER. Se trata de un ensayo de fase II que se diseñó para evaluar la combinación de abemaciclib más trastuzumab con o sin fulvestrant en comparación con trastuzumab más quimioterapia. El Grupo A recibió el triplete abemaciclib, trastuzumab y fulvestrant; el Grupo B fue tratado con abemaciclib y trastuzumab; y el Grupo C recibió quimioterapia y trastuzumab. El objetivo primario fue la SLP, evaluando en primer lugar el grupo de pacientes que recibió el triplete con abemaciclib, trastuzumab y fulvestrant frente al brazo control con trastuzumab y quimioterapia. La combinación con el triplete mejoró significativamente la SLP, con una mediana de 8.3 meses frente a 5.7 meses para la quimioterapia con trastuzumab (HR 0.67; IC del 95%: 0.45-1.00; p = 0,051). En el análisis final, la mediana de SG fue de 30.3 meses en el brazo del triplete, 31.43 meses en el brazo de abemaciclib más trastuzumab y de 22.7 meses en el brazo de quimioterapia y trastuzumab, diferencias que no alcanzaron la significación estadística. Similarmente al ensayo PATRICIA, en el análisis exploratorio por RNAseq, los subtipos intrínsecos luminales se asociaron con un incremento en la SLP de 8.6 frente a 5.4 meses (HR 0.54; IC del 95%: 0.38; 0.79) y de la SG de 31.7 frente a 19.7 meses (HR 0.68; IC del 95%: 0.46) en comparación con los no luminales.³³⁰

El ensayo PATINA es otro estudio relevante, de fase III randomizado, que está explorando el papel de palbociclib asociado al tratamiento endocrino en el mantenimiento con doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab en la primera línea de pacientes con CMM HER2 positivo y receptores hormonales positivos. Los resultados están pendientes de ser reportados (NCT02947685).

1.8.5.4.2. Inhibidores de la vía de PI3K/AKT

Adicionalmente, hay combinaciones en desarrollo que además de bloquear la vía de HER2, utilizan otras alteraciones como las mutaciones en el gen *PIK3CA*, para tratarlas con inhibidores específicos. De este modo se trata de superar potenciales mecanismos de resistencia. Entre los distintos inhibidores de esta vía que se han probado en esta población se encuentran buparlisib, copanlisib, alpelisib, pilarisib e inavolisib, la mayoría de ellos en combinación con trastuzumab.³¹⁶

Entre los ensayos con inhibidores de nueva generación destaca el estudio fase Ib B-PRECISE-01 con la combinación de MEN1611 y trastuzumab, añadiendo fulvestrant en las pacientes cuyos tumores expresan receptores hormonales. MEN1611 es un inhibidor oral de PI3K activo en las isoformas p110 α mutante y salvaje, β y γ , excluyendo a la δ . Las pacientes con CM HER2 positivo incluidas tenían una mutación confirmada en *PIK3CA* y habían sido tratadas con al menos 2 líneas previas de terapia anti-HER2 en el contexto metastásico, incluyendo trastuzumab y en la mayoría de los casos también T-DM1. Un 34% de pacientes tratadas con la dosis recomendada para la fase II presentaron respuesta parcial y una paciente alcanzó una respuesta completa. La mediana de SLP fue de 5.6 meses y la de SG 11.9 meses. Las pacientes con positividad de receptores hormonales que recibieron fulvestrant presentaron una mediana de SG de 21.9 meses en comparación con 11.9 meses en pacientes no luminales. El perfil de seguridad fue manejable siendo los efectos adversos más frecuentes los más característicos de esta

clase de inhibidores: gastrointestinales, náuseas y diarreas, además de la hiperglicemia.³³¹

En el contexto del tratamiento de mantenimiento de la primera línea con trastuzumab y pertuzumab tras la inducción con taxanos y doble bloqueo, destaca el ensayo clínico de fase Ib, IPATHER. En este estudio se añadió el inhibidor de AKT, ipatasertib, al mantenimiento con trastuzumab y pertuzumab. Los efectos adversos más frecuentes fueron diarrea y náuseas en el 12% de pacientes. La tasa de respuesta fue del 31%, con un beneficio clínico del 69%. La mediana de SLP fue de 15,4 meses, con un 48% de pacientes libres de progresión tras 18 meses desde la inclusión en el estudio.³³²

1.8.5.4.3. Inhibidores del punto de control inmunitario

Los estudios moleculares del microambiente tumoral han demostrado que el mayor potencial inmunogénico en el CM lo presentan los subtipos triples negativo y HER2 positivo. Según estos datos, la inmunoterapia podría ser una estrategia atractiva para pacientes con tumores HER2 positivos avanzados. Sin embargo, hay escasos datos prospectivos en este contexto.³¹⁶

Un ensayo de fase Ib/II, PANACEA, estudió la combinación del anticuerpo inhibidor de PD-1 pembrolizumab con trastuzumab en pacientes con CMM HER2 positivo que habían progresado a trastuzumab. La mediana de duración del control de enfermedad fue de 11.1 meses. La tasa de respuesta fue del 15% en las pacientes que presentaban PD-L1-positivo y el 8% mantuvieron estabilidad de la enfermedad durante más de 6 meses. Un análisis de subgrupos mostró niveles más elevados de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) en el grupo PD-L1 positivo, hallazgo que podría ser sugestivo de que el mecanismo inmunológico puede ser importante en la resistencia a las terapias anti-HER2 y predecir la respuesta a pembrolizumab. En el grupo de pacientes con tumores PD-L1 negativos no hubo ninguna respuesta sugiriendo la ausencia de beneficio en esta población.²⁰⁷

El ensayo KATE2 evaluó la combinación del anticuerpo inhibidor de PD-L1 atezolizumab o placebo con T-DM1 en pacientes con CMM HER2 positivo que habían recibido tratamiento con trastuzumab y taxanos. El objetivo primario fue la SLP, cuya mediana fue de 8.2 meses en el grupo de T-DM1 más atezolizumab frente a 6.8 en el grupo de T-DM1 más placebo (HR 0.82; $p = 0.33$), sin que se observaran diferencias en la tasa de respuesta entre los dos brazos. En el análisis de subgrupos, aunque sin significación estadística, los pacientes con PD-L1 positivo y/o TIL $\geq 5\%$, tuvieron una mediana de SLP más prolongada y una mayor tasa de respuesta con atezolizumab. Hubo además mayor toxicidad severa en el brazo de atezolizumab, como trombocitopenia (13% con atezolizumab frente al 4% con placebo), elevación de las enzimas hepáticas (13% frente al 6%), anemia (5% frente a 0%).²⁹²

Hay en la actualidad otros ensayos para la población de pacientes HER positivas con enfermedad avanzada en curso con diversos abordajes basados en la inmunoterapia.³¹⁶

2. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS 1: Determinadas alteraciones genómicas podrán conferir resistencia primaria a determinados tratamientos.

HIPÓTESIS 2: Determinadas alteraciones genómicas adquiridas podrán conferir resistencia adquirida a determinados tratamientos.

HIPÓTESIS 3-A: Las alteraciones genómicas del ADN serán concordantes entre el tejido tumoral y el ctDNA extraídos en un mismo tiempo.

HIPÓTESIS 3-B: Las alteraciones genómicas del ADN podrán ser discordantes entre muestras de ctDNA extraídas en distintas líneas de tratamiento.

HIPÓTESIS 4. La determinación de la amplificación de *ERBB2* en ctDNA será factible como predictor de beneficio a tratamiento anti-HER2.

HIPÓTESIS 5. La amplificación de *ERBB2* podrá ser discordante entre tejido tumoral y ctDNA.

HIPÓTESIS 6. La generación de modelos de PDX derivados de tumor de pacientes HER2 positivas pueden ser informativos para estudios de mecanismos de resistencia a fármacos anti-HER2.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal de esta tesis doctoral es explorar la biopsia líquida como herramienta para la identificación de mecanismos de sensibilidad o resistencia a distintas terapias en la población de pacientes con CM metastásico HER2 positivo.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

Otros objetivos secundarios consisten en:

- Valorar la concordancia entre las alteraciones genómicas identificadas en muestras sincrónicas de tejido y plasma, y la descripción de las diferencias que pueden surgir en plasma a lo largo de muestras recolectadas de forma secuencial durante las diferentes líneas de tratamiento anti-HER2 recibidas por las pacientes.
- Valorar la amplificación de HER2 en biopsia líquida como predictora de respuesta a terapia anti-HER2 y la concordancia con los resultados realizados en tejido con las técnicas convencionales.
- Explorar la rentabilidad de generación de modelos de PDX a partir de biopsias tumorales de las pacientes, la consolidación del estudio de resistencias terapéuticas en estos modelos, así como la concordancia de la respuesta obtenida a las mismas terapias recibidas por las pacientes y los PDX de cuyos tumores deriven.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio retrospectivo de una cohorte de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama metastásico (CMM) HER2 positivo tratadas con terapias anti-HER2 en el Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH) de las que se dispone de muestras de tejido tumoral y de muestras de plasma.

Las muestras han sido recogidas de manera prospectiva tras haber obtenido el consentimiento de las pacientes para su participación en los proyectos de investigación incluidos en el programa de prescreening del Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO) (PR (AG) 147-2009) y de diseño molecular del tratamiento personalizado del cáncer de mama. (PR(AG) 20-2019).

Se incluyen muestras de tejido tumoral analizadas prospectivamente dentro del proyecto de prescreening VHIO con panel Amplicon.

Se utiliza la tecnología de Secuenciación de Nueva Generación (NGS) mediante panel VHIO-300 en muestras de tejido. Para el análisis de las muestras de plasma se utiliza tecnología NGS mediante el panel Guardant360 VHIO. Se analizan las alteraciones genómicas en las muestras disponibles de manera retrospectiva si no han sido previamente analizadas en el programa de prescreening.

Se estudia la expresión de HER2 en las muestras de tejido con las técnicas convencionales de Inmunohistoquímica (IHQ) e hibridación in situ (ISH), y se determina el H-score.

Con los resultados obtenidos de los análisis de las muestras:

- Se valora la posible relación de las alteraciones genómicas encontradas con los mecanismos de resistencia primaria o adquirida a terapias anti-HER2.
- Se valora la concordancia de las alteraciones genómicas encontradas en muestras pareadas de tejido y plasma extraídas en un mismo momento.
- Se valoran las diferencias entre las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de plasma disponibles de cada paciente a lo largo del tiempo.
- Se valora la amplificación de ERBB2 obtenida por NGS en muestras de tejido y plasma como predictora de respuesta a terapia anti-HER2.
- Se valora la concordancia de la amplificación de ERBB2 obtenida por NGS en muestras de tejido y plasma pareadas, y con los de los resultados realizados en tejido con las técnicas convencionales de IHQ/ISH.
- Se valora la rentabilidad de las biopsias de tejido tumoral para generar modelos animales derivados de tumor (*Patient Derived Xenografts*: PDX) de las pacientes a las que se hayan hecho biopsias que se hayan utilizado para este fin en distintos momentos de la evolución de la enfermedad.
- Se estudia la sensibilidad al tratamiento y los posibles mecanismos de resistencia a la progresión de los PDX que hayan sido tratados con distintas terapias anti-HER2.
- Se correlaciona la sensibilidad a tratamiento en las pacientes con la respuesta obtenida por los PDX.

Este proyecto de tesis ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación con Medicamentos (CEIm) y Comisión de Proyectos de Investigación de HUVH con el código PR (AG) 28/2024. (Documento en apéndice).

4.2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO Y SELECCIÓN DE MUESTRAS

Entre el 19 de julio de 2017 y el 31 de diciembre de 2022 se ofrece participar de manera consecutiva a todas las pacientes en el proyecto con diagnóstico de cáncer de mama HER2 positivo metastásico que acuden al HUVH a realizar tratamiento oncoespecífico que incluya algún agente dirigido contra la proteína HER2. Se permite la inclusión independientemente de la línea de tratamiento en que se encuentre la paciente.

Todas las pacientes firman las versiones vigentes de las hojas informativas para las pacientes, consentimientos informados, para participar en los proyectos de VHIO asociados a (ambos documentos en apéndice):

- PERFIL GENÉTICO DE TUMORES DE PACIENTES CANDIDATOS RECIBIR TRATAMIENTO EN EL VHIO: MUESTRAS RECOGIDAS DURANTE EL PRESCREENING Y AL MOMENTO DE LA PROGRESIÓN (PR (AG) 147-2009)
- DISEÑO MOLECULAR DEL TRATAMIENTO PERSONALIZADO DEL CÁNCER DE MAMA (PR(AG) 20-2019).

De forma prospectiva se recogen muestras basales de plasma tras la firma de los consentimientos informados previamente al inicio de una línea de tratamiento anti-HER2, y posteriormente, tras la primera evaluación de respuesta al tratamiento y cada 6 meses o hasta la progresión al tratamiento, lo que ocurriera antes. En caso de que la paciente inicie una nueva línea de tratamiento, la muestra obtenida a la progresión del tratamiento previo se considera la muestra basal en la línea posterior. Este procedimiento de extracciones se repite para cada línea de tratamiento.

Asimismo, de manera prospectiva se van recogiendo muestras de tejido mediante biopsias o procedentes de cirugía, según la práctica clínica habitual en el caso de que estuvieran indicadas para decisiones terapéuticas. En todos los casos en que sea posible y la paciente lo consienta, se valora la utilización de parte de la muestra obtenida de tejido para la generación de modelos murinos derivados de tumor (*Patient Derived Xenographs*: PDX).

Si está indicado para decisión terapéutica, sobre las muestras de tejido se hacen los análisis de las alteraciones moleculares y genéticas del cáncer a través del programa de prescreening de VHIO con las técnicas de secuenciación genómica disponibles en cada momento. En caso contrario se archivan las muestras para su análisis posterior.

Las muestras de plasma son procesadas, congeladas y almacenadas para su análisis posterior.

Para el análisis retrospectivo de las muestras se prioriza y limita a la inclusión de pacientes de las cuales haya muestras pareadas de tejido tumoral y plasma para análisis de ctDNA en un mismo punto temporal al inicio o progresión de una línea de tratamiento sistémico que incluya terapias anti-HER2. De estas mismas pacientes se analizan las muestras de suero disponibles para análisis de ctDNA previamente a cada línea de tratamiento sistémico anti-HER2. Se incluyen los resultados de muestras obtenidos previamente ya fuera para otros proyectos o para decisiones asistenciales. Por parte del

laboratorio de Anatomía Patológica de VHIO se valora la viabilidad de todas estas muestras de tejido para ser analizadas. Se descartan las muestras de pacientes en las que no hay tejido sobrante suficiente tras el diagnóstico asistencial para los análisis.

4.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE TEJIDO

4.3.1. Determinación de HER2

Tras firmar el correspondiente consentimiento informado aprobado por el Comité Ético, se recoge una muestra tumoral de cada paciente, que es sometida a un control de calidad por un patólogo experto. Si hay presentes más de un 20% de células tumorales, se corta el número apropiado de laminillas para la extracción de ADN, IHQ y/o análisis ISH, de acuerdo con la solicitud.

En las muestras de tejido se determina el estatus de HER2 según las guías ASCO/CAP de 2018, previamente descritas en la introducción del manuscrito.⁴³

Determinación de H-score de HER2:

HER2 H-score se calcula en las muestras de tejido como $((\%IHC3+) \times 3) + ((\%IHC2+) \times 2) + (\%IHC1+)$ y se obtiene un valor que puede oscilar entre 0 y 300. Así, se trata de una variable continua. Cuanto mayor es el valor de H-score mayor proporción de celularidad HER2 positiva en el tumor.³³³

4.3.2. Análisis moleculares

Los análisis moleculares se realizan según los estándares del programa de Prescreening del HUVH/VHIO, que se describen brevemente a continuación.

Tejido:

Tras firmar el correspondiente consentimiento informado aprobado por el Comité Ético, se recoge una muestra tumoral de cada paciente, que es sometida a un control de calidad por un patólogo experto. Si hay presentes más de un 20% de células tumorales, se corta el número apropiado de laminillas para la extracción de ADN.

Para los análisis genómicos de tejido se han utilizado:

4.3.2.1. Panel Amplicon VHIO

Se realiza una PCR múltiple inicial con VHIO-Card, un panel personalizado, en muestras tumorales fijadas en formol e incluidas en parafina. La última versión del panel contiene más de 800 pares de cebadores dirigidos a mutaciones frecuentes en oncogenes y varios supresores tumorales, con un total de 61 genes (Tabla 2). Desde la puesta en marcha de AmpliconSeq, este panel se ha ido personalizando continuamente para incluir genes y mutaciones adicionales, de acuerdo con los criterios de inclusión de los ensayos clínicos en curso en nuestra Institución y el estado del conocimiento en la materia. Por este motivo, el número de muestras analizadas para una mutación determinada puede variar en función del momento del análisis. Por ejemplo, las mutaciones en TP53 no se incorporaron hasta la última versión del panel, mientras que el número de mutaciones detectadas en PIK3CA no ha variado desde el principio. Las bibliotecas indexadas se cargaron en un equipo MiSeq74 y se realizó la secuenciación (2X100). Tras la alineación

y la identificación de variantes, se filtraron los SNPs con las bases de datos dbSNP y 1000 genome. Todas las variantes detectadas se comprobaron manualmente. De acuerdo con la sensibilidad analítica de esta técnica, se realizó una determinación de mutación en presencia de >5% de alelos mutantes en una muestra determinada.

En la tabla 2 se muestran los genes incluidos en el panel.

Amplicon panel de genes					
ABL1	CSF1R	FLT3	KIT	NOTCH2	RUNX1
AKT1	CTNNB1	GATA1	KRAS	NOTCH3	SMAD4
AKT2	EGFR	GATA3	MAG	NOTCH4	SMARCB1
AKT3	ERBB2	GNA11	MAP2K1	NRAS	SRC
ALK	ERBB3	GNAQ	MET	PDGFRA	STK11
APC	ESR1	GNAS	MLH1	PIK3CA	TP53
BRAF	FBXW7	HRAS	MPL	PIK3R1	VHL
BRCA1	FGFR1	IDH1	MSH6	PIK3R5	
BRCA2	FGFR2	IDH2	MYC	PTEN	
CDKN2A	FGFR3	JAK1	NF2	RB1	
CHD1	FGFR4	JAK3	NOTCH1	RET	

Tabla 2. Genes incluidos en el panel Amplicon

4.3.2.2. Panel VHIO-300

Las bibliotecas de ADN se generan a partir de 500 ng de ADN por muestra utilizando el kit SureSelect XT Target enrichment (Agilent Technologies). Para ello, el ADN se fragmenta utilizando un sonicador Covaris S2 (Covaris, Woburn, MA) y el control de calidad se realiza utilizando un Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies) para garantizar un tamaño medio de fragmento de 150 a 200 pb. Tras la fragmentación se procede a la reparación de los extremos, la cola A y la ligadura del adaptador de secuenciación. Tras 10 ciclos de amplificación de la PCR, los productos de la PCR se aíslan en cuentas AMPure XP (Agencourt, Beckman Coulter). Las bibliotecas preparadas se comprueban y cuantifican utilizando un chip DNA1000 del bioanalizador Agilent y 750 ng se hibridan con las sondas biotiniladas VHIO-300, dirigidas a 430 genes relacionados con el cáncer. Tras la hibridación, las moléculas diana se purifican en cuentas magnéticas (Dynabeads MyOne Streptavidin T1, Invitrogen) y se amplifican por PCR durante 12 ciclos de PCR. El control de calidad se realiza utilizando un chip de alta sensibilidad Agilent Bioanalyzer y el producto se cuantifica mediante análisis qPCR utilizando el kit qPCR KAPA SYBR® FAST ABI Prism (KAPA Biosystems). Las bibliotecas VHIO-300 se secuencian en un instrumento HiSeq 2500 (Illumina, Inc.) de acuerdo con los parámetros de secuenciación requeridos (cobertura y longitud de lectura). El análisis bioinformático posterior se realiza en el Laboratorio de Genómica del Cáncer de VHIO. El límite de sensibilidad se fijó en el 5% para variantes puntuales y en el 10% para variantes de inserción o delección.

En la tabla 3 se muestran los genes incluidos en el panel.

VHIO 300 panel genes								
ABL1	CARD11	E2F3	FGFR4	IL7R	MDM2	PDCD1LG2	RAD52	SOX2
ABL2	CASP8	EED	FH	INHBA	MDM4	PDGFRA	RAD54L	SOX9
ACVR1B	CBFB	EGFL7	FLCN	INPP4A	MED12	PDGFRB	RAF1	SPEN
AKT1	CBL	EGFR	FLT1	INPP4B	MEF2B	PDK1	RANBP2	SPOP
AKT2	CCND1	EIF1AX	FLT3	INSR	MEN1	PDPK1	RARA	SPTA1
AKT3	CCND2	EP300	FLT4	IRAK4	MET	PHOX2B	RASA1	SRC
ALK	CCND3	EPCAM	FOXA1	IRF2	MITF	PIK3C2B	RB1	STAG2
ALOX12B	CCNE1	EPHA3	FOXL2	IRF4	MLH1	PIK3C2G	RBM10	STAT3
AMER1	CD274	EPHA5	FOXP1	IRS1	MPL	PIK3C3	RECQL4	STAT4
APC	CD276	EPHA7	FRS2	IRS2	MRE11A	PIK3CA	REL	STK11
AR	CD79A	EPHB1	FUBP1	JAK1	MSH2	PIK3CB	RET	STK40
ARAF	CD79B	ERBB2	GABRA6	JAK2	MSH6	PIK3CD	RFWD2	SUFU
ARFRP1	CDC73	ERBB3	GATA1	JAK3	MTOR	PIK3CG	RHEB	SUZ12
ARID1A	CDH1	ERBB4	GATA2	JUN	MUTYH	PIK3R1	RHOA	SYK
ARID1B	CDK12	ERCC2	GATA3	KAT6A	MYC	PIK3R2	RICTOR	TAF1
ARID2	CDK4	ERCC3	GATA4	KDM5A	MYCL	PIK3R3	RIT1	TBX3
ARID5B	CDK6	ERCC4	GATA6	KDM5C	MYCL1	PIM1	RNF43	TERT
ASXL1	CDK8	ERCC5	GID4	KDM6A	MYCN	PLCG2	RNPC3	TET1
ASXL2	CDKN1A	ERG	GLI1	KDR	MYD88	PLK2	ROS1	TET2
ATM	CDKN1B	ERRF1	GNA11	KEAP1	MYOD1	PMAIP1	RPS6KA4	TGFBR1
ATR	CDKN2A	ESR1	GNA13	KEL	NBN	PMS1	RPS6KB2	TGFBR2
ATRX	CDKN2B	ETV1	GNAQ	KIT	NCOR1	PMS2	RPTOR	TMEM127
AURKA	CDKN2C	ETV6	GNAS	KLF4	NF1	PNRC1	RSPO2	TMPRSS2
AURKB	CEBPA	EXOSC10	GPR124	KLHL6	NF2	POLD1	RUNX1	TNFAIP3
AXIN1	CHD2	EZH2	GREM1	KMT2A	NFE2L2	POLE	RUNX1T1	TNFRSF14
AXIN2	CHD4	FAM175A	GRIN2A	KMT2C	NFKBIA	POLR3A	RYBP	1,00 TOP
AXL	CHEK1	FAM46C	GRM3	KMT2D	NKX2-1	POLR3B	SDHA	TOP2A
B2M	CHEK2	FANCA	GSK3B	KRAS	NKX3-1	PPP2R1A	SDHAF2	TP53
BAP1	CIC	FANCC	H3F3A	LATS1	NOTCH1	PPP2R2A	SDHB	TRAF7
BARD1	CREBBP	FANCD2	H3F3C	LATS2	NOTCH2	PRDM1	SDHD	TSC1
BBC3	CRKL	FANCE	HGF	LRP1B	NOTCH3	PRKAR1A	SETD2	TSC2
BCL2	CRLF2	FANCF	HIST1H1C	LYN	NPM1	PRKCI	SF3B1	TSHR
BCL2L1	CSF1R	FANCL	HIST1H3B	LZTR1	NRAS	PRKDC	SH2D1A	U2AF1
BCL2L2	CTLA4	FANCM	HNF1A	MAD2L2	NSD1	PRSS8	SHH	VEGFA
BCL6	CTNNA1	FAS	HRAS	MAGI2	NTRK1	PTCH1	SHQ1	VHL

BCOR	CTNNB1	FAT1	HSD3B1	MALT1	NTRK2	PTEN	SLIT2	VTGN1
BCORL1	CUL3	FBXW7	HSP90AA1	MAP2K1	NTRK3	PTPN11	SMAD2	WISP3
BLM	CYLD	FGF10	ICOSLG	MAP2K2	NUP93	PTPRD	SMAD3	WT1
BMPR1A	DAXX	FGF14	IDH1	MAP2K4	PAK1	PTPRS	SMAD4	XIAP
BRAF	DCUN1D1	FGF19	IDH2	MAP3K1	PAK3	PTPRT	SMARCA4	XPO1
BRCA1	DDR2	FGF23	IFNGR1	MAP3K13	PAK7	QKI	SMARCB1	YAP1
BRCA2	DICER1	FGF3	IGF1	MAP3K5	PALB2	RAC1	SMARCD1	YES1
BRD4	DIS3	FGF4	IGF1R	MAPK1	PARK2	RAD50	SMO	ZBTB2
BRIP1	DNMT1	FGF6	IGF2	MAPK7	PARP1	RAD51	SNCAIP	ZNF217
BTG1	DNMT3A	FGFR1	IKBKE	MAX	PAX5	RAD51B	SOCS1	ZNF703
BTK	DNMT3B	FGFR2	IKZF1	MCL1	PBRM1	RAD51C	SOX10	
C11ORF30	DOT1L	FGFR3	IL10	MDC1	PDCD1	RAD51D	SOX17	

Tabla 3. Genes incluidos en panel VHIO-300.

Los análisis tanto del panel Amplicon como del panel VHIO-300 se realizan en el laboratorio de Genómica de VHIO, bajo estándares de alta calidad con acreditación según la norma ISO 15189:2023, con alcance flexible (Acreditación nº: 1052/LE2022).

4.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PLASMA

Para obtención de plasma se ha utilizado el circuito establecido para plasmateca de VHIO que se detalla a continuación:

A. Extracción de sangre

1. Se hace coincidir la extracción con analíticas rutinarias programadas de la paciente para recoger las muestras en los tubos de plasmateca en el Hospital de Día (HD) del área de cáncer de mama. Se realiza mediante acceso venoso periférico o *central line* (PAC, PICC).
2. La extracción de sangre se realiza en 3 tubos de EDTA de 9 ml, tratando de colmar los tubos en la medida de las posibilidades. Se invierten los tubos 8-10 veces inmediatamente tras la extracción.
1. Las muestras son identificadas con la fecha de la extracción y el momento en que corresponde la extracción (ej.: basal, respuesta parcial (RP), Progresión de enfermedad (PD)...). Se codifica el ID de la paciente (ID = 3 primeros dígitos con el número de inclusión de forma consecutiva + 2 últimos dígitos con el número de muestras que se han obtenido en este mismo paciente). (Ej.: 001-01. Primer paciente, primera muestra)
3. En todos los casos posibles, es preferible procesar la muestra inmediatamente. En caso contrario, se deberá conservar la muestra en posición vertical a 4°C y procesarla antes de las 2 horas.
4. Se añade la identificación de la muestra a la base de datos de la plasmateca.

B. Procesamiento del plasma

1. Primera centrifugación: Se centrifugan los 3 tubos de EDTA a 1600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se transfiere el sobrenadante a un tubo Falcon vacío de 15 ml con una micropipeta.

2. Segunda centrifugación: Se centrifuga el plasma transferido al falcon a 3000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Esta 2ª centrifugación es importante para remover cualquier residuo. Se transfiere el plasma sobrenadante con una micropipeta a 9 alícuotas de 1,5 ml.
3. Se identifica cada alícuota de plasma para su almacenaje con el código de identificación del paciente tal y como se describe en el apartado previo de extracción.

C. Almacenamiento del plasma

Se colocan las alícuotas en una caja hidrofóbica, correctamente identificada, preparada para el almacenamiento de las muestras. Se congelan las muestras temporalmente en hielo seco y finalmente a -80°C en el congelador del hospital de día de mama. Para mantener la integridad de la muestra, es recomendable que entre la centrifugación y su congelación no transcurra un tiempo superior a 1 hora.

Se registran las muestras y la caja en la base de datos de seroteca. Las cajas se identifican como “Mama + nº correlativo”

Se Registran las cajas llenas en la base de datos de los ultracongeladores para que las muestras sean almacenadas en el congelador definitivo, ubicado en el edificio Cellex (VHIO) mediante un circuito específico creado con los celadores.

4.4.1. Análisis moleculares

4.4.1.1. Panel Guardant360 VHIO

Para los análisis genómicos en muestras de plasma se ha utilizado el panel Guardant360 VHIO como se describe brevemente a continuación:

-A partir de la muestra de sangre, se obtiene el ADNct utilizando el kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, QIAGEN y siguiendo las instrucciones del fabricante. Entre 5 y 30 ng de ADN extraído del plasma se utiliza para preparar librerías de secuenciación, las cuales son enriquecidas por captura híbrida utilizando el panel VHIO360 y secuenciadas en paralelo en una plataforma de Illumina, Inc. Concretamente, mediante un proceso automatizado, los fragmentos de ADN circulante se unen por ligación a adaptadores con identificadores de molécula única (Unique Molecular Identifiers – UMIs). Estos UMIs permiten la detección de errores de secuenciación y la detección de variantes a baja frecuencia alélica.

Las lecturas de secuenciación se analizan utilizando un flujo de análisis propiedad de la empresa Guardant Health (Redwood City, CA, US). Se realiza un preprocesamiento de datos en que las lecturas brutas de secuenciación pasan por filtros de calidad y se alinean contra el genoma humano de referencia. Se aplican algoritmos avanzados para la identificación de variantes genómicas incluyendo mutaciones puntuales, inserciones/deleciones, fusiones génicas y variaciones en el número de copias.

Los datos son revisados manualmente y la clasificación de las variantes identificadas se realiza utilizando bases de datos públicas disponibles (COSMIC, cBioPortal, ClinVar, etc.).

Los genes incluidos en el panel se muestran en la tabla 4.

Guardant VHIO360 panel de genes						
---------------------------------------	--	--	--	--	--	--

AKT1	CCND2	ESR1	HRAS	MET	NTRK3	ROS1
ALK	CCNE1	EZH2	IDH1	MLH1	PDGFRA	SMAD4
APC	CDH1	FBXW7	IDH2	MPL	PIK3CA	SMO
AR	CDK12	FGFR1	JAK2	MTOR	PTEN	STK11
ARAF	CDK4	FGFR2	JAK3	MYC	PTPN11	TERT
ARID1A	CDK6	FGFR3	KIT	NF1	RAF1	TP53
ATM	CDKN2A	GATA3	KRAS	NFE2L2	RB1	TSC1
BRAF	CTNNB1	GNA11	MAP2K1	NOTCH1	RET	VHL
BRCA1	DDR2	GNAQ	MAP2K2	NPM1	RHEB	
BRCA2	EGFR	GNAS	MAPK1	NRAS	RHOA	
CCND1	ERBB2	HNF1A	MAPK3	NTRK1	RIT1	

Tabla 4. Genes incluidos en panel VHIO-300.

Los análisis se realizan con el panel Guardant360 VHIO en el laboratorio de Genómica de VHIO, bajo estándares de alta calidad con acreditación según la norma ISO 15189:2023, con alcance flexible (Acreditación nº: 1052/LE2022).

4.5. GENERACIÓN DE MODELOS DE PDX

Para la generación de modelos de PDX, previamente mediante el proceso de firma del consentimiento informado DISEÑO MOLECULAR DEL TRATAMIENTO PERSONALIZADO DEL CÁNCER DE MAMA (PR(AG) 20-2019), se le explica a las pacientes esta posibilidad. Si la paciente acepta, coincidiendo con la realización de una biopsia de tejido tumoral por motivos asistenciales o de ensayo clínico, se extrae un fragmento adicional de tejido que se recoge en el lugar de la biopsia, en fresco, por personal del laboratorio. Posteriormente, se implantan los fragmentos de tumores de mama procedentes de la paciente en la glándula mamaria de ratones, a los que se suplementó con 1 µM de 17β-estradiol (Sigma-Aldrich) en el agua de bebida. Se utilizan de uno a dos ratones por muestra para implantar las biopsias de pacientes, en función de su tamaño. Se trata de modelos murinos NOD.CB17-Prkdcscid/J (NOD/SCID) de seis a ocho semanas de edad adquiridos a Janvier Labs. Los ratones se mantuvieron y trataron de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Ético para el Uso de Animales de Experimentación del Instituto de Oncología Vall d'Hebron el 25 de octubre de 2018 (código ético: CEA-OH/10303/1).

4.6. ESTADÍSTICA

4.6.1. Bases de datos

Los datos del proyecto se encuentran codificados en una base de datos de pacientes con CMM HER2 positivo creada en RedCap VHIO.

El registro de los pacientes en la base de datos, las determinaciones histológicas y moleculares y el tratamiento se llevan a cabo en las instalaciones del HUVH/VHIO. Se revisan las historias clínicas de todas las pacientes para confirmar la exactitud de las variables registradas en la base de datos. Se recogen y registran los datos demográficos de los pacientes (edad, sexo, estatus menopáusico), antecedentes patológicos (comorbilidades), las características del tumor al diagnóstico (localización, estadificación

inicial, tipo histológico, grado, receptores de estrógenos y progesterona, HER2, Ki67, análisis moleculares realizados previamente), tratamientos previos recibidos (neoadyuvancia, cirugía, adyuvancia), las características de la enfermedad metastásica antes de iniciar el tratamiento específico anti-HER2 y en cada línea sucesiva (número y tipo de localizaciones metastásicas, estatus de HER2, material de tejido y/o plasma disponible), tratamiento recibido en cada línea (tipo de tratamiento anti-HER2 y otros tratamientos oncoespecíficos concomitantes, fecha de inicio y fin del tratamiento), resultado del tratamiento obtenido (mejor respuesta, motivo de interrupción del tratamiento y localizaciones tumorales a la progresión) y el estado vital (incluida la fecha y motivo de fallecimiento o del último seguimiento) de cada paciente en la fecha de cierre de la base de datos.

Los resultados de los análisis anatomopatológicos y moleculares de las muestras se encuentran codificados en formato Excel.

4.6.2. Variables clínicas y patológicas

Las variables a estudio son:

- Tasa de respuesta: Porcentaje de pacientes que presentan respuesta a cada tratamiento considerando:
 - Respuesta Completa (RC): Desaparición de todas las lesiones tumorales, sin aparición de nuevas lesiones.
 - Respuesta Parcial (RP): Una disminución de al menos el 30% en la suma de los diámetros de las lesiones, tomando como referencia la suma inicial al comienzo del tratamiento.
 - Enfermedad Estable (EE): Situación en la que ni se cumplen los criterios de RP ni los de progresión de la enfermedad. Esto significa que no se observa una reducción suficiente para calificar como respuesta parcial, pero tampoco hay criterios de progresión.
 - Progresión de la Enfermedad (PE): Aumento del 20% de las lesiones tumorales o la aparición de nuevas lesiones.
- Tasa de beneficio clínico: La tasa de beneficio clínico (*Clinical-Benefit Rate*, CBR) se definió como el porcentaje de pacientes con enfermedad avanzada que logran, como mejor respuesta, una respuesta completa, respuesta parcial o enfermedad estable en un momento del tiempo. Para el estudio se evalúa la tasa de beneficio clínico a 6 meses.
- Supervivencia libre de progresión (SLP): La SLP (*Progression-free survival*, PFS) se definió como el tiempo desde el inicio del tratamiento sistémico (para cada línea de tratamiento en enfermedad avanzada) hasta la progresión de la enfermedad o el fallecimiento por cualquier causa.
- Tiempo a la progresión (TTP): El TTP se calculó sólo para las líneas de tratamiento con progresión. Se definió como el tiempo desde el inicio del tratamiento sistémico (para cada línea de tratamiento en enfermedad avanzada) hasta la progresión de la enfermedad (o fecha de inicio de la siguiente línea o fallecimiento por cualquier causa).

- Supervivencia global (SG): La SG (*Overall survival*, OS) se definió como el tiempo desde el inicio del primer tratamiento sistémico para la enfermedad avanzada hasta fallecimiento por cualquier causa.
- Resistencia primaria clínica: La resistencia primaria clínica se definió como la proporción de pacientes cuya mejor respuesta es EE durante \leq de 4 meses (120 días) o PE.
- Resistencia secundaria clínica: La resistencia secundaria clínica se definió como las adquiridas por las pacientes tras progresar a un tratamiento al menos $>$ de 4 meses (120 días).
- Mutaciones en tejido: Mutaciones detectadas por Amplicon y panel VHIO-300 clasificadas como variantes de significado incierto (VUS), patogénicas y probablemente patogénicas.
- Mutaciones en ctDNA: Mutaciones detectadas por panel Guardant360 VHIO clasificadas como variantes de significado incierto (VUS), patogénicas y probablemente patogénicas.
- Amplificación/sobreexpresión de HER2 en tejido: Determinación de la expresión de la proteína HER2 o amplificación de ERBB2 por técnicas de IHQ/ISH según las recomendaciones de las guías ASCO/CAP.¹⁰ Determinación de la amplificación de ERBB2 por Amplicon y por panel VHIO-300.
- Amplificación/sobreexpresión de HER2 en plasma: Determinación de la amplificación de ERBB2 por panel Guardant360 VHIO.
- Porcentaje de generación de PDX: Tasa de modelos murinos de PDX implantados en los que se genera un modelo de PDX viable.
- Porcentaje de respuesta en PDX: Tasa de reducción tumoral tras tratamiento en PDX.
- Tiempo a la progresión en PDX: Tiempo desde el inicio de tratamiento sistémico hasta la progresión tumoral.
- Supervivencia en PDX: Tiempo desde el inicio de tratamiento sistémico hasta el éxito del PDX.

4.6.3. Análisis estadístico descriptivo

Se realiza un análisis descriptivo de las variables demográficas y basales de los pacientes con cáncer de mama HER2+ y enfermedad avanzada. Las variables categóricas se reportan en número absoluto y porcentaje, y las variables continuas en términos de media, desviación estándar (DE), mediana, rango y rango intercuartílico.

Para el análisis de supervivencia (PFS y OS), se utilizó el método de Kaplan-Meier, presentando los resultados con un intervalo de confianza del 95% (95% CI). Para

determinar diferencias en los análisis de supervivencia, se usaron modelos de riesgos proporcionales de Cox univariados, estimando los *hazard ratios* (HR) con IC del 95% y valores de p.

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa R, versión 4.3.1 mediante el uso de paquetes como dplyr (v 1.1.4), odytools (v 0.8.1.9000), gtsummary (v 1.7.2), survival (v 3.7.0), survminer (v 0.4.9), ggsurvfit (v 1.1.0) y ggplot2 (v 3.5.1)

4.6.4. Análisis estadístico genómico

Para la obtención de datos genómicos interpretables, se procesan las muestras de ctDNA (analizadas por Guardant360 VHIO) de la siguiente manera: para que una mutación (SNVs) sea considerada, es necesario que *call* = 1, que *somatic_call* = "somatic" y que la entrada *Classification* no esté vacía. Para las copy-number, *call* = 1 se considera un evento gain y mayor que 1 se considera una amplificación.

Para la estimación de *tumor fraction* en las muestras de Guardant360, se selecciona la frecuencia más alta de una alteración patogénica. Para calcular la frecuencia alélica máxima estimada de una muestra, se selecciona la máxima frecuencia de cualquier alteración. La clonalidad de cada alteración se calcula dividiendo la frecuencia alélica por la máxima frecuencia alélica de la muestra, y es considerada clonal o subclonal si resulta mayor o menor a 0.5, respectivamente.

Para las muestras de tejido (analizadas con el Panel VHIO-300), las mutaciones (SNVs) son consideradas siempre que *call_somatic* = 1 y la entrada *Classification* no esté vacía. Para las copy-number, dado que *call* = 2 se considera el número normal de copias en células diploides, *call* = 1 corresponde a un evento loss y menor que 1 una delección, así como *call* = 3 o 4 se considera un evento gain y mayor que 4 una amplificación.

No se han incluido fusiones genómicas a causa de su baja detección.

Debido a la falta de datos crudos de las muestras secuenciadas por Amplicon, estas no han podido ser incluidas en el análisis genómico.

Para evaluar las correlaciones entre variables numéricas como el número de alteraciones, el número de genes alterados, las líneas de tratamiento, entre otros, se han construido modelos lineales generales. También se han utilizado correlaciones de Pearson y Spearman cuando ha sido necesario. Asimismo, se han empleado pruebas de Wilcoxon para los análisis y comparaciones entre grupos correspondientes.

El procesamiento de datos genómicos y análisis estadístico ha sido desarrollado en R versión 4.4.2 (31-10-2024), mediante el uso de paquetes como dplyr (v 1.1.4)³³⁴, tidyr (v 1.3.1)³³⁵, purrr³³⁶. Para la visualización se han utilizado paquetes como ggplot2³³⁷ (v 3.5.1), ggpubr (v 0.6.0)³³⁸, ComplexHeatmap (v 2.20.0)³³⁹, eulerr (v 7.0.2)³⁴⁰, y funciones adaptadas de maftools (v 2.20.0)³⁴¹.

5. RESULTADOS

5.1. FLUJO DE PACIENTES Y MUESTRAS

Se incluyen 107 pacientes de las cuales se realiza extracción seriada prospectiva de 608 muestras de plasma.

MUESTRAS PAREADAS:

Se identifican 39 pacientes con muestras pareadas de tejido tumoral y plasma en el mismo momento temporal. Se excluyen 68 pacientes de las que no hay disponibles muestras pareadas. Las pacientes se distribuyen según el diagrama de flujo (figura 7):

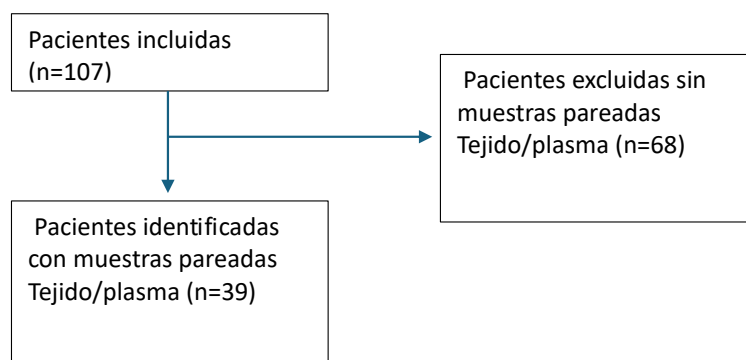


Figura 7. Diagrama de flujo de las pacientes de las pacientes incluidas en el proyecto.

Se identifican 39 pacientes con 54 muestras pareadas de tejido y plasma disponibles para análisis, de las cuales 26 tienen 1 muestra, 11 tienen 2 muestras y 2 tienen 3 muestras (figura 8).

Se analizan 51 muestras de tejido en total.

No es posible obtener resultados de 3 muestras de tejido porque el material no pasa el control de calidad para los análisis.

De las muestras de tejido:

- En 45 muestras provenientes de 35 pacientes es posible determinar HER2 por técnicas convencionales para valorar IHQ e ISH. De 6 pacientes no hay material suficiente disponible. De 43 pacientes se puede realizar H-score de HER2. Hay 8 pacientes sin material suficiente disponible.
- 12 muestras provenientes de 11 pacientes se analizan mediante Amplicon (resultados provenientes del programa de Prescreening asistencial de VHIO).
- 44 muestras procedentes de 34 pacientes se analizan mediante panel VHIO-300, de las cuales 2 son resultados provenientes del programa de Prescreening asistencial y 42 se analizan dentro del proyecto.
- Hay 5 muestras analizadas por Amplicon y panel VHIO-300.

De las muestras de plasma:

- Se analizan 52 muestras de 53, ya que una paciente tiene 2 muestras de tejido en el mismo momento temporal por lo que ambas tienen una misma muestra de plasma pareada. Se obtienen 49 muestras pareadas.
- 1 muestra no pasa el control de calidad y no se analiza.
- 2 muestras se analizan con resultados, pero provienen de la línea previa de tratamiento con respecto a la de tejido.

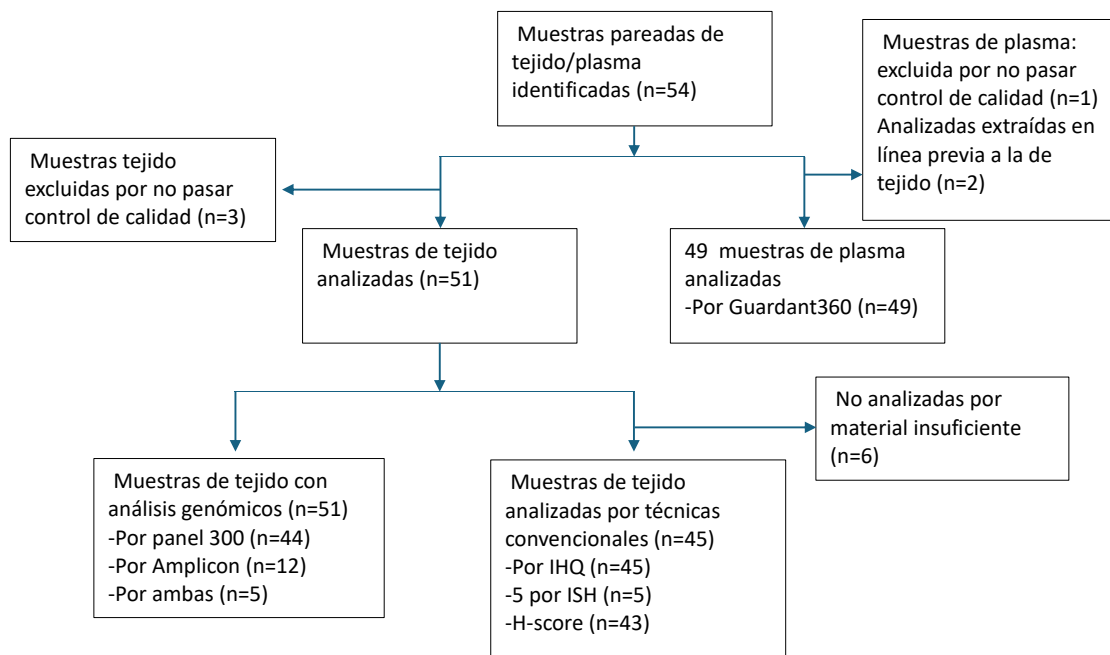


Figura 8. Diagrama de flujo de las pacientes y muestras pareadas incluidas en el proyecto.

MUESTRAS DE PLASMA ADICIONALES:

Se identifican 119 muestras de plasma correspondientes al inicio de alguna línea de tratamiento de las 39 pacientes incluidas en la cohorte de muestras pareadas (figura 9). Se analizan las 119 muestras de plasma, todas ellas con panel Guardant360 VHIO, de las cuales 3 no pasan control de calidad y no se obtienen resultados. Todas las muestras se analizan dentro del proyecto.

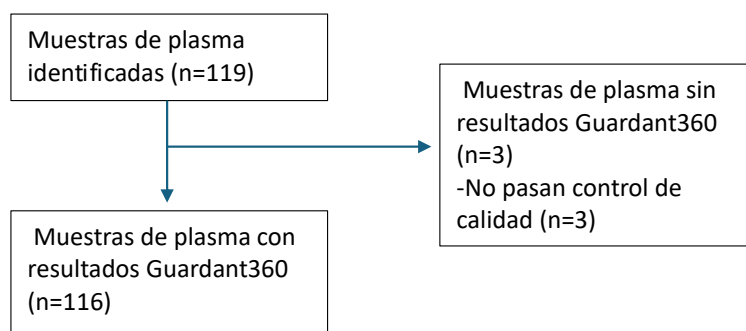


Figura 9. Diagrama de flujo de las muestras de biopsia líquida (Guardant) incluidas en el proyecto.

MUESTRAS DE TEJIDO PARA GENERACIÓN DE PDX:

En 49 biopsias de tejido realizadas a las 107 pacientes dentro del proyecto se obtiene material extra para la generación de PDX (figura 10). Se implantan 49 de los cuales 13 son viables.

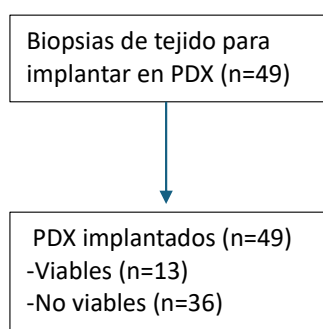


Figura 10. Diagrama de flujo de las biopsias realizadas para implantación en modelos de PDX

5.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES

A continuación, se describen las características de las 39 pacientes de las que se dispone de muestras pareadas para su análisis (tabla 5).

Todas las pacientes incluidas, presentaban un cáncer de mama estadio IV en tratamiento anti-HER2 en el momento de la inclusión y todas ellas eran de sexo femenino.

La mediana de edad al diagnóstico de las pacientes era de 49 años con un rango de 29 a 85 años. La mediana de edad de inclusión en el proyecto era de 53 años con un rango de 33 a 87 años. Hay 21 pacientes (54%) postmenopáusicas y 18 (46%) premenopáusicas.

Hay 9 pacientes (23%) con comorbilidades cardiovasculares, pulmonares o diabetes mellitus. La mayoría de las pacientes presentaban tumores unilaterales, 34 (87%), aunque había un 13% de bilateralidad, en 5 pacientes.

Se incluyen 13 pacientes (33%) que se habían diagnosticado con enfermedad metastásica de debut.

Habían recibido tratamiento neoadyuvante basado en quimioterapia 14 pacientes (36%), de las cuales 10 pacientes (71%) habían sido tratadas con antraciclinas. Respecto al tratamiento anti-HER2, lo recibieron 9 pacientes (64%) asociado a tratamiento neoadyuvante, todas recibieron al menos trastuzumab, 4 pacientes pertuzumab y ninguna recibió otros tratamientos anti-HER2.

La cirugía del tumor primario se había practicado a un total de 26 de las 39 pacientes (67%) incluidas. De ellas, 24 de 26 pacientes (92%) fueron intervenidas en el ámbito de enfermedad temprana y 2 pacientes de 13 (15%) pacientes con metástasis de novo en el ámbito metastásico.

Respecto a tratamiento adyuvante, 23 pacientes (59%) lo recibieron. La quimioterapia adyuvante se administró a 11 pacientes (48%) de las cuales 9 pacientes (82%), recibieron antraciclinas. 12 pacientes (52%) recibieron tratamiento anti-HER2 adyuvante, 11 (28%) trastuzumab y 1 (2,6%) T-DM1. Recibieron tratamiento hormonal adyuvante 16 pacientes (70%), de las cuales 13 (33%) basado en tamoxifeno, 3 (7.7%) inhibidor de aromatasa y 1 (2.6%) supresión ovárica. 20 pacientes (87%) fueron tratadas con radioterapia adyuvante.

Las localizaciones de progresión metastásica o de novo en las 39 pacientes fueron en 27 (69%) mama, 16 (41%) hígado, 8 (21%) pulmón, 24 (62%) adenopatías, 18 (46%) , ósea, 2 (5.1%) cerebro, 5 (13%) letálides y 4 (10%) en otras localizaciones.

A la progresión había 5 pacientes (12.8%) que habían cambiado su estatus de HER2, 4 (80%) a HER2 positivo y 1 (20%) a HER2 negativo. 23 pacientes (59%) presentaban metástasis viscerales de inicio.

La mediana de líneas de tratamiento recibidos en el ámbito metastásico fue de 6 con un rango (1-14), 5 (13%) pacientes recibieron ≤ 2 líneas, 13 (33%) > 2 y ≤ 5 y 21 (54%) > 5 líneas.

El estatus en el último seguimiento de las pacientes fue de 9 (23%) vivas y 30 (77%) éxitus. Las causas de éxitus fueron progresión de enfermedad en 29 (97%) pacientes, 1 (3.3%) sin tratamiento activo por una infección respiratoria, no hubo ninguna muerte por toxicidad.

Características de las pacientes	N (%)	
Sexo, n (%)	39	
Femenino		39 (100%)
Masculino		0 (0%)
Edad al diagnóstico	39	
Media (DE)		47.9 (11.5)
Mediana (25%,75%)		49.3 (42.1,53.7)
Rango		29.4 - 85.1
Edad a la firma de CI	37	
Media (DE)		54.1 (11.4)
Mediana (25%,75%)		53.7 (45.7,61.9)
Rango		33.0 - 87.9
(Desconocido)		2
Estado menopáusico, n (%)	39	
Premenopáusica		18 (46%)
Postmenopáusica		21 (54%)
Segundas neoplasias, n (%)	39	6 (15%)
Hábito tabáquico, n (%)	39	
Fumador actual		6 (15%)
Exfumador		10 (26%)
No fumador		23 (59%)
Patología cardiovascular (hipertensión, insuficiencia cardíaca, etc.), n (%)	39	7 (18%)
Patología pulmonar (EPOC, disnea de esfuerzo, etc.), n (%)	39	1 (2.6%)
Patología renal, n (%)	39	0 (0%)
Diabetes mellitus?, n (%)	39	1 (2.6%)
Bilateralidad, n (%)	39	
Unilateral		34 (87%)
Bilateral		5 (13%)
Lateralismo:, n (%)	34	
Derecho		18 (53%)
Izquierdo		16 (47%)
(Desconocido)		5
Debut metastásico, n (%)	39	13 (33%)
Tratamiento neoadyuvante previo, n (%)	39	14 (36%)
Quimioterapia neoadyuvante, n (%)	14	14 (100%)
No se administra		25
Antraciclinas neoadyuvantes, n (%)	14	10 (71%)
No se administran		25
Anti-HER2 neoadyuvante, n (%)	14	9 (64%)
No se administra		25

Características de las pacientes	N (%)	
Trastuzumab, n (%)	39	9 (23%)
Pertuzumab, n (%)	39	4 (10%)
Lapatinib, n (%)	39	0 (0%)
Cirugía del tumor primario, n (%)	39	
<i>Sí total</i>		26 (67%)
<i>Sí, en enfermedad temprana</i>	26	24 (92%)
<i>Sí, en enfermedad metastásica</i>	13	2 (15%)
<i>No</i>		13 (33%)
Tratamiento adyuvante, n (%)	39	23 (59%)
Quimioterapia adyuvante, n (%)	23	11 (48%)
<i>No se administra</i>		16
Antraciclinas adyuvantes, n (%)	11	9 (82%)
<i>No se administran</i>		28
Anti-HER2 adyuvante, n (%)	23	12 (52%)
<i>No se administra</i>		16
Trastuzumab, n (%)	39	11 (28%)
Pertuzumab, n (%)	39	0 (0%)
Lapatinib, n (%)	39	0 (0%)
Neratinib, n (%)	39	0 (0%)
T-DM1, n (%)	39	1 (2.6%)
Terapia hormonal adyuvante, n (%)	23	16 (70%)
<i>No se administra</i>		16
Tamoxifeno, n (%)	39	13 (33%)
Inhibidores de aromatasa, n (%)	39	3 (7.7%)
Supresión ovárica, n (%)	39	1 (2.6%)
Radioterapia adyuvante, n (%)	23	20 (87%)
<i>No se administra</i>		16
Localizaciones de progresión a M1 o de M1 de novo, n (%)	39	39 (100%)
Mama, n (%)	39	27 (69%)
Hígado, n (%)	39	16 (41%)
Pulmón, n (%)	39	8 (21%)
Adenopatías, n (%)	39	24 (62%)
Ósea, n (%)	39	18 (46%)
Cerebro, n (%)	39	2 (5.1%)
Letálides, n (%)	39	5 (13%)
Otras, n (%)	39	4 (10%)
Estado HER2 ha cambiado a HER2+ o HER2- después de la primera progresión, n (%)	39	5 (13%)
Cambio de estado HER2?, n (%)	5	
<i>Cambio a HER2+ (positivo)</i>		4 (80%)
<i>Cambio a HER2- (negativo)</i>		1 (20%)
<i>Sin cambio</i>		34
Número de líneas de tratamiento enfermedad metastásica	39	
<i>Mediana (DE)¹</i>		6.3 (3.6)
<i>Mediana (25%,75%)</i>		6.0 (4.0,8.0)
<i>Rango</i>		1.0 - 14.0
Número de líneas de tratamiento enfermedad metastásica agrupada, n (%)	39	
<i>> 2 & ≤ 5</i>		13 (33%)
<i>> 5</i>		21 (54%)
<i>≤ 2</i>		5 (13%)
Metastasis visceral al debut n (%)	39	23 (59%)
Estado en el último seguimiento, n (%)	39	
<i>Viva</i>		9 (23%)
<i>Éxito</i>		30 (77%)
Motivo de exitus, n (%)	29	
<i>Progresión Enfermedad</i>		29 (97%)

Características de las pacientes	N (%)
Toxicidad	0 (0%)
Infección respiratoria	1 (3.3%)

Tabla 5. Características de las pacientes. ¹ M1: Metástasis. ² DE: Desviación estándar

CARACTERÍSTICAS DE LOS TUMORES AL DIAGNÓSTICO DE LAS PACIENTES

En la muestra de 39 pacientes incluidas, se diagnostican 44 tumores debido a la bilateralidad, cuyas características se incluyen en la tabla 6.

La estadificación de los tumores al diagnóstico fue de 2 (4.5%) en estadio 0, 5 (11%) en IA, 7 (16%) en IIA, 4 (9.1%) en IIB, 6 (14%) en IIIA, 1 (2.3%) en IIIB, 3 (6.8%) en IIIC y 16 (36%) en estadio IV.

La focalidad observada en los tumores fue en 33 (75%) unifocal, en 2 (4.5%) multifocal, en 5 (11%) multicéntrico y en 4 (9.1%) desconocido.

Respecto al tipo histológico, la mayoría de los tumores 41 (93%) eran ductales, 1 (2.3%) lobular, 1 (2.3%) mixto y 1 (2.3%) de otra estirpe. El grado histológico observado fue grado 1 en 1 (2.3%) tumor, grado 2 en 19 (43%), grado 3 en 12 (27%) y desconocido en 12 (27%) tumores.

En la IHQ observada para el receptor de estrógenos fue positivo en 25 (57%) de los tumores, negativo en 18 (41%) y desconocido en 1 (2.3%). Respecto al porcentaje de receptor de estrógeno la mediana fue de 70% y el rango (0-100). Para el receptor de progesterona, fue positivo en 23 (52%) de los tumores, negativo en 20 (45%) y desconocido en 1 (2.3%). La mediana de porcentaje de receptor de progesterona observada fue de 43% con un rango (0-100). En relación con el estatus de HER2 en los 44 tumores, fue negativo en 10 (23%), positivo en 31 (70%) y desconocido en 3 (6.8%). La IHQ de HER2 en los tumores primarios fue de 0 en 1 (2.3%), +1 en 2 (4.5%), +2 en 6 (14%), +3 en 23 (52%), y desconocida en 12 (27%). Había 8 (18%) de tumores con ISH para HER2 positivo y 36 (82%) no realizado. Para el ki67 la mediana fue de 32 con un rango de 5-90 para los 31 tumores de los que se disponía del resultado.

El subtipo intrínseco subrogado según el resultado de IHQ fue de HER2 POSITIVO luminal en 13 (30%) de los tumores, HER2 POSITIVO no luminal en 18 (41%), luminal A en 3 (6.8%), luminal B en 7 (16%), luminal (no especificado) en 2 (4.5%) y desconocido en 1 (2.3%).

En 29 de los tumores se realizó cirugía, en 3 (10%) mediante mastectomía con biopsia selectiva de ganglio centinela (BSGC), 6 (21%) con mastectomía con linfadenectomía, 11 (38%) con mastectomía radical modificada, 8 (28%) mediante tumorectomía con BSGC y 1 (3.4%) otra técnica. No se realizó tratamiento quirúrgico en 15 tumores. En los 15 tumores de los que se dispone de información postneoadyuvancia, ninguno había alcanzado pCR.

Característica	N	N (%)
Estadificación al diagnóstico n (%)	44	
0		2 (4.5%)
IA		5 (11%)

Característica	N	N (%)
<i>IIA</i>		7 (16%)
<i>IIB</i>		4 (9.1%)
<i>IIIA</i>		6 (14%)
<i>IIIB</i>		1 (2.3%)
<i>IIIC</i>		3 (6.8%)
<i>IV</i>		16 (36%)
Tipo Histológico, n (%)	44	
<i>Ductal</i>		41 (93%)
<i>Lobular</i>		1 (2.3%)
<i>Mixto</i>		1 (2.3%)
<i>Otro</i>		1 (2.3%)
Focalidad, n (%)	44	
<i>Multicéntrico</i>		5 (11%)
<i>Multifocal</i>		2 (4.5%)
<i>Unifocal</i>		33 (75%)
<i>Desconocido</i>		4 (9.1%)
Grado Histológico, n (%)	44	
<i>1</i>		1 (2.3%)
<i>2</i>		19 (43%)
<i>3</i>		12 (27%)
<i>Desconocido</i>		12 (27%)
Porcentaje Receptor Estrógeno	25	
<i>Media (DE)¹</i>		51 (41)
<i>Mediana (25%,75%)</i>		70 (5,90)
<i>Rango</i>		0 - 100
Positividad Receptor Estrógeno, n (%)	44	
<i>Negativo</i>		18 (41%)
<i>Positivo</i>		25 (57%)
<i>Desconocido</i>		1 (2.3%)
Porcentaje Receptor Progesterona	22	
<i>Media (DE)¹</i>		43 (41)
<i>Mediana (25%,75%)</i>		43 (0,83)
<i>Rango</i>		0 - 100
Positividad Receptor Progesterona, n (%)	44	
<i>Negativo</i>		20 (45%)
<i>Positivo</i>		23 (52%)
<i>Desconocido</i>		1 (2.3%)
Estatus HER2 , n (%)	44	
<i>Negativo</i>		10 (23%)
<i>Positivo</i>		31 (70%)
<i>Desconocido</i>		3 (6.8%)
IHQ² HER2, n (%)	44	
<i>+1</i>		2 (4.5%)
<i>+2</i>		6 (14%)
<i>+3</i>		23 (52%)
<i>0</i>		1 (2.3%)
<i>Desconocida</i>		12 (27%)
ISH³ HER2, n (%)	44	
<i>Positivo</i>		8 (18%)
<i>Desconocido</i>		36 (82%)
ki67	31	
<i>Media (DE)</i>		39 (24)
<i>Mediana (25%,75%)</i>		32 (20,55)
<i>Rango</i>		5 - 90
Subtipo intrínseco subrogado, n (%)	44	
<i>HER2+ Luminal</i>		13 (30%)

Característica	N	N (%)
HER2+ No Luminal		18 (41%)
Luminal A		3 (6.8%)
Luminal B		7 (16%)
Luminal (no especificado)		2 (4.5%)
Desconocido		1 (2.3%)
Cirugía, n (%)	29	
Mastectomía con BSGC ⁴		3 (10%)
Mastectomía con Linfadenectomía		6 (21%)
Mastectomía Radical Modificada		11 (38%)
Otra		1 (3.4%)
Tumorectomía con BSGC		8 (28%)
No realizada		15
RCB postneoadyuvancia, n (%)	15	
RCB II		3 (20%)
Desconocido		12 (80%)
pCR postneoadyuvancia, n (%)	15	
No		13 (87%)
Desconocido		2 (13%)

Tabla 6. Características de los tumores al diagnóstico de las pacientes.¹DE: Desviación estándar; ²IHQ: Inmunohistoquímica; ³ISH: Hibridación in situ; ⁴BSGC: Biopsia Selectiva Ganglio Centinela.

5.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS LÍNEAS DE TRATAMIENTO PARA ENFERMEDAD METASTÁSICA RECIBIDAS POR LAS PACIENTES

Las 39 pacientes incluidas han recibido al menos un tratamiento anti-HER2 en el ámbito de la enfermedad metastásica. La mediana de líneas de tratamiento recibidos en el ámbito metastásico fue de 6 con un rango (1-14).

La mediana de seguimiento de las pacientes desde el inicio de tratamiento anti-HER2 en primera línea hasta el último seguimiento de 51.7 meses con un rango de 20 a 185 meses. La mediana de seguimiento desde la inclusión en el proyecto es de 35 meses con un rango de 5.6 a 95 meses.

Las 39 pacientes reciben un total de 244 tratamientos. Son tratadas 39 pacientes en primera línea (1L), 35 en 2L, 34 en 3L, 30 en 4L, 25 en 5L, 21 en 6L, 16 en 7L, 15 en 8L, 8 en 9L, 7 en 10L, 5 en 11L, 5 en 12L, 2 en 13L y 2 en 14L. Las terapias anti-HER2 recibidas por tratamiento fueron trastuzumab en 118 (48%), pertuzumab en 30 (12%), zanidatamab (ZW25) en 5 (2%), margetuximab en 1 (0.4%), zenocutuzumab (MCLA-128) en 1 (0.4%), trastuzumab duocarmazina (SYD985) en 10 (4%), trastuzumab deruxtecan (TDXd) en 25 (10%), lapatinib en 13 (5%), neratinib en 2 (0.8%), tucatinib en 10 (4%) y dasatinib en 1 (0.4%) tratamiento.

TRATAMIENTOS RECIBIDOS POR LÍNEA DE TRATAMIENTO

Las pacientes van recibiendo distintos tratamientos a lo largo de las diferentes líneas de tratamiento. Reciben tanto tratamientos específicos anti-HER2 como otros tratamientos no anti-HER2. Los tratamientos se administraron considerando la mejor opción terapéutica para la paciente en cada momento, recibiendo así tratamiento asistencial o un tratamiento experimental dentro de un estudio clínico con terapias dirigidas contra HER2 (tablas 7 y 8).

Se agrupan los tratamientos recibidos en monoterapia y en las combinaciones más utilizadas y relevantes. Se denominan y codifican como Cleopatra group: taxano-trastuzumab-pertuzumab, HT: hormonoterapia, iCDK: inhibidor de ciclinas, Ipi3k_Akt: Inhibidor PI3K/AKT, QT: quimioterapia, SYD985: trastuzumab duocarmacina, TDM1: trastuzumab emtansina, TDXd: trastuzumab deruxtecan, TKI: Inhibidor tirosina quinasa, TZ: trastuzumab, TZ_HT: trastuzumab-hormonoterapia, TZ_iCDK: trastuzumab - inhibidor de ciclinas-hormonoterapia, TZ_QT: trastuzumab-quimioterapia, TZ_QT_HT: trastuzumab-quimioterapia-hormonoterapia.

En 1L, de las 39 pacientes, 33 (85%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 27 (69%) reciben trastuzumab, 21 (54%) pertuzumab, 2 (5.1%) trastuzumab emtansina (T-DM1), 2 (5.1%) trastuzumab deruxtecan (T-DXd), 2 (5.1%) lapatinib y 1 (2.6%) dasatinib. Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 21 (54%) reciben Cleopatra: taxano- trastuzumab-pertuzumab, 3 (7.7%) TKi, 2 (5.1%) HT, 2 (5.1%) iCDK, 2 (5.1%) QT, 2 (5.1%) TZ_QT_HT. Hay 27 (69%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y 12 (31%) tratadas en ensayo clínico. Ninguna paciente fue tratada en uso compasivo.

En 2L, de las 35 pacientes, 30 (86%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 19 (54%) reciben T-DM1, 7 (20%) trastuzumab, 3 (8.6%) pertuzumab, 3 (8.6%) lapatinib, 1 (2.9%) TDXd, 1 (2.9%) trastuzumab duocarmacina (SYD-985). Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 3 (8.6%) reciben Cleopatra, 1 (2.9%) HT, 1 (2.9%) iCDK, 1 (2.9%) Ipi3k_Akt, 1 (2.9%) QT, 3 (8.6%) TKi, 3 (8.6%) TZ_QT. Hay 26 (74%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y 8 (23%) tratadas en ensayo clínico. Una paciente (2.9%) fue tratada en uso compasivo.

En 3L, de las 34 pacientes, 32 (94%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 18 (53%) reciben trastuzumab, 5 (15%) T-DM1, 5 (15%) T-DXd, 3 (8.8%) pertuzumab, 3 (8.8%) lapatinib, 2 (5.9%) tucatinib, 1 (2.9%) neratinib, 1 (2.9%) margetuximab. Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 3 (8.8%) Cleopatra, 1 (2.9%) HT, 2 (5.9%) QT, 6 (18%) TKI, 11 (32%) TZ_QT, 1 (2.9%) TZ_QT_HT. Hay 16 (47%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y 17 (50%) tratadas en ensayo clínico. Una paciente (2.9%) fue tratada en uso compasivo.

En 4L, de las 30 pacientes, 25 (83%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 16 (53%) reciben trastuzumab, 4 (13%) tucatinib, 3 (10%) T-DXd, 3 (10%) SYD-985, 3 (10%) lapatinib, 2 (6.7%) T-DM1. Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 1 (3.4%) iCDK, 1 (3.4%) Ipi3k_Akt, 2 (6.9%) QT, 7 (24%) TKI, 1 (3.4%) TZ, 1 (3.4%) TZ_iCDK, 8 (28%) TZ_QT. Hay 14 (47%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y 14 (47%) tratadas en ensayo clínico. Dos pacientes (6.7%) fueron tratadas en uso compasivo.

En 5L, de las 25 pacientes, 24 (96%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 15 (60%) reciben trastuzumab, 6 (24%) T-DXd, 2 (8%) tucatinib, 2 (8%) zanidatamab, 1 (4%) pertuzumab, 1 (4%) lapatinib.

Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 1 (4%) Cleopatra, 1 (4%) HT, 1 (4%) iCDK, 1 (4%) QT, 3 (12%) TKI, 1 (4%) TZ_HT, 11 (44%) TZ_QT. Hay 14 (56%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y 9 (36%) tratadas en ensayo clínico. Dos pacientes (8%) fueron tratadas en uso compasivo

En 6L, de las 21 pacientes, 17 (81%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 10 (48%) reciben trastuzumab, 3 (14%) T-DM1, 3 (14%), SYD-985, 1 (4.8%) tucatinib, 1 (4.8%) zanidatamab.

Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 1 (5%) HT, 1 (5%) iCDK, 2 (10%) Ipi3k_Akt, 2 (10%) QT, 1 (5%) TKI, 2 (10%) TZ_HT, 5 (25%) TZ_QT. Hay 11 (55%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y 8 (40%) tratadas en ensayo clínico. Una paciente (5%) fue tratada en uso compasivo.

En 7L, de las 16 pacientes, 15 (94%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 10 (63%) reciben trastuzumab, 3 (19%) T-DXd, 1 (6.3%) MCLA-128.

Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 1 (6.7%) Ipi3k_Akt, 2 (13%) QT, 1 (6.7%) TZ_HT, 8 (53%) TZ_QT.

Hay 10 (63%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y 4 (25%) tratadas en ensayo clínico. Dos pacientes (13%) fueron tratadas en uso compasivo.

En 8L, de las 15 pacientes, 10 (67%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 4 (27%) reciben trastuzumab, 2 (13%) T-DXd, 1 (6.7%) T-DM1, 1 (6.7%) SYD-985, 1 (6.7%) zanidatamab, 1 (6.7%) neratinib.

Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 1 (6.7%) HT, 2 (13%) iCDK, 1 (6.7%) Ipi3k_Akt, 3 (20%) QT, 1 (6.7%) TKI, 3 (20%) TZ_QT.

Hay 8 (53%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y 3 (20%) tratadas en ensayo clínico. Cuatro pacientes (27%) fueron tratadas en uso compasivo.

En 9L, de las 8 pacientes, 6 (75%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 5 (63%) reciben trastuzumab, 1 (13%) T-DXd, 1 (13%) pertuzumab.

Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 1 (13%) Cleopatra, 1 (13%) HT, 1 (13%) iCDK, 1 (13%) TZ_iCDK, 3 (38%) TZ_QT.

Hay 6 (75%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y 2 (25%) tratadas en ensayo clínico. Ninguna paciente fue tratada en uso compasivo.

En 10L, de las 7 pacientes, 4 (57%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 1 (14%) recibe trastuzumab, 1 (14%) T-DM1, 1 (14%) T-DXd, 1 (14%) zanidatamab.

Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 1 (14%) HT, 1 (14%) iCDK, 2 (29%) QT, 1 (14%) TZ_QT.

Hay 5 (71%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y 1 (14%) tratadas en ensayo clínico. Una paciente (14%) fue tratada en uso compasivo.

En 11L, de las 5 pacientes, 4 (80%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 2 (40%) reciben trastuzumab, 1 (20%) pertuzumab, 1 (20%) lapatinib, 1 (20%) SYD-985.

Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 1 (20%) QT, 1 (20%) TKI, 1 (20%) TZ_HT, 1 (20%) TZ_QT.

Hay 3 (60%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y 2 (40%) tratadas en ensayo clínico. Ninguna paciente fue tratada en uso compasivo.

En 12L, de las 5 pacientes, 3 (60%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 2 (40%) reciben trastuzumab, 1 (20%) T-DXd, 1 (20%) tucatinib.

Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 2 (40%) QT, 1 (20%) TKI, 1 (20%) TZ_QT_HT.

Hay 4 (80%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y 1 (20%) tratadas en ensayo clínico. Ninguna paciente fue tratada en uso compasivo.

En 13L, de las 2 pacientes, 2 (100%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 1 (50%) recibe trastuzumab y 1 (50%) SYD-985.

Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 1 (50%) TZ_QT.

Hay 1 (50%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y 1 (50%) tratadas en ensayo clínico. Ninguna paciente fue tratada en uso compasivo.

En 14L, de las 2 pacientes, 1 (50%) reciben tratamiento anti-HER2. De ellas 1 (50%) recibe trastuzumab.

Respecto a las combinaciones de tratamiento y otros tratamientos no anti-HER2, 1 (100%) TZ_HT.

Hay 1 (50%) de pacientes tratadas con tratamiento asistencial y ninguna tratada en ensayo clínico. Una paciente (50%) fue tratada en uso compasivo.

Considerando todas las pacientes tratadas con tratamiento asistencial por cada línea de tratamiento, la media sería de 10.43 pacientes con una DE de 8.41 y una mediana de 9 que se corresponde con un 60.71% de pacientes de media con una DE de 11% y una mediana de 58%.

Si tenemos en cuenta todas las pacientes tratadas en ensayo clínico a lo largo de las líneas de tratamiento, la media sería de 5.86 pacientes por línea con una DE de 5.41 y una mediana de 3.5 pacientes, que a su vez se correspondería con una media de un 30% de pacientes con DE de 15.18 por línea y una mediana del 28%.

Para las pacientes tratadas en uso compasivo, la media sería de 1.07 pacientes por línea con una DE de 1.14 y una mediana de 1 que se correspondería con un 9.25% de media con una DE de 13.92 y una mediana de 3.95%.

Tratamiento anti-HER2 por línea	1L N= 39	2L N= 35	3L N= 34	4L N= 30	5L N= 25	6L N= 21	7L N= 16	8L N= 15	9L N= 8	10L N= 7	11L N= 5	12L N= 5	13L N= 2	14L N= 2
ANTICUERPOS														
Trastuzumab, n (%)	27 (69%)	7 (20%)	18 (53%)	16 (53%)	15 (60%)	10 (48%)	10 (63%)	4 (27%)	5 (63%)	1 (14%)	2 (40%)	2 (40%)	1 (50%)	1 (50%)
Pertuzumab, n (%)	21 (54%)	3 (8.6%)	3 (8.8%)	-	1 (4.0%)	-	-	-	1 (13%)	-	1 (20%)	-	-	-
Margetuximab, n (%)	-	-	1 (2.9%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zanidatamab (ZW25), n (%)	-	-	-	-	2 (8.0%)	1 (4.8%)	-	1 (6.7%)	-	1 (14%)	-	-	-	-

Tratamiento anti-HER2 por línea	1L N= 39	2L N= 35	3L N= 34	4L N= 30	5L N= 25	6L N= 21	7L N= 16	8L N= 15	9L N= 8	10L N= 7	11L N= 5	12L N= 5	13L N= 2	14L N= 2
Zenocutuzumab (MCLA-128), n (%)	-	-	-	-	-	-	1 (6.3%)	-	-	-	-	-	-	-
ADCs														
Trastuzumab emtansina (T-DM1), n (%)	2 (5.1%)	19 (54%)	5 (15%)	2 (6.7%)	-	3 (14%)	-	1 (6.7%)	-	1 (14%)	-	-	-	-
Trastuzumab deruxtecan (TDXd), n (%)	2 (5.1%)	1 (2.9%)	5 (15%)	3 (10%)	6 (24%)	-	3 (19%)	2 (13%)	1 (13%)	1 (14%)	-	1 (20%)	-	-
trastuzumab duocarmazina (SYD985), n (%)	-	1 (2.9%)	-	3 (10%)	-	3 (14%)	-	1 (6.7%)	-	-	1 (20%)	-	1 (50%)	-
TKIs														
Lapatinib, n (%)	2 (5.1%)	3 (8.6%)	3 (8.8%)	3 (10%)	1 (4.0%)	-	-	-	-	-	1 (20%)	-	-	-
Neratinib, n (%)	-	-	1 (2.9%)	-	-	-	-	1 (6.7%)	-	-	-	-	-	-
Tucatinib, n (%)	-	-	2 (5.9%)	4 (13%)	2 (8.0%)	1 (4.8%)	-	-	-	-	-	1 (20%)	-	-
Dasatinib, n (%)	1 (2.6%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 7. Tratamientos específicos anti-HER2 por cada línea de tratamiento

Tipo de tratamiento por línea	1L N= 39	2L N= 35	3L N= 34	4L N= 30	5L N= 25	6L N= 21	7L N= 16	8L N= 15	9L N= 8	10L N= 7	11L N= 5	12L N= 5	13L N= 2	14L N= 2
Grupo de combinaciones anti-HER2														
Cleopatra group ¹	21 (54%)	3 (8.6%)	3 (8.8%)	-	1 (4.0%)	-	-	-	1 (13%)	-	-	-	-	-
TZ_QT ²	3 (7.7%)	3 (8.6%)	11 (32%)	8 (28%)	11 (44%)	5 (25%)	8 (53%)	3 (20%)	3 (38%)	1 (14%)	1 (20%)	-	1 (50%)	-
TZ_QT_HT ¹³	2 (5.1%)	-	1 (2.9%)	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (20%)	-	-
TZ_HT ⁴	-	-	-	-	1 (4.0%)	2 (10%)	1 (6.7%)	-	-	-	1 (20%)	-	-	1 (100%)
TDM1 ⁵	2 (5.1%)	19 (54%)	5 (15%)	2 (6.9%)	-	3 (15%)	-	1 (6.7%)	-	1 (14%)	-	-	-	-
TdXd ⁶	2 (5.1%)	1 (2.9%)	5 (15%)	3 (10%)	6 (24%)	-	3 (20%)	2 (13%)	1 (13%)	1 (14%)	-	1 (20%)	-	-
SYD985 ⁷	-	1 (2.9%)	-	3 (10%)	-	3 (15%)	-	1 (6.7%)	-	-	1 (20%)	-	1 (50%)	-
TKI ⁸	3 (7.7%)	3 (8.6%)	6 (18%)	7 (24%)	3 (12%)	1 (5.0%)	-	1 (6.7%)	-	-	1 (20%)	1 (20%)	-	-

Tabla 8. Grupos de tratamiento anti-HER2 por cada línea metastásica. ¹Cleopatra group: taxano- trastuzumab-pertuzumab, ²TZ_QT: trastuzumab-quimioterapia, ³TZ_QT_HT: trastuzumab-quimioterapia-hormonoterapia, ⁴TZ_HT: trastuzumab-hormonoterapia, ⁵TDM1: trastuzumab emtansina, ⁶TdXd: trastuzumab deruxtecan, ⁷SYD985: trastuzumab duocarmazina, ⁸TKI: Inhibidor tirosina quinasa.

5.4. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA

RESPUESTA Y TIEMPO A LA PROGRESIÓN (TTP) POR LÍNEA DE TRATAMIENTO

Se recoge la evaluación de la respuesta a cada línea de tratamiento recibida por las 39 pacientes incluidas.

Considerando todos los tratamientos recibidos por las pacientes la media de TTP ha sido de 9.2 meses, la mediana (25%,75%) de 5.7 (3,12) meses con un rango de 0 a 62.9 meses. En 83 (35%) tratamientos se encuentra una TTP < 4 meses y en 154 (65%) es > 4 meses.

En 7 tratamientos no es valorable. Hay beneficio clínico con CBR > 6 meses en 121 tratamientos (58%), en 86 (42%) tratamientos no la hay y en 37 no es valorable. La evaluación de respuesta por cada línea de tratamiento se detalla en la tabla 9.

LÍNEA METASTÁSICA	1L N= 39	2L N= 35	3L N= 34	4L N= 30	5L N= 25	6L N= 21	7L N= 16	8L N= 15	9L N= 8	10L N= 7	11L N= 5	12L N= 5	13L N= 2	14L N= 2
Valoración de respuesta, n (%)	35 (100%)	30 (94%)	31 (97%)	27 (90%)	24 (96%)	16 (84%)	15 (100%)	15 (100%)	8 (100%)	5 (83%)	5 (100%)	4 (80%)	2 (100%)	1 (50%)
No valorada/ Desconocida	4	3	2	0	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0
Mejor respuesta a tratamiento, n (%)														
CR ¹	2 (5.9%)	-	1 (3.3%)	1 (4.2%)	-	-	-	1 (6.7%)	-	-	-	-	-	-
PR ²	25 (74%)	16 (55%)	13 (43%)	5 (21%)	12 (52%)	1 (6.7%)	4 (27%)	5 (33%)	2 (29%)	2 (50%)	2 (40%)	1 (25%)	-	-
SD ³	6 (18%)	9 (31%)	6 (20%)	8 (33%)	5 (22%)	7 (47%)	5 (33%)	5 (33%)	1 (14%)	1 (25%)	2 (40%)	1 (25%)	-	-
PD ⁴	1 (2.9%)	4 (14%)	10 (33%)	10 (42%)	6 (26%)	7 (47%)	6 (40%)	4 (27%)	4 (57%)	1 (25%)	1 (20%)	2 (50%)	2 (100%)	1 (100%)
No valorada/ Desconocida	5	6	4	6	2	6	1	0	1	3	0	1	0	1
Discontinuación de tratamiento, n (%)	35 (90%)	35 (100%)	33 (97%)	30 (100%)	24 (96%)	21 (100%)	15 (94%)	15 (100%)	8 (100%)	7 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
Motivo de la discontinuación, n (%)														
PD ⁴	32 (91%)	30 (86%)	28 (85%)	27 (90%)	22 (92%)	17 (81%)	14 (93%)	11 (73%)	6 (75%)	5 (71%)	4 (80%)	4 (80%)	2 (100%)	1 (50%)
Toxicidad	2 (5.7%)	5 (14%)	3 (9.1%)	2 (6.7%)	2 (8.3%)	-	1 (6.7%)	1 (6.7%)	1 (13%)	-	1 (20%)	-	-	-
Exitus	-	-	-	1 (3.3%)	-	4 (19%)	-	2 (13%)	1 (13%)	2 (29%)	-	1 (20%)	-	1 (50%)
Otros	1 (2.9%)	-	2 (6.1%)	-	-	-	-	1 (6.7%)	-	-	-	-	-	-
No valorada/ Desconocida	4	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Pacientes en progresión a cada línea, n (%)	36 (92%)	33 (94%)	33 (97%)	30 (100%)	22 (88%)	20 (95%)	14 (88%)	13 (87%)	8 (100%)	7 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
Cambio de estatus HER2 por línea, n (%)	2 (5.7%)	2 (6.1%)	2 (6.1%)	3 (10%)	2 (8.7%)	4 (21%)	1 (6.7%)	2 (15%)	-	-	-	-	-	-
No valorado/ Desconocido	4	2	1	1	2	2	1	2	0	0	1	0	0	0

Tabla 9. Tasa de respuesta y discontinuación de tratamiento por cada línea de tratamiento. ¹CR: Respuesta completa, ²PR: Respuesta parcial, ³SD: Enfermedad estable, ⁴PD: Progresión de enfermedad.

La evaluación de TTP y CBR por cada línea de tratamiento, se detalla en la tabla 10 y gráfico 1.

LÍNEA M1 ³	Overall N= 244	1L N= 39	2L N= 35	3L N= 34	4L N= 30	5L N= 25	6L N= 21	7L N= 16	8L N= 15	9L N= 8	10L N= 7	11L N= 5	12L N= 5	13L N= 2	14L N= 2
TTP ¹ (en meses)															
Media (DE) ²	9.2 (9.8)	19.1 (14.7)	10.5 (9.0)	9.0 (7.3)	7.9 (7.8)	7.8 (8.7)	3.8 (3.9)	4.9 (3.4)	6.3 (5.2)	8.5 (11.2)	6.8 (5.6)	2.9 (2.1)	3.7 (2.5)	2.3 (0.3)	1.8 (0.5)
Mediana (25%,75%)	5.7 (3,12)	13.3 (9,25)	7.5 (5,14)	6.6 (3,14)	5.5 (3,8)	5.3 (3,7)	3.0 (2,4)	3.7 (2,6)	4.3 (4,8)	3.7 (3,6)	4.9 (4,8)	3.1 (2,3)	3.5 (3,4)	2.3 (2,2,2,4)	1.8 (1,6,2)
Rango	0.0 - 62.9	2.8 - 62.9	0.7 - 41.0	1.0 - 30.3	0.8 - 34.0	1.1 - 38.4	0.1 - 19.1	1.0 - 12.4	0.7 - 17.8	2.8 - 34.9	1.9 - 18.1	0.0 - 5.7	0.7 - 7.5	2.1 - 2.5	1.4 - 2.2
TTP 4 meses, n (%)															
< 4 meses	83 (35%)	1 (2.8%)	7 (20%)	11 (33%)	10 (33%)	8 (33%)	16 (76%)	8 (53%)	5 (36%)	4 (50%)	2 (29%)	4 (80%)	3 (60%)	2 (100%)	2 (100%)
>= 4 meses	154 (65%)	35 (97%)	28 (80%)	22 (67%)	20 (67%)	16 (67%)	5 (24%)	7 (47%)	9 (64%)	4 (50%)	5 (71%)	1 (20%)	2 (40%)	-	-

LÍNEA M1 ³	Overall N= 244	1L N= 39	2L N= 35	3L N= 34	4L N= 30	5L N= 25	6L N= 21	7L N= 16	8L N= 15	9L N= 8	10L N= 7	11L N= 5	12L N= 5	13L N= 2	14L N= 2
Tasa de beneficio clínico, n (%)															
No respondedora	86 (42%)	2 (5.9%)	6 (21%)	11 (38%)	13 (54%)	8 (35%)	13 (87%)	10 (67%)	7 (47%)	5 (71%)	2 (50%)	3 (60%)	3 (75%)	2 (100%)	1 (100%)
Respondedora	121 (58%)	32 (94%)	23 (79%)	18 (62%)	11 (46%)	15 (65%)	2 (13%)	5 (33%)	8 (53%)	2 (29%)	2 (50%)	2 (40%)	1 (25%)	-	-
Resistencia, n (%)															
No resistencia primaria clínica	135 (65%)	33 (97%)	25 (86%)	18 (62%)	14 (58%)	17 (74%)	3 (20%)	7 (47%)	10 (67%)	3 (43%)	2 (50%)	2 (40%)	1 (25%)	-	-
Resistencia primaria clínica	72 (35%)	1 (2.9%)	4 (14%)	11 (38%)	10 (42%)	6 (26%)	12 (80%)	8 (53%)	5 (33%)	4 (57%)	2 (50%)	3 (60%)	3 (75%)	2 (100%)	1 (100%)

Tabla 10. Tiempo a la progresión (TTP) y beneficio clínico por línea de tratamiento. ¹TTP: Tiempo a la progresión; ²DE: Desviación estándar. ³M1: Metastásica.

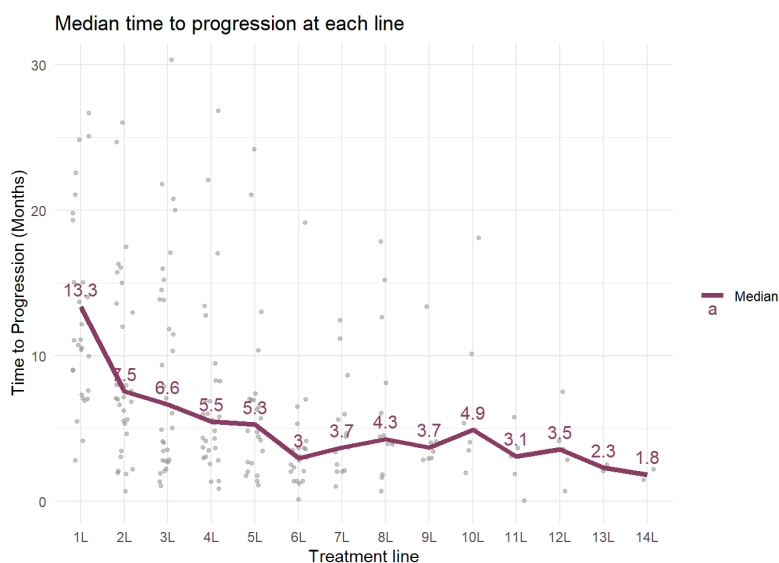


Gráfico 1. Diagrama de Kaplan-Meier con curva de mediana de tiempo a la progresión por cada línea de tratamiento. Treatment line: línea de tratamiento. Time to progresion (months): Tiempo a la progresión (meses). Median: mediana.

TIEMPO A LA PROGRESIÓN (TTP) SEGÚN LA RESPUESTA ALCANZADA

Si consideramos todas las pacientes que tienen valoración de respuesta por cada línea de tratamiento recibida la mediana de TTP para las 208 valoraciones de respuesta, independientemente de la respuesta alcanzada fue de 5.8 meses con un rango de 0 a 62.9 meses. Entre todos los tratamientos evaluados, se obtuvo un beneficio clínico > 6 meses (CBR) en 121 tratamientos (58%) y no se obtuvo en 86 tratamientos (42%). En 1 tratamiento no pudo evaluarse.

En la tabla 11 se detalla la respuesta alcanzada a los tratamientos por cada línea de tratamiento, así como la TTP y CBR alcanzada en función de la respuesta obtenida.

LÍNEAS METASTÁSICAS	TOTAL, N = 207	CR ¹ , N = 5	PR ² , N = 87	SD ³ , N = 56	PD ⁴ , N = 59
EVENTO, n (%)					
1L	34 (16%)	2 (40%)	25 (29%)	6 (11%)	1 (1.7%)
2L	29 (14%)	-	16 (18%)	9 (16%)	4 (6.8%)
3L	30 (14%)	1 (20%)	13 (15%)	6 (11%)	10 (17%)
4L	24 (12%)	1 (20%)	5 (5.7%)	8 (14%)	10 (17%)

LÍNEAS METASTÁSICAS	TOTAL, N = 207	CR ¹ , N = 5	PR ² , N = 87	SD ³ , N = 56	PD ⁴ , N = 59
5L	23 (11%)	-	12 (14%)	5 (8.9%)	6 (10%)
6L	15 (7.2%)	-	1 (1.1%)	7 (13%)	7 (12%)
7L	15 (7.2%)	-	4 (4.5%)	5 (8.9%)	6 (10%)
8L	15 (7.2%)	1 (20%)	5 (5.7%)	5 (8.9%)	4 (6.8%)
9L	7 (3.4%)	-	2 (2.3%)	1 (1.8%)	4 (6.8%)
10L	4 (1.9%)	-	2 (2.3%)	1 (1.8%)	1 (1.7%)
11L	5 (2.4%)	-	2 (2.3%)	2 (3.6%)	1 (1.7%)
12L	4 (1.9%)	-	1 (1.1%)	1 (1.8%)	2 (3.4%)
13L	2 (1.0%)	-	-	-	2 (3.4%)
14L	1 (0.5%)	-	-	-	1 (1.7%)
TTP⁵ (en meses)					
Media (DE) ⁶	9.6 (10.3)	11.7 (8.8)	14.8 (12.0)	9.0 (8.5)	2.5 (1.1)
Mediana (25%,75%)	5.8 (3.1,12.1)	7.3 (6.6,14.5)	11.1 (6.6,19.5)	6.3 (4.1,10.4)	2.2 (1.7,3.2)
Rango	0.0 - 62.9	6.0 - 21.8	0.0 - 62.9	1.9 - 48.9	0.7 - 4.9
No valorable	7	2	4	1	0
TTP⁵ 4 meses, n (%)					
< 4 meses	68 (34%)	-	5 (6.0%)	13 (24%)	50 (85%)
>= 4 meses	133 (66%)	3 (100%)	79 (94%)	42 (76%)	9 (15%)
No valorable	7	2	4	1	0
Tasa de beneficio clínico, n (%)					
No Respondedora	86 (42%)	-	-	27 (49%)	59 (100%)
Respondedora	121 (58%)	5 (100%)	88 (100%)	28 (51%)	-
No valorable	1	0	0	1	0

Tabla 11. Tabla de tiempo a la progresión según la respuesta alcanzada.¹CR: Respuesta completa, ²PR: Respuesta parcial, ³SD: Enfermedad estable, ⁴PD: Progresión de enfermedad. ⁵TTP: Tiempo a la progresión; ⁶DE: Desviación estándar;

TIEMPO A LA PROGRESIÓN (TTP) POR GRUPO DE TRATAMIENTO ANTI-HER2 INDEPENDIENTEMENTE DE LA LÍNEA EN QUE SE ADMINISTRA

Se considera la TTP alcanzada en cada grupo de tratamiento anti-HER2 independientemente de la línea en que fuera administrado.

En la tabla 12 se detallan las TTP alcanzadas para cada grupo de tratamiento anti-HER2.

Variable	Cleopatra group N= 29	TZ_QT N= 58	TZ_QT_HT N= 4	TZ_HT N= 6	TDM1 N= 33	TdXd N= 25	SYD985 N= 10	TKi N= 26
TTP¹ (meses)								
Media (DE) ²	12.6 (8.2)	6.2 (8.7)	17.6 (14.1)	3.9 (2.1)	9.6 (8.9)	13.8 (11.0)	7.2 (7.1)	8.4 (9.0)
Mediana (25%,75%)	10.4 (7.4, 13.8)	3.6 (2.1, 6.0)	15.2 (8.0, 24.8)	3.6 (2.4, 5.2)	7.1 (4, 12.6)	8.7 (6.7, 20)	3.5 (2.3, 11.2)	5.1 (2.8, 11.7)
Rango	3.4 - 40.6	0.0 - 48.9	4.1 - 36.0	1.4 - 6.9	0.7 - 43.9	2.0 - 38.4	1.4 - 22.1	0.7 - 44.0
No valorable/ desconocido	2	1	0	0	0	3	0	0

Tabla 12. Tiempo a la progresión por grupo de tratamiento anti-HER2 independiente de la línea en que se administra.

¹TTP: Tiempo a la progresión; ²DE: Desviación estándar. (Cleopatra group): taxano asociado a doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab. . (TZ_QT): trastuzumab asociado a QT. (TZ_QT_HT): trastuzumab asociado a QT seguido de HT. (TZ_HT): trastuzumab asociado a HT. TDM1: T-DM1. TdXd: T-DXd. SYD985: Trastuzumab duocarmacina. TKI: Inhibidor de tirosina quinasa

ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA POR GRUPO DE TRATAMIENTO EN PRIMERA LÍNEA

Se hace análisis de supervivencia para las pacientes tratadas en primera línea (1L). Se calcula la Supervivencia libre de progresión (SLP) a los tratamientos recibidos con método Kaplan-Meier.

Las 39 pacientes incluidas, todas han recibido tratamiento en 1L.

La mediana de SLP (gráfico 2, tabla 13) en las 39 pacientes incluidas que han recibido tratamiento en 1L es de 14 meses (11 a 25).

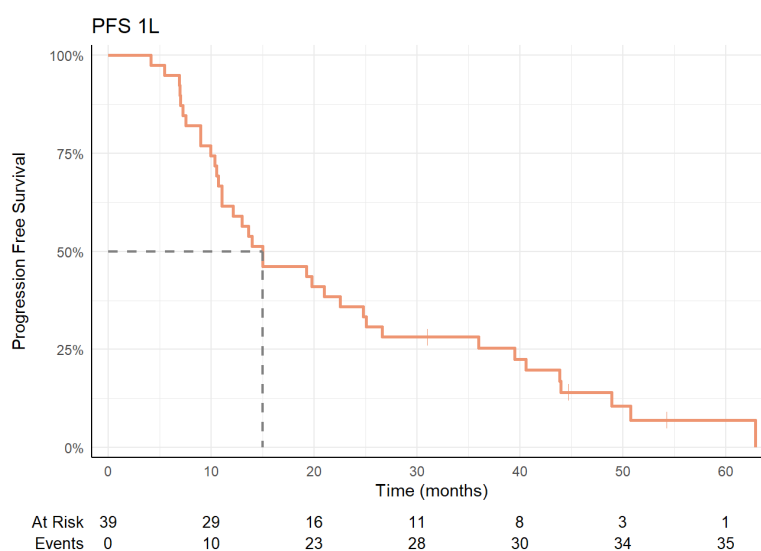


Gráfico 2. Diagrama de Kaplan-Meier con curva de mediana de supervivencia libre de progresión en primera línea. PFS: Progression Free Survival: Supervivencia libre de progresión (SLP). 1L: Primera línea. Time (months): Tiempo (meses). At risk: En riesgo. Events: eventos.

Variable	N	Evento N	% SLP a 12 meses (95% CI)	% SLP a 24 meses (95% CI)	Mediana SLP 1L meses
Total	39	36	59% (45% to 77%)	33% (21% to 52%)	14 (11 to 25)

Tabla 13. Tabla de supervivencia libre de progresión en primera línea. SLP: Supervivencia libre de progresión. 1L: Primera línea

En la tabla 14 se detalla el TTP alcanzado por cada grupo de tratamiento recibido por las pacientes en 1L:

Grupo de tratamiento N=39	Cleopatra group N = 21	HT N = 2	iCDK N = 2	QT N = 2	TDM1 N = 2	TDXd N = 2	TKi N = 3	TZ_QT N = 3	TZ_QT_HT N = 2
TTP¹ (en meses)									
Media (DE) ²	14.0 (9.1)	12.6 (10.1)	15.2 (5.8)	51.2 (16.5)	27.5 (23.2)	7.1 (NA)	23.2 (18.1)	24.7 (23.2)	28.5 (10.6)
Mediana (25%,75%)	10.5 (8.3,14.5)	12.6 (9.1,16.2)	15.2 (13.1,17.2)	51.2 (45.4,57.0)	27.5 (19.3,35.7)	7.1 (7.1,7.1)	15.0 (12.9,29.5)	22.5 (12.6,35.7)	28.5 (24.8,32.3)
Rango	4.1 - 40.6	5.5 - 19.8	11.0 - 19.3	39.5 - 62.9	11.1 - 43.9	7.1 - 7.1	10.7 - 44.0	2.8 - 48.9	21.0 - 36.0
No valorable/ Desconocido	2	0	0	0	0	1	0	0	0

Tabla 14. Tiempo a la progresión en grupos de tratamiento en primera línea. ¹TTP: Tiempo a la progresión; ²DE: Desviación estándar. (cleopatra group): taxano asociado a doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab. (HT): hormonoterapia. (iCDK) inhibidor de ciclinas. (QT): quimioterapia. TDM1: T-DM1. TDXd: T-DXd. TKi: Inhibidor de tirosina quinasa. (TZ_QT): trastuzumab asociado a QT. (TZ_QT_HT): trastuzumab asociado a QT seguido de HT.

En el gráfico 3 se representan las medianas de TTP alcanzadas por las pacientes en cada grupo de tratamiento en 1L:

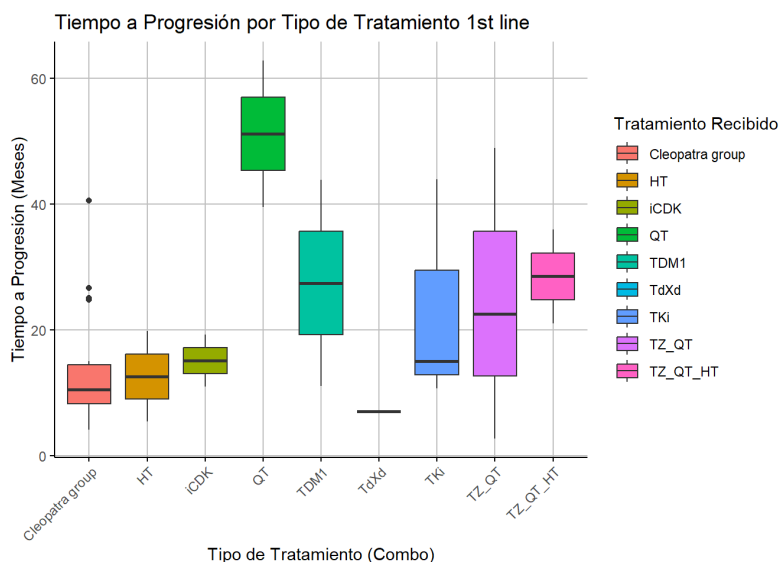


Gráfico 3. Gráfico de cajas con los grupos de tratamiento en primera línea. (Cleopatra group): taxano asociado a doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab. (HT): hormonoterapia. (iCDK) inhibidor de ciclinas. (QT): quimioterapia. TDM1: T-DM1. TdXd: T-DXd. TKI: Inhibidor de tirosina quinasa. (TZ_QT): trastuzumab asociado a QT. (TZ_QT-HT): trastuzumab asociado a QT seguido de HT.

- Análisis exploratorio comparativo de los tratamientos agrupados recibidos en primera línea por las pacientes

Se compara el tratamiento estándar actual en primera línea con taxano asociado a trastuzumab y pertuzumab (cleopatra group) con otros tratamientos anti-HER2 y con pacientes que no reciben tratamiento anti-HER2 en primera línea (gráfico 4). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en SLP entre los 3 grupos con medianas de 12 meses para las 21 pacientes tratadas el tratamiento en el grupo cleopatra, 22 meses para las 12 pacientes tratadas con algún tratamiento anti-HER2 y 20 meses para las 6 pacientes que no recibieron tratamiento anti-HER2 en primera línea (tabla 15).

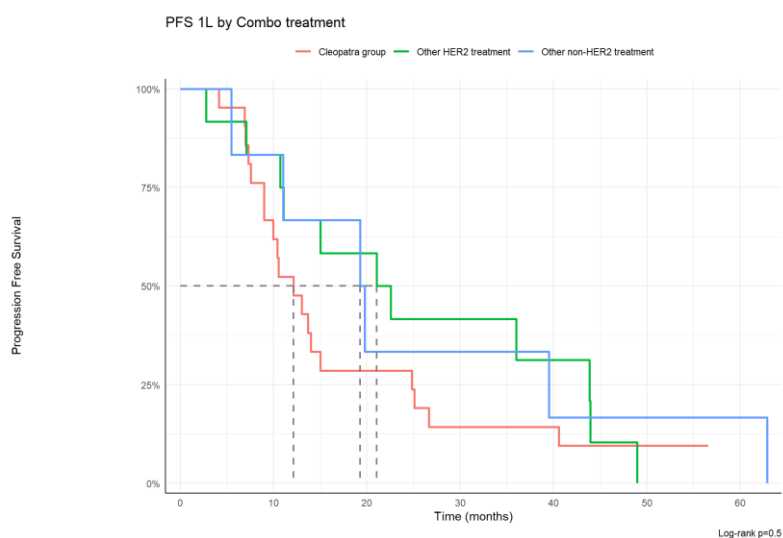


Gráfico 4. Diagrama de Kaplan-Meier con curva de mediana de supervivencia libre de progresión comparativa de tratamientos agrupados en primera línea. Rojo: Cleopatra Group: taxano-trastuzumab-pertuzumab. Verde: Otros tratamientos anti-HER2. Azul: Sin tratamiento anti-HER2.

Variable	N	Evento N	% SLP a 12 meses (95% CI)	% SLP a 24 meses (95% CI)	Mediana SLP 1L	HR (95% CI) ¹	Valor p
Grupo de tratamiento 1L	39	36					
Cleopatra group			52% (35% a 79%)	29% (15% a 56%)	12 (9.0 a 25)	—	
Otro tratamiento anti-HER2			75% (54% a 100%)	50% (28% a 88%)	29 (15 a —)	0.57 (0.27 a 1.21)	0.15
No tratamiento anti-HER2			67% (38% a 100%)	33% (11% a 100%)	20 (11 a —)	0.62 (0.23 a 1.67)	0.34

Tabla 15. Tratamientos agrupados en primera línea. ¹ HR = Hazard Ratio, CI = Confidence Interval: Intervalo de confianza, 1L: Primera línea, SLP: Supervivencia libre de progresión.

ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA POR GRUPO DE TRATAMIENTO EN SEGUNDA LÍNEA

Se hace análisis de supervivencia para las pacientes tratadas en segunda línea (2L). Se calcula la Supervivencia libre de progresión (SLP) a los tratamientos recibidos con método Kaplan-Meier (gráfico 5).

De las 39 pacientes incluidas, 35 (90%) han recibido tratamiento en segunda línea con una mediana de SLP de 7.5 meses (6.6 a 13), en tabla 16.

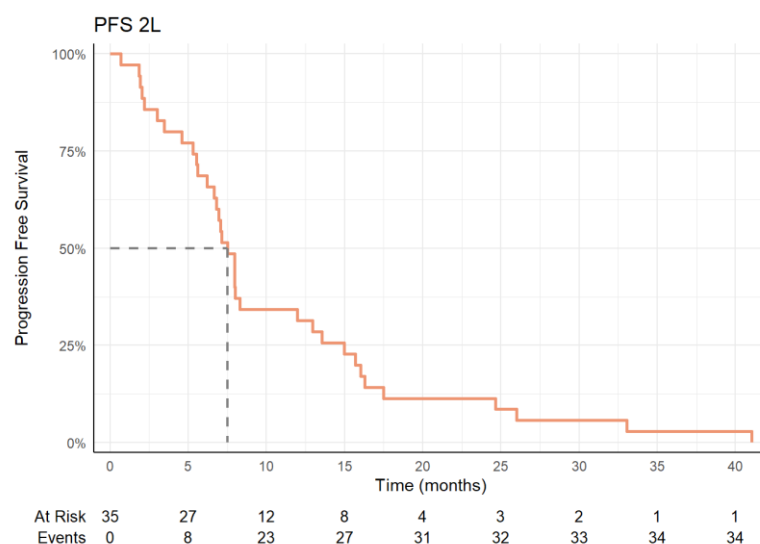


Gráfico 5. Diagrama de Kaplan-Meier con curva de mediana de supervivencia libre de progresión en segunda línea. PFS: Progression Free Survival: Supervivencia libre de progresión (SLP). 2L: Segunda línea. Time (months): Tiempo (meses). At risk: En riesgo. Events: eventos.

Variable	N	Evento N	% SLP a 12 meses (95% CI)	% SLP a 24 meses (95% CI)	Mediana SLP 2L meses
Total	35	35	31% (19% to 51%)	11% (4.5% to 29%)	7.5 (6.6 to 13)

Tabla 16. Supervivencia libre de progresión en segunda línea. SLP: Supervivencia libre de progresión. 2L: Segunda línea.

En la tabla 17 se detalla el TTP alcanzado por cada grupo de tratamiento recibido por las pacientes en 2L.

Grupo de tratamiento N=35	Cleopatra group N = 3	HT N = 2	iCDK N = 1	Ipi3k_Akt N = 1	QT N = 1	SYD985 N = 1	TDM1 N = 19	TdXd N = 1	TKi N = 3	TZ_QT N = 3
TTP¹ (en meses)										
Media (DE) ²	8.3 (5.1)	7.5 (0.7)	16.3 (NA)	33.0 (NA)	3.0 (NA)	12.9 (NA)	9.0 (6.5)	6.6 (NA)	12.0 (4.0)	16.4 (21.4)
Mediana (25%,75%)	8.0 (5.7,10.8)	7.5 (7.2,7.8)	16.3 (16.3,16.3)	33.0 (33.0,33.0)	3.0,,3.0)	12.9 (12.9,12.9)	7.1 (4.9,11.6)	6.6 (6.6,6.6)	12.0 (10.0,14.0)	6.2 (4.1,23.6)
Rango	3.4 - 13.6	7.0 - 8.0	16.3 - 16.3	33.0 - 33.0	3.0,,3.0	12.9 - 12.9	0.7 - 26.0	6.6 - 6.6	8.0 - 16.0	2.0 - 41.0

Tabla 17. Grupos de tratamiento en segunda línea. ¹TTP: Tiempo a la progresión; ²DE: Desviación estándar. (cleopatra group): taxano asociado a doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab. (HT): hormonoterapia. (iCDK) inhibidor de ciclinas. (Ipi3k_Akt): inhibidor de PI3K/AKT (QT): quimioterapia. SYD985: trastuzumab duocarmacina TDM1: T-DM1. TdXd: T-DXd. TKI: Inhibidor de tirosina quinasa. (TZ_QT): trastuzumab asociado a QT. (TZ_QT_HT): trastuzumab asociado a QT seguido de HT.

En el gráfico 6 se representan las medianas de TTP alcanzadas por las pacientes en cada grupo de tratamiento en 2L.

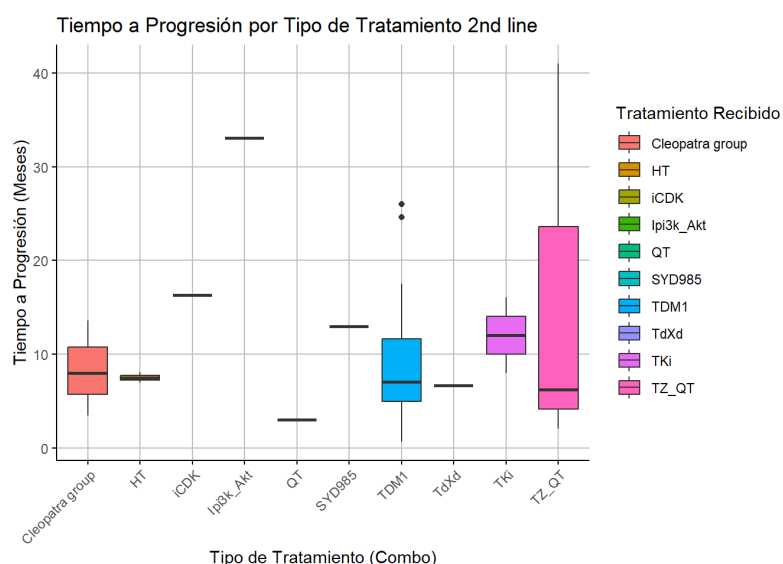


Gráfico 6. Gráfico de cajas con los grupos de tratamiento en segunda línea. (Cleopatra group): taxano asociado a doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab. (HT): hormonoterapia. (iCDK) inhibidor de ciclinas. Ipi3k_AKT: Inhibidor de PI3K/AKT. (QT): quimioterapia. TDM1: T-DM1. TDXd: T-DXd. SYD985: Trastuzumab duocarmacina. TKI: Inhibidor de tirosina quinasa. (TZ_QT): trastuzumab asociado a QT.

-Análisis exploratorio comparativo de los tratamientos agrupados recibidos en segunda línea por las pacientes

Se compara T-DM1 que era el tratamiento estándar en el momento en que las pacientes recibieron tratamiento en segunda línea con otros tratamientos anti-HER2 y con pacientes que no reciben tratamiento anti-HER2 en segunda línea (gráfico 7). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en SLP entre los 3 grupos con medianas de 7.1 meses para las 19 pacientes tratadas con T-DM1, 8 meses para las 11 pacientes tratadas con algún tratamiento anti-HER2 y 8 meses para las 5 pacientes que no recibieron tratamiento anti-HER2 en segunda línea (tabla 18).

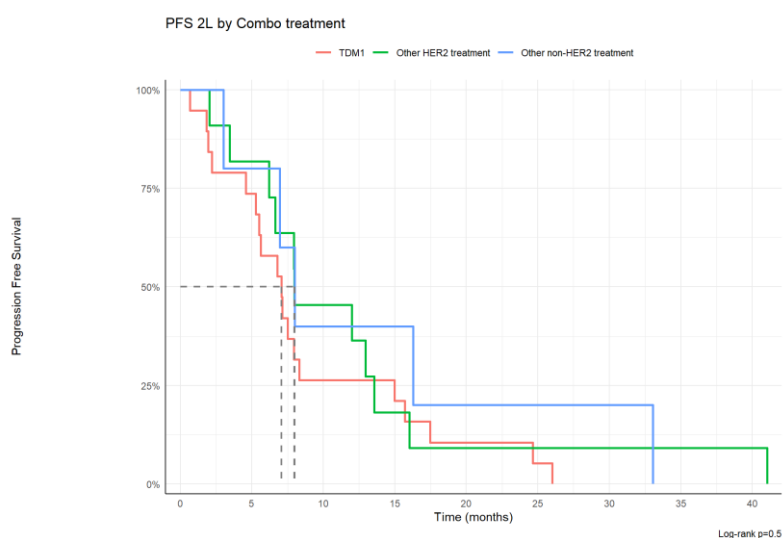


Gráfico 7. Diagrama de Kaplan-Meier con curva de mediana de supervivencia libre de progresión comparativa de tratamientos agrupados en segunda línea. Rojo: T-DM1. Verde: Otros tratamientos anti-HER2. Azul: Sin tratamiento anti-HER2.

Variable	N	Evento N	% SLP a 12 meses (95% CI)	% SLP a 24 meses (95% CI)	Mediana SLP 2L	HR (95% CI) ¹	Valor p
Grupo de tratamiento 1L	35	35					
TDM1			26% (12% to 56%)	11% (2.8% to 39%)	7.1 (5.5 to 16)	—	
Otro tratamiento anti-HER2			36% (17% to 79%)	9.1% (1.4% to 59%)	8.0 (6.6 to —)	0.72 (0.33 to 1.57)	0.37
No tratamiento anti-HER2			40% (14% to 100%)	20% (3.5% to 100%)	8.0 (7.0 to —)	0.59 (0.22 to 1.6)	0.31

Tabla 18. Tabla de tratamientos agrupados en segunda línea. ¹ HR = Hazard Ratio, CI = Intervalo de confianza, 2L: Segunda línea, SLP: Supervivencia libre de progresión.

ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA POR GRUPO DE TRATAMIENTO EN TERCERA LÍNEA

Se hace análisis de supervivencia para las pacientes tratadas en tercera línea (3L). Se calcula la Supervivencia libre de progresión (SLP) a los tratamientos recibidos con método Kaplan-Meier (gráfico 8).

De las 39 pacientes incluidas, 34 (87%) han recibido tratamiento en tercera línea con una mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) de 6.8 meses (4.1 a 14), en tabla 19.

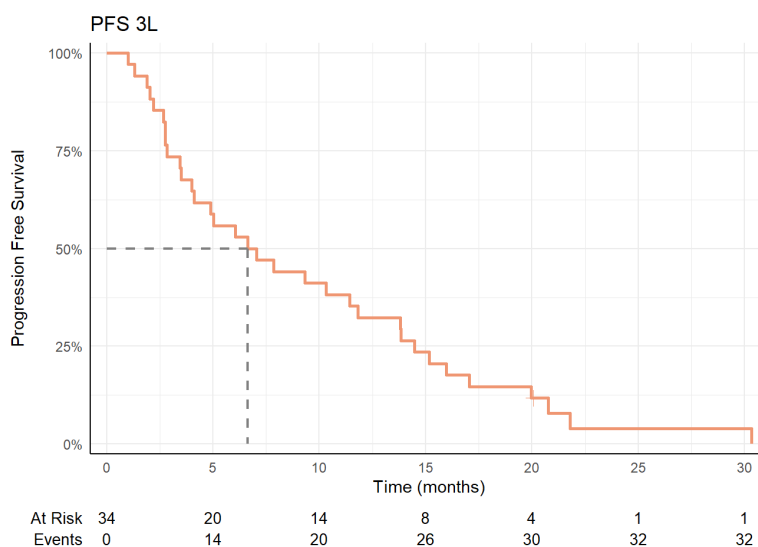


Gráfico 8. Diagrama de Kaplan-Meier con curva de mediana de supervivencia libre de progresión en tercera línea. PFS: Progression Free Survival: Supervivencia libre de progresión (SLP). 3L: Tercera línea. Time (months): Tiempo (meses). At risk: En riesgo. Events: eventos.

Variable	N	Evento N	% SLP a 12 meses (95% CI)	% SLP a 24 meses (95% CI)	Mediana PFS 3L meses
Total	34	33	32% (20% to 53%)	3.9% (0.6% to 25%)	6.8 (4.1 to 14)

Tabla 19. Supervivencia libre de progresión en tercera línea. SLP: Supervivencia libre de progresión. 3L: Tercera línea.

En la tabla 20 se detalla el TTP alcanzado por cada grupo de tratamiento recibido por las pacientes en 3L.

Grupo de tratamiento N=34	Cleopatra group, N = 3	HT, N = 1	QT, N = 2	TDM1, N = 5	TdXd, N = 5	TKI, N = 6	TZ_QT, N = 11	TZ_QT_HT, N = 1
TTP¹ (meses)								
Media (DE) ²	9.6 (5.7)	30.3 (NA)	4.7 (2.7)	7.2 (5.0)	14.9 (6.2)	9.6 (7.0)	6.1 (6.5)	9.3 (NA)
Mediana (25%,75%)	7.9 (6.4,11.9)	30.3 (30.3,30.3)	4.7 (3.7,5.7)	4.1 (4.0,11.4)	15.4 (12.1,18.2)	8.2 (4.1,13.4)	2.8 (2.0,8.4)	9.3 (9.3,9.3)
Rango	4.9 - 16.0	30.3 - 30.3	2.8 - 6.6	2.7 - 13.8	7.1 - 21.8	2.8 - 20.8	1.0 - 20.0	9.3 - 9.3
Desconocido	0	0	0	0	1	0	0	0

Tabla 20. Grupos de tratamiento anti-HER2 en tercera línea. ¹TTP: Tiempo a la progresión; ²DE: Desviación estándar. (cleopatra group): taxano asociado a doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab. (HT): hormonoterapia. (QT): quimioterapia. TDM1: T-DM1. TdXd: T-DXd. TKI: Inhibidor de tirosina quinasa. (TZ_QT): trastuzumab asociado a QT. (TZ_QT_HT): trastuzumab asociado a QT seguido de HT.

En el gráfico 9 se representan las medianas de TTP alcanzadas por las pacientes en cada grupo de tratamiento en 3L.

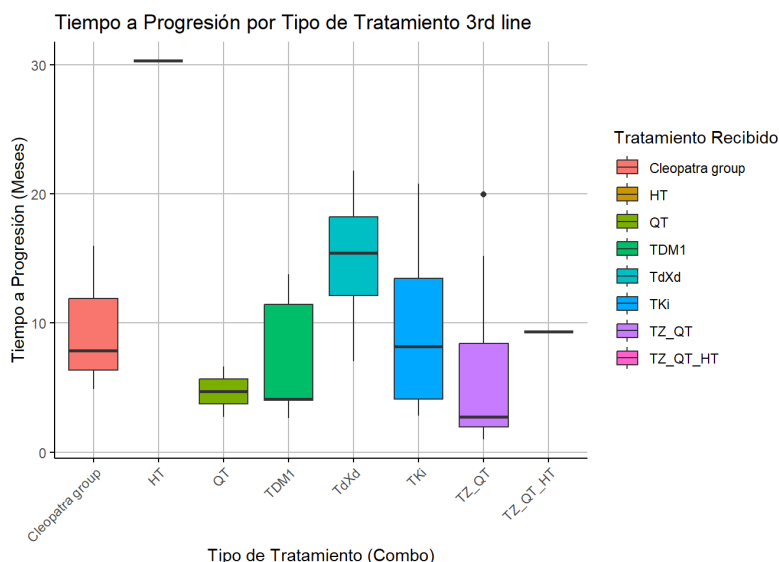


Gráfico 9. Gráfico de cajas con los grupos de tratamiento en tercera línea. (Cleopatra group): taxano asociado a doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab. (HT): hormonoterapia. (iCDK) inhibidor de ciclinas. (QT): quimioterapia. TDM1: T-DM1. TdXd: T-DXd. TKI: Inhibidor de tirosina quinasa. (TZ_QT): trastuzumab asociado a QT. (TZ_QT_HT): trastuzumab asociado a QT seguido de HT.

-Análisis exploratorio comparativo de los tratamientos agrupados recibidos en tercera línea por las pacientes

Se comparan T-DM1, con trastuzumab deruxtecan (T-DXd), con otros tratamientos anti-HER2 y con pacientes que no reciben tratamiento anti-HER2 (gráfico 10). Exclusivamente se encuentran diferencias estadísticamente significativas en SLP entre los 4 grupos de tratamiento para T-DXd con medianas de 17 meses para las 5 pacientes tratadas con una HR 0.23 (0.06.a 0.95) p=0.042. Para las 5 pacientes tratadas con T-DM1, la SLP fue 4.1 meses, para las 22 pacientes tratadas con algún tratamiento anti-HER2 diferente la mediana de SLP fue de 5 meses y para las 2 pacientes que no recibieron tratamiento anti-HER2 en tercera línea, fue de 18 meses (tabla 21).

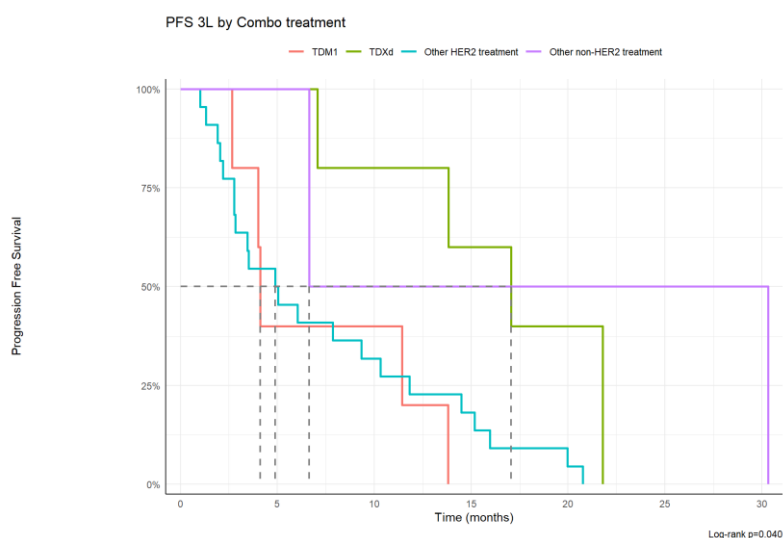


Gráfico 10. Diagrama de Kaplan-Meier con curva de mediana de supervivencia libre de progresión comparativa de tratamientos agrupados en tercera línea. Rojo: T-DM1. Verde: Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) Azul: Otros tratamientos anti-HER2. Lila: Sin tratamiento anti-HER2.

Variable	N	Evento N	% SLP a 12 meses (95% CI)	% SLP a 24 meses (95% CI)	Mediana SLP 3L	HR (95% CI) ¹	Valor p
treatment_group_3l	34	33					
TDM1			20% (3.5% to 100%)	— (— to —)	4.1 (4.0 to —)	—	
TDXd			80% (52% to 100%)	— (— to —)	17 (14 to —)	0.23 (0.06 to 0.95)	0.042
Otro tratamiento anti-HER2			23% (11% to 49%)	— (— to —)	5.0 (2.8 to 12)	0.82 (0.30 to 2.22)	0.70
No tratamiento anti-HER2			50% (13% to 100%)	50% (13% to 100%)	18 (6.6 to —)	0.12 (0.01 to 1.20)	0.072

Tabla 21. Tratamientos agrupados en tercera línea.¹ HR = Hazard Ratio, CI = Intervalo de confianza, 3L: Tercera línea, SLP: Supervivencia libre de progresión.

SUPERVIVENCIA GLOBAL

En el momento del análisis de los datos había 30 (77%) de las 39 pacientes incluidas en los análisis que habían sido éxitus. La mediana de SG es de 61 meses (gráfico 11). Un 100% de pacientes estaban vivas a los 12 meses, un 97% de pacientes estaban vivas a los 24 meses y un 87% a los 36 meses (tabla 22).

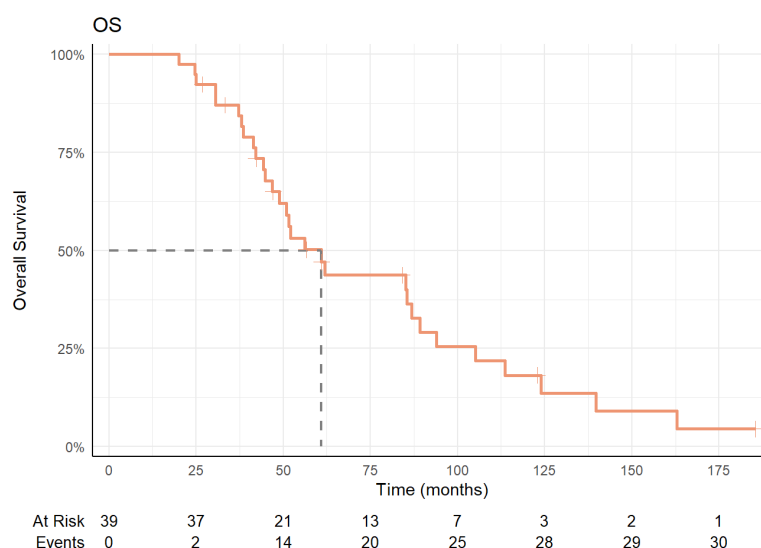


Gráfico 11. Diagrama de Kaplan-Meier con curva de mediana de supervivencia global. OS: Overall Survival: Supervivencia global (SG). Time (months): Tiempo (meses). At risk: En riesgo. Events: eventos.

Variable	N	Evento N	% SG a 12 meses (95% CI)	% SG a 24 meses (95% CI)	% SG a 36 meses (95% CI)	Mediana SG meses
Total	39	29	100% (100% a 100%)	97% (93% a 100%)	87% (77% a 98%)	61 (49 a 94)

Tabla 22. Supervivencia Global. SG: Supervivencia global

5.5. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS

TODAS LAS MUESTRAS ANALIZADAS DE TEJIDO Y PLASMA

Para las 39 pacientes incluidas de las que se han analizado muestras de tejido, 26 (67%) tienen 1 muestra analizada, 11 (28%) 2 muestras y 2 (5.1%) 3 muestras. De los 51 tests realizados en las muestras de tejido, 39 (76%) han sido analizadas por panel VHIO-300, 7 (14%) por panel Amplicon y 5 (9.8%) por ambos paneles.

En cuanto al número de biopsias líquidas analizadas por paciente, con 1 biopsia hay 7 (18%), con 2 biopsias hay 13 (33%), con 3 biopsias hay 4 (10%), con 4 biopsias hay 6 (15%), con 5 biopsias hay 5 (13%), con 6 biopsias hay 3 (7.7%) y con 7 biopsias hay 1 (2.6%), en tablas 23 y 24.

Número de pacientes	
Número de biopsias por paciente	N = 39
Número de biopsias de tejido, n (%)	
1	26 (67)
2	11 (28)
3	2 (5.1)
Número de biopsias líquidas, n (%)	
1	7 (18)
2	13 (33)
3	4 (10)

	Número de pacientes
Número de biopsias por paciente	N = 39
4	6 (15)
5	5 (13)
6	3 (7.7)
7	1 (2.6)

Tabla 23. Número de biopsias de tejido y biopsias líquidas analizadas por paciente.

	Num total Tests
Análisis realizados en tejido	N = 51
Tipo de análisis, n (%)	
Amplicon	7 (14)
Amplicon y Panel VHIO-300	5 (9.8)
Panel VHIO-300	39 (76)

Tabla 24. Número de análisis por panel realizados en biopsia de tejido por paciente.

El mínimo de resultados obtenidos de las muestras de tejido y plasma analizadas de las 39 pacientes incluidas se detalla en la tabla 25.

	Número pacientes
Variable	N = 39
Mínimo 1 CANDIDATO de biopsia de tejido para cada paciente, n (%)	39 (100)
Mínimo 1 resultado de ANÁLISIS de biopsia de tejido para cada paciente, n (%)	37 (95)
Mínimo 1 ANÁLISIS de biopsia de tejido con éxito para cada paciente, n (%)	37 (95)
Mínimo 1 biopsia de tejido pareada con biopsia líquida para cada paciente, n (%)	35 (90)
Mínimo 1 CANDIDATO de biopsia líquida para cada paciente, n (%)	39 (100)
Mínimo 1 resultado de ANÁLISIS de biopsia líquida para cada paciente, n (%)	39 (100)
Mínimo 1 ANÁLISIS de biopsia líquida con éxito para cada paciente, n (%)	39 (100)
Mínimo 1 biopsia líquida emparejada con biopsia de tumor para cada paciente, n (%)	35 (90)

Tabla 25. Mínimo de resultados obtenidos de los análisis por paciente y biopsia de tejido o plasma.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BIOPSIAS DE TEJIDO PAREADAS CON BIOPSIA LÍQUIDA

Se identifican 54 muestras pareadas de tejido y plasma provenientes de las 39 pacientes disponibles para análisis, de las cuales 26 tienen 1 muestra, 11 tienen 2 muestras y 2 tiene 3 muestras.

La línea de tratamiento en la que se obtienen las muestras de tejido es variable y se detalla en el diagrama de barras (gráfico 12).

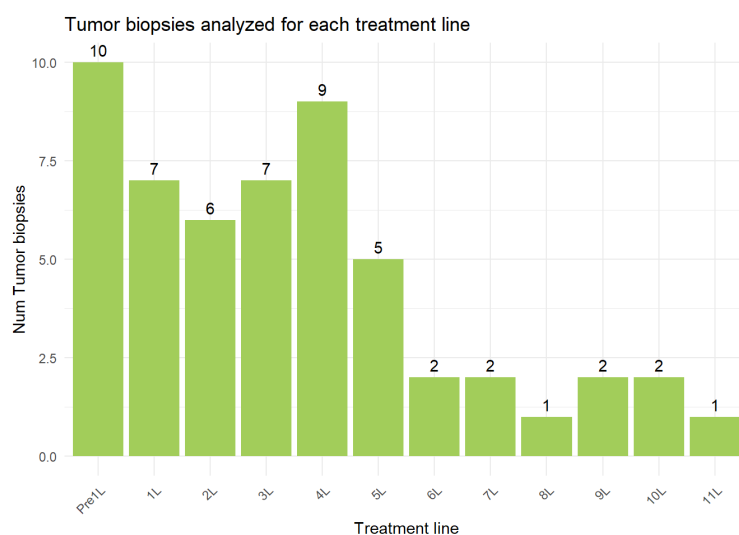


Gráfico 12. Diagrama de barras con el número de biopsias de tejido analizadas por línea de tratamiento. Num Tumor biopsies: Número de biopsias tumorales. Treatment line: Línea de tratamiento.

Respecto a las localizaciones de donde provienen las biopsias de tejido tumoral, se muestran en el diagrama de barras (gráfico 13):

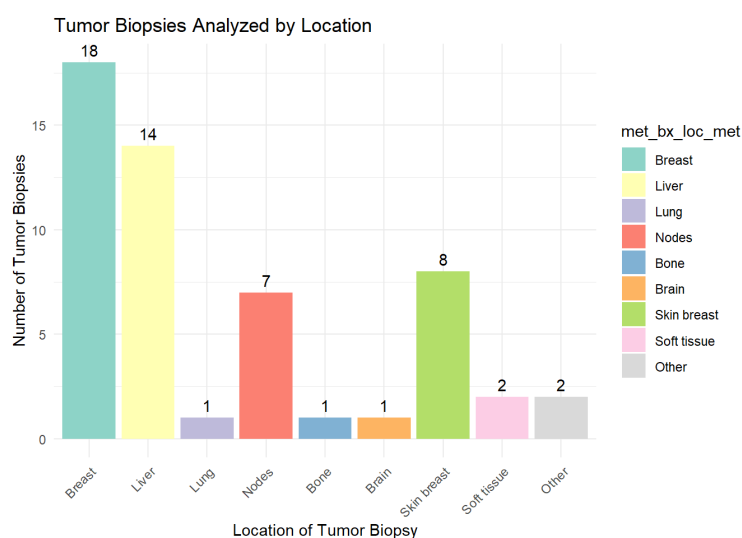


Gráfico 13. Diagrama de barras con la localización de biopsias analizadas por localización. Number Tumor biopsies: Número de biopsias tumorales. Location of Tumor biopsy: Localización de la biopsia tumoral. Treatment line: Línea de tratamiento. Breast: Mama (18%). Liver: Hígado (26%). Lung: Pulmón (2%). Nodes: Adenopatías (13%). Bone: hueso (2%), Brain: Cerebro (2%). Skin breast: letálides. Soft tissue: Tejidos blandos (4%). Other: Otras localizaciones (4%).

La localización de las biopsias por línea de tratamiento se muestra en el diagrama de barras (gráfico 14):

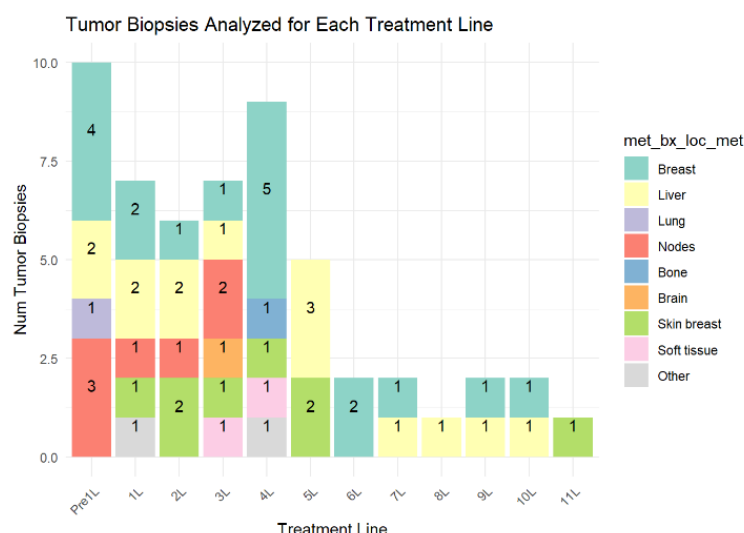


Gráfico 14. Diagrama de barras con la localización de biopsias analizadas por línea de tratamiento. Number Tumor biopsies: Número de biopsias tumorales. Location of Tumor biopsy: Localización de la biopsia tumoral. Treatment line: Línea de tratamiento. Breast: Mama. Liver: Hígado. Lung: Pulmón. Nodes: Adenopatías. Bone: hueso, Brain: Cerebro. Skin breast: letálides. Soft tissue: Tejidos blandos. Other: Otras localizaciones.

De las 54 muestras disponibles de tejido se analizan 51 (94%) en total ya que de 3 muestras de tejido el material no pasa el control de calidad para los análisis. En 44 (81%) muestras se realiza el panel VHIO-300, en 12 (22%) muestras se analizan por Amplicon. En 21 muestras se realiza el panel dentro del proyecto de prescreening de VHIO. Hay 49 muestras de tejido pareadas con una biopsia líquida. De las 3 muestras no pareadas, en 1 no pasa el control de calidad y 2 tienen resultados, aunque fueron extraídas en la línea previa de la biopsia de tejido.

En la tabla 26 se detallan las características generales de las biopsias de tejido analizadas. Se muestra la línea en que se obtuvieron las biopsias, la localización, el panel con el que fueron analizadas y la proporción de test genómico en tejido con biopsia líquida pareada.

Biopsias tumorales de tejido	N = 54
Momento de la biopsia, n (%)	
Pre1L	10 (19%)
1L	7 (13%)
2L	6 (11%)
3L	7 (13%)
4L	9 (17%)
5L	5 (9.3%)
6L	2 (3.7%)
7L	2 (3.7%)
8L	1 (1.9%)
9L	2 (3.7%)
10L	2 (3.7%)
11L	1 (1.9%)
Biopsia de localización metastásica obtenida en HUVH, n (%)	54 (100%)
Localización de la biopsia, n (%)	
Mama	18 (33%)
Hígado	14 (26%)

Biopsias tumorales de tejido	N = 54
Pulmón	1 (1.9%)
Adenopatías	7 (13%)
Ósea	1 (1.9%)
Cerebro	1 (1.9%)
Letálides	8 (15%)
Tejidos blandos	2 (3.7%)
Otras	2 (3.7%)
Biopsia metastásica candidata para análisis genómico n (%)	54 (100%)
Análisis genómico del tumor con resultado, n (%)	51 (94%)
Amplicon, n (%)	
No realizado	42 (78%)
Realizado	12 (22%)
Panel VHIO-300, n (%)	
No realizado	10 (19%)
Realizado	44 (81%)
Análisis genómico prescreening VHIO, n (%)	21 (41%)
Test genómico tejido pareado con biopsia líquida, n (%)	49 (96%)

Tabla 26. Características generales de las biopsias tumorales de tejido.

En la tabla 27 se detalla para cada línea de tratamiento en la que fueron extraídas las biopsias de tejido, el número, la localización, el panel con el que fueron analizadas y la proporción de test genómico en tejido con biopsia líquida pareada.

Biopsia de tumor	Pre1L N = 10	1L N = 7	2L N = 6	3L N = 7	4L N = 9	5L N = 5	6L N = 2	7L N = 2	8L N = 1	9L N = 2	10L N = 2	11L N = 1
Biopsia de localización metastásica obtenida en HUVH, n (%)	10 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	7 (100%)	9 (100%)	5 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (100%)
Localización de la biopsia n, n (%)												
Mama	4 (40%)	2 (29%)	1 (17%)	1 (14%)	5 (56%)	-	2 (100%)	1 (50%)	-	1 (50%)	1 (50%)	-
Hígado	2 (20%)	2 (29%)	2 (33%)	1 (14%)	-	3 (60%)	-	1 (50%)	1 (100%)	1 (50%)	1 (50%)	-
Pulmón	1 (10%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adenopatías	3 (30%)	1 (14%)	1 (17%)	2 (29%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Ósea	-	-	-	-	1 (11%)	-	-	-	-	-	-	-
Cerebro	-	-	-	1 (14%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Letálides	-	1 (14%)	2 (33%)	1 (14%)	1 (11%)	2 (40%)	-	-	-	-	-	1 (100%)
Tejidos blandos	-	-	-	1 (14%)	1 (11%)	-	-	-	-	-	-	-
Otras	-	1 (14%)	-	-	1 (11%)	-	-	-	-	-	-	-
Biopsia metastásica candidata para análisis genómico, n (%)	10 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	7 (100%)	9 (100%)	5 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (100%)
Análisis genómico del tumor con resultado, n (%)	10 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	6 (86%)	7 (78%)	5 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (100%)
Amplicon, n (%)												
No realizado	9 (90%)	4 (57%)	5 (83%)	4 (57%)	8 (89%)	4 (80%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (100%)

Biopsia de tumor	Pre1L N = 10	1L N = 7	2L N = 6	3L N = 7	4L N = 9	5L N = 5	6L N = 2	7L N = 2	8L N = 1	9L N = 2	10L N = 2	11L N = 1
Realizado	1 (10%)	3 (43%)	1 (17%)	3 (43%)	1 (11%)	1 (20%)	-	-	-	1 (50%)	1 (50%)	-
Panel VHIO-300, n (%)												
No realizado	-	3 (43%)	1 (17%)	2 (29%)	3 (33%)	-	-	-	-	-	1 (50%)	-
Realizado	10 (100%)	4 (57%)	5 (83%)	5 (71%)	6 (67%)	5 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	2 (100%)	1 (50%)	1 (100%)
Análisis genómico asistencial, n (%)												
No valorable	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
Realizado	3 (30%)	4 (57%)	2 (33%)	3 (50%)	4 (57%)	1 (20%)	1 (50%)	-	-	1 (50%)	2 (100%)	-
Análisis genómico de tejido pareado con plasma, n (%)												
No valorable	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
Realizado	10 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	5 (83%)	7 (100%)	5 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	2 (100%)	1 (50%)	1 (100%)

Tabla 27. Biopsias de tejido analizadas disponibles por línea metastásica.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE TODAS LAS BIOPSIAS LÍQUIDAS DE PLASMA

Se identifican 119 muestras de plasma correspondientes al inicio de alguna línea de tratamiento de las 39 pacientes incluidas en la cohorte de muestras pareadas. Se analizan las 119 muestras de plasma, todas ellas con panel Guardant360 VHIO, de las cuales 3 no pasan control de calidad y no se obtienen resultados. Todas las muestras se analizan dentro del proyecto. Hay 7 (18%) de pacientes con 1 biopsia líquida analizada, 13 (33%) con 2, 4 (10%) con 3, 6 (15%) con 4, 5 (13%) con 5, 3 (7.7%) con 6 y 1 (2.6%) paciente con 7.

La línea de tratamiento en la que se obtienen las muestras de plasma es variable y se detalla en el diagrama de barras (gráfico 15).

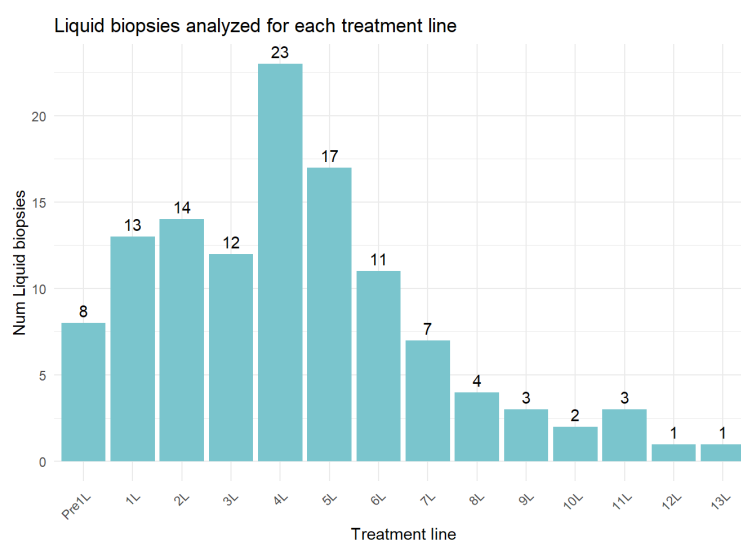


Gráfico 15. Diagrama de barras con el número de biopsias líquidas analizadas por línea de tratamiento. Num Liquid biopsies: Número de biopsias tumorales. Treatment line: Línea de tratamiento.

En la tabla 28 se detallan las características generales de las biopsias líquidas analizadas. Se muestra la línea en que se obtuvieron las biopsias, análisis con el panel Guardant360 VHIO y la proporción de biopsia líquida con test genómico en tejido pareada.

Biopsias líquidas de plasma	N = 119
Momento de la biopsia, n (%)	
Pre1L	8 (6.7%)
1L	13 (11%)
2L	14 (12%)
3L	12 (10%)
4L	23 (19%)
5L	17 (14%)
6L	11 (9.2%)
7L	7 (5.9%)
8L	4 (3.4%)
9L	3 (2.5%)
10L	2 (1.7%)
11L	3 (2.5%)
12L	1 (0.8%)
13L	1 (0.8%)
Biopsia líquida disponible obtenida en HUVH, n (%)	119 (100%)
Biopsia líquida candidata para análisis de Guardant, n (%)	119 (100%)
Biopsia con resultado Guardant, n (%)	119 (100%)
Biopsia analizada con éxito por Guardant, n (%)	116 (97%)
Biopsia líquida pareada con biopsia de tejido, n (%)	46 (39%)

Tabla 28. Características generales de las biopsias líquidas de plasma.

En la tabla 29 se detalla para cada línea de tratamiento en la que fueron extraídas las biopsias de plasma, el número, análisis con panel Guardant360 VHIO y la proporción de biopsia líquida con test genómico en tejido pareada.

Biopsia líquida	Pre1L N = 8	1L N = 13	2L N = 14	3L N = 12	4L N = 23	5L N = 17	6L N = 11	7L N = 7	8L, N = 4	9L N = 3	10L N = 2	11L N = 3	12L N = 1	13L N = 1
Biopsia líquida disponible en HUVH, n (%)	8 (100%)	13 (100%)	14 (100%)	12 (100%)	23 (100%)	17 (100%)	11 (100%)	7 (100%)	4 (100%)	3 (100%)	2 (100%)	3 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
Biopsia líquida candidata para análisis de Guardant, n (%)	8 (100%)	13 (100%)	14 (100%)	12 (100%)	23 (100%)	17 (100%)	11 (100%)	7 (100%)	4 (100%)	3 (100%)	2 (100%)	3 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
Biopsia con resultado Guardant, n (%)	8 (100%)	13 (100%)	14 (100%)	12 (100%)	23 (100%)	17 (100%)	11 (100%)	7 (100%)	4 (100%)	3 (100%)	2 (100%)	3 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
Biopsia analizada con éxito por Guardant, n (%)	8 (100%)	11 (85%)	14 (100%)	12 (100%)	23 (100%)	17 (100%)	11 (100%)	7 (100%)	3 (75%)	3 (100%)	2 (100%)	3 (100%)	1 (100%)	1 (100%)

Biopsia líquida	Pre1L N = 8	1L N = 13	2L N = 14	3L N = 12	4L N = 23	5L N = 17	6L N = 11	7L N = 7	8L, N = 4	9L N = 3	10L N = 2	11L N = 3	12L N = 1	13L N = 1
Biopsia líquida pareada con biopsia de tejido, n (%)	8 (100%)	7 (54%)	6 (43%)	5 (42%)	6 (26%)	5 (29%)	2 (18%)	2 (29%)	1 (25%)	2 (67%)	1 (50%)	1 (33%)	-	-

Tabla 29. Tabla con las biopsias líquidas analizadas por línea metastásica.

5.6. ANÁLISIS EN MUESTRAS DE TEJIDO

5.6.1. Determinación de HER2 por técnicas convencionales, IHQ y FISH

De las 54 muestras de tejido identificadas inicialmente provenientes de las 39 pacientes, hay 47 muestras provenientes de 36 pacientes que están disponibles para su análisis por técnicas convencionales. De ellas 2 no son recuperables para su análisis por falta de material suficiente. Hay una que por corresponder a un bloque celular se puede determinar HER2, pero no el H-score para HER2 y de otra que el HER2 está determinado, pero no hay material para realizar el H-score.

De las 45 muestras analizadas hay:

- 32 que cumplen criterios de positividad para HER2 por presentar una IHQ de membrana 3+ en > 10% de las células tumorales, considerando que está basada en la tinción circunferencial de la membrana que es completa e intensa.
- 5 que presentan una IHQ de membrana 2+ para HER2 consideradas equívocas HER2 2+ definido por una tinción de membrana completa de débil a moderada observada en > 10% de las células tumorales. Se realiza test de hibridación in situ con fluorescencia (FISH), hibridación basada en doble sonda, que está amplificado en 3 muestras. La ratio HER2/CEP17 (sonda de enumeración cromosómica 17) es ≥ 2.0 ; con unas ratios en las muestras analizadas de 10, 7.5 y 3.3 respectivamente y por tanto son consideradas HER2 positivas. Hay otras 2 muestras en que no hay amplificación, sino que se considera que el gen de HER2 es polisómico con unas ratios <2.0, de 1.97 y 1.45 respectivamente, por tanto, consideradas HER2 negativas.
- Ninguna muestra presenta IHQ para HER2 1+.
- 8 muestras presentan una IHQ para HER2 0+, ya que no se observa tinción o la tinción de la membrana es incompleta y débil/apenas perceptible en $\leq 10\%$ de las células tumorales. Por tanto, se trata de muestras HER2 negativas.

5.6.1.1. H-Score

Se calcula el H-score para las 43 muestras disponibles con un rango entre 0-295.

- Las 30 pacientes con HER2 3+ presentan un rango entre 95 y 295.
- Las 3 pacientes con HER2 2+ (FISH amplificado) presentan un rango entre 120-190
- Las 2 pacientes con HER2 2+ (FISH no amplificado) presentan un rango entre 130-140
- Las 8 pacientes con HER 0+ presentan un rango entre 0 y 5.

5.6.2. Genómica

Se identifican 54 muestras pareadas de tejido y plasma provenientes de las 39 pacientes incluidas de las que se han analizado muestras de tejido. De ellas, 26 (67%) tienen 1 muestra analizada, 11 (28%) 2 muestras y 2 (5.1%) 3 muestras. De los 51 tests realizados con éxito en las muestras de tejido, 39 (76%) han sido analizadas por panel VHIO-300, 7 (14%) por panel Amplicon y 5 (9.8%) por ambos paneles.

Así para los análisis genómicos se dispone de resultados con panel VHIO-300 de 44 muestras de tejido que son los que se describen a continuación.

5.6.2.1. Determinación de alteraciones genómicas

-Correlación entre el número de alteraciones genómicas detectadas y número de líneas previas de tratamiento recibidas por cada paciente en el momento de extracción de la muestra:

Se valora si hay correlación entre las líneas de tratamiento recibidas previamente y la cantidad de variables genómicas de cada clase que se encuentran en las muestras analizadas con panel VHIO-300.

-Mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas

La media de alteraciones genómicas de tipo mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas en todas las muestras de tejido analizadas ha sido de 2.64 con una mediana de 1 alteración, una desviación estándar (DE) de 1.64. La media de genes alterados con mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas encontrada ha sido de 2.48, con una mediana de 2 y una DE de 1.44.

Si se tienen en cuenta el total de las alteraciones genómicas de tipo mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas por muestra de tejido y línea de tratamiento en que fueron extraídas, se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es de $C=0.184$ con una $p=0.232$, no estadísticamente significativa. El coeficiente de correlación de Spearman es de $C=0.305$ con una $p=0.044$, que tras ser normalizada pierde significación estadística $p=0.141$ (gráfico 16). Por tanto, los coeficientes muestran una correlación débil-moderada no estadísticamente significativa entre la cantidad de mutaciones de tipo patogénicas y probablemente patogénicas encontradas y la línea de tratamiento en que se obtuvo la muestra de tejido. Oncoplot con todas las alteraciones genómicas encontradas en tejido se encuentra en el apéndice.

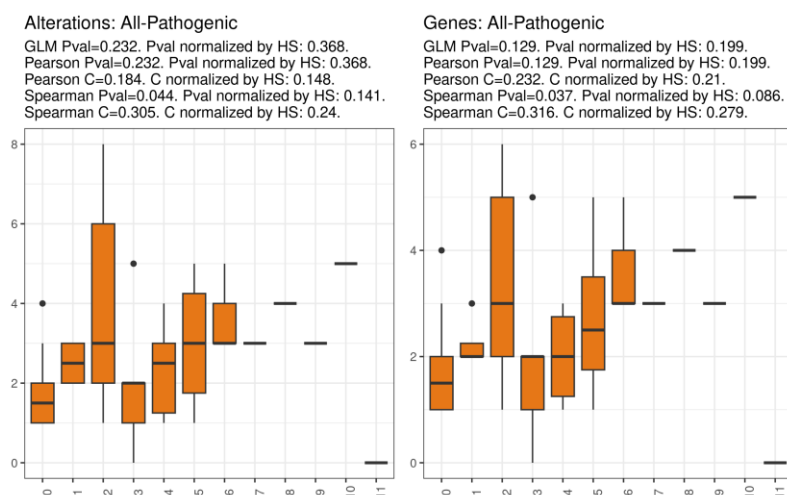


Gráfico 16. Gráfico de dispersión por número total de alteraciones genómicas de tipo mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas por muestra (alteraciones y genes alterados) y línea de tratamiento.

-Variantes de significado incierto (VUS)

La media de alteraciones genómicas de tipo VUS en todas las muestras de tejido analizadas ha sido de 12.39 con una mediana de 10 alteraciones, una desviación estándar (DE) de 8.9. La media de genes alterados con VUS encontrada ha sido de 11.59, con una mediana de 9.5 y una DE de 7.87.

Si se tienen en cuenta el total de las alteraciones genómicas de tipo VUS por muestra de tejido y línea de tratamiento en que fueron extraídas se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es de $C=0.219$ con una $p=0.153$, no estadísticamente significativa. El coeficiente de correlación de Spearman es de $C=0.007$ con una $p=0.966$, no estadísticamente significativa (gráfico 17). Por tanto, los coeficientes muestran una correlación débil no significativa entre la cantidad de mutaciones de tipo VUS encontradas y la línea de tratamiento en que se obtuvo la muestra de tejido. Oncoplot con todas las alteraciones genómicas encontradas en tejido se encuentra en el apéndice.

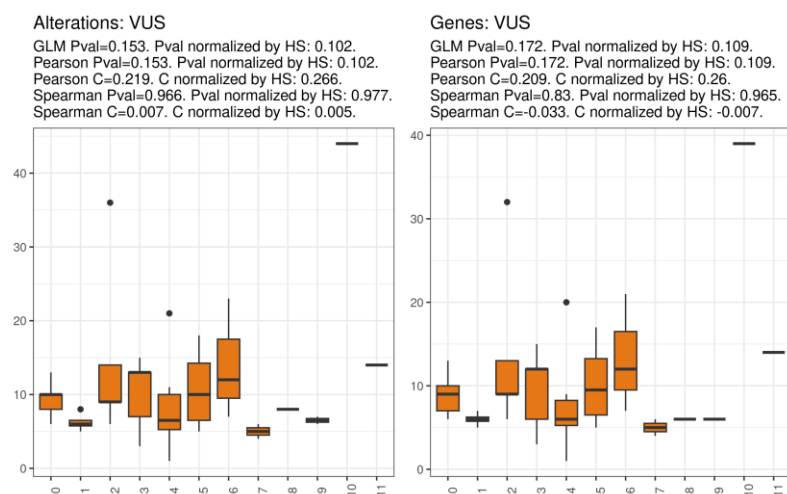


Gráfico 17. Gráfico de dispersión por número total de alteraciones genómicas de tipo VUS por muestra (alteraciones y genes alterados) y línea de tratamiento.

-Amplificaciones

La media de alteraciones genómicas de tipo amplificaciones en todas las muestras de tejido analizadas ha sido de 10.18 con una mediana de 8.5 alteraciones, una desviación estándar (DE) de 7.47. La media de genes alterados con mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas encontrada ha sido de 9.95, con una mediana de 8.5 y una DE de 7.28.

Si se tienen en cuenta el total de las alteraciones genómicas de tipo amplificaciones por muestra de tejido y línea de tratamiento en que fueron extraídas se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es de $C=0.08$ con una $p=0.607$, no estadísticamente significativa. El coeficiente de correlación de Spearman es de $C=0.014$ con una $p=0.929$ (gráfico 18). Por tanto, se encuentra una correlación débil no significativa entre la cantidad de amplificaciones encontradas y la línea de tratamiento en que se obtuvo la muestra de tejido. Oncoplot con todas las alteraciones genómicas encontradas en tejido se encuentra en el apéndice.

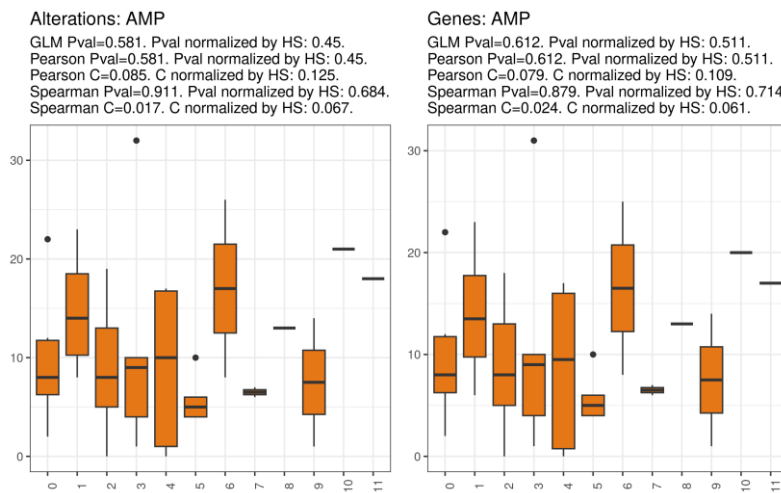


Gráfico 18. Gráfico de dispersión por número total de alteraciones genómicas de tipo amplificaciones por muestra (alteraciones y genes alterados) y línea de tratamiento.

-Pérdida de material genómico

La media de alteraciones genómicas de tipo pérdida de material genómico, incluyendo las deleciones en todas las muestras de tejido analizadas ha sido de 2.84 con una mediana de 1 alteración, una desviación estándar (DE) de 4.41. La media de genes alterados con pérdida de material genómico encontrada ha sido de 2.81, con una mediana de 1 y una DE de 4.36.

Si se tienen en cuenta todas las alteraciones genómicas de tipo pérdida de material genómico por muestra de tejido y línea de tratamiento en que fueron extraídas se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es de $C=0.438$ con una $p=0.003$, estadísticamente significativa. El coeficiente de correlación de Spearman es de $C=0.416$ con una $p=0.005$ (gráfico 19). Por tanto, se encuentra una correlación positiva moderadamente fuerte y significativa entre la cantidad de deleciones y la línea de tratamiento en que se obtuvo la muestra de tejido.

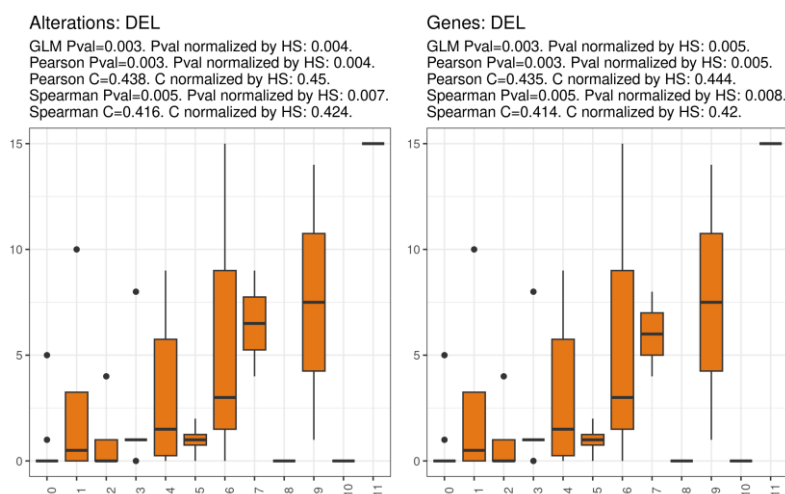


Gráfico 19. Gráfico de dispersión por número total de alteraciones genómicas de tipo pérdida de material genómico por muestra (alteraciones y genes alterados) y línea de tratamiento.

5.7. ANÁLISIS EN MUESTRAS DE PLASMA, BIOPSIA LÍQUIDA:

Se han analizado 119 muestras correspondientes a 39 pacientes de las cuales se dispone de resultados en 116 muestras.

La media de muestras analizadas con Guardant360 VHIO por pacientes es de 3.05 con una mediana de 2 muestras por paciente. La media de muestras analizadas por cada línea es de 6.5.

5.7.1. Genómica

5.7.1.1. Determinación alteraciones genómicas

-Correlación entre el número de alteraciones genómicas detectadas y número de líneas de tratamiento recibidas por cada paciente en el momento de extracción de la muestra:

-Mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas

La media de alteraciones genómicas de tipo mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas en todas las muestras de tejido analizadas ha sido de 3.15 con una mediana de 3 alteraciones, una desviación estándar (DE) de 2.82. La media de genes alterados con mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas encontrada ha sido de 2.38, con una mediana de 2 y una DE de 1.60.

Si se tienen en cuenta todas las alteraciones genómicas de tipo mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas por muestra de plasma y línea de tratamiento en que fueron extraídas se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es de $C=0.231$ con una $p=0.012$, estadísticamente significativa que normalizada por TF es de 0.006 y se mantiene significativa. El coeficiente de correlación de Spearman es de $C=0.346$ con una $p=0$, estadísticamente significativa que normalizada por TF es de 0 y se mantiene significativa (gráfico 20). Por tanto, se encuentra una correlación débil-moderada y significativa entre la cantidad de mutaciones de tipo mutaciones patogénicas y

probablemente patogénicas y la línea de tratamiento en que se obtuvo la muestra de plasma. Oncoplot con todas las alteraciones genómicas encontradas en plasma se encuentra en el apéndice.

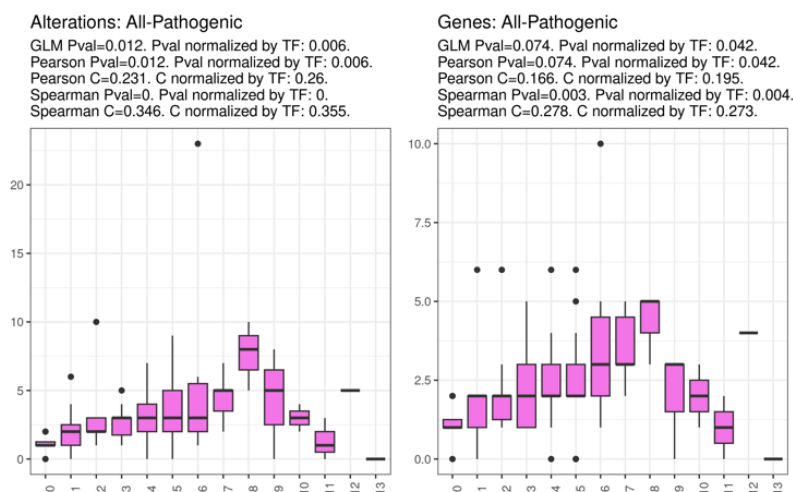


Gráfico 20. Gráfico de dispersión por número total de alteraciones genómicas de tipo mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas por muestra (alteraciones y genes alterados) y línea de tratamiento.

-Variantes de significado incierto (VUS)

La media de alteraciones genómicas de tipo VUS en todas las muestras de tejido analizadas ha sido de 2.68 con una mediana de 1 alteración, una desviación estándar (DE) de 3.91. La media de genes alterados con VUS encontrada ha sido de 2.33, con una mediana de 1 y una DE de 3.2.

Si se tienen en cuenta todas las alteraciones genómicas de tipo VUS por muestra de plasma y línea de tratamiento en que fueron extraídas se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es de $C=0.202$ con una $p=0.029$, estadísticamente significativa que normalizada por la proporción ctDNA en comparación con el ADN normal circulante o fracción tumoral (TF) es de 0.023 y se mantiene significativa. El coeficiente de correlación de Spearman es de $C=0.273$ con una $p=0.003$, estadísticamente significativa que normalizada por TF es de 0.007 y se mantiene significativa (gráfico 21). Por tanto, se encuentra una correlación moderada y significativa entre la cantidad de mutaciones de tipo VUS y la línea de tratamiento en que se obtuvo la muestra de plasma. Oncoplot con todas las alteraciones genómicas encontradas en plasma se encuentra en el apéndice.

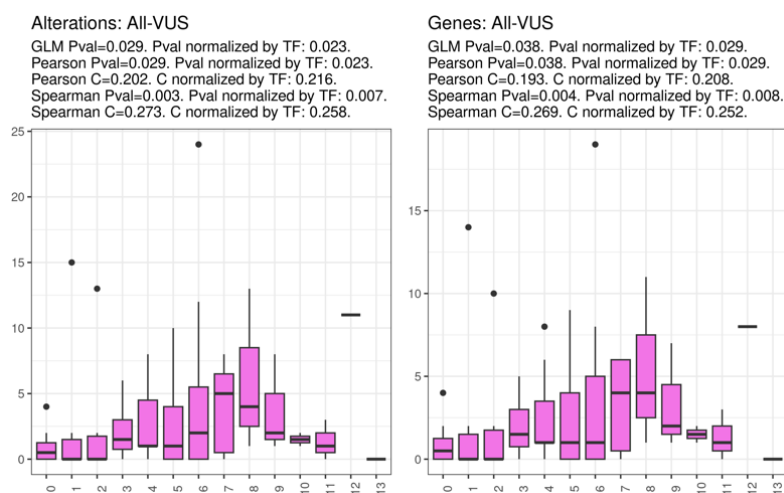


Gráfico 21. Gráfico de dispersión por número total de alteraciones genómicas de tipo VUS por muestra (alteraciones y genes alterados) y línea de tratamiento

-Amplificaciones

La media de alteraciones genómicas de tipo amplificaciones en todas las muestras de tejido analizadas ha sido de 1.65 con una mediana de 1 alteración, una desviación estándar (DE) de 1,86. La media de genes alterados con mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas encontrada ha sido de 1.66, con una mediana de 1 y una DE de 1.86.

Si se tienen en cuenta todas las alteraciones genómicas de tipo amplificaciones por muestra de plasma y línea de tratamiento en que fueron extraídas se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson es de $C=0.202$ con una $p=0.029$, estadísticamente significativa que normalizada por TF es de 0.023 y se mantiene significativa. El coeficiente de correlación de Spearman es de $C=0.273$ con una $p=0.03$, estadísticamente significativa que normalizada por TF es de 0.007 y se mantiene significativa (gráfico 22). Por tanto, se encuentra una correlación moderada y significativa entre la cantidad de alteraciones genómicas de tipo amplificación y la línea de tratamiento en que se obtuvo la muestra de plasma. Oncoplot con todas las alteraciones genómicas encontradas en plasma se encuentra en el apéndice.

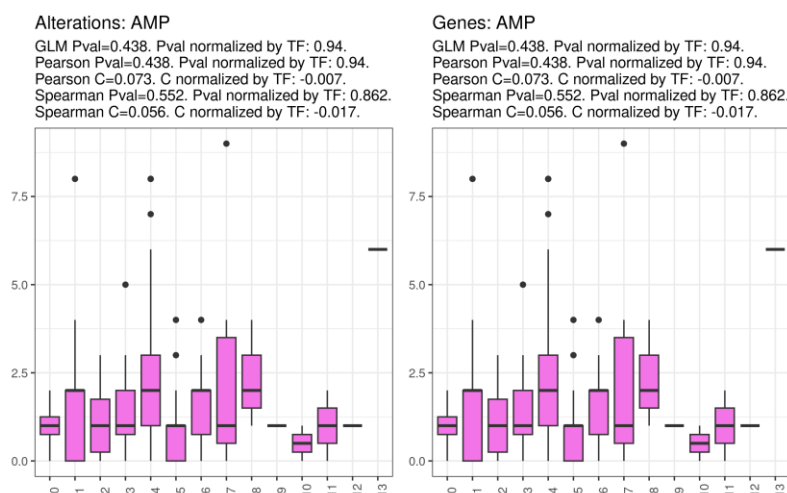


Gráfico 22. Gráfico de dispersión por número total de alteraciones genómicas de tipo amplificaciones por muestra (alteraciones y genes alterados) y línea de tratamiento.

-Pérdida de material genómico

En las muestras analizadas no se han encontrado pérdidas de material genómico en los genes estudiados. Por lo tanto, no es posible determinar la evolución de estas alteraciones a lo largo de las distintas líneas de tratamiento.

5.8. GENES MÁS FRECUENTEMENTE ALTERADOS

Los genes en los que se han encontrado alteraciones genómicas en mutaciones y alteraciones en el número de copias más frecuentemente en al menos una de las muestras analizadas por cada paciente han sido:

-Mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas

En las 39 pacientes incluidas, se han encontrado mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas en 26 genes diferentes en al menos una muestra de cada paciente, que se detallan en la tabla 30. En el gráfico 23 se representan los genes en los que se han encontrado al menos un 10% mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas en cada paciente en al menos una muestra.

Pacientes (n)	Genes con mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas	Porcentaje (%)
35	TP53	90
20	PIK3CA	51
6	ARID1A, ESR1	15
5	ERBB2, ATM	13
4	GATA3, PTEN	10
3	CDKN2A, KRAS, NFE2L2, SMAD4	7.5
2	APC, BRCA2, CDH1, CDK12, RB1, RHOA	5
1	AKT1, BRCA1, EGFR, FGFR2, MAPK1, NF1, PDGFRA, VHL	2.5

Tabla 30. Mutaciones tipo patogénicas y probablemente patogénicas encontradas al menos en una muestra de cada paciente.

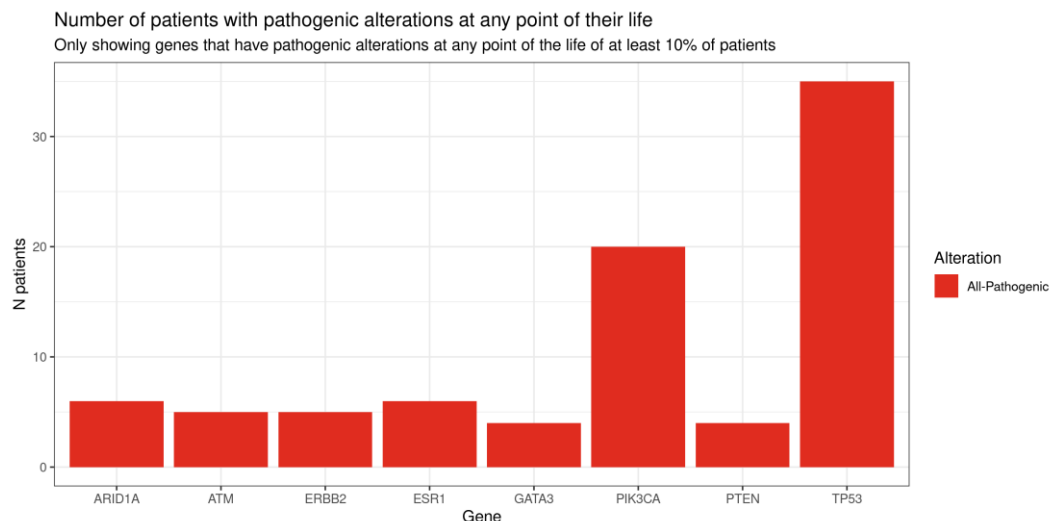


Gráfico 23. Diagrama de barras con los genes en los que se han encontrado al menos un 10% mutaciones patológicas o probablemente patológicas en cada paciente en al menos una muestra.

-Variantes de significado incierto VUS

En las 39 pacientes incluidas, se han encontrado mutaciones de tipo VUS en 55 genes diferentes en al menos una muestra de cada paciente, que se detallan en la tabla 31. En el gráfico 24 se representan los genes en los que se han encontrado al menos un 10% de mutaciones tipo VUS en cada paciente en al menos una muestra.

Pacientes (número)	Genes con mutaciones de tipo VUS	Porcentaje (%)
14	APC	36
12	CDK12	31
11	ATM, BRCA2, EGFR	28
9	ERBB2, PDGFRA	23
8	BRCA1, KIT	21
7	MET	18
6	ARID1A, NF1	15
5	FGFR1, MYC, NTRK1	13
4	AR, PIK3CA, RAF1, RB1	10
3	ALK, BRAF, CDK6, FGFR2, MTOR, NOTCH1, RHOA, TERT	8
2	CCND2, CDK4, FGFR3, HRAS, NTRK3, PTEN, ROS1, SMAD4, SMO, TSC1	5
1	CCND1, CCNE1, CDKN2A, ESR1, GNA11, GANQ, GNAS, HNF1A, IDH1, JAK2, JAK3, MAP2K1, MLH1, PTPN11, RET, RIT1, STK11, TP53	2.5

Tabla 31. Mutaciones tipo VUS encontradas al menos en una muestra de cada paciente.

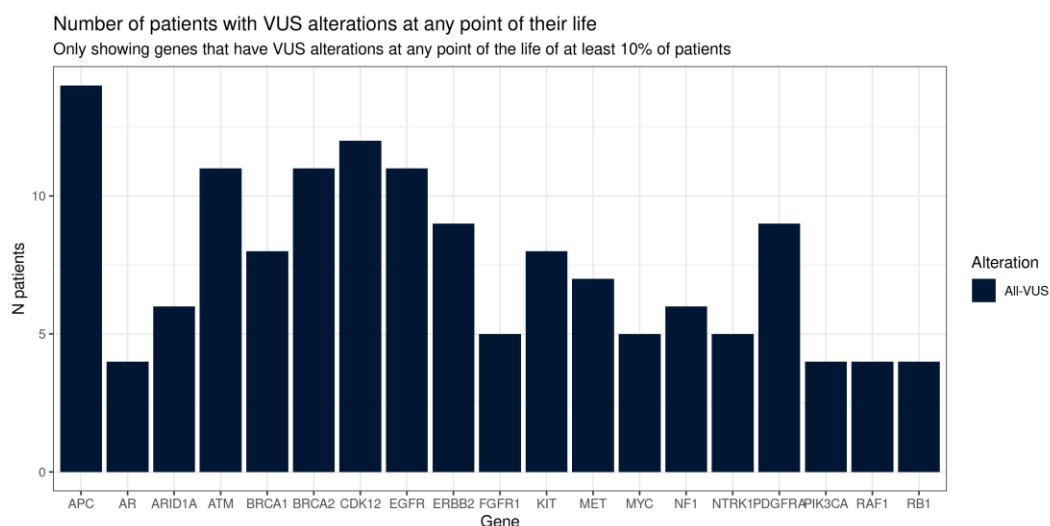


Gráfico 24. Diagrama de barras con los genes en los que se han encontrado al menos un 10% mutaciones de tipo VUS en cada paciente en al menos una muestra.

-Amplificaciones

En las 39 pacientes incluidas, se han encontrado amplificaciones en 31 genes diferentes en al menos una muestra de cada paciente, que se detallan en la tabla 32. En el gráfico 25 se representan los genes en los que se han encontrado al menos un 10% de alteraciones en CNV de tipo amplificación en cada paciente en al menos una muestra.

Pacientes (número)	Genes con amplificación	Porcentaje (%)
34	ERBB2	87
23	CDK12	59
16	CCND1, MYC	41
14	PIK3CA	36
9	CDK6	26
8	BRAF	21
6	CDK4, KIT	15
5	FGFR1	13
4	KRAS, MET, NF1, RAF1	10
3	PDGFRA	8
2	AR, CCNE1, ESR1, FGFR2, GATA3	5
1	BRCA1, CCND2, CDH1, FBXW7, GNAS, MPL, NRAS, RET, RIT1, ROS1, VHL	2.5

Tabla 32. Amplificaciones encontradas al menos en una muestra de cada paciente.

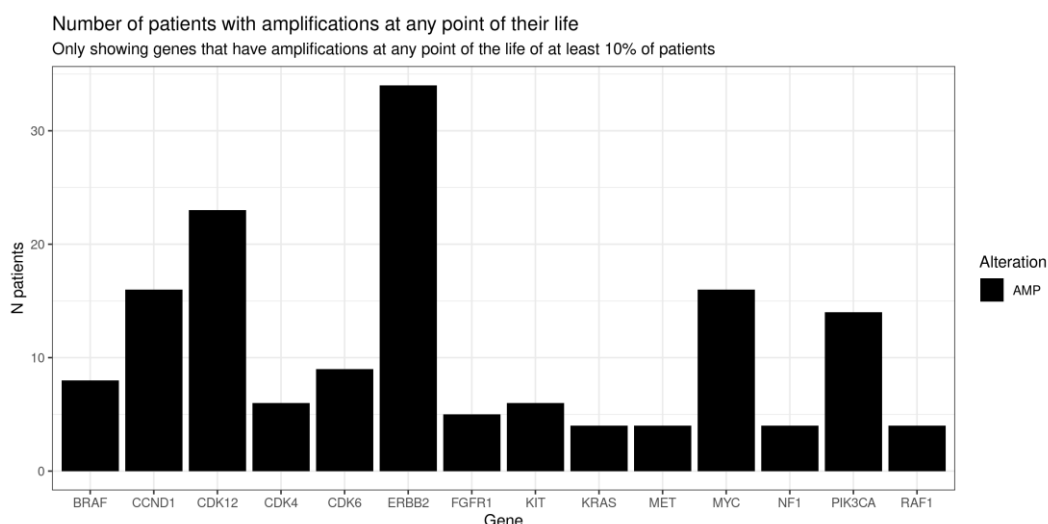


Gráfico 25. Diagrama de barras con los genes en los que se han encontrado al menos un 10% alteraciones de tipo amplificación en cada paciente en al menos una muestra.

En el gráfico 26 se representan los genes y alteraciones encontrados con más frecuencia en al menos una muestra de cada paciente.

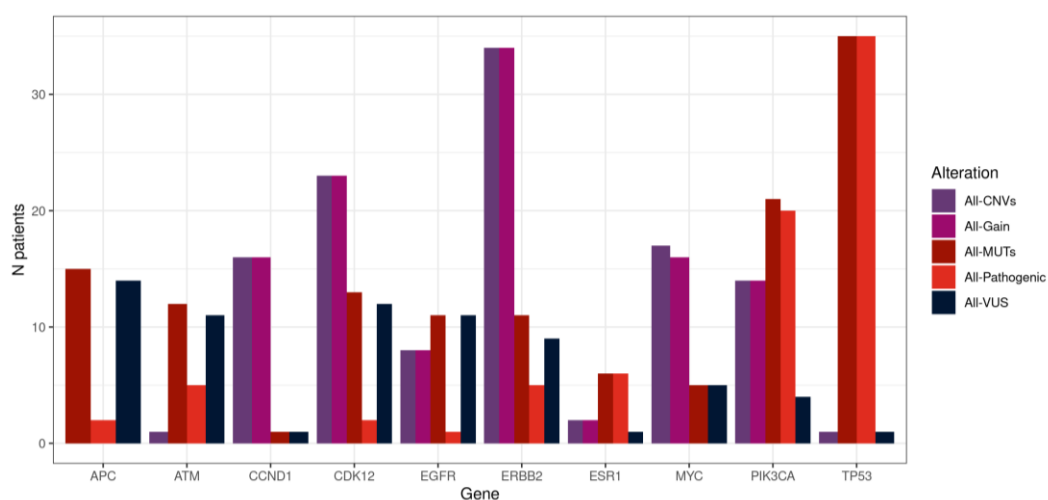


Gráfico 26. Diagrama de barras con los genes y alteraciones encontrados con más frecuencia en al menos una muestra por paciente. All-CNVs: todas las alteraciones en número de copias. All-Gain: todas las alteraciones en ganancia en número de copias. All-MUT: todas las mutaciones. All-pathogenic: todas las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas. All-VUS: todas las mutaciones VUS.

5.9. DETERMINADAS ALTERACIONES GENÓMICAS PODRÁN CONFERIR RESISTENCIA PRIMARIA A DETERMINADOS TRATAMIENTOS

Para testar esta hipótesis se han utilizado los resultados de los análisis de las muestras de tejido y plasma disponibles de las pacientes que muestran una resistencia primaria clínica al tratamiento y se han comparado con las de las que no la presentan. Para considerar la resistencia primaria se han establecido valores clínicos de progresión de enfermedad como mejor respuesta en la primera valoración radiológica y/o un intervalo

libre de progresión < 4 meses (120 días) a un determinado tratamiento anti-HER2 sin haber presentado respuesta objetiva al mismo. Se han comparado las alteraciones genómicas que presentan estas pacientes frente a las pacientes que no cumplen estas características para cada grupo definido de tratamiento anti-HER2. Se valoran las mutaciones con variantes de un nucleótido (SNV) de tipo VUS, patogénicas y probablemente patogénicas. Asimismo, se valoran las variaciones en el número de copias (CNV) de tipo amplificaciones. Se valoran los genes en los que hay solapamiento entre panel VHIO-300 y panel Guardant360 VHIO. El resto de genes no incluidos en los dos paneles, no se han considerado para este análisis. Por tanto, se valoran alteraciones en 73 genes para SNV y en 18 genes para CNV. Se comparan las muestras disponibles de tejido y plasma de las pacientes que han recibido cada tratamiento según el criterio de resistencia primaria o no resistencia. Para la comparación se escoge la muestra más próxima posible al tratamiento, preferiblemente la inmediatamente anterior.

Para las 39 pacientes incluidas se valoran todos los tratamientos que han recibido a lo largo de las distintas líneas de tratamiento sumando un total de 244 (gráfico 27).

En las valoraciones de respuesta, entre los tratamientos considerados para cada paciente, hay 156 tratamientos en que no presentan los criterios establecidos de resistencia primaria. Entre ellos, hay 5 en que se alcanza una RC, 88 una RP, en 42 EE y en 21 no se ha podido recoger la respuesta, aunque la TTP es > de 4 meses y por lo tanto estos tratamientos no se han incluido en el grupo de resistencia primaria. Hay 87 tratamientos que cumplen criterios clínicos de resistencia primaria. De ellos 59 corresponden a PE < 4 meses como mejor respuesta, 13 con EE y SLP < 4 meses. En 15 tratamientos no se ha podido recoger la respuesta, aunque por haber presentado TTP < 4 meses se consideran con resistencia primaria.

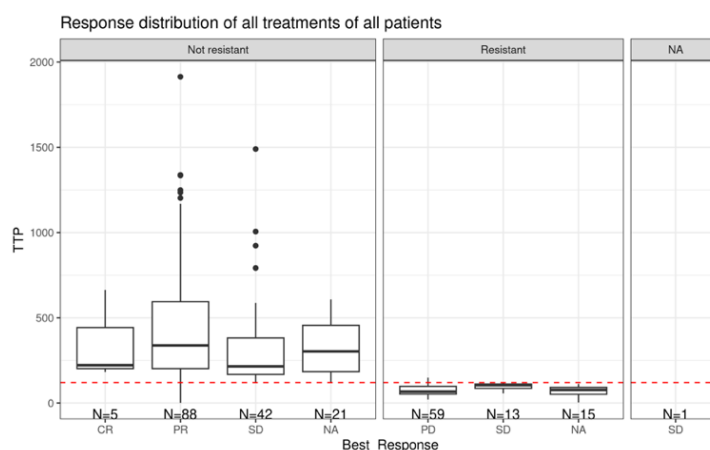


Gráfico 27. Diagrama de cajas de la distribución de los tratamientos recibidos por las pacientes según la respuesta obtenida. TTP: tiempo a la progresión, y criterios clínicos de resistencia primaria. La línea discontinua roja representa el límite de 120 días. Best Response: mejor respuesta obtenida a tratamiento. CR: Respuesta completa. PR: Respuesta parcial. SD: Enfermedad estable. NA: No disponible.

Para valorar las posibles alteraciones genómicas relacionadas con la resistencia primaria al tratamiento se identifican las muestras disponibles, cuya distribución acorde a los criterios de resistencia se representa en el diagrama de cajas correspondiente al gráfico 28.

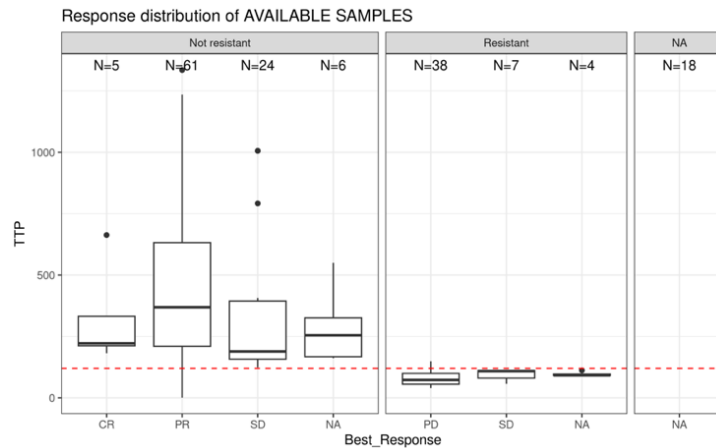


Gráfico 28. Diagrama de cajas de la distribución de las muestras disponibles de las pacientes según la respuesta obtenida. TTP: tiempo a la progresión, y criterios clínicos de resistencia primaria. La línea discontinua roja representa el límite de 120 días. Best Response: mejor respuesta obtenida a tratamiento. CR: Respuesta completa. PR: Respuesta parcial. SD: Enfermedad estable. NA: No disponible.

5.9.1. Cleopatra group

Considerando cada grupo de tratamiento, en el Cleopatra group no se ha detectado ninguna paciente que cumpla criterios de resistencia primaria entre 29 pacientes evaluables que recibieron el tratamiento. Por tanto, no se puede evaluar este grupo de tratamiento para establecer alguna variante sugestiva de resistencia primaria.

5.9.2. Trastuzumab-quimioterapia

En el grupo de TZ_QT, las pacientes han realizado 27 (47%) tratamientos en los que no se cumplen criterios de resistencia y 31 (53%) clasificados como resistentes. Hay 40 muestras disponibles para análisis. Hay más muestras que pacientes incluidas en el estudio, ya que una misma paciente puede recibir trastuzumab asociado a diferentes quimioterapias en diferentes líneas de tratamiento. De las muestras, hay un 26 (65%) que corresponden a pacientes con criterio de resistencia primaria y 14 (35%) no resistentes. Es importante tener en consideración que, en estas pacientes con criterios de resistencia primaria, estrictamente se trataría de una resistencia adquirida en todos los casos, ya que todas las pacientes habían tenido exposición previa a trastuzumab en primera línea sin cumplir criterios de resistencia primaria. Por tanto, se trataría de pacientes con progresión precoz al tratamiento. Al comparar todas las alteraciones genómicas encontradas en las pacientes con SLP < 4 meses con EE o PD como mejor respuesta con las no resistentes con el test exacto de Fisher, no se ha encontrado ninguna variante estadísticamente significativa. Así no hay ninguna SNV o CNV en los genes testados estadísticamente diferente entre las pacientes respondedoras y no respondedoras sugestiva de contribuir a la resistencia. Por tanto, no se puede establecer ninguna variante sugestiva de resistencia adquirida con progresión precoz a este grupo de tratamiento.

5.9.3. T-DM1

En el grupo de TDM1, las pacientes han realizado 23 (70%) tratamientos en los que no se cumplen criterios de resistencia y 10 (30%) clasificados como resistentes. Hay muestras con resultados disponibles de 20 pacientes que lo han recibido, de las cuales

hay 4 (20%) que cumplen criterios de resistencia primaria, mientras que hay 16 (80%) que no la presentan. Al comparar las mutaciones de tipo SNV entre el grupo de pacientes con criterios de resistencia frente a la que no la presentan hay 2 variantes estadísticamente significativas con el test exacto de Fisher. El gen *CDKN2A* teniendo en consideración en conjunto todas sus posibles mutaciones, VUS, patogénicas y probablemente patogénicas alcanza la significación estadística con una $p=0.0392$. Sin embargo, pierde significación con una $p=0.222$ para cada tipo de mutación en concreto. Se encuentra mutación patogénica en *CDKN2A* en 25% y una VUS en 25% de las pacientes con criterios de resistencia primaria y en ninguna sin criterios. El gen *PTEN* alcanza significación estadística para todas las mutaciones en conjunto y para las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas con una $p=0.0392$ en todos los casos. Se encuentra mutación en *PTEN* en el 50% de las pacientes con criterios de resistencia primaria a T-DM1 y en ninguna sin criterios. Para las amplificaciones, se encuentra una diferencia estadísticamente significativa en el gen *RAF1* con una $p=0.0392$. Se encuentra la amplificación en *RAF1* en 50% de pacientes con criterios de resistencia primaria y en ninguna sin criterios. En el resto de genes no hay diferencias en la amplificación, incluyendo a *ERBB2*. Para este gen de especial interés, es destacable que entre las muestras de las pacientes resistentes a tratamiento hay 2 de 4 muestras (50%) que no muestran amplificación de *ERBB2*, mientras que solamente en 1 de 16 (6%) de las respondedoras estaba ausente. Se muestran las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de las pacientes con criterios de resistencia primaria a T-DM1 comparadas con las que no los cumplen en el oncoplot (figura 11).

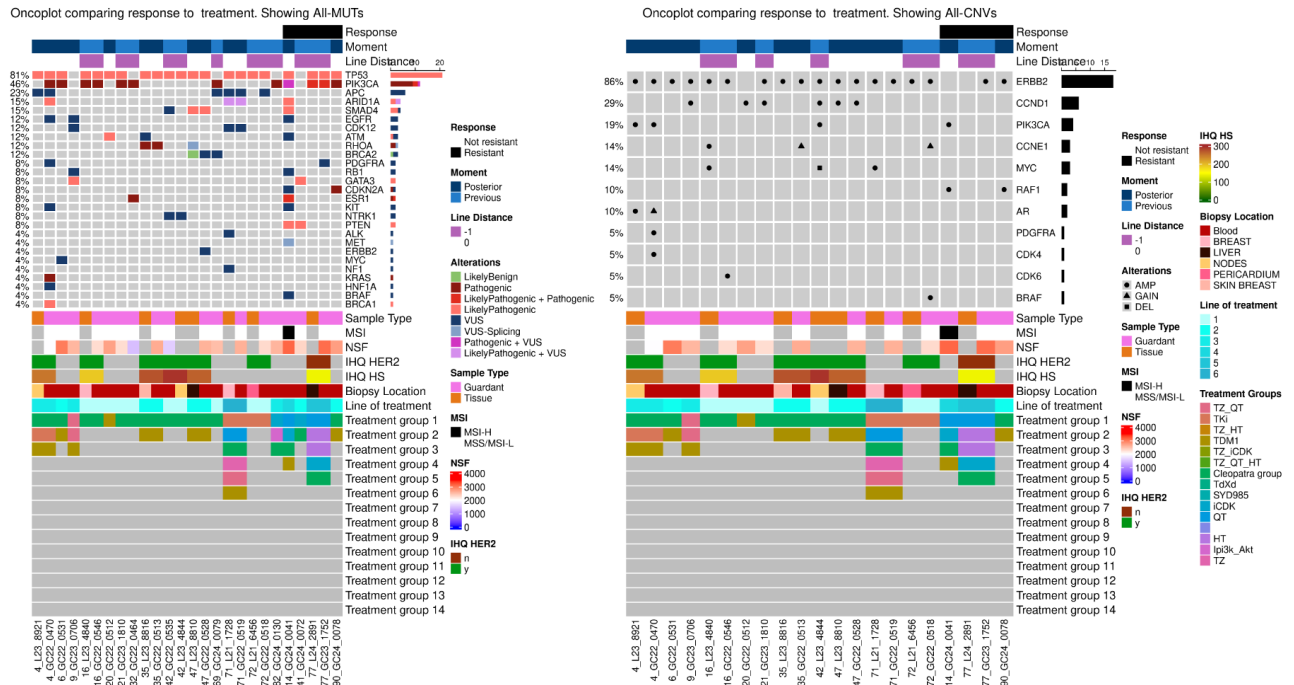


Figura 11. OncoPrint con las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de pacientes que presentan resistencia primaria y de las que no la presentan a tratamiento con T-DM1. Cada columna representa una muestra individual, mientras que cada fila representa un gen diferente. Response: blanco: no resistencia primaria. Negro: resistencia primaria. Moment: momento de extracción de la muestra. Azul oscuro: posterior a tratamiento. Azul claro: anterior a tratamiento. Line distance: Distancia del tratamiento. -1: línea previa. 0: progresión línea actual. Se representan las alteraciones genómicas SNV: VUS en azul oscuro, VUS-Splicing en azul claro, mutaciones patogénicas en granate, probablemente patogénicas en salmón, coexistencia de patogénicas y probablemente patogénicas en

rojo, probablemente benignas en verde, patogénicas y VUS en fucsia, probablemente patogénicas y VUS en lila. CNV en negro. Amplificación con un punto, ganancia con un triángulo y pérdida con un cuadrado. Tipo de muestra: Tejido en naranja, plasma en rosa. MSI: carga mutacional. NSF: Non singleton families. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. Biopsy location: Localización de la biopsia: Blood: Plasma. Breast: Mama. Liver: Hígado. Nodes: Adenopatías. Pericardium: pericardio. Skin breast: letálides.

Se propone a la paciente 14 como ejemplo de resistencia primaria a T-DM1. Se trata de una paciente que había presentado un cáncer de mama estadio IIIA con perfil luminal B HER2 negativo, tratada en adyuvancia con antraciclinas y taxanos, radioterapia y hormonoterapia adyuvante. Recidiva en curso de tratamiento hormonal presentando una crisis visceral, mantiene perfil luminal B HER2 negativo e inicia primera línea (1L) con esquema IMELDA (docetaxel y bevacizumab seguido de capecitabina y bevacizumab) con tiempo a la progresión TTP de 40 meses. En 2L se mantiene perfil luminal B HER2 negativo y recibe tratamiento dentro de ensayo clínico con la combinación de giredestrant, letrozol y palbociclib con TTP de 16 meses. Antes de la 3L se realiza biopsia en la que se evidencia que el tumor cambia a un perfil luminal B HER2 positivo (HER2 3+). Así, en 3L recibe paclitaxel, trastuzumab y pertuzumab con TTP de 8 meses alcanzando RP. En 4L recibe T-DM1 con una SLP < 2 meses con PE como mejor respuesta. Se valora la muestra de biopsia líquida previa a T-DM1. En la muestra se detectan mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas en los genes *ARID1A*, *PIK3CA* (triple mutación: patogénica, probablemente patogénica y VUS), *PTEN*, *ESR1*, *TP53* y *SMAD4*. Se encuentran VUS en *EGFR*, *KIT*, *MET*, *BRAF*, *RB1*, *ATM* y *CDKN2A*. Hay amplificación en *PIK3CA* y *RAF1*, pero no en *ERBB2*.

5.9.4. Trastuzumab deruxtecan

En el grupo de TDXd, las pacientes han realizado 22 (88%) tratamientos en los que no se cumplen criterios de resistencia, 2 (8%) clasificados como resistentes y 1 (4%) en el que no hay información suficiente para su clasificación. Hay 24 muestras disponibles de pacientes que lo han recibido de las cuales 3 (12.5%) cumplen criterios de resistencia primaria y las 21 (87.5%) restantes no los cumplen.

Al comparar todas las alteraciones genómicas encontradas en las pacientes con criterios de resistencia primaria con las no resistentes con el test exacto de Fisher no se ha encontrado ninguna variante estadísticamente significativa. Así no hay ninguna SNV o CNV en los genes testados estadísticamente diferente entre las pacientes respondedoras y no respondedoras sugestiva de contribuir a la resistencia. Se muestran las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de las pacientes con criterios de resistencia primaria a T-DXd comparadas con las que no los cumplen en el oncoplot (figura 12).

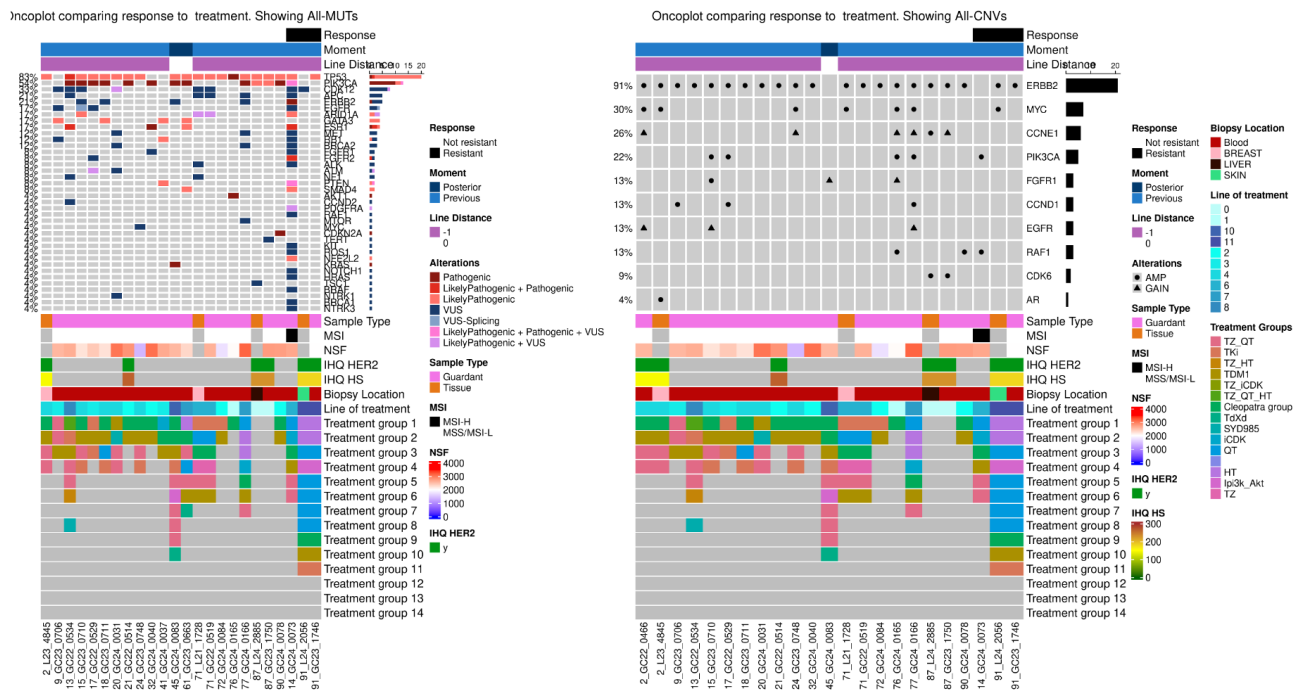


Figura 12. OncoPrint con las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de pacientes que presentan resistencia primaria y de las que no la presentan a tratamiento con T-DXd. Cada columna representa una muestra individual, mientras que cada fila representa un gen diferente. Response: blanco: no resistencia primaria. Negro: resistencia primaria. Moment: momento de extracción de la muestra. Azul oscuro: posterior a tratamiento. Azul claro: anterior a tratamiento. Line distance: Distancia del tratamiento. -1: línea previa. 0: progresión línea actual. Se representan las alteraciones genómicas SNV: VUS en azul oscuro, VUS-Splicing en azul claro, mutaciones patogénicas en granate, probablemente patogénicas en salmón, coexistencia de patogénicas y probablemente patogénicas en rojo, probablemente benignas en verde, patogénicas y VUS en fucsia, probablemente patogénicas y VUS en lila. CNV en negro. Amplificación con un punto, ganancia con un triángulo y pérdida con un cuadrado. Tipo de muestra: Tejido en naranja, plasma en rosa. MSI: carga mutacional. NSF: Non singleton families. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. Biopsy location: Localización de la biopsia: Blood: Plasma. Breast: Mama. Liver: Hígado. Skin breast: letálides.

Se propone a la paciente 91 como ejemplo de resistencia primaria a TDXd. Se trata de una paciente con cáncer de mama estadio IIA con perfil luminal B HER2 negativo inicialmente tratada con cirugía, antraciclinas y tamoxifeno adyuvante. Presenta recaída luminal B HER2 negativa en curso de adyuvancia hormonal e inicia 1L con letrozol con TTP de 6 meses. En 2L recibe fulvestrant con TTP de 8 meses. En 3L recibe capecitabina con TTP de 7 meses. En 4L se detecta mutación en *PIK3CA* y recibe dentro de ensayo clínico la combinación de alpelisib, everolimus y exemestano con TTP de 1 mes. En 5L inicia vinorelbina con TTP de 2 meses. En 6L recibe paclitaxel con TTP de 2 meses. En 7L sigue eribulina con TTP de 1 mes. En 8L recibe esquema CMF metronómico. En 9L se realiza biopsia que muestra emergencia de amplificación de HER2 con un HER2 3+ por IHQ y realiza esquema cleopatra con docetaxel-trastuzumab y pertuzumab con TTP de 13 meses. En 10L recibe T-DM1 asociado a radioterapia en mama con TTP de 4 meses. En 11L recibe capecitabina y lapatinib con TTP < 4 meses. En 12L recibe TDXd dentro de ensayo DESTINY-Breast01 con TTP < 4 meses.

Se dispone de biopsia líquida y de tejido previamente a inicio de tratamiento con TDXd. En la biopsia de plasma únicamente se aprecia una mutación probablemente patogénica en TP53 que no está presente en tejido. Hay una VUS en *CDK12* en tejido no detectable

en plasma. En tejido no se encuentra ninguna mutación patogénica, pero sí múltiples VUS que solo están incluidas para su posible detección en panel VHIO-300 por lo que no se pueden detectar en plasma. Incluyen los genes *ABL2*, *ASXL1*, *BRIP1*, *E2FR*, *ERG*, *FLT3*, *LATS1*, *PIK3C2B*, *PRSS8*, *QK1*, *RARA* Y *SPOP*. Respecto a las alteraciones en CNV, en ambas muestras hay amplificación de *ERBB2* que es la única alteración detectable en plasma. Sin embargo, en tejido hay múltiples alteraciones incluyendo amplificación en *MYC* que no se detecta en plasma. Entre las múltiples alteraciones en genes que solamente son detectables en tejido por panel VHIO-300 se encuentran amplificaciones en *AXIN1*, *BRCA1*, *BRIP1*, *CD79B*, *CDK12*, *FAM46C*, *FLCN*, *GRIN2A*, *PRKARI1*, *RSPO2*, *SOCS1*, *SPOP*, *VTCN1*, *YES* Y *ZFN217*.

5.9.5. Trastuzumab duocarmacina

En el grupo de SYD985, las pacientes han realizado 5 (50%) tratamientos en los que no se cumplen criterios de resistencia y 5 (50%) clasificados como resistentes. Hay 10 muestras disponibles de pacientes que lo han recibido de las cuales 3 (30%) cumplen criterios de resistencia primaria y las 7 (70%) restantes no los cumplen.

Al comparar todas las alteraciones genómicas encontradas en las pacientes con criterios de resistencia primaria con las no resistentes con el test exacto de Fisher no se ha encontrado ninguna variante estadísticamente significativa. Así no hay ninguna SNV o CNV en los genes testados estadísticamente diferente entre las pacientes respondedoras y no respondedoras sugestiva de contribuir a la resistencia.

Se muestran las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de las pacientes con criterios de resistencia primaria a SYD985 comparadas con las que no los cumplen en el oncoplot (figura 13).

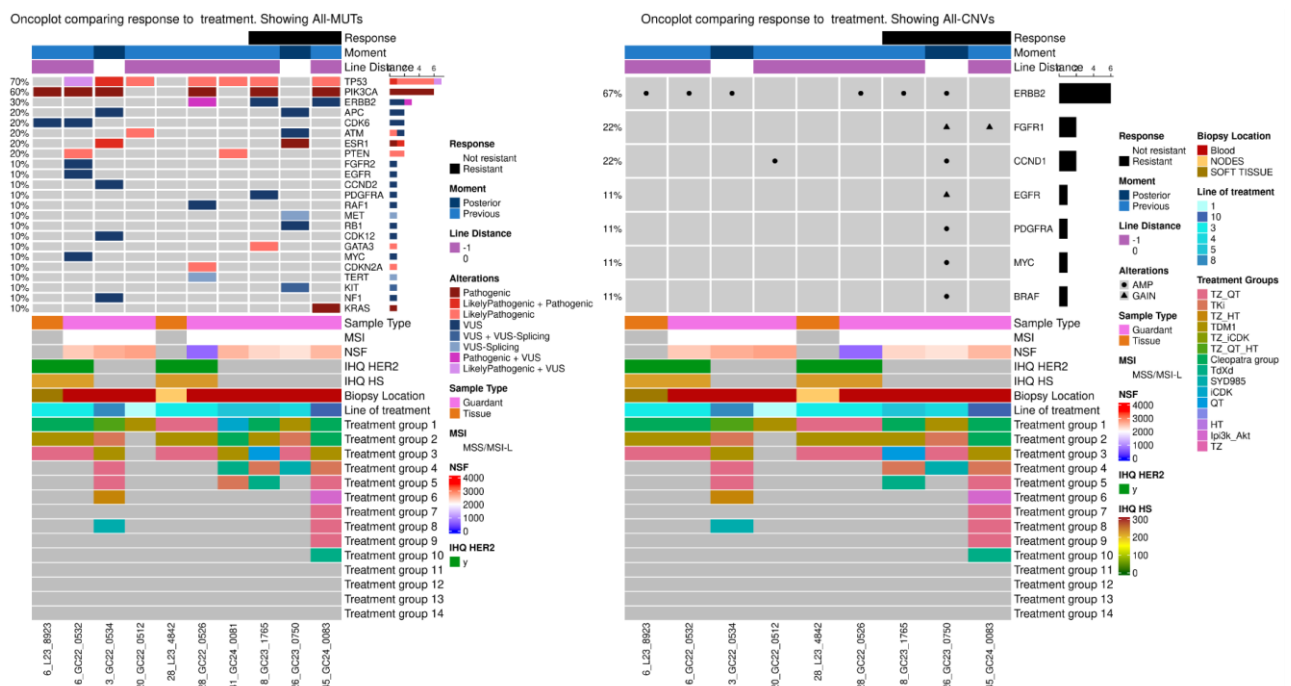


Figura 13. Oncoplot con las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de pacientes que presentan resistencia primaria y de las que no la presentan a tratamiento con SYD985. Cada columna representa una muestra individual, mientras que cada fila representa un gen diferente. Response: blanco: no resistencia primaria. Negro:

resistencia primaria. Moment: momento de extracción de la muestra. Azul oscuro: posterior a tratamiento. Azul claro: anterior a tratamiento. Line distance: Distancia del tratamiento. -1: línea previa. 0: progresión línea actual. Se representan las alteraciones genómicas VUS en azul oscuro, VUS-Splicing en azul claro, mutaciones patogénicas en granate, probablemente patogénicas en salmón, coexistencia de patogénicas y probablemente patogénicas en rojo, probablemente benignas en verde, patogénicas y VUS en fucsia, probablemente patogénicas y VUS en lila. CNV en negro. Amplificación con un punto, ganancia con un triángulo y pérdida con un cuadrado. Tipo de muestra: Tejido en naranja, plasma en rosa. MSI: carga mutacional. NSF: Non singleton families. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. Biopsy location: Localización de la biopsia: Blood: Plasma. Nodes: Adenopatías. Soft tissue: Tejidos blandos.

Se propone a la paciente 26 como ejemplo de resistencia primaria a SYD985. Se trata de una paciente con cáncer de mama estadio IIIC con perfil luminal B HER2 positivo (HER2 2+/ISH amplificado) de entrada. Realiza neoadyuvancia con antraciclinas, taxanos. El estadio tras cirugía pasa a IIIA y sigue adyuvancia con radioterapia, trastuzumab y tamoxifeno. Progresas en curso de hormonoterapia y a menos de 6 meses del fin de trastuzumab. Inicia 1L con T-DM1 con TTP de 11 meses. En 2L recibe capecitabina y lapatinib con TTP de 12 meses. En 3L sigue trastuzumab y vinorelbina con TTP de 2 meses. En 4L recibe SYD985 con TTP de 3 meses. Se dispone de biopsia líquida a la progresión. Se detecta una mutación patogénica en *ESR1* y VUS en *APC*, *ATM*, *MET*, *RB1* y *KIT*. Respecto a las alteraciones en CNV, hay amplificación en *ERBB2*, *CCND1*, *PDGFRA*, *MYC* y *BRAF*. Hay ganancia en número de copias que no llega a criterios de amplificación en *FGFR1* y *EGFR*.

5.9.6. TKI

En el grupo de TKi, las pacientes han realizado 15 (58%) tratamientos en los que no se cumplen criterios de resistencia, 11 (42%) clasificados como resistentes. Hay 17 muestras disponibles de pacientes que lo han recibido de las cuales 8 (47%) cumplen criterios de resistencia primaria y las 9 (53%) restantes no los cumplen.

Al comparar todas las alteraciones genómicas encontradas en las pacientes con criterios de resistencia primaria con las no resistentes con el test exacto de Fisher no se ha encontrado ninguna variante estadísticamente significativa. Así no hay ninguna SNV o CNV en los genes testados estadísticamente diferente entre las pacientes respondedoras y no respondedoras sugestiva de contribuir a la resistencia.

Se muestran las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de las pacientes con criterios de resistencia primaria a TKIs comparadas con las que no los cumplen en el oncoplot (figura 14).

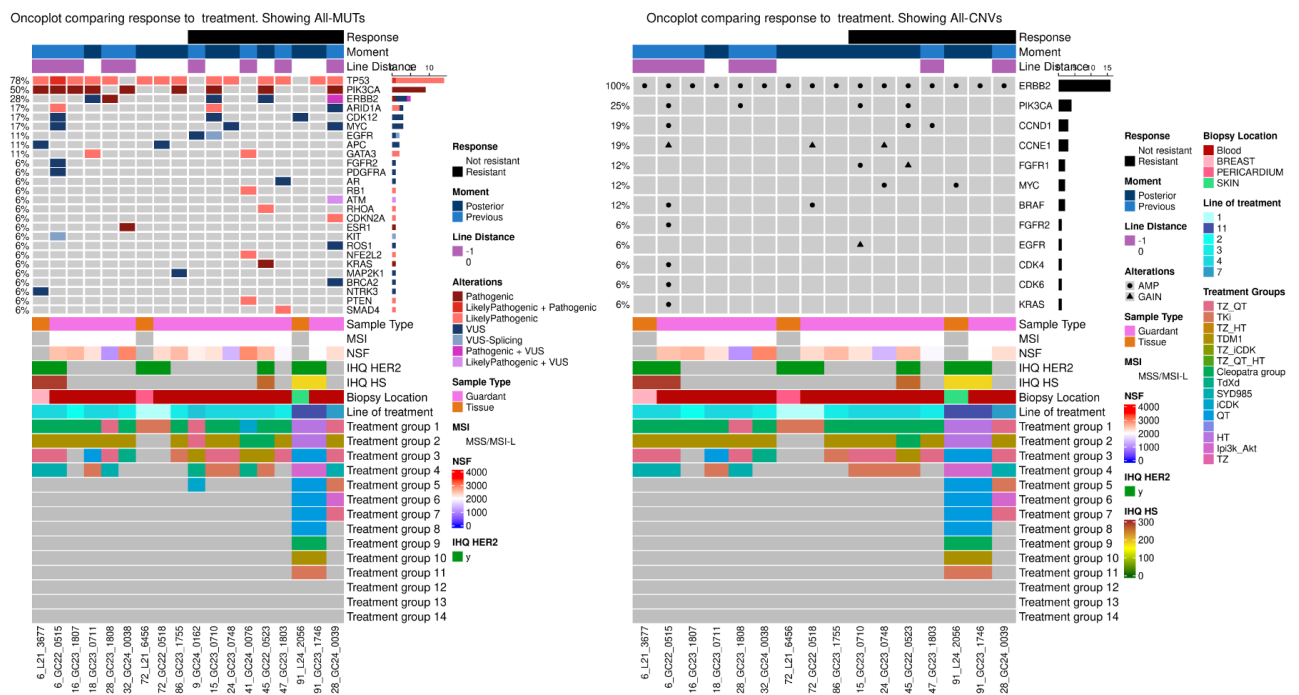


Figura 14. OncoPrint con las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de pacientes que presentan resistencia primaria y de las que no la presentan a tratamiento con TKI. Cada columna representa una muestra individual, mientras que cada fila representa un gen diferente. Response: blanco: no resistencia primaria. Negro: resistencia primaria. Moment: momento de extracción de la muestra. Azul oscuro: posterior a tratamiento. Azul claro: anterior a tratamiento. Line distance: Distancia del tratamiento. -1: línea previa. 0: progresión línea actual. Se representan las alteraciones genómicas SNV: VUS en azul oscuro, VUS-Splicing en azul claro, mutaciones patogénicas en granate, probablemente patogénicas en salmón, coexistencia de patogénicas y probablemente patogénicas en rojo, probablemente benignas en verde, patogénicas y VUS en fucsia, probablemente patogénicas y VUS en lila. CNV en negro. Amplificación con un punto, ganancia con un triángulo y pérdida con un cuadrado. Tipo de muestra: Tejido en naranja, plasma en rosa. MSI: carga mutacional. NSF: Non singleton families. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. Biopsy location: Localización de la biopsia: Blood: Plasma. Breast: Mama. Pericardium: pericardio. Skin breast: letálides.

Se propone a la paciente 15 como ejemplo de resistencia primaria a TKI. Se trata de una paciente con cáncer de mama metastásico al debut con perfil luminal B HER2 positivo con HER2 3+. Recibe en 1L docetaxel, trastuzumab y pertuzumab con TTP de 11 meses. En 2L recibe en ensayo clínico KATE2 la combinación de T-DM1 y atezolizumab con TTP de 7 meses. En 3L sigue trastuzumab y vinorelbina con TTP < 4 meses. EN 4L recibe en ensayo clínico HER2CLIMB el triplete de capecitabina, trastuzumab y tucatinib con TTP de 6 semanas.

Se dispone de biopsia líquida a la progresión. Se detectan mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas en los genes *PIK3CA*, *TP53* y *ARID1A*. Hay VUS en *CDK12*, *ERBB2* y *EGFR*. Respecto a las alteraciones en CNV, se encuentra amplificación en *ERBB2* y *FGFR1*. Hay ganancia en número de copias sin cumplir criterios de amplificación en *EGFR*.

Para todos los tratamientos anti-HER2 en los que se ha testado, los resultados obtenidos no permiten validar la hipótesis de que determinadas alteraciones genómicas analizadas por NGS en muestras de plasma y tejido podrán conferir resistencia primaria a determinados tratamientos. En general no se han encontrado alteraciones genómicas sugestivas de conferir resistencia primaria en el análisis estadístico comparativo entre

las muestras de pacientes con criterios clínicos de resistencia primaria y las que no los cumplen. Excepcionalmente, se ha encontrado que la mutación probablemente patogénica en *PTEN* y la amplificación de *RAF1* podrían estar relacionadas con la resistencia primaria a T-DM1.

5.10. DETERMINADAS ALTERACIONES GENÓMICAS ADQUIRIDAS PODRÁN CONFERIR RESISTENCIA ADQUIRIDA A DETERMINADOS TRATAMIENTOS

Para testar la hipótesis de que determinadas mutaciones adquiridas podrán conferir resistencia adquirida o secundaria a terapias anti-HER2, se han valorado las pacientes de las que se disponen de resultados de genómicos antes y después de un determinado tratamiento. Se consideran todas las muestras disponibles de todas las pacientes tanto de tejido como de plasma. Se valoran los genes en los que hay solapamiento entre panel VHIO-300 y panel Guardant360 VHIO. Por tanto, se valoran alteraciones en 73 genes para SNV y en 18 genes para CNV. Así, es factible valorar las posibles alteraciones genómicas que pudieran emerger y potencialmente conferir resistencia al tratamiento.

5.10.1. Cleopatra group

Al comparar las muestras de plasma y tejido antes y después del tratamiento disponibles en 5 pacientes, no se encuentra ninguna diferencia estadísticamente significativa en las alteraciones genómicas encontradas que sea sugestiva de haber emergido como responsable de la resistencia. Se valoran alteraciones en 73 genes con mutaciones patogénicas y de tipo VUS. En el test exacto de Fisher, realizado para cada gen alterado, no hay ninguna alteración genómica con un valor estadísticamente significativo. Se testan también las posibles diferencias en alteraciones del número de copias de genes antes y después del tratamiento. De los 18 genes en los que se valoran alteraciones, ninguna es estadísticamente significativa. Se muestran las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de las pacientes antes y después del tratamiento con esquema Cleopatra en el oncoplot (figura 15).

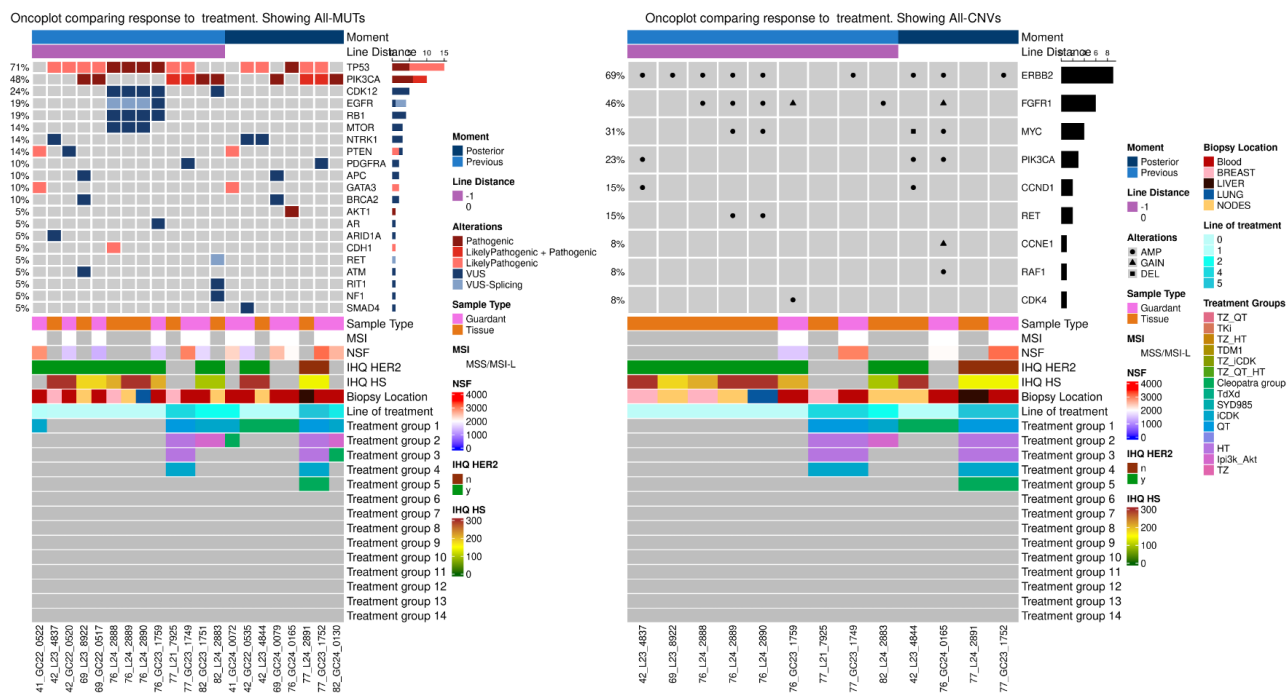
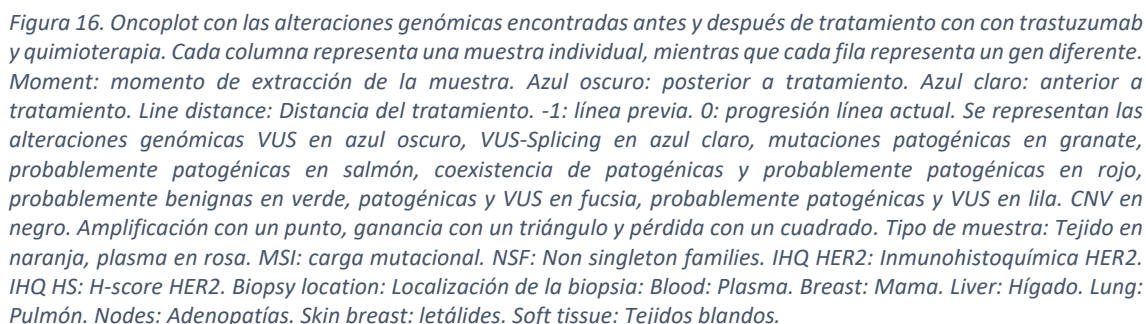


Figura 15. OncoPrint con las alteraciones genómicas encontradas antes y después de tratamiento con taxano, trastuzumab, pertuzumab. Cada columna representa una muestra individual, mientras que cada fila representa un gen diferente. Moment: momento de extracción de la muestra. Azul oscuro: posterior a tratamiento. Azul claro: anterior a tratamiento. Line distance: Distancia del tratamiento. -1: línea previa. 0: progresión línea actual. Se representan las alteraciones genómicas SNV: VUS en azul oscuro, VUS-Splicing en azul claro, mutaciones patogénicas en granate, probablemente patogénicas en salmón, coexistencia de patogénicas y probablemente patogénicas en rojo. Tipo de muestra: Tejido en naranja, plasma en rosa. CNV en negro. Amplificación con un punto, ganancia con un triángulo y pérdida con un cuadrado. MSI: carga mutacional. NSF: Non singleton families. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. Biopsy location: Localización de la biopsia: Blood: Plasma. Breast: Mama. Liver: Hígado. Lung: Pulmón. Nodes: Adenopatías.

Ya que no es posible encontrar ninguna diferencia estadística, se propone a la paciente 76 como ejemplo de las diferencias encontradas antes y después del tratamiento con doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab. La paciente presentó un ILP de 7 meses. Se trata de una paciente metastásica de novo de la que se dispone de resultados de biopsias sincrónicas en tejido de mama, adenopatía axilar, pulmonar y plasma antes del tratamiento y de una muestra de plasma después. Es la paciente de la que se dispone de más muestras antes del tratamiento 1L. Se comparan las alteraciones encontradas con la muestra de plasma analizada tras el tratamiento. Presenta una mutación patogénica en *TP53* que se conserva en todas las muestras antes y después. Sin embargo, hay VUS en *CDK12*, *EGFR*, *RB1* antes de recibir el tratamiento que se detectan en todas las muestras y que se pierden a la progresión. En esta paciente, emerge una mutación de *AKT1* en plasma que no estaba presente al inicio. Respecto a la amplificación de *ERBB2*, se encuentra en todas las muestras de tejido, pero no en la de plasma al inicio. A la progresión emerge en plasma la amplificación de *ERBB2*. Respecto a amplificaciones en otros genes, emerge *MYC* en plasma tras el tratamiento que se había encontrado en tejido de entrada, pero no en plasma. Emerge amplificación en *PIK3CA* en plasma que no se había encontrado en ninguna muestra previamente a tratamiento. En el gen *FGFR1* se encontraba amplificación en las muestras de tejido antes de tratamiento y se mantiene una ganancia en número de copias en plasma antes y después del tratamiento.

Al comparar las muestras de plasma y tejido antes y después del tratamiento disponibles en 10 pacientes, no se encuentra ninguna diferencia estadísticamente significativa en las alteraciones genómicas encontradas que sea sugestiva de haber emergido como responsable de la resistencia. Se valoran alteraciones en 73 genes con mutaciones patogénicas y de tipo VUS. En el test exacto de Fisher, realizado para cada gen alterado, no es estadísticamente significativo. Se testan también las posibles diferencias en alteraciones del número de copias de genes antes y después del tratamiento. De los 18 genes en los que se valoran alteraciones, ninguna es estadísticamente significativa. Se muestran las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de las pacientes antes y después del tratamiento con trastuzumab y quimioterapia en el oncoplot (figura 16).



144

comparan las alteraciones encontradas con la muestra de plasma analizada previamente al tratamiento. Presenta mutaciones patogénicas en *TP53*, *PIK3CA* y *GATA3* que se conservan en todas las muestras antes y después. En las muestras de plasma antes y después se detectan VUS en *ERBB2*, *PDGFRA* y *EGFR* que no se encuentran en la muestra sincrónica de tejido recogida tras tratamiento. En la muestra de plasma tras tratamiento, emerge una VUS en *APC* que no se había detectado ni en tejido ni en plasma antes de tratamiento. Respecto a las alteraciones en el número de copias, la paciente presenta amplificación de *ERBB2* en todas las muestras. Además, se encuentra amplificación de *BRAF* en plasma antes y después, pero no en tejido. La mayor variación se aprecia en la emergencia de alteraciones en el número de copias en plasma de varios genes que no estaban presentes antes del tratamiento. Así hay nuevas amplificaciones en *PIK3CA*, *CCND1*, *CCND2*, *MET*, *MYC* y *RAF1* que no se encuentran en la muestra pareada de tejido postratamiento. Adicionalmente se encuentran numerosas alteraciones en el número de copias en la muestra de tejido en forma de amplificaciones de los genes *BTK*, *ERCC5*, *IRS2*, *SH2D1A*, *STAG2*, *XIAP* y deleciones en *CDKN2A*, *CDKN2B*, *ERG*, *ICOSLG*, todos ellos genes cuyas alteraciones en número de copias no son detectables en plasma con el panel Guardant360 VHIO.

5.10.3. T-DM1

Al comparar las muestras de plasma y tejido antes y después del tratamiento disponibles en 7 pacientes, no se encuentra ninguna diferencia estadísticamente significativa en las alteraciones genómicas encontradas que sea sugestiva de haber emergido como responsable de la resistencia. Se valoran alteraciones en 73 genes con mutaciones patogénicas y de tipo VUS. En el test exacto de Fisher, realizado para cada gen alterado, no es estadísticamente significativo. Se testan también las posibles diferencias en alteraciones del número de copias de genes antes y después del tratamiento. De los 18 genes en los que se valoran alteraciones, ninguna es estadísticamente significativa. Se muestran las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de las pacientes antes y después del tratamiento con T-DM1 en el oncoplot (figura 17).

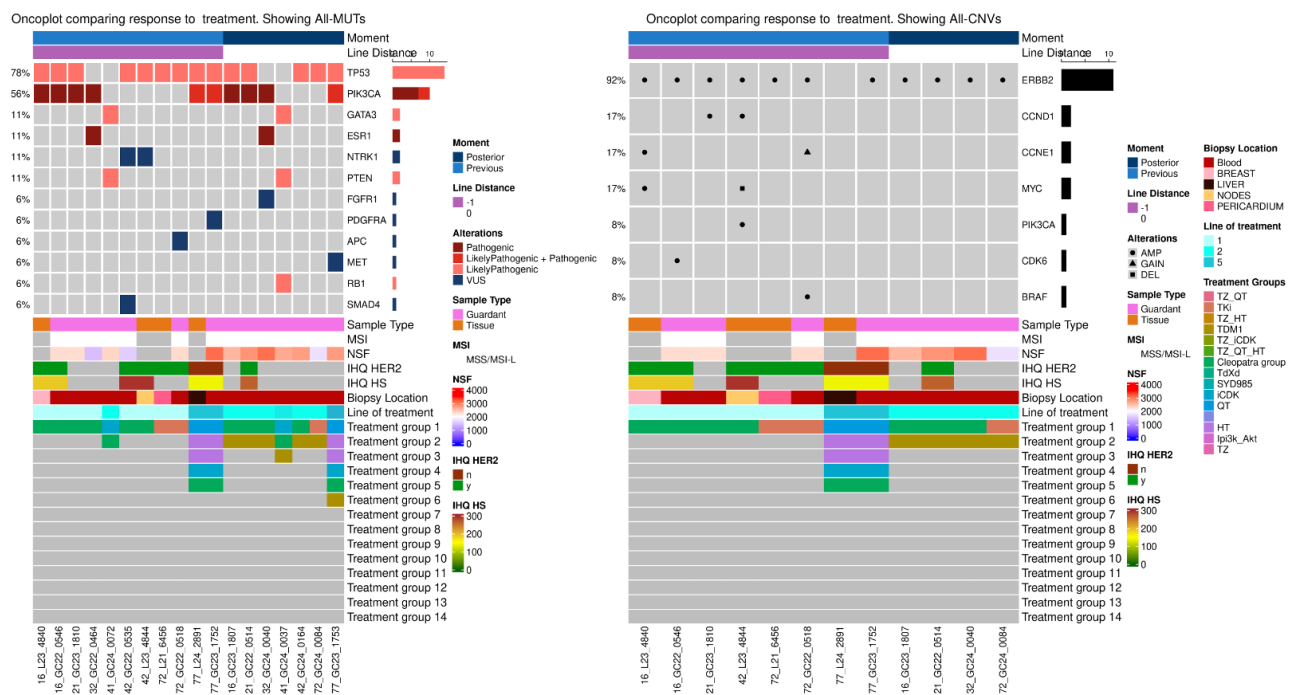


Figura 17. Oncoplot con las alteraciones genómicas encontradas antes y después de tratamiento con T-DM1. Cada columna representa una muestra individual, mientras que cada fila representa un gen diferente. Moment: momento de extracción de la muestra. Azul oscuro: posterior a tratamiento. Azul claro: anterior a tratamiento. Line distance: Distancia del tratamiento. -1: línea previa. 0: progresión línea actual. Se representan las alteraciones genómicas SNV: VUS en azul oscuro, mutaciones patogénicas en granate, probablemente patogénicas en salmón, coexistencia de patogénicas y probablemente patogénicas en rojo. CNV en negro. Amplificación con un punto, ganancia con un triángulo y pérdida con un cuadrado. Tipo de muestra: Tejido en naranja, plasma en rosa. MSI: carga mutacional. NSF: Non singleton families. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. Biopsy location: Localización de la biopsia: Blood: Plasma. Breast: Mama. Liver: Hígado. Lung: Pulmón. Nodes: Adenopatías. Pericardium: Pericardio.

Ya que no es posible encontrar ninguna diferencia estadística, se propone a la paciente 42 como ejemplo de las diferencias encontradas en las alteraciones genómicas antes y después del tratamiento con T-DM1. Se trata de una paciente metastásica de novo cuyo fenotipo tumoral al debut era luminal B HER2 positivo. Había recibido tratamiento de primera línea doble bloqueo asociado a taxano con un SLP de 12 meses con EE. Posteriormente recibe T-DM1 con una SLP de 26 meses con EE.

Se dispone de biopsias sincrónicas en adenopatía locorregional y plasma antes del inicio de tratamiento. Se comparan las alteraciones encontradas con la muestra de plasma analizada correspondiente a la progresión al tratamiento. Presenta mutación patogénica en *TP53* en todas las muestras antes y después. Hay una VUS en *NTRK1* presente en tejido y plasma antes del tratamiento que se pierde a la progresión. En la muestra de plasma antes se detecta una VUS en *SMAD4* que no se visualiza ni en la muestra pareada de tejido, ni en la de plasma postratamiento. En la muestra de tejido previa al tratamiento presenta una mutación en *MAP3K1* que no se detecta en plasma porque no está incluida en el panel Guardant360 VHIO. Hay otras mutaciones tipo VUS como *ERCC2*, *INPP4B*, *KEL*, *NOTCH4* y *SOX10* que solo se detectan en la muestra de tejido. Respecto a las alteraciones en el número de copias, la paciente presenta amplificación de *ERBB2* en la muestra de tejido previamente a tratamiento, pero no en muestra de plasma pareada y tampoco se detecta amplificación tras la progresión a T-DM1. Se encuentran amplificaciones en diversos genes en tejido antes del tratamiento que

Ya que no es posible encontrar ninguna diferencia estadística, se propone a la paciente 24 como ejemplo de las diferencias encontradas en las alteraciones genómicas antes y después del tratamiento con T-DXd. Se trata de una paciente metastásica que había progresado > 12 meses del fin de la adyuvancia con trastuzumab, cuyo fenotipo tumoral al debut era luminal B HER2 positivo. Había recibido como tratamiento de primera línea doble bloqueo asociado a taxano con un SLP de 7 meses. Posteriormente en 2L recibe T-DM1 con una SLP de 2 meses. Sigue tratamiento en 3L con Capecitabina asociado a lapatinib con una SLP < 2 meses. En 4L recibe doble bloqueo con trastuzumab y lapatinib con SLP de 3 meses. En 5L inicia tratamiento con T-DXd con una SLP de 21 meses alcanzando una RP.

Se dispone de biopsias sincrónicas de letálides cutáneas y plasma a la progresión del tratamiento. Se comparan las alteraciones encontradas con la muestra de plasma correspondiente previa al inicio de tratamiento. Presenta mutación patogénica en *TP53* en la muestra de plasma previa a tratamiento, que conserva en tejido a la progresión, aunque se pierde la detección en plasma. Hay una VUS en *MYC* presente en plasma antes del tratamiento que posteriormente no se detecta en las muestras de tejido y plasma a la progresión. En la muestra de tejido posterior al tratamiento presenta varias VUS incluyendo *RHOA* y *NOTCH1* que no se detectan en plasma. Así, en la muestra de plasma tras T-DXd ya no se detecta ninguna mutación.

Respecto a las alteraciones en el número de copias, la paciente presenta amplificación de *ERBB2* en la muestra de plasma previamente a tratamiento, pero ya no se detecta en las muestras de plasma y tejido pareadas a la progresión a T-DXd. Sí se mantiene la detección de amplificación en *MYC* tanto en plasma antes del inicio del tratamiento como en tejido a la progresión, aunque se pierde la detección en plasma tras el tratamiento. La única alteración genómica que se detecta en la muestra de plasma tras T-DXd es la emergencia de una amplificación en *CDK6* que no se detecta en la muestra de tejido pareada.

5.10.5. Trastuzumab duocarmacina

Al comparar las muestras de plasma y tejido antes y después del tratamiento disponibles en 6 pacientes, no se encuentra ninguna diferencia estadísticamente significativa en las alteraciones genómicas encontradas que sea sugestiva de haber emergido como responsable de la resistencia. Se valoran alteraciones en 73 genes con mutaciones patogénicas y de tipo VUS. En el test exacto de Fisher, realizado para cada gen alterado, no es estadísticamente significativo. Se testan también las posibles diferencias en alteraciones del número de copias de genes antes y después del tratamiento. De los 18 genes en los que se valoran alteraciones, ninguna es estadísticamente significativa. Se muestran las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de las pacientes antes y después del tratamiento con SYD985 en el oncoplot (figura 19).

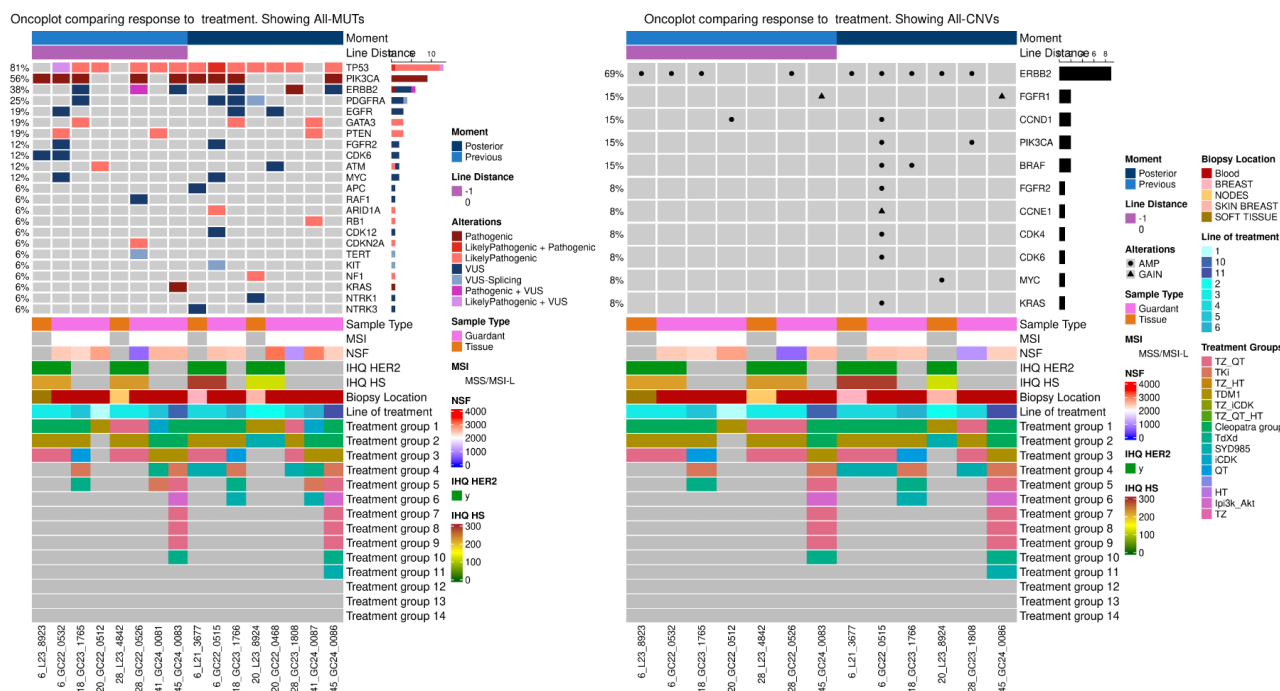


Figura 19. Oncoplot con las alteraciones genómicas encontradas antes y después de tratamiento con trastuzumab duocarmacina. Cada columna representa una muestra individual, mientras que cada fila representa un gen diferente. Moment: momento de extracción de la muestra. Azul oscuro: posterior a tratamiento. Azul claro: anterior a tratamiento. Line distance: Distancia del tratamiento. -1: línea previa. 0: progresión línea actual. Se representan las alteraciones genómicas VUS en azul oscuro, VUS-Splicing en azul claro, mutaciones patogénicas en granate, probablemente patogénicas en salmón, coexistencia de patogénicas y probablemente patogénicas en rojo, patogénicas y VUS en fucsia, probablemente patogénicas y VUS en lila. CNV en negro. Amplificación con un punto, ganancia con un triángulo y pérdida con un cuadrado. Tipo de muestra: Tejido en naranja, plasma en rosa. MSI: carga mutacional. NSF: Non singleton families. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. Biopsy location: Localización de la biopsia: Blood: Plasma. Breast: Mama. Nodes: Adenopatías. Skin breast: letálides. Soft tissue: Tejidos blandos.

Ya que no es posible encontrar ninguna diferencia estadística, se propone a la paciente 6 como ejemplo de las diferencias encontradas en las alteraciones genómicas antes y después del tratamiento con SYD985.

Se trata de una paciente metastásica de novo cuyo fenotipo tumoral al debut era luminal B HER2 positivo. Había recibido como tratamiento de primera línea doble bloqueo asociado a taxano con un SLP de 25 meses alcanzando RP. Posteriormente en 2L recibe T-DM1 asociado a doxorubicina liposomal en ensayo clínico con un TTP de 5 meses con EE. Sigue tratamiento en 3L con trastuzumab asociado a vinorelbina con un TTP de 15 meses alcanzando RP. En 4L recibe tratamiento con SYD985 con un TTP de 22 meses alcanzando una RP.

Se dispone de biopsias sincrónicas de partes blandas y plasma antes del tratamiento. También hay muestras pareadas a la progresión de tratamiento de mama y plasma. Se comparan las alteraciones encontradas entre todas las muestras disponibles.

Presenta mutación patogénica en *PIK3CA* que está presente en todas las muestras. Se detecta en plasma previamente al tratamiento una mutación probablemente patogénica y VUS en *TP53* que no está presente en la muestra pareada de tejido. A la progresión se detecta mutación probablemente patogénica en *TP53* en tejido y patogénica en plasma. Hay una mutación probablemente patogénica en *PTEN* que

únicamente es detectada en plasma antes del tratamiento y no después. Se detecta una VUS en *CDK6* en tejido y plasma antes de tratamiento que es indetectable después. Hay otras VUS que únicamente se detectan en plasma y no en tejido antes de SYD985 en los genes *EGFR*, *FGFR2* y *MYC*. De ellas se mantienen a la progresión *FGFR2* y *MYC*. Emerge en plasma una mutación probablemente patogénica en *ARID1A* que no es visible en tejido. En tejido emergen VUS en *APC* y *NKTR3* no visibles en plasma. En plasma emergen VUS en *PDGFRA*, *CDK12* y *KIT* no visibles en tejido.

Respecto a las alteraciones en el número de copias, la paciente mantiene amplificación de *ERBB2* en todas las muestras analizadas. A la progresión no hay ninguna amplificación emergente detectada en tejido. Sin embargo, en plasma emergen nuevas amplificaciones en *CCND1*, *PIK3CA*, *BRAF*, *FGFR2*, *CDK4*, *CDK6* y *RAS*.

5.10.6. TKI

Al comparar las muestras de plasma y tejido antes y después del tratamiento disponibles en 5 pacientes, no se encuentra ninguna diferencia estadísticamente significativa en las alteraciones genómicas encontradas que sea sugestiva de haber emergido como responsable de la resistencia. Se valoran alteraciones en 73 genes con mutaciones patogénicas y de tipo VUS. En el test exacto de Fisher, realizado para cada gen alterado, no es estadísticamente significativo. Se testan también las posibles diferencias en alteraciones del número de copias de genes antes y después del tratamiento. De los 18 genes en los que se valoran alteraciones, ninguna es estadísticamente significativa. Se muestran las alteraciones genómicas encontradas en las muestras de las pacientes antes y después del tratamiento con TKIs en el oncoplot (figura 20).

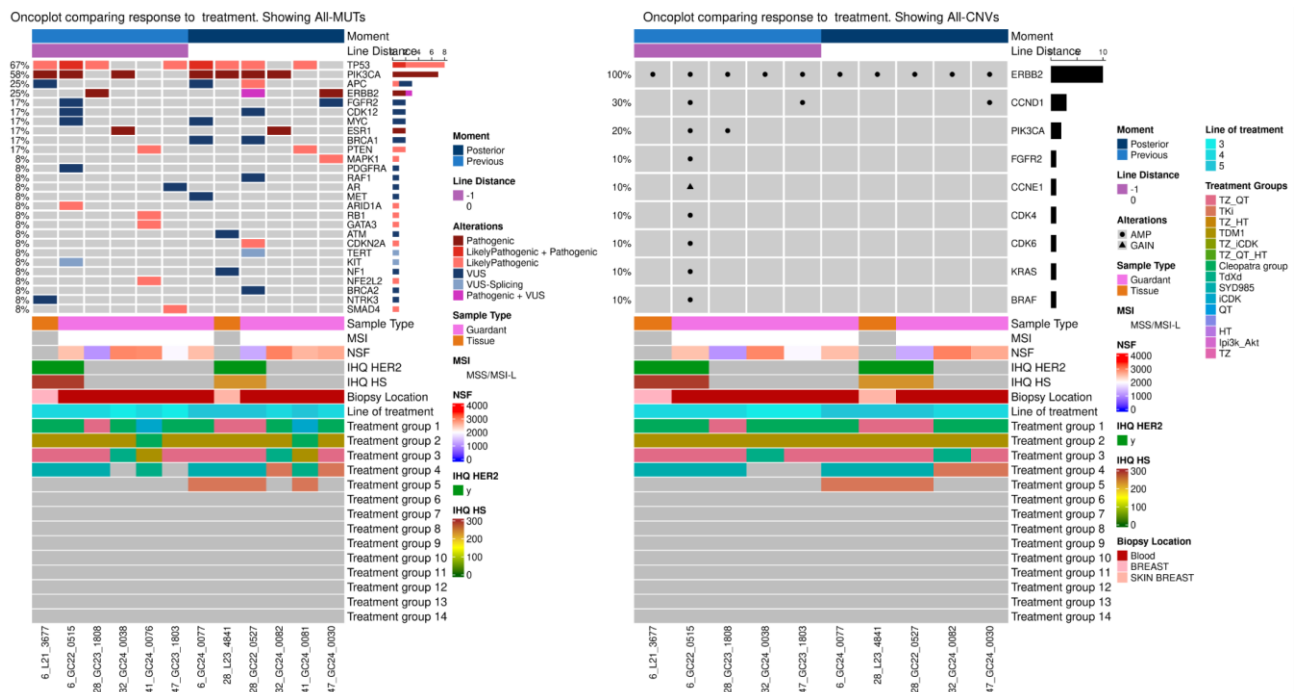


Figura 20. Oncoplot con las alteraciones genómicas encontradas antes y después de tratamiento con con TKI. Cada columna representa una muestra individual, mientras que cada fila representa un gen diferente. Moment: momento de extracción de la muestra. Azul oscuro: posterior a tratamiento. Azul claro: anterior a tratamiento. Line distance: Distancia del tratamiento. -1: línea previa. 0: progresión línea actual. Se representan las alteraciones genómicas VUS

en azul oscuro, VUS-Splicing en azul claro, mutaciones patogénicas en granate, probablemente patogénicas en salmón, coexistencia de patogénicas y probablemente patogénicas en rojo, patogénicas y VUS en fucsia, probablemente patogénicas y VUS en lila. CNV en negro. Amplificación con un punto, ganancia con un triángulo y pérdida con un cuadrado. Tipo de muestra: Tejido en naranja, plasma en rosa. MSI: carga mutacional. NSF: Non singleton families. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. Biopsy location: Localización de la biopsia: Blood: Plasma. Breast: Mama. Nodes: Adenopatías. Skin breast: letálides. Soft tissue: Tejidos blandos.

Ya que no es posible encontrar ninguna diferencia estadística, se propone a la paciente 28 como ejemplo de las diferencias encontradas en las alteraciones genómicas antes y después del tratamiento con TKI.

Se trata de una paciente que progresó en curso de trastuzumab adyuvante cuyo fenotipo tumoral al debut era HER2 positivo no luminal. Recibió como 1L metastásica trastuzumab asociado a taxano con un SLP de 2 meses con PE como mejor respuesta. Posteriormente en 2L recibe T-DM1 con una SLP de 8 meses con EE. Sigue tratamiento en 3L con trastuzumab asociado a vinorelbina con una SLP de 2 meses con PE como mejor respuesta. En 4L recibe tratamiento con SYD985 con una SLP de 6 meses alcanzando una RC. En 5L recibe capecitabina asociado a lapatinib con una SLP de 5 meses con RP.

Se dispone de biopsias sincrónicas de letálides y plasma a la progresión del tratamiento que se comparan con muestra de plasma previa al inicio de tratamiento. En la muestra de plasma antes del inicio de tratamiento presentaba únicamente una mutación probablemente patogénica en *TP53* y patogénica en *ERBB2*. En las muestras pareadas tras tratamiento se detectan en plasma las mutaciones previamente detectadas en *TP53* y en *ERBB2* a la que se añade una VUS en el mismo gen. Además, emergen mutaciones patogénicas en *PIK3CA*, y *CDKN2A*. En tejido se visualizan las mutaciones tanto en *TP53* como *PIK3CA*, pero no *ERBB2* ni *CDKN2A*. Hay mutaciones emergentes en tejido en los genes *ATM* y *NF1* que únicamente son detectables por panel VHIO-300. Como mutaciones VUS en plasma emergen *CDK12*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RAF1* y *TERT* que no se comparten en tejido.

Respecto a las alteraciones en el número de copias, la paciente mantiene amplificación de *ERBB2* en todas las muestras analizadas de plasma y tejido. Antes del inicio de tratamiento se detecta amplificación en *PIK3CA* en plasma que a la progresión no se detecta. Hay amplificaciones en tejido emergentes en genes que solo se testan en panel VHIO-300 en *CDK12*, *SPOP* y *EPHA5*.

Los resultados obtenidos no permiten confirmar la hipótesis planteada de que determinadas alteraciones genómicas adquiridas podrán conferir resistencia adquirida a determinados tratamientos. No se encuentra ninguna alteración genómica emergente con significación estadística que sea sugestiva de conferir resistencia adquirida o secundaria a ninguna de las terapias anti-HER2 evaluadas.

5.11. LAS ALTERACIONES GENÓMICAS DEL ADN SERÁN CONCORDANTES ENTRE EL TEJIDO TUMORAL Y EL ctDNA EXTRAÍDOS EN UN MISMO TIEMPO

Para testar esta hipótesis se ha valorado el solapamiento de genes concordantes entre las técnicas de análisis genómico con NGS disponibles para muestras de tejido con panel VHIO-300 y de plasma con panel Guardant360 de VHIO.

5.11.1. Correlación y solapamiento de las variantes genómicas encontradas en las muestras pareadas de biopsia de tejido y biopsia de plasma o biopsia líquida

Se valora el solapamiento a priori entre los genes valorados por cada técnica para determinar la potencial correlación en las 81 muestras pareadas totales analizadas. Hay 42 pares de muestras, ya que una misma muestra de plasma puede estar pareada con más de una muestra de tejido obtenida de diferentes localizaciones tumorales de una misma paciente. En todas ellas se ha encontrado alguna alteración genómica. Hay una media de 5.09 muestras por línea de tratamiento.

Las muestras pareadas disponibles por cada línea de tratamiento están representadas en el gráfico 29.

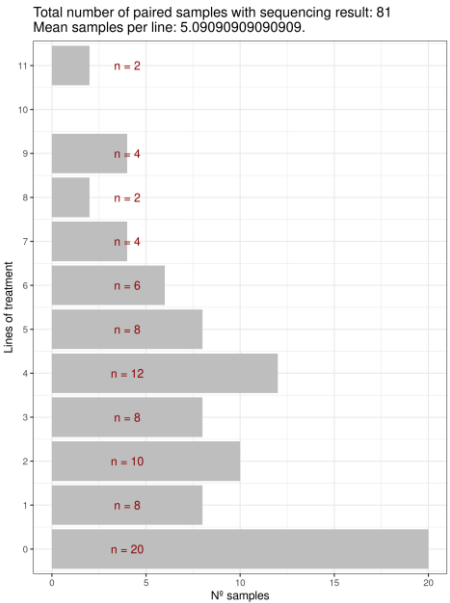


Gráfico 29. Número de muestras pareadas secuenciadas y con resultados por línea de tratamiento. Número total de muestras analizadas con resultados: 81. Media de muestras por línea: 5.09.

El panel VHIO-300 realizado en tejido es el que analiza un mayor número de genes, 421. Se trata de un panel dinámico al que se le han añadido 14 genes extra alcanzando un total de 435 en la versión utilizada en las últimas muestras analizadas. Analiza en todos ellos variantes de un solo nucleótido (SNV) y alteraciones en el número de copias (CNV). Se analizan fusiones y la carga mutacional del tumor o *Tumor mutational Burden* (TMB). El panel Guardant360 VHIO analiza SNV en 74 genes para mutaciones, CNV en 18 genes y fusiones en 14 genes.

El solapamiento entre panel VHIO-300 y Guardant360 VHIO para las SNV es de 73 genes y para las CNV de 18 genes.

Respecto al solapamiento de Amplicon con panel VHIO-300 y Guardant360 para las SNV es de 41 genes y para las CNV de 11 genes (tabla 33, figura 21).

Test Genómico	Número de genes analizados
Panel VHIO-300	421
Guardant SNVs	74

Test Genómico	Número de genes analizados
Guardant Amplificaciones	18
Guardant Fusiones	14
Amplicon	62
Genes comunes SNVs panel + guardant	73
CNVs panel + guardant en común	18
Genes comunes panel + amplicon	58
Genes comunes SNVs guardant + amplicon	41
Genes comunes CNVs guardant + amplicon	11
Genes Extra panel	14
Total Panel VHIO-300 + genes extra	435
Genes comunes SNVs panel (+ extra) + guardant	73
Genes comunes CNVs panel (+ extra) + guardant	18

Tabla 33. Número de genes analizados y solapamiento entre cada técnica de NGS utilizada.

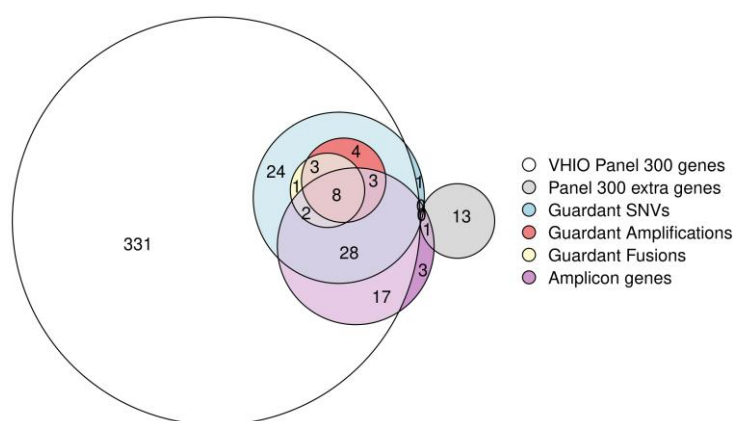


Figura 21. Representación del solapamiento de las alteraciones genómicas detectadas por cada test. VHIO300 representado en blanco (panel en tejido). Guardant SNVs representado en azul (panel en plasma). Guardant amplificaciones representado en rojo (panel en plasma). Guardant fusiones representado en amarillo. Amplicon representado en lila (panel en tejido). SNVs: variantes de un solo nucleótido.

Los genes comunes entre el panel VHIO-300 y Guardant360 se representan en la tabla 34.

VHIO panel VHIO-300 / Guardant360 Genes comunes						
AKT1	CCND2	ESR1	HRAS	MLH1	PDGFRA	SMAD4
ALK	CCNE1	EZH2	IDH1	MPL	PIK3CA	SMO
APC	CDH1	FBXW7	IDH2	MTOR	PTEN	STK11
AR	CDK12	FGFR1	JAK2	MYC	PTPN11	TERT
ARAF	CDK4	FGFR2	JAK3	NF1	RAF1	TP53
ARID1A	CDK6	FGFR3	KIT	NFE2L2	RB1	TSC1

ATM	CDKN2A	GATA3	KRAS	NOTCH1	RET	VHL
BRAF	CTNNB1	GNA11	MAP2K1	NPM1	RHEB	
BRCA1	DDR2	GNAQ	MAP2K2	NRAS	RHOA	
BRCA2	EGFR	GNAS	MAPK1	NTRK1	RIT1	
CCND1	ERBB2	HNF1A	MET	NTRK3	ROS1	

Tabla 34. Listado de genes comunes estudiados en paneles VHIO300 y Guardant360

Características del test Guardant360 VHIO y procedencia de las muestras pareadas:

El test de Guardant tiene algunas limitaciones y características que se deben tener en consideración para la interpretación de los resultados. Es importante considerar las llamadas “*Non-singleton families*” (NSF), es decir familias no nucleares o equivalentes genómicos de las muestras de Guardant360 VHIO. Se refiere a grupos de variantes genómicas que no son únicas, es decir, que se puede encontrar más de una copia de ellas en la muestra de plasma analizada. Estas variantes de alteraciones encontradas como NSF, pueden indicar mutaciones somáticas recurrentes en el tumor, a diferencia de las “*singleton families*” que consisten en variaciones que aparecen solo una vez. Este concepto es relevante para el análisis de secuenciación genómica, donde se busca identificar y cuantificar variantes genéticas presentes en múltiples copias para obtener un perfil genómico más preciso del tumor. Por tanto, se trata de una característica intrínseca de la muestra que afecta a la sensibilidad y especificidad de la prueba. Se considera que el número ideal de NSF detectadas por muestra debería ser >2000 ya que, por debajo de este umbral, se podrían dejar de detectar alteraciones genómicas con una frecuencia alélica baja. Sin embargo, las variantes genómicas detectadas en muestras de plasma con un número ≤ 2000 NSF son fiables. No obstante, por debajo de este umbral alguna alteración podría no haber sido detectada.

Otro factor que se debe considerar en el momento de la interpretación de los resultados del test de Guardant360, es la fracción tumoral o “*tumor fraction*” (TF). Se corresponde con el porcentaje de ADN tumoral circulante (ctDNA) con respecto al total de ADN libre circulante que se encuentra en una muestra de plasma. Por tanto, es una medida de la cantidad de ADN tumoral en la muestra. Se utiliza como biomarcador de la sensibilidad de la prueba.

Otro factor que se puede determinar en plasma y también en tejido es el “*tumor mutational burden*” (TMB) o carga mutacional tumoral. Se trata de una medida del número de mutaciones por muestra que se corresponde con el número de mutaciones en el genoma del tumor. Se relaciona con la respuesta a la inmunoterapia, siendo más probable a mayor carga mutacional o TMB presente en la muestra.

- Para las muestras pareadas de plasma analizadas con Guardant360 (N=39), se representan las “*non-singleton families*” detectadas en cada muestra (NSF), la fracción tumoral (TF) y el “*tumor mutational burden*” (TMB). Se indica, además, la línea de tratamiento en que se encontraba la paciente en el momento de la extracción de la muestra. También se representan las localizaciones de donde provienen las muestras pareadas de tejido (gráfico 30).

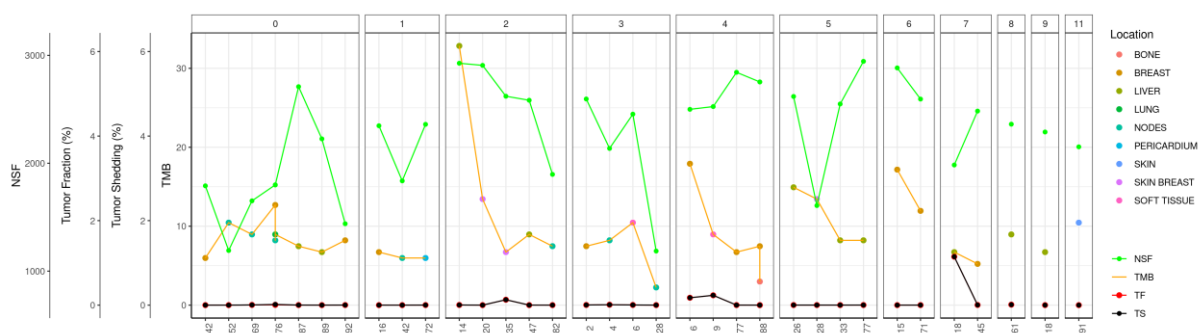


Gráfico 30. Características genómicas y procedencia de las muestras pareadas. Representa en verde las NSF: Non singleton families detectadas en cada muestra (NSF), en rojo la TF: Tumor fraction: Fracción tumoral en plasma, en naranja el TMB: Tumor Mutational Burden: Carga Mutacional Tumoral: (TMB), en negro TS: Tumor Shedding: Liberación de ctDNA tumoral en plasma. Se representan las localizaciones de donde provienen las muestras pareadas de tejido. Bone: Hueso. Breast: Mama. Liver: Hígado. Lung: Pulmón. Nodes: Adenopatías. Pericardium: Pericardio. Skin: Piel. Skin breast: Letálides. Soft tissue: Tejidos blandos.

Cada bloque se corresponde con las muestras que se han ido extrayendo en cada línea de tratamiento en que se encontraba la paciente en ese momento.

5.11.1.1. Total de alteraciones genómicas encontradas

Consideramos todas las alteraciones genómicas encontradas en las 81 muestras, 42 de tejido y 39 plasma entre los genes que potencialmente se solapan por panel VHIO-300 y Guardant360 VHIO incluyendo todas las SNV, todas las CNV y *splicing*. La media de alteraciones totales es de 17.12 con una mediana de 16 y una desviación estándar (DE) de 13. El rango de alteraciones encontradas se encuentra entre 1 y 62. La media de número de genes en los que se han encontrado todas las alteraciones genómicas es de 15.37 con una mediana de 14 y una DE de 11.92 con un rango entre 1 y 51.

5.11.1.2. Mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas

Si consideramos todas las alteraciones de tipo mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas en genes que potencialmente se solapan entre el panel VHIO-300 y Guardant360 VHIO encontradas en las 81 muestras analizadas, la media es de 2.57 con una mediana de 2 y una desviación estándar (DE) de 1.94. El rango de alteraciones encontradas se encuentra entre 0 y 10. La media de genes alterados en todas las muestras es de 2.19 con una mediana de 2 y una DE de 1.44 con un rango entre 0 y 6. El solapamiento general para las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas en los 42 pares de muestras de tejido y plasma se encuentra en 32 (76%) de ellos con una media de genes compartidos del 78.48%.

El solapamiento encontrado por línea de tratamiento en la que se encuentra la paciente para las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas:

En el gráfico 31 se representa la concordancia en las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas encontrada por cada muestra pareada de tejido y plasma, según la línea de tratamiento en que se obtuvo.

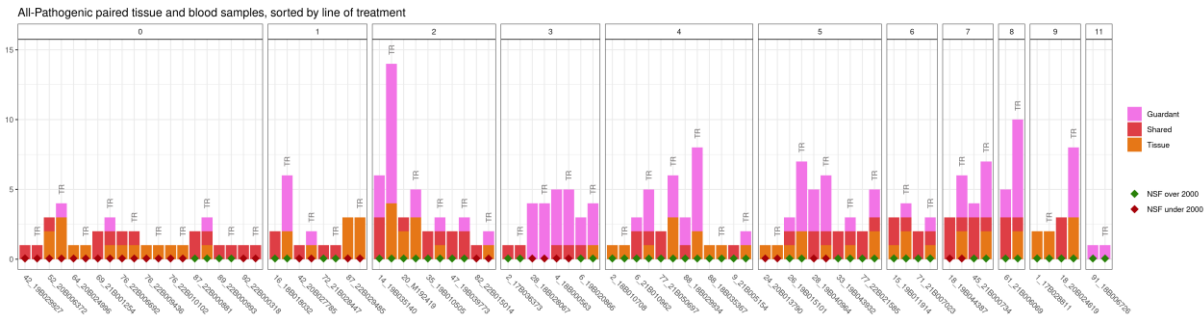


Gráfico 31. Diagrama de barras con todas las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas en muestras pareadas de tejido y plasma. Cada barra corresponde a una muestra pareada de tejido y plasma analizada por panel VHIO-300 y Guardant360 VHIO cuya altura representa el número de variantes de patogénicas o probablemente patogénicas encontradas. Cada gráfico de barras agrupado corresponde a una línea de tratamiento (entre 0-11). En color naranja representadas las variantes encontradas en tejido. En color rosa las encontradas en plasma. En color rojo el solapamiento entre ambas. NSF: Non singleton families.

Solapamiento de genes con mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas:

En los 32 pares de muestras en las que se han encontrado solapamiento de genes, en 5 había mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas compartidas en 3 genes, en 12 en 2 genes y en 15 en un gen. En 10 muestras no había ningún solapamiento. Respecto al porcentaje de solapamiento de alteraciones encontradas por cada par de las 32 muestras que lo presentan, ha sido del 100% en 19 muestras, del 75% en 1 muestra, del 66,67% en 2 muestras, del 60% en 1 muestra, del 50% en 3 muestras, del 40% en 1 muestra, del 33,33% en 4 muestras y del 20% en 1 muestra.

Las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas compartidas en genes en las muestras pareadas, las solo encontradas en tejido y no en su muestra pareada de plasma, así como las encontradas en tejido y no en su muestra pareada de plasma, se encuentran detalladas en la tabla 35.

Concordancia mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas	Genes	Número de Muestras
Genes compartidos	TP53	25 pares de muestras
	PIK3CA	16 pares de muestras
	GATA3	4 pares de muestras
	ARID1A	3 pares de muestras
	PTEN	2 pares de muestras
	BRCA2, ESR1, RHOA, SMAD4	1 par de muestras
Mutaciones en plasma (no en tejido correspondiente)	TP53	5 muestras
	ERBB2, ESR1, KRAS	3 muestras
	ARID1A, CDKN2A, PIK3CA	2 muestras
	APC, BRCA1, PTEN	1 muestra
Mutaciones en tejido (no en plasma correspondiente)	TP53	8 muestras (1 con doble mutación)

Concordancia mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas	Genes	Número de Muestras
	<i>BRCA2, CDH1, CDKN2A</i>	2 muestras
	<i>APC</i>	1 muestra
	<i>NF1 (con doble mutación)</i>	1 muestra
	<i>PIK3CA</i>	1 muestra

Tabla 35. Concordancia de los genes con mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas encontrados en muestras pareadas de tejido y plasma.

Genes potencialmente accionables según clasificación ESCAT de ESMO:³⁴²

Teniendo en cuenta la potencial accionabilidad terapéutica de las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas encontradas en los genes estudiados, se valora la detección que ha habido en las muestras de tejido y plasma pareadas. Se utiliza la clasificación ESCAT de ESMO, considerando que se trata de pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 positivo.

Entre genes potencialmente accionables clasificados ESCAT I por la escala de ESMO para el cáncer de mama luminal HER2 negativo se encuentra *ESR1*. Para pacientes HER2 positivas, debería considerarse ESCAT II, ya que no hay ningún fármaco aprobado para esta indicación. Ha habido concordancia en un 25%, detectando la mutación en ambas muestras pareadas en 1 ocasión. Han sido encontradas exclusivamente en plasma en 3 (75%) muestras.

En el caso del gen *BRCA1*, hay 0% de concordancia en las muestras pareadas, la mutación ha sido detectada únicamente en 1 (100%) muestra de plasma. No se trataba de una paciente con mutación germinal conocida en *BRCA1*. En el caso del gen *BRCA2*, ha habido concordancia en 2 (67%) muestras pareadas de tejido y plasma en una misma paciente con una mutación germinal conocida. En otra paciente sin mutación germinal conocida no ha habido concordancia, detectándose únicamente en tejido (33%).

El gen *PIK3CA* ha sido clasificado como ESCAT I para el cáncer de mama luminal HER2 negativo, aunque para el cáncer de mama HER2 positivo se debería considerar ESCAT II, ya que no hay ningún fármaco aprobado para esta diana en esta indicación. Ha habido concordancia en 16 (84%) pares de muestras de tejido y plasma. Se ha detectado únicamente en plasma en 2 (11%) muestras y exclusivamente en tejido en 1 (6%) muestra.

Para *PTEN*, clasificado como ESCAT II, ha habido concordancia en 2 (67%) muestras pareadas. Se ha encontrado mutación únicamente en plasma en 1 (33%) muestra. No se ha detectado exclusivamente en tejido en ninguna muestra.

Un gen potencialmente accionable considerado como ESCAT III es *ERBB2*. Se ha encontrado concordancia en 0% de muestras pareadas. Se han detectado mutaciones patogénicas únicamente en plasma en 3 (100%) muestras. No se ha encontrado ninguna mutación en tejido.

Se detallan en la tabla 36 las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas con concordancia en ambas muestras pareadas y las discordantes que se encuentran o bien solamente en la muestra de tejido o exclusivamente en la de plasma.

Gen	Clasificación ESCAT	Mutaciones en Plasma	% Plasma	Mutaciones en Tejido	% Tejido	Muestras Concordantes	% Concordantes
ESR1	I	3	75%	0	0%	1	25%
BRCA1	I	1	100%	0	0%	0	0%
BRCA2	I	0	0%	1	33%	2	67%
PIK3CA	I/II	2	11%	1	6%	16	84%
PTEN	II	1	33%	0	0%	2	67%
ARID1A	III	2	40%	0	0%	3	60%
CDH1	III	0	0%	2	100%	0	0%
ERBB2	III	3	100%	0	0%	0	0%
NF1	III	0	0%	1	100%	0	0%
RB1	III	1	100%	0	0	0	0%
KRAS	III/IV	2	100%	0	0%	0	0%
APC	IV	1	50%	1	50%	0	0%
CDKN2A	IV	2	67%	1	33%	0	0%
TP53	IV	5	13%	8	21%	25	66%

Tabla 36. Concordancia mutaciones en tejido/plasma según clasificación ESCAT ESMO. % plasma: porcentaje de amplificaciones en plasma no detectadas en tejido. % tejido: porcentaje de amplificaciones en tejido no detectadas en plasma. % concordantes: concordancia en muestras de tejido y plasma.

Oncoplot mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas:

Se han representado visualmente los eventos de alteración genómica del conjunto de muestras pareadas de tejido y plasma analizadas mediante oncoplots. Para hacer más fácil la visualización los oncoplots se han filtrado por las distintas alteraciones encontradas, dado el gran número de ellas (figura 22).

Los genes con mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas más frecuentemente representados en las muestras analizadas han sido *TP53* en 85%, *PIK3CA* en 47%, *ARID1A* y *GATA3* en 11%, *ESR1* y *PTEN* en 7%, *BRCA2* en 5%, *ERBB2*, *CDKN2A* y *KRAS* en 4%, *APC*, *CDH1*, *RHOA* y *SMAD4* en 3%.

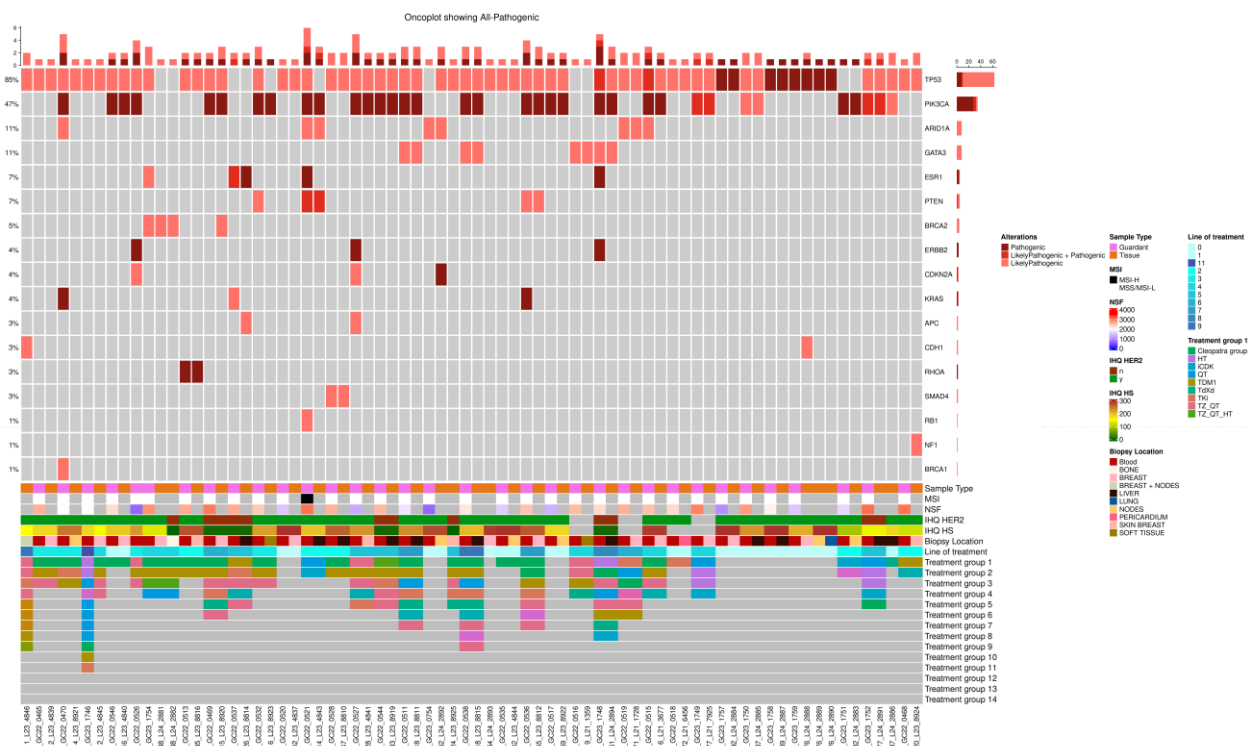


Figura 22. Oncoplot mutaciones patológicas y probablemente patológicas en muestras pareadas de tejido y plasma. Cada columna representa una muestra individual, mientras que cada fila representa un gen diferente. Se representan las mutaciones patológicas en granate, las probablemente patológicas en salmón, si coexisten ambas en rojo. Tipo de muestra: Tejido en naranja, plasma en rosa. MSI: carga mutacional. NSF: Non singleton families. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. Biopsy location: Localización de la biopsia: Blood: Plasma. Breast: Mama. Liver: Hígado. Lung: Pulmón. Nodes: Adenopatías. Pericardium: Pericardio. Skin: Piel. Skin breast: Letálides. Soft tissue: Tejidos blandos. Line of treatment: línea de tratamiento. Treatment groups: Grupo de tratamiento: Cleopatra group: taxano- trastuzumab-pertuzumab, HT: hormonoterapia, iCDK: inhibidor de ciclinas, Ipi3k_Akt: Inhibidor PI3K/AKT, QT: quimioterapia, SYD985: trastuzumab duocarmacina, TDM1: trastuzumab emtansina, TDXd: trastuzumab deruxtecan, TKI: Inhibidor tirosina quinasa, TZ: trastuzumab, TZ-HT: trastuzumab-hormonoterapia, TZ_iCDK: trastuzumab -inhibidor de ciclinas-hormonoterapia, TZ_QT: trastuzumab-quimioterapia, TZ_QT-HT: trastuzumab-quimioterapia-hormonoterapia.

5.11.1.3. Variantes de significado incierto (VUS)

Si consideramos todas las alteraciones de tipo VUS en genes que potencialmente se solapan entre el pane300 VHIO y Guardant360 VHIO encontradas en las 81 muestras analizadas, la media es de 6.99 con una mediana de 6 y una desviación estándar (DE) de 7.02. El rango de alteraciones encontradas se encuentra entre 0 y 42. La media de genes alterados es de 6.49 con una mediana de 6 y una DE de 6.45 con un rango entre 0 y 37. El solapamiento general para las VUS en los 38 pares de muestras de tejido y plasma en los que hay este tipo de alteración genómica, se encuentra en 8 (21%) de ellos con una media de genes compartidos del 34.98%.

El solapamiento encontrado por línea de tratamiento en la que se encuentra la paciente para las VUS:

En el gráfico 32 se representa la concordancia en las mutaciones tipo VUS encontrada por cada muestra pareada de tejido y plasma, según la línea de tratamiento en que se obtuvo.

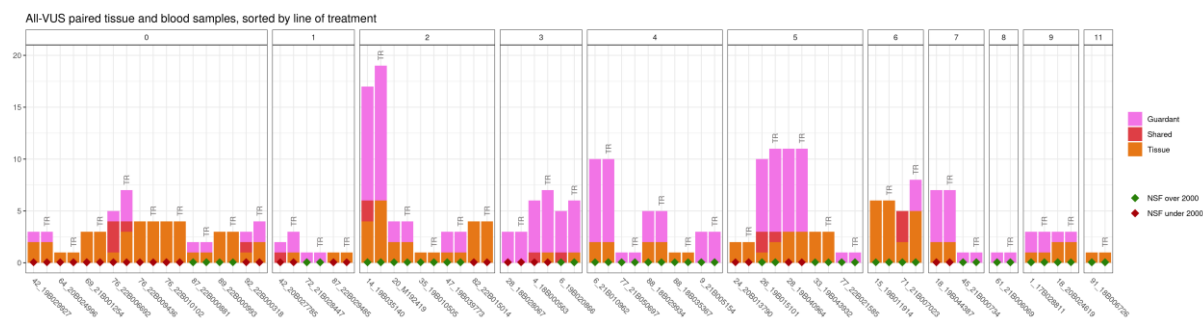


Gráfico 32. Diagrama de barras con todas las mutaciones tipo VUS en muestras pareadas de tejido y plasma. Cada barra corresponde a una muestra pareada de tejido y plasma analizada por panel VHIO-300 y Guardant360 VHIO cuya altura representa el número de variantes de VUS encontradas. Cada gráfico de barras agrupado corresponde a una línea de tratamiento (entre 0-11). En color naranja representadas las variantes encontradas en tejido. En color rosa las encontradas en plasma. En color rojo el solapamiento entre ambas. NSF: Non singleton families. TR: Transcript, para las alteraciones genómicas en SNV se compara la transcripción específica de cada alteración.

Solapamiento de genes con VUS:

En los 8 pares de muestras en las que se han encontrado solapamiento de genes, en 2 había VUS compartidas en 3 genes, en 2 en 2 genes y en 4 en un gen.

Respecto al porcentaje de solapamiento de alteraciones encontradas por cada par de las 8 muestras que lo presentan, ha sido del 60% en 2 muestras, del 50% en 1 muestra, del 33,33% en 1 muestra, del 22,22% en 1 muestra, del 20% en 1 muestra y del 14,29% en 1 muestra.

Hay en 14 pares de muestras de plasma en las que no se encuentra ninguna VUS y en tejido se evidencian entre 1 y 5 mutaciones. Hay 10 muestras de tejido en las que no se encuentra ninguna VUS y en plasma varía entre 1 y 5.

Las VUS compartidas en genes en las muestras pareadas, las solo encontradas en tejido y no en su muestra pareada de plasma, así como las encontradas en tejido y no en su muestra pareada de plasma, se encuentran detalladas en la tabla 37.

Concordancia en mutaciones tipo VUS	Genes	Número de Muestras
VUS compartidas	APC	4 pares de muestras
	PIK3CA, CDK12, RB1	2 pares de muestras
	ARID1A, CDK6, EGFR, NTRK1	1 par de muestras
VUS en tejido (no en plasma correspondiente)	NF1	6 muestras
	ATM	5 muestras
	APC, CDK12, RAF1	4 muestras
	MTOR, NTRK1, PDGFRA	3 muestras
	ARID1A, BRCA1, EGFR, RB1, TERT, TSC1	2 muestras
	ALK, BRCA2, CDH1, CDKN2A, ERBB2, FGFR1, FGFR3, GNAQ, GNAS, JAK3, NOTCH1, NTRK3, PTEN, RIT1, RET, RHOA, SMO	1 muestra
VUS en plasma (no en tejido correspondiente)	ERBB2	9 muestras

Concordancia en mutaciones tipo VUS	Genes	Número de Muestras
	<i>EGFR</i>	6 muestras
	<i>BRCA2, CDK12, KIT, PDGFRA</i>	5 muestras
	<i>FGFR2, MYC, PTPN11, RAF1, RB1</i>	3 muestras
	<i>ATM, APC, ESR1, FGFR1</i>	2 muestras
	<i>AR, ARID1A, CDK4, HNF1A, HRAS, IDH1, FGFR3, PTEN</i>	1 muestra

Tabla 37. Concordancia de los genes con mutaciones tipo VUS encontrados en muestras pareadas de tejido y plasma

Oncoplot VUS:

Se han representado visualmente los eventos de alteración genómica del conjunto de muestras pareadas de tejido y plasma analizadas mediante oncoplots. Para hacer más fácil la visualización los oncoplots se han filtrado por las distintas alteraciones encontradas, dado el gran número de ellas (figura 23).

Los genes en los que se han encontrado VUS con mayor frecuencia han sido 24% de muestras en *APC*, 20% en *CDK12*, 15% en *ERBB2* y *RB1*, 11% en *ATM*, *EGFR* y *PDGFRA*, 9% en *ARID1A*, *BRCA1*, *BRCA2*, *NKTR1* y *RAF1*.

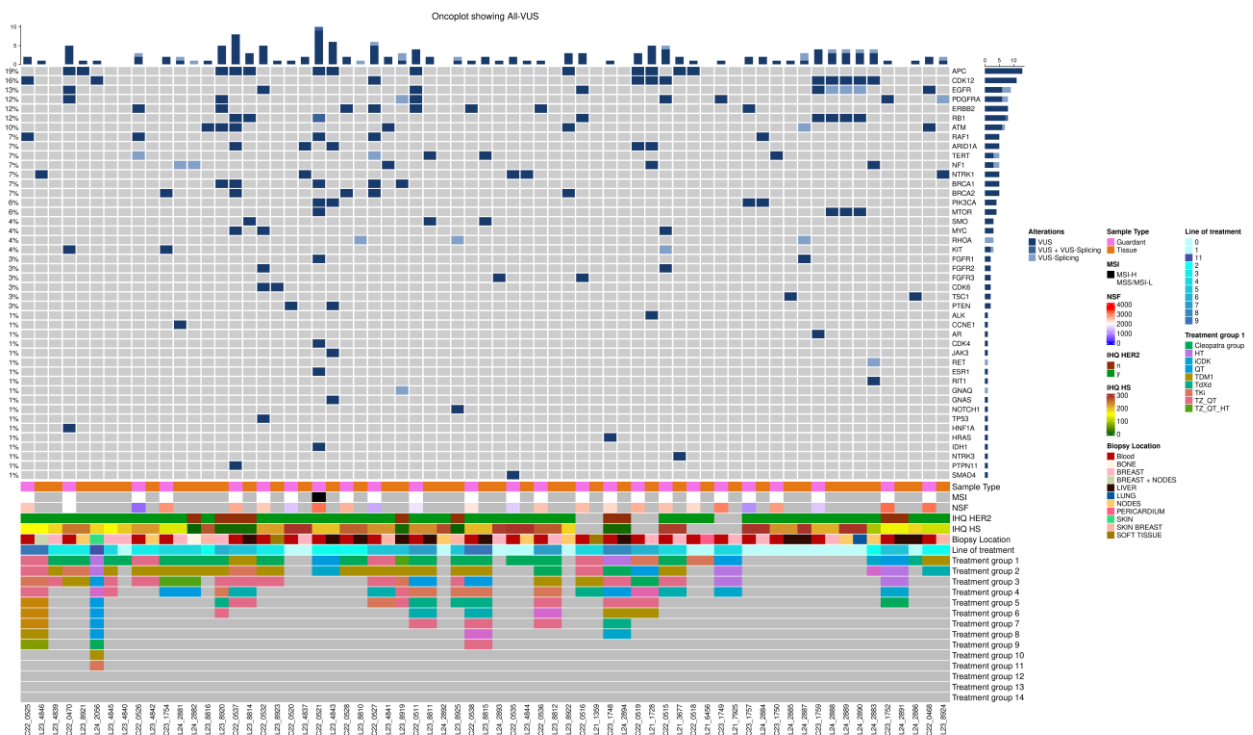


Figura 23. Oncoplot mutaciones tipo VUS en muestras pareadas de tejido y plasma. Cada columna representa una muestra individual, mientras que cada fila representa un gen diferente. Se representan las alteraciones genómicas VUS en azul. Tipo de muestra: Tejido en naranja, plasma en rosa. MSI: carga mutacional. NSF: Non singleton families. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. Biopsy location: Localización de la biopsia: Blood: Plasma. Breast: Mama. Liver: Hígado. Lung: Pulmón. Nodes: Adenopatías. Pericardium: Pericardio. Skin: Piel. Skin breast: Letálides. Soft tissue: Tejidos blandos. Line of treatment: línea de tratamiento. Treatment groups: Grupo de

tratamiento: Cleopatra group: taxano- trastuzumab-pertuzumab, HT: hormonoterapia, iCDK: inhibidor de ciclinas, Ipi3k_Akt: Inhibidor PI3K/AKT, QT: quimioterapia, SYD985: trastuzumab duocarmacina, TDM1: trastuzumab emtansina, TDXd: trastuzumab deruxtecan, TKI: Inhibidor tirosina quinasa, TZ: trastuzumab, TZ_HT: trastuzumab-hormonoterapia, TZ_iCDK: trastuzumab -inhibidor de ciclinas-hormonoterapia, TZ_QT: trastuzumab-quimioterapia, TZ_QT_HT: trastuzumab-quimioterapia-hormonoterapia.

5.11.1.4. Amplificaciones

Si consideramos todas las alteraciones de tipo amplificaciones en genes que potencialmente se solapan entre el panel VHIO300 y Guardant360 VHIO encontradas en las 81 muestras analizadas, la media es de 5.90 con una mediana de 4 y una desviación estándar (DE) de 6.19. El rango de alteraciones encontradas se encuentra entre 0 y 26. La media de genes alterados es de 4 con una mediana de 5.80 y una DE de 6.05 con un rango entre 0 y 25.

El solapamiento general para las amplificaciones en los 40 pares de muestras de tejido y plasma en las que se ha encontrado esta alteración genómica se encuentra en 26 (65%) de ellos con una media de genes compartidos del 60.83%.

El solapamiento encontrado por línea de tratamiento en la que se encuentra la paciente para las amplificaciones:

En el gráfico 33 se representa la concordancia en las amplificaciones encontrada por cada muestra pareada de tejido y plasma, según la línea de tratamiento en que se obtuvo:

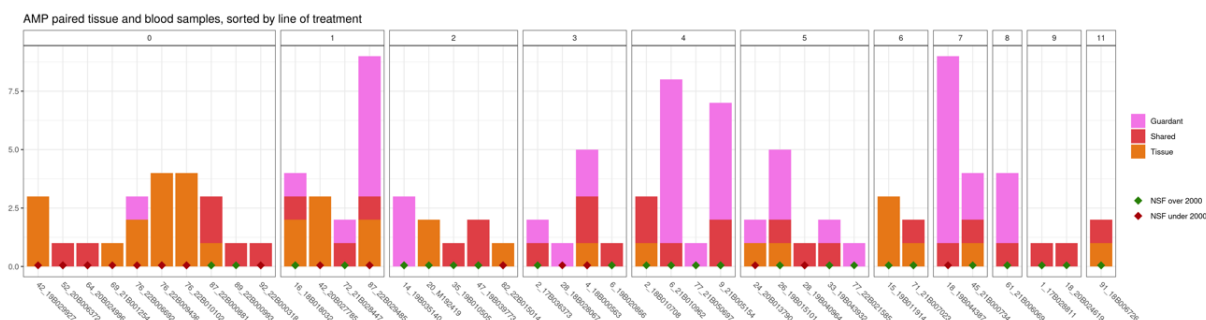


Gráfico 33. Diagrama de barras con todas las amplificaciones en muestras pareadas de tejido y plasma. Cada barra corresponde a una muestra pareada de tejido y plasma analizada por panel VHIO-300 y Guardant360 VHIO cuya altura representa el número de amplificaciones encontradas. Cada gráfico de barras agrupado corresponde a una línea de tratamiento (entre 0-11). En color naranja representadas las variantes encontradas en tejido. En color rosa las encontradas en plasma. En color rojo el solapamiento entre ambas. NSF: Non singleton families.

Solapamiento de genes con amplificaciones:

En los 26 pares de muestras en las que se han encontrado solapamiento de genes, en 5 había amplificaciones compartidas en 2 genes, en 21 en 1 gen. En 14 muestras restantes, no había ningún solapamiento.

Respecto al porcentaje de solapamiento de alteraciones encontradas por cada par de las 26 muestras que lo presentan, ha sido del 100% en 10 muestras, del 66,67% en 2 muestras, del 50% en 5 muestras, del 40% en 1 muestra, del 28.57% en 1 muestra, del

25% en 3 muestras, del 20% en 1 muestras, del 12.50% en 1 muestra y del 11.11% en 2 muestras.

Las amplificaciones compartidas en genes en las muestras pareadas, las solo encontradas en tejido y no en su muestra pareada de plasma, así como las encontradas en tejido y no en su muestra pareada de plasma, se encuentran detalladas en la tabla 38.

Concordancia amplificaciones	Genes	Número de Muestras
Genes amplificados compartidos	<i>ERBB2</i>	23 pares de muestras
	<i>CCND1</i>	5 pares de muestras
	<i>CDK6, MYC, PIK3CA</i>	1 par de muestras
Amplificaciones en plasma (no en tejido correspondiente)	<i>BRAF, CCND1, CDK4</i>	5 muestras
	<i>CDK6, PIK3CA</i>	6 muestras
	<i>ERBB2</i>	4 muestras
	<i>KRAS</i>	3 muestras
	<i>FGFR2, PDGFRA</i>	2 muestras
	<i>CCND2, MET, RAF1</i>	1 muestra
Amplificaciones en tejido (no en plasma correspondiente)	<i>ERBB2, MYC</i>	8 muestras
	<i>FGFR1</i>	7 muestras
	<i>CCNE1</i>	3 muestras
	<i>AR, CCND1, PIK3CA, RET</i>	2 muestras
	<i>CDK6</i>	1 muestra

Tabla 38. Concordancia de los genes con amplificaciones encontrados en muestras pareadas de tejido y plasma

Genes potencialmente accionables según clasificación ESCAT de ESMO:³⁴²

Teniendo en cuenta la potencial accionabilidad terapéutica de las amplificaciones encontradas en los genes estudiados, se valora la detección que ha habido en las muestras de tejido y plasma pareadas. Se utiliza la clasificación ESCAT de ESMO, considerando que se trata de pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 positivo.

Entre genes potencialmente accionables clasificados ESCAT I por la escala de ESMO para el cáncer de mama únicamente se encuentra *ERBB2*. Ha habido concordancia en 23 (66%) pares de muestras de tejido y plasma. Se ha detectado únicamente en plasma en 4 (11%) muestras y exclusivamente en tejido en 8 (23%) muestras.

Para la amplificación de *PIK3CA*, clasificada como ESCAT II se ha encontrado concordancia en 1 (11%) muestra pareada de tejido y plasma. Se ha detectado exclusivamente en plasma en 6 (67%) de muestras y únicamente en tejido de 2 (22%) muestras.

Se detallan en la tabla 39 las amplificaciones con concordancia en ambas muestras pareadas y las discordantes que se encuentran o bien solamente en la muestra de tejido o exclusivamente en la de plasma.

Clasificación ESCAT	Gen	Amplificaciones en Plasma	% Plasma	Amplificaciones en Tejido	% Tejido	Muestras concordantes	% Concordantes
I	ERBB2	4	11%	8	23%	23	66%
II	PIK3CA	6	67%	2	22%	1	11%.
III	AR	0	0%	2	100%	0	0%
III	BRAF	6	100%	0	0%	0	0%
III	CCND1	5	42%	2	16%	5	42%
III	CCND2	1	100%	0	0%	0	0%
III	CCNE1	0	0%	3	100%	0	0%
III	CDK4	5	100%	0	0%	0	0%
III	CDK6	6	75%	1	12.5%	1	12.5%
III	FGFR1	0	0%	7	100%	0	0%
III	FGFR2	2	100%	0	0%	0	0%
III/IV	KRAS	3	100%	0	0%	0	0%.
III	MET	1	100%	0	0%	0	0%
III/IV	MYC	5	36%	8	57%	1	7%
III	PDGFRA	2	100%	0	0%	0	0%
III	RAF1	2	100%	0	0%	0	0%
III	RET	0	0%	2	100%	0	0%

Tabla 39. Concordancia amplificaciones en tejido/plasma según clasificación ESCAT ESMO. % plasma: porcentaje de amplificaciones en plasma no detectadas en tejido. % tejido: porcentaje de amplificaciones en tejido no detectadas en plasma. % concordantes: concordancia en muestras de tejido y plasma.

Oncoplot amplificaciones:

Se han representado visualmente los eventos de alteración genómica del conjunto de muestras pareadas de tejido y plasma analizadas mediante oncoplots. Para hacer más fácil la visualización los oncoplots se han filtrado por las distintas alteraciones encontradas, dado el gran número de ellas (figura 24).

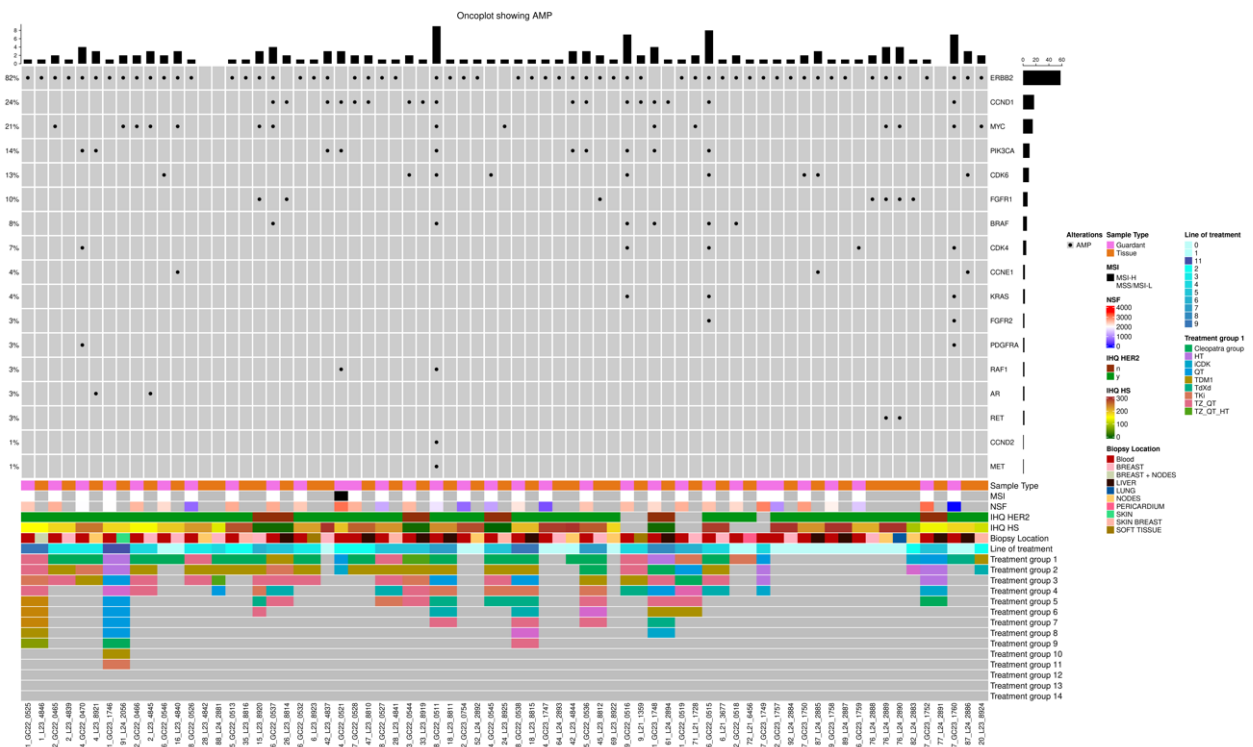


Figura 24. Oncoplot de amplificaciones en muestras pareadas de tejido y plasma. Cada columna representa una muestra individual, mientras que cada fila representa un gen diferente. Se representan las amplificaciones como un punto negro Tipo de muestra: Tejido en naranja, plasma en rosa. MSI: carga mutacional. NSF: Non singleton families. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. Biopsy location: Localización de la biopsia: Blood: Plasma. Breast: Mama. Liver: Hígado. Lung: Pulmón. Nodes: Adenopatías. Pericardium: Pericardio. Skin: Piel. Skin breast: Letálides. Soft tissue: Tejidos blandos. Line of treatment: línea de tratamiento. Treatment groups: Grupo de tratamiento: Cleopatra group: taxano- trastuzumab-pertuzumab, HT: hormonoterapia, iCDK: inhibidor de ciclinas, Ipi3k_Akt: Inhibidor PI3K/AKT, QT: quimioterapia, SYD985: trastuzumab duocarmacina, TDM1: trastuzumab emtansina, TDXd: trastuzumab deruxtecan, TKI: Inhibidor tirosina quinasa, TZ: trastuzumab, TZ_HT: trastuzumab-hormonoterapia, TZ_iCDK: trastuzumab -inhibidor de ciclinas-hormonoterapia, TZ_QT: trastuzumab-quimioterapia, TZ_QT_HT: trastuzumab-quimioterapia-hormonoterapia.

Los resultados obtenidos respaldan la hipótesis de que las mutaciones serán concordantes entre el tejido tumoral y el ctDNA extraídos en un mismo tiempo para las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas, ya que es la variación genómica en que encuentra la mayor coincidencia con una media de un 78% genes compartidos. En el caso de las amplificaciones se encuentra una coincidencia moderada con 61% de genes compartidos. Sin embargo, para las VUS se encuentra que hay una variabilidad muy amplia entre las variantes encontradas entre las dos técnicas de secuenciación en tejido y plasma con una media de genes compartidos de 32%.

5.12. LAS ALTERACIONES GENÓMICAS DEL ADN PODRÁN SER DISCORDANTES ENTRE MUESTRAS DE ctDNA EXTRAÍDAS EN DISTINTAS LÍNEAS DE TRATAMIENTO.

Para testar esta hipótesis se ha valorado la diferencia entre las alteraciones genómicas encontradas en plasma con panel Guardant360 VHIO disponibles de cada paciente a medida que va recibiendo distintas líneas de tratamiento. Se tienen adicionalmente en

consideración el número de muestras disponibles de plasma analizadas con Guardant360 VHIO en cada una de las 39 pacientes incluidas. En la tabla 40 se detalla en número de biopsias líquidas analizadas disponibles por cada paciente.

Número de pacientes	
Número de biopsias líquidas, n (%)	N = 39 (%)
1	7 (18)
2	13 (33)
3	4 (10)
4	6 (15)
5	5 (13)
6	3 (7.7)
7	1 (2.6)

Tabla 40. Pacientes con biopsias líquidas analizadas

Se analiza para cada tipo de alteración genómica encontrada la variación a medida que se disponen de más muestras de cada paciente.

5.12.1. Mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas

Para todas las alteraciones de tipo mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas, no se encuentra una correlación estadísticamente significativa concordante con todos los tests de correlación aplicados, Pearson, Spearman y GLM entre las alteraciones genómicas encontradas en las pacientes dependiendo del número de muestras disponibles en cada una de ellas y líneas de tratamiento recibidas, excepto en las 13 pacientes de las que se dispone de 2 muestras (gráfico 34).

Para las pacientes de las que se dispone de 2 muestras los coeficientes de correlación oscilan entre 0.416 con el test de Spearman y 0.82 con el test normalizado de Pearson. En todos los casos se alcanza la significación estadística, con una asociación entre moderada y alta en el cambio de este tipo de alteraciones entre las 2 muestras disponibles por paciente. Sin embargo, para la paciente de la que se dispone de 7 muestras se encuentran coeficientes de correlación bajos que varían entre -0.217 y 0.117, que demuestran una débil correlación no estadísticamente significativa. De manera similar, los coeficientes de correlación son bajos e incluso negativos para el resto de pacientes con más de 2 muestras analizadas disponibles. Los resultados sugieren que a mayor número de muestras disponibles en las pacientes y sobre todo a partir de 3 muestras, es improbable detectar un aumento significativo en la emergencia de mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas.

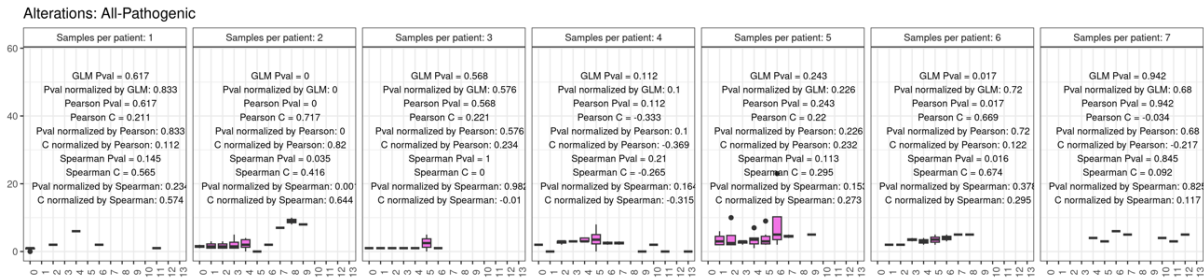


Gráfico 34. Representación de la correlación de la variación de alteraciones genómicas tipo mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas según el número de muestras disponibles por paciente a lo largo de las líneas de tratamiento recibidas.

5.12.2. Variantes de significado incierto (VUS)

Para todas las alteraciones de tipo VUS no se encuentra una correlación estadísticamente significativa concordante con todos los tests de correlación aplicados, Pearson, Spearman y GLM entre las alteraciones encontradas en las pacientes dependiendo del número de muestras disponibles en cada una de ellas y líneas de tratamiento recibidas (gráfico 35).

Para la paciente de la que se dispone de 7 muestras se encuentran coeficientes de correlación elevados que varían entre 0.512 y 0.876, pero según el test aplicado varía la significación estadística. De hecho, únicamente es estadísticamente significativo el normalizado por Pearson y GLM con coeficiente de correlación de 0.512 y una p 0.022 que sugiere que el número de alteraciones encontradas aumenta a medida que la paciente recibe más líneas de tratamiento.

Para las 3 pacientes de las que se dispone de 6 muestras los coeficientes de correlación son variables y se encuentran entre 0.069 y 0.731. Alcanzan significación estadística para el test de Spearman, Pearson con coeficientes de correlación elevados de 0.655 y 0.713 respectivamente. Los resultados sugieren que el número de alteraciones encontradas aumenta a medida que las pacientes reciben más líneas de tratamiento. A medida que se disponen de menos muestras de cada paciente, los coeficientes de correlación tienen tendencia a ser más bajos, indicando una débil asociación en los cambios que se producen en las variables genómicas a lo largo de las muestras disponibles en las distintas líneas y no alcanzan en ningún caso la significación estadística. Los resultados sugieren que a mayor número de muestras disponibles en las pacientes y sobre todo a partir de 6 muestras, es más probable detectar un aumento en la emergencia de mutaciones de tipo VUS.

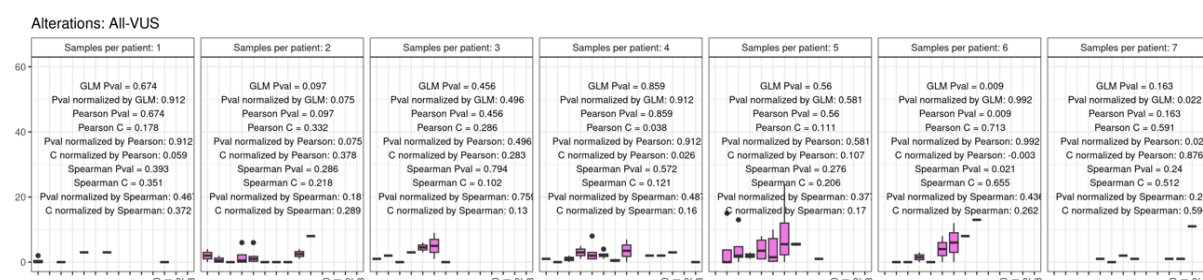


Gráfico 35. Representación de la correlación de la variación de alteraciones genómicas tipo VUS según el número de muestras disponibles por paciente a lo largo de las líneas de tratamiento recibidas.

5.12.3. Amplificaciones

Para todas las alteraciones de tipo amplificaciones, no se encuentra una correlación estadísticamente significativa concordante con todos los tests de correlación aplicados, Pearson, Spearman y GLM entre las alteraciones genómicas encontradas en las pacientes dependiendo del número de muestras disponibles en cada una de ellas y líneas de tratamiento recibidas (gráfico 36). Se aprecia una gran variabilidad en los coeficientes de correlación independientemente del número de muestras disponibles que en algunos casos son negativos, sugiriendo una gran variabilidad en este tipo de

alteraciones genómicas a lo largo de las distintas líneas de tratamiento que recibe una paciente.

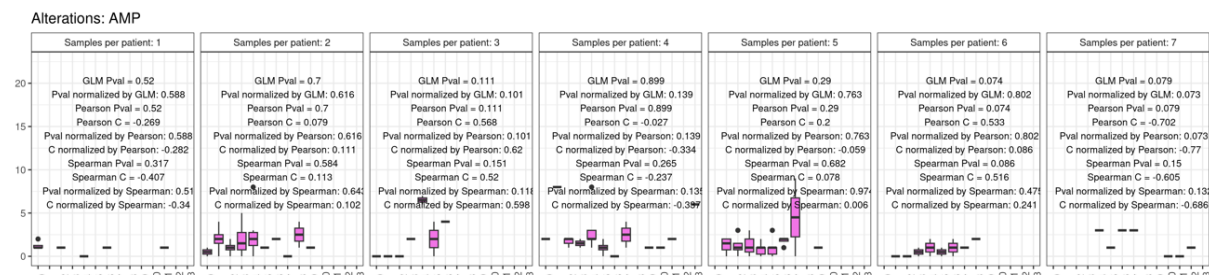


Gráfico 36. Representación de la correlación de la variación de alteraciones genómicas tipo amplificaciones según el número de muestras disponibles por paciente a lo largo de las líneas de tratamiento recibidas.

Para ilustrar las variaciones en las alteraciones genómicas encontradas a lo largo de las líneas de tratamiento, se expone el caso de la paciente 45, ya que es de la que se dispone de mayor número de muestras de biopsia líquida a lo largo de las diferentes líneas de tratamiento anti-HER2 recibidas (figura 25). Se trata de una paciente con diagnóstico inicial de CMM con perfil luminal B HER2 positivo con una IHQ 3+.

Recibe primera línea 1L con docetaxel asociado a doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab y posteriormente tras la QT se añade letrozol con una SLP de 9 meses, alcanzando RP. En 2L se hace retratamiento con el mismo esquema de 1L con tamoxifeno de mantenimiento con una SLP de 8 meses, alcanzando RP. En 3L recibe tratamiento con T-DM1 con SLP de 4 meses, con PE como mejor respuesta. En 4L recibe capecitabina asociado a lapatinib con una SLP < 3 meses, con PE como mejor respuesta. Acude a nuestro centro a la progresión. Se obtiene muestra basal de plasma y biopsia de tumor primario en progresión. Se analiza de manera contemporánea la muestra de tejido dentro del programa de prescreening VHIO con panel Amplicon VHIO. Se detectan mutaciones patogénicas en *GATA3*, *PIK3CA* y *TP53*. Adicionalmente se encuentran amplificaciones en *FGFR1* y *ERBB2*. En la muestra correspondiente pareada de plasma analizada retrospectivamente, se detectan todas las alteraciones previamente visualizadas en Amplicon VHIO, excepto la mutación en *GATA3*. Adicionalmente se encuentran en plasma una mutación patogénica en *KRAS*, una probablemente patogénica en *RHOA* y una VUS en *ERBB2*. Se detectan, además, alteraciones en el número de copias en forma de amplificaciones de *PIK3CA* y *CCND1* en plasma.

En 5L recibe tratamiento con trastuzumab asociado a eribulina en contexto de brazo control en ensayo clínico, con una SLP < 4 meses, pero alcanzando RP. Se extrae muestra de plasma tras la progresión. En esta muestra se mantienen las mutaciones en *PIK3CA*, *TP53* y *KRAS*, pero se pierde la VUS en *ERBB2*. Como en la muestra previa, se encuentra una mutación en *RHOA* clasificada como probablemente benigna. Se mantienen las amplificaciones en *ERBB2* y ganancia en *FGFR1* y no se detectan en *PIK3CA* y *CCND1*.

En 6L recibe trastuzumab y fulvestrant asociado a MEN1611, un inhibidor de PI3K en el contexto de ensayo clínico. Presenta una SLP de 3 meses alcanzando EE como mejor respuesta. Se obtiene muestra de plasma a la progresión. Los resultados obtenidos son similares a los de la muestra basal de plasma, se visualiza nuevamente la mutación en *RHOA* y la amplificación en *PIK3CA* y *CCND1*. Aparece una mutación emergente probablemente patogénica en *PTEN* y una VUS en *FGFR1*.

En 7L recibe Doxorubicina liposomal, ciclofosfamida y trastuzumab, con una SLP de 6 meses alcanzando RP. Se extrae muestra de plasma y biopsia de tejido de tumor

primario a la progresión. En la muestra pareada de tejido y plasma, se obtienen resultados similares en las variantes que se solapan entre el panel VHIO-300 y Guardant360 VHIO. Así, ambos detectan las mutaciones de *PIK3CA*, *TP53* y *PTEN*. En plasma y no en tejido, se detectan la mutación previamente identificada en *KRAS* y emerge de nuevo una VUS en *ERBB2*. Respecto a alteraciones en el número de copias, ambas técnicas las detectan en *ERBB2* y *FGFR1*. Sin embargo, las amplificaciones de *PIK3CA* y *CCND1* solo se encuentran en plasma. En tejido se encuentran alteraciones adicionales en genes que no se analizan en Guardant360 VHIO, aunque ninguna de ellas se corresponde con alguna mutación patogénica.

En 8L recibe trastuzumab y vinorelbina con una SLP de 1 mes, con PE como mejor respuesta. No se obtiene muestra a la progresión.

En 9L recibe paclitaxel, carboplatino y trastuzumab con una SLP < 4 meses con PE como mejor respuesta. No se obtiene muestra a la progresión.

En 10L recibe trastuzumab deruxtecan en el contexto de uso compasivo, con una SLP de 10 meses alcanzando RP. Se extrae muestra de plasma a la progresión. En esta biopsia líquida se encuentran menos alteraciones que en la extraída tras la 7L. Se mantienen las mutaciones patogénicas en *PIK3CA*, *KRAS* y probablemente patogénica en *TP53*, así como la VUS en *ERBB2*. Se deja de detectar la mutación en *PTEN*. Se dejan de visualizar, además, las amplificaciones en *ERBB2*, *PIK3CA* y *CCND1*, aunque se mantiene la ganancia en *FGFR1*.

En 11L recibe trastuzumab duocarmacina (SYD985) en contexto de ensayo clínico con una SLP de 2 meses. Se extrae muestra de plasma a la progresión. En esta muestra, con respecto a la anterior, no aparece ninguna variante emergente, más bien al contrario, ya que no se detecta la mutación patogénica en *KRAS*. Sigue sin detectarse amplificación de *ERBB2*.

En 12L recibe docetaxel y gemcitabina con una SLP < 4 meses y PE como mejor respuesta. Se extrae muestra de plasma a la PD. En esta última muestra extraída, se siguen detectando como en todas las anteriores las mutaciones en *PIK3CA* y *TP53*. Nuevamente emerge la amplificación de *PIK3CA*. Como nuevas variantes, se aprecian 3 mutaciones en *ERBB2*, una VUS, una patogénica y una probablemente patogénica, aunque sigue sin detectarse amplificación. En el gen *ATM*, se detecta una doble mutación probablemente patogénica y una VUS. Emergen VUS en diversos genes en los que no había habido previamente alteraciones detectables en las biopsias previas. Estos genes alterados son *APC*, *BRAF*, *BRCA2*, *CDK6*, *KIT* y *MET*.

Tras la 12L la paciente es éxito con una SG desde el inicio de la primera línea de 62 meses, mayor de 5 años. Este caso ilustra la variabilidad que podemos encontrar en una misma paciente en los resultados de biopsia líquida a lo largo de las diferentes líneas de tratamiento. Hay alteraciones genómicas que se visualizaban previamente que se vuelven indetectables temporalmente, otras permanecen indetectables, algunas se mantienen estables a lo largo de todos los tratamientos, mientras que también se aprecia la emergencia de nuevas alteraciones sobre todo tras la última línea de tratamiento. Asimismo, podemos apreciar la posible variabilidad en los resultados en las biopsias pareadas analizadas en esta paciente.

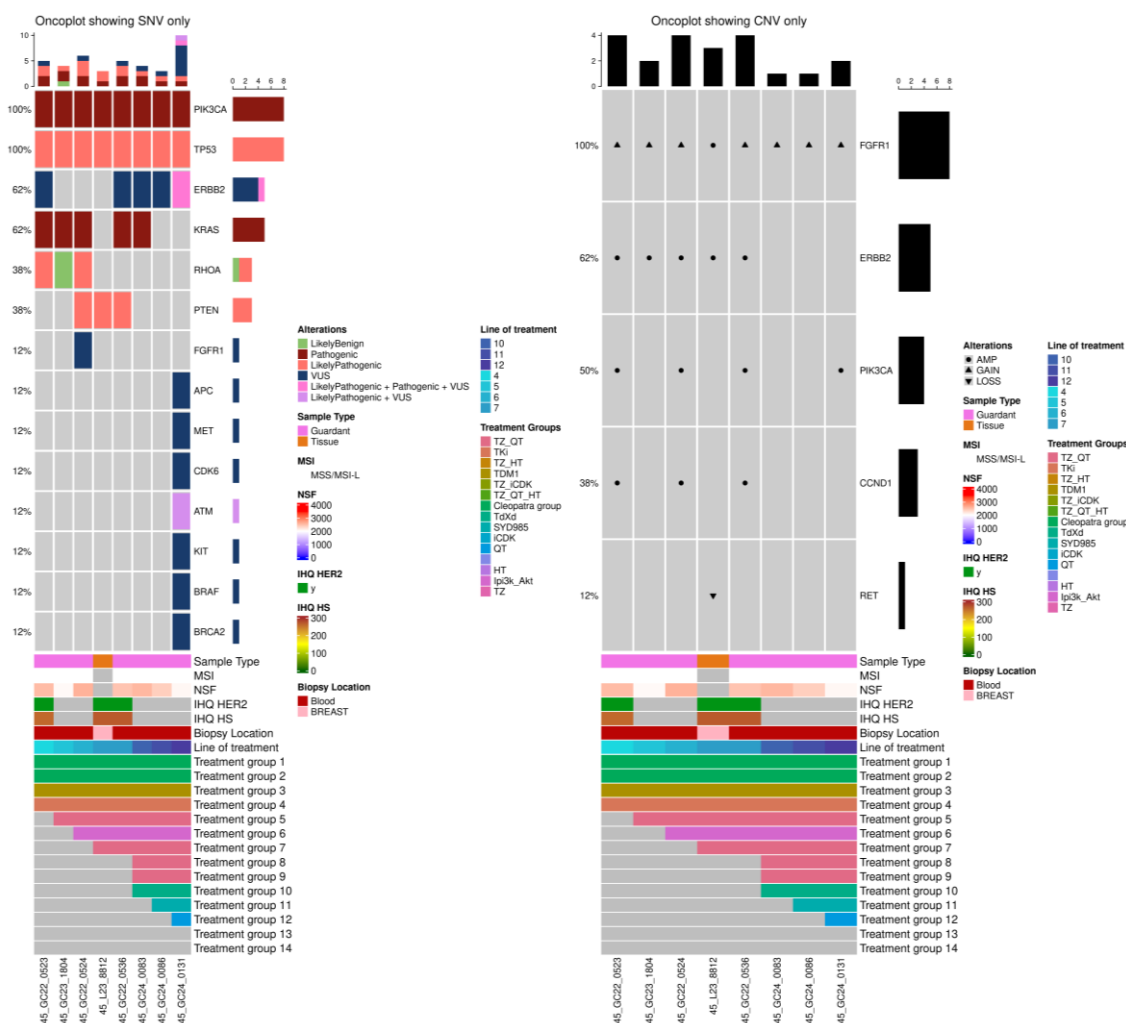


Figura 25. OncoPrint con las alteraciones genómicas encontradas en la paciente 45 en las muestras analizadas con panel VHIO-300 y Guardant360 VHIO. Se representan las alteraciones genómicas probablemente benignas en verde, VUS en azul oscuro, mutaciones patogénicas en granate, probablemente patogénicas en salmón, probablemente patogénicas y VUS en lila, probablemente patogénicas y VUS en rosa. Punto negro: amplificación, triángulo con vértice arriba: ganancia, triángulo con vértice abajo: pérdida. Tipo de muestra: Tejido en naranja, plasma en rosa. MSI: carga mutacional. NSF: Non singleton families. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. Biopsy location: Localización de la biopsia: Blood: Plasma. Breast: Mama.

De acuerdo con los resultados obtenidos, para las mutaciones de tipo VUS se han apreciado diferencias significativas en las pacientes de las que se disponía de mayor número de muestras. Sin embargo, para las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas las diferencias se han encontrado en las pacientes con 2 muestras disponibles, las cuales son las más representadas. Para las amplificaciones no se ha encontrado correlación en ningún caso. Así, los resultados obtenidos al evaluar la hipótesis de que las alteraciones genómicas detectadas serán discordantes en las distintas líneas de tratamiento anti-HER2 recibido por las pacientes han sido variables según el tipo de alteración genómica evaluada.

5.13. LA DETERMINACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE *ERBB2* EN ctDNA SERÁ FACTIBLE COMO PREDICTOR DE BENEFICIO A TRATAMIENTO ANTI-HER2.

Los métodos convencionales de IHQ e ISH son los únicos que están validados para determinar la positividad de HER2 y definir las pacientes con potencial beneficio a las terapias anti-HER2.¹⁰ Esta hipótesis valora la posibilidad de que la amplificación de *ERBB2* determinada mediante NGS en plasma con panel Guardant360 VHIO o en tejido con panel VHIO-300 sea predictora de beneficio a tratamiento anti-HER2.

5.13.1. Amplificación gen *ERBB2* vs no amplificación en plasma

Para testar esta hipótesis se valora si las pacientes cuyas muestras analizadas con el test de Guardant360 VHIO no tienen amplificación de *ERBB2* detectada en ctDNA, tienen peor tiempo a la progresión (TTP) ajustada a línea de tratamiento que las que sí que la presentan.

Al comparar el TTP que presentan las pacientes cuyas muestras presentan amplificación de *ERBB2* en el test de Guardant360 VHIO con la que no la presentan y tras ajustar por línea de tratamiento anti-HER2 recibida, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con el test de Wilcoxon con una $p=0.37$ (gráfico 37). Por tanto, en nuestra muestra de pacientes, no se encuentra correlación entre la PFS y la amplificación de *ERBB2* en plasma ajustada por línea de tratamiento anti-HER2 recibido por las pacientes.

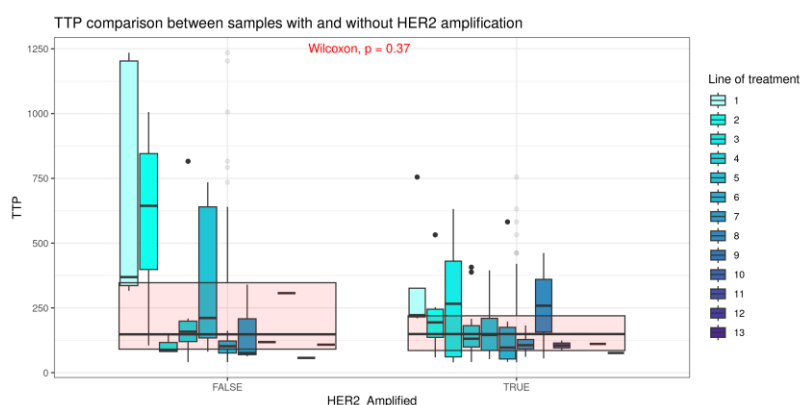


Gráfico 37. Diagrama de cajas representando la comparación de TTP entre pacientes cuyas muestras presentan amplificación de *ERBB2* por Guardant360 VHIO con las que no la presentan ajustado a línea de tratamiento anti-HER2. TTP: Tiempo a la progresión. *HER2_Amplified*: gen *ERBB2* amplificado. False: No amplificado. True: Sí amplificado. Número de copias de HER2. Line of treatment: Línea de tratamiento.

5.13.2. Número de copias del gen *ERBB2* en plasma

Para testar esta hipótesis se valora si las pacientes cuyas muestras analizadas con el test de Guardant360 VHIO presentan un menor número de copias del gen *ERBB2* detectadas en ctDNA, tienen peor TTP ajustada a línea de tratamiento anti-HER2 que las que sí que la presentan.

Al comparar la TTP que presentan las pacientes teniendo en cuenta el número total de copias del gen *ERBB2* encontrado en cada muestra analizada con el test de Guardant360 VHIO y tras ajustar por línea de tratamiento anti-HER2 recibida, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con el test de Wilcoxon

con una $p=0.822$ (gráfico 38). Por tanto, en nuestra muestra de pacientes, no se encuentra correlación entre el número de copias en plasma y la TTP ajustada por línea de tratamiento anti-HER2 recibido por las pacientes.

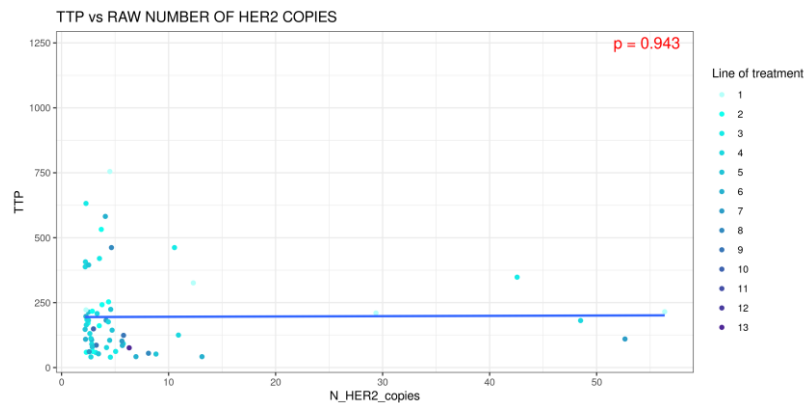


Gráfico 38. Diagrama de dispersión representando la comparación de TTP según el número de copias del gen *ERBB2* encontradas en cada muestra analizada por Guardant360 VHIO ajustado a línea de tratamiento anti-HER2. TTP: Tiempo a la progresión. N_HER2_copies: Número de copias de HER2. Line of treatment: Línea de tratamiento.

5.13.3. Amplificación gen *ERBB2* vs no amplificación en tejido

Para testar esta hipótesis se valora si las pacientes cuyas muestras analizadas con el test de panel VHIO-300 no tienen amplificación de *ERBB2* detectada en tejido, tienen peor TTP ajustada a línea o a tipo de tratamiento que las que sí que la presentan.

Al comparar la TTP que presentan las pacientes cuyas muestras presentan amplificación de *ERBB2* en el test de panel VHIO-300 con la que no la presentan y tras ajustar por línea de tratamiento anti-HER2 recibida, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con el test de Wilcoxon con una $p=0.61$ (gráfico 39). Por tanto, en nuestra muestra de pacientes, no se encuentra correlación entre la PFS y la amplificación de *ERBB2* ajustada por línea de tratamiento anti-HER2 recibido por las pacientes.

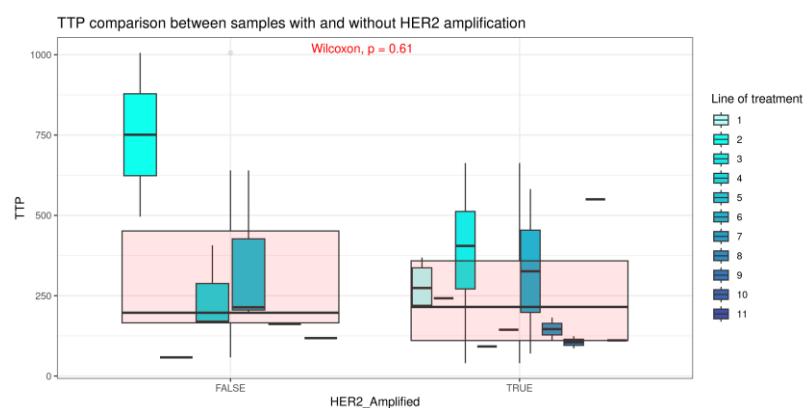


Gráfico 39. Diagrama de cajas representando la comparación de TTP entre pacientes cuyas muestras presentan amplificación de *ERBB2* por panel VHIO-300 con las que no la presentan ajustado a línea de tratamiento anti-HER2. TTP: Tiempo a la progresión. HER2_Amplified: gen *ERBB2* amplificado. False: No amplificado. True: Sí amplificado. Número de copias de HER2. Line of treatment: Línea de tratamiento.

5.13.4. Número de copias del gen *ERBB2* en tejido

Para testar esta hipótesis se valora si las pacientes cuyas muestras analizadas con el test de panel VHIO-300 presentan un menor número de copias del gen *ERBB2* detectadas en tejido, tienen peor TTP ajustada a línea de tratamiento anti-HER2 que las que sí que la presentan.

Al comparar la TTP que presentan las pacientes teniendo en cuenta el número total de copias del gen *ERBB2* encontrado en cada muestra analizada con el test de panel VHIO-300 y tras ajustar por línea de tratamiento anti-HER2 recibida, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con el test de Wilcoxon con una $p=0.757$ (gráfico 40). Por tanto, en nuestra muestra de pacientes, no se encuentra correlación entre el número de copias y la TTP ajustada por línea de tratamiento anti-HER2 recibido por las pacientes.

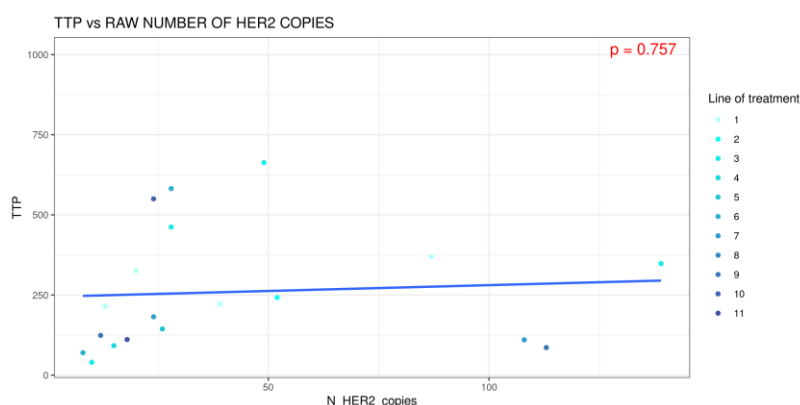


Gráfico 40. Diagrama de dispersión representando la comparación de TTP según el número de copias del gen *ERBB2* encontradas en cada muestra analizada por panel VHIO-300 ajustado a línea de tratamiento anti-HER2. TTP: Tiempo a la progresión. N_HER2_copies: Número de copias de HER2. Line of treatment: Línea de tratamiento.

Según los resultados obtenidos, no se evidencia que la amplificación de *ERBB2* se correlacione con beneficio a tratamiento anti-HER2. Los resultados no han sido estadísticamente significativos por ninguna de las técnicas de valoración de la amplificación por NGS, ya sea en tejido o en plasma.

5.14. LA AMPLIFICACIÓN DE *ERBB2* PODRÁ SER DISCORDANTE ENTRE TEJIDO TUMORAL Y ctDNA.

En las muestras de tejido disponibles de las pacientes incluidas se ha determinado HER2 por técnicas convencionales de IHQ e ISH y se ha determinado el H-Score de HER2. Asimismo, se ha valorado en tejido mediante panel VHIO-300 y en plasma mediante Guardant360 VHIO la amplificación y número de copias de *ERBB2*. Se trata de muestras pareadas, es decir, recogidas en un mismo momento en cada paciente antes del inicio de una línea de tratamiento. Se establece la hipótesis de que la amplificación de HER2 podría ser discordante entre tejido tumoral y ctDNA. Para testarla, se valora la concordancia entre todas las técnicas disponibles para determinar la amplificación de *ERBB2*.

5.14.1. Correlación entre amplificación de *ERBB2* en tejido por Panel VHIO-300 comparado con Guardant360 VHIO en plasma

La amplificación de *ERBB2* se ha valorado por técnicas genómicas en 42 muestras pareadas de tejido y plasma mediante panel VHIO-300 y panel Guardant360 VHIO respectivamente (tabla 41). Se ha encontrado concordancia en la amplificación, estando presente tanto en tejido como en plasma en 23 muestras. Hay concordancia en la no amplificación ni en tejido ni en plasma en 7 muestras. Se han encontrado 4 muestras discordantes en las que hay amplificación de *ERBB2* en plasma, pero no en tejido. Hay 8 muestras en las que la amplificación se encuentra en tejido, pero no en plasma. Encontramos una correlación estadísticamente significativa con el test de Fisher con una $p=0.0343$, aunque con el test de Chi cuadrado no llega a la significación estadística con una $p=0.0596$. El coeficiente Phi de 0.3442 es sugestivo de que la asociación entre las dos técnicas sería moderada ya que hay discordancia en 12 muestras de las 42 testadas. Por tanto, hay que considerar que probablemente existe una correlación moderada entre ambas técnicas de detección de *ERBB2* por NGS, aunque en un número no despreciable de muestras (29%) se encuentran discrepancias.

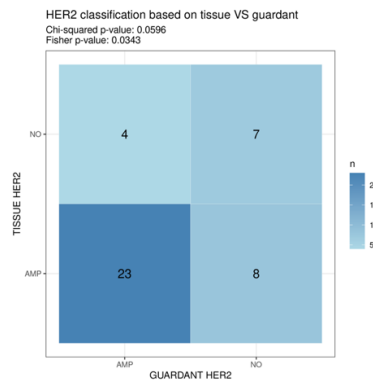


Tabla 41. Tabla de contingencia para la amplificación de HER2 testada el tejido con panel VHIO-300 comparado con la amplificación en plasma testada con Guardant360 VHIO. Tissue HER2: Muestras de tejido testadas con panel VHIO-300 para la amplificación en *ERBB2*. Guardant HER2: Muestras de plasma testadas con Guardant360 VHIO para la amplificación en *ERBB2*. AMP: Muestra amplificada. NO: Muestra no amplificada. n=número de muestras.

Se valora la correlación considerando el número de copias detectado para el gen *ERBB2* en cada una de las técnicas de NGS aplicadas en las muestras pareadas de tejido y plasma. Se encuentra que existe una asociación estadísticamente significativa entre ambas con una $p=0.255$ (gráfico 41). Por tanto, si consideramos con ambas técnicas el número de copias de *ERBB2* como una variable numérica continua sin considerar si cumplía o no criterios de amplificación, encontramos una correlación significativa.

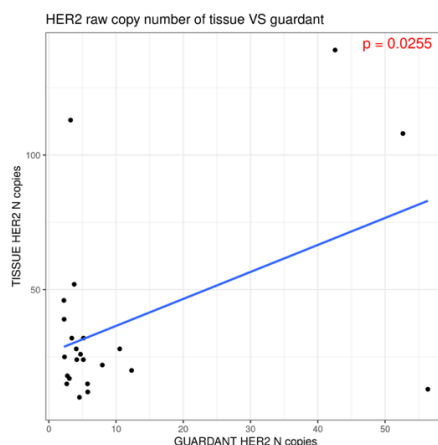


Gráfico 41. Gráfico de correlación del número de copias de *ERBB2* en muestras pareadas de tejido y plasma analizadas por panel VHIO-300 y Guardant360. HER2 raw copy number of tissue: Número de copias bruto de HER2 en tejido. Tissue HER2 n copies: Número de copias de *ERBB2* en tejido. Guardant HER2 n Copies: Número de copias de *ERBB2* en plasma.

5.14.2. Correlación entre amplificación de *ERBB2* en tejido por Panel VHIO-300 comparado con IHQ/ISH

La amplificación de *ERBB2* se ha valorado por técnicas genómicas en 42 muestras de tejido mediante panel VHIO-300. En las mismas muestras se ha determinado HER2 mediante técnicas validadas de IHQ/ISH siguiendo las guías ASCO/CAP (tabla 42).¹⁰ Se ha encontrado concordancia en la amplificación estando presente por ambas técnicas, en 28 muestras. Hay concordancia en la no amplificación en 7 muestras. Se han encontrado 3 muestras discordantes en las que hay amplificación de *ERBB2* (HER2) mediante técnicas genómicas, pero no en las convencionales. Hay 4 muestras en las que la amplificación se encuentra por IHQ/ISH, pero no por panel VHIO-300. Encontramos una correlación estadísticamente significativa tanto con el test de Fisher con una $p=0.00138$, como con el test de Chi cuadrado con una $p=0.00106$. El coeficiente Phi de 0.5615 es sugestivo de que existe una moderada-fuerte asociación entre las dos técnicas para valorar HER2. Por tanto, en la valoración de la amplificación de *ERBB2* mediante NGS por panel VHIO-300 comparada con la determinación de HER2 mediante NGS en las mismas muestras, el nivel de concordancia es alto y significativo. No obstante, no son totalmente superponibles, ya que un 17% de muestras discordantes.

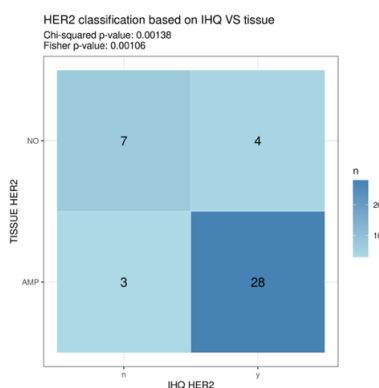


Tabla 42. Tabla de contingencia para la amplificación de HER2 testada el tejido con panel VHIO-300 comparado con la determinación de HER2 por técnicas convencionales de IHQ/ISH. Tissue HER2: Muestras de tejido testadas con panel VHIO-300 para la amplificación en ERBB2. IHQ HER2: Muestras de tejido testadas con IHQ/ISH según guías ASCO/CAP para la amplificación en ERBB2. AMP: Muestra amplificada. NO: Muestra no amplificada. n: No. y: Sí. N: número de muestras.

5.14.3. Correlación entre la determinación de HER2 en tejido por H-Score con la amplificación de *ERBB2* por panel VHIO-300

Se establece la asociación en la misma muestra de tejido entre la variable H-Score de la IHQ de HER2 como variable continua para la determinación de HER2 y la amplificación de *ERBB2* por el panel VHIO-300. Se encuentra con el test de Wilcoxon que hay una correlación estadísticamente significativa entre ambas técnicas con una $p= 0.0002$ (gráfico 42). Por tanto, encontramos que a mayor H-score que presenta cada muestra hay más muestras consideradas como *ERBB2* amplificado por NGS en la misma muestra de tejido.

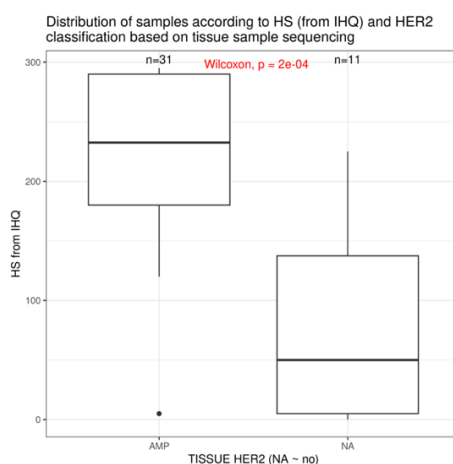


Gráfico 42. Diagrama de cajas de correlación entre H-Score y la amplificación de *ERBB2* en las mismas muestras de tejido por panel VHIO-300. HS from IHQ: Valor de H-score a partir de IHQ. Tissue HER2: Valor de amplificación *ERBB2* por panel VHIO-300. AMP: Amplificado. NA: No amplificado.

Se establece, además, la correlación entre el H-score de HER2 y el número de copias de *ERBB2* obtenido en la misma muestra de tejido analizada con panel VHIO-300. No se aprecia una correlación estadísticamente significativa entre ambas con $p=0.0957$ (gráfico 43). Por tanto, al comparar en número de copias bruto obtenido en el análisis de NGS en la muestra de tejido como una variable continua con el H-Score como variable continua de la IHQ de HER2 no se establece que exista correlación entre ambas.

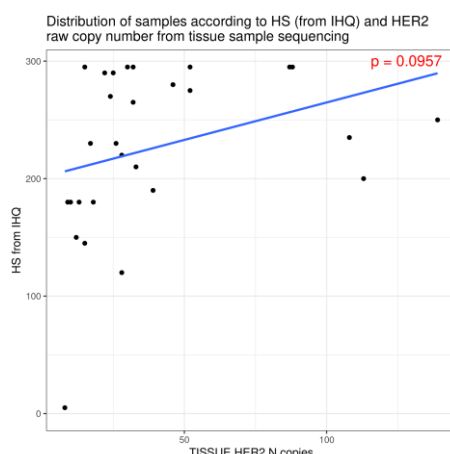


Gráfico 43. Gráfico de dispersión de correlación entre H-Score y el número de copias de *ERBB2* en las mismas muestras de tejido por panel VHIO-300. Distribution of samples according to HS (from IHQ) and HER2 raw copy number from tissue sample sequencing: Distribución de las muestras según el HS (de IHQ) y el número de copias en bruto de HER2 a partir de la secuenciación de muestras de tejido. HS from IHQ: H-score de IHQ. Tissue HER2 n copies: Número de copias brutas de *ERBB2* en tejido por panel VHIO-300.

5.14.4. Correlación entre la determinación de HER2 en tejido por IHQ/ISH con la amplificación de *ERBB2* por Guardant360 VHIO

La amplificación de *ERBB2* se ha valorado en 42 muestras pareadas de tejido y plasma mediante panel Guardant360 VHIO en plasma y con técnicas convencionales de IHQ/ISH en tejido respectivamente (tabla 43). Se ha encontrado concordancia en la amplificación, estando presente tanto en tejido como en plasma en 22 muestras. Hay concordancia en la no amplificación ni en tejido ni en plasma en 5 muestras. Se han encontrado 5 muestras discordantes en las que hay amplificación de *ERBB2* (HER2) en plasma, pero no en tejido. Hay 10 muestras en las que la amplificación se encuentra en tejido, pero no en plasma. Encontramos que no existe una correlación estadísticamente significativa para las dos técnicas ni con el test de Fisher con una $p=0.451$, ni con el test de Chi cuadrado con una $p=0.483$. El coeficiente Phi de 0.1317 confirma la débil asociación entre las dos técnicas. Por tanto, se encuentra una ausencia de concordancia significativa entre la amplificación de *ERBB2* determinada en biopsia líquida por NSG comparada con el resultado obtenido para HER2 con IHQ/ISH ya que hay discordancia en el 36% de las muestras testadas.

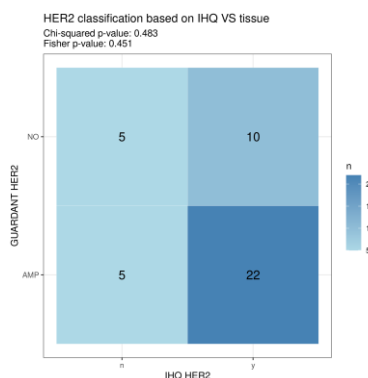


Tabla 43. Tabla de contingencia para la amplificación de HER2 testada el tejido con panel Guardant360 VHIO comparado con la determinación de HER2 por técnicas convencionales de IHQ/ISH. Guardant HER2: Muestras de tejido testadas con Guardant360 VHIO para la amplificación en *ERBB2*. IHQ HER2: Muestras de tejido testadas con IHQ/ISH

según guías ASCO/CAP para la amplificación en ERBB2. AMP: Muestra amplificada. NO: Muestra no amplificada. n:No. y: Sí. N:número de muestras.

5.14.5. Correlación entre la determinación de HER2 en tejido por H-Score con la amplificación de *ERBB2* por Guardant360 VHIO en plasma

Se establece la asociación en las muestras pareadas de tejido y plasma entre la variable H-Score de la IHQ de HER2 como variable continua para la determinación de HER2 en tejido y la amplificación de *ERBB2* por el Guardant360 VHIO en plasma. Se encuentra con el test de Wilcoxon que no hay una correlación estadísticamente significativa entre ambas técnicas con una $p = 0.088$ (gráfico 44). Por tanto, no encontramos que a mayor H-score que presente una muestra de tejido sea más probable que se considere amplificación de *ERBB2* por NGS en plasma.

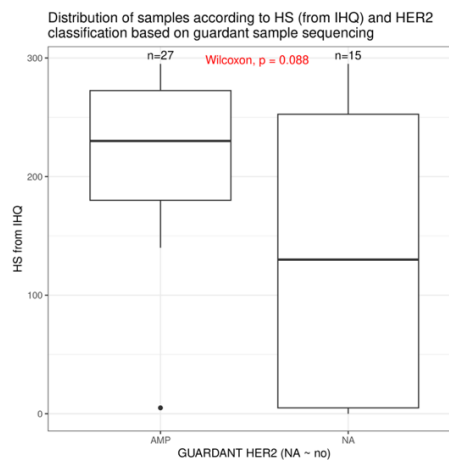


Gráfico 44. Diagrama de cajas de correlación entre H-Score en tejido y la amplificación de *ERBB2* por Guardant360 VHIO en plasma en muestras pareadas. Distribution of samples according to HS (from IHQ) and HER2 classification based on guardant sample sequencing: Distribución de las muestras según el HS (de IHQ) y el número de copias en bruto de HER2 a partir de la secuenciación de muestras de tejido. HS from IHQ: H-score de IHQ. Guardant HER2: Valor de amplificación *ERBB2* por Guardant360 VHIO. AMP: Amplificado. NA: No amplificado.

Asimismo, se valora la correlación entre el H-score de HER2 y el número de copias de *ERBB2* obtenido en la muestra pareada correspondiente de plasma analizada con Guardant360 VHIO. No se aprecia una correlación estadísticamente significativa entre ambas con $p=0.95$ (gráfico 45). Por tanto, al comparar en número de copias bruto obtenido en el análisis de NGS en la muestra de plasma como una variable continua con el H-Score como variable continua de la IHQ de HER2 no se establece que exista correlación entre ambas.

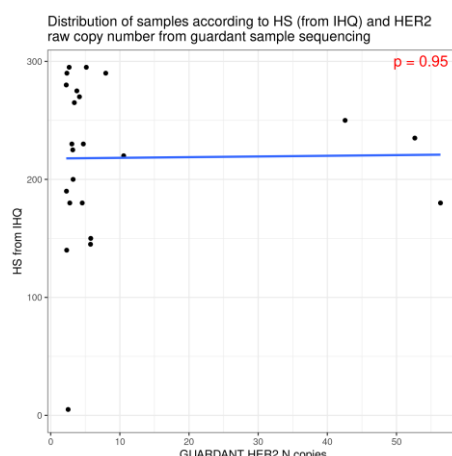


Gráfico 45. Gráfico de dispersión de correlación entre H-Score en tejido y el número de copias de ERBB2 por Guardant360 VHIO en plasma en muestras pareadas. Distribution of samples according to HS (from IHQ) and HER2 raw copy number from guardant sample sequencing: Distribución de las muestras según el HS (de IHQ) y el número de copias bruto de HER2 a partir de la secuenciación de muestras por Guardant. HS from IHQ: H-score de IHQ. Guardant HER2 N copies: Número de copias brutas de ERBB2 por Guardant360.

Los resultados obtenidos al comparar la amplificación de *ERBB2* en tejido y plasma por las distintas técnicas de NGS, apoyan la hipótesis de que pueda ser discordante en las muestras pareadas. La significación estadística no ha sido consistente en los dos modelos de correlación aplicados y se ha encontrado un número significativo de muestras con resultados diferentes entre panel VHIO-300 y Guardant360. Sin embargo, la concordancia entre la amplificación de *ERBB2* determinada por NGS y por técnicas convencionales en las mismas muestras de tejido ha mostrado una mayor concordancia con significación estadística.

5.15. LA GENERACIÓN DE MODELOS DE PDX DERIVADOS DE TUMOR PUEDE SER INFORMATIVA PARA ESTUDIOS DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS ANTI-HER2

En las pacientes que consienten para destinar parte de las biopsias tumorales que se realizan por motivos asistenciales, se explora la rentabilidad de generación de modelos murinos derivados de tumor (*Patient Derived Xenographs*: PDX) a partir de sus biopsias. Adicionalmente, se planifica explorar la consolidación del estudio de resistencias terapéuticas en estos modelos en los casos en que se hayan obtenido modelos viables de PDX y valorar en ellos la concordancia de la respuesta obtenida a las mismas terapias recibidas por las pacientes y los PDX de cuyos tumores deriven.

Para testar esta hipótesis se tienen en consideración las 107 pacientes incluidas consecutivamente desde el inicio en el proyecto, no solamente las 39 pacientes de las que proceden las muestras pareadas.

Se obtienen 49 biopsias procedentes de tumores de pacientes incluidas en el proyecto y que acceden a donar material para implantar en PDX. De las biopsias obtenidas, hay 21 (43%) que proceden de una biopsia pareada analizada para el proyecto y 28 (57%) de otras biopsias no analizadas. Hay 28 pacientes de las que se ha implantado una biopsia, 3 pacientes de las que se han implantado 2 biopsias y 5 pacientes de las que se implantan 3 biopsias en PDX en momentos diferentes. 14 (29%) de las muestras proceden de

pacientes cuyos tumores tenían un fenotipo luminal B HER2 positivo, mientras que las 35 (71%) restantes provenían de tumores HER2 positivos no luminales.

De las 49 biopsias implantadas hay 36 (73.5%) que no son viables y 13 (26.5%) que sí lo son y dan lugar a la generación de PDX (gráfico 46). En las biopsias procedentes del fenotipo luminal B HER2 positivo el éxito de implantación fue en 2 (16%) de 14, mientras que en las no luminales fueron viables 11 (31%) de las 35 implantadas.

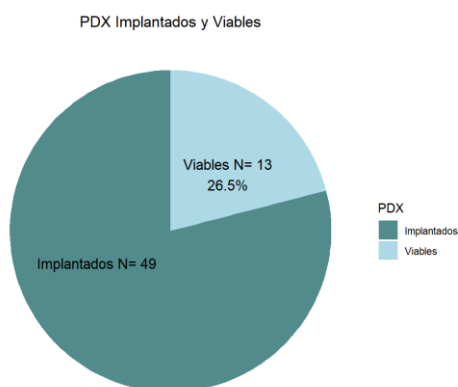


Gráfico 46. Gráfico de sectores con proporción en la viabilidad de modelos de PDX implantados

De forma generalizada, no se realizan experimentos específicos para testar la sensibilidad de los PDX a los mismos tratamientos que han recibido las pacientes. Por este motivo no se estudia la concordancia en las respuestas obtenidas en las pacientes comparadas con los PDX. Por tanto, tampoco es posible comparar y estudiar posibles mecanismos de resistencia coincidentes entre las pacientes y los PDX.

Se utiliza como ejemplo un caso en el que un PDX fue sometido al mismo tratamiento con el ADC trastuzumab duocarmacina (SYD985) que había recibido una paciente incluida en el proyecto de muestras pareadas.

5.15.1. Concordancia de respuesta obtenida por PDX tratado con el mismo tratamiento que la paciente de la que proviene

Como ejemplo de la concordancia entre la respuesta obtenida por un PDX se valora el caso de la paciente 28. Se implantaron biopsias procedentes de letálides cutáneas de la paciente para generación de PDX en 3 ocasiones. En todas ellas se obtuvieron PDX viables. En un proyecto paralelo se trató uno de los PDX generados con 2 ADCs de nueva generación diferentes. Uno de ellos era SYD985, el otro TDXd.

La paciente tenía diagnóstico de CMM HER2 positivo no luminal de alto grado con IHQ 3+ para HER2 con enfermedad local en mama con letálides y afectación adenopática. Había recibido tratamiento con paclitaxel y trastuzumab en primera línea (1L) con un TTP menor de 3 meses, T-DM1 en 2L con un TTP de 8 meses, trastuzumab vinorelbina en 3L con TTP menor de 2 meses. Se extrajo entonces la primera muestra para PDX de la que se obtuvo un modelo viable (PDX28-1). Posteriormente, participó en EC TULIP donde recibió SYD985 en 4L con TTP de 6 meses alcanzando una RC. Siguió 5L con capecitabina lapatinib con TTP menor de 5 meses. Se extrajo entonces la segunda

muestra para PDX de la que se obtuvo un modelo viable (PDX28-2). Dado que la paciente presentaba mutación en *PIK3CA*, en 6L recibió el inhibidor de PI3K MEN1611 asociado a trastuzumab dentro de EC B-PRECISE-01 con TTP de 6 semanas.³³¹ Se extrajo a la progresión la tercera muestra para PDX de la que se obtuvo un modelo viable (PDX28-3). En 7L recibió doxorubicina liposomal, ciclofosfamida y trastuzumab con TTP de 3 meses. En 8L recibió tratamiento con capecitabina y neratinib con TTP de dos meses.

EL último PDX generado de la paciente tras la 6L fue tratado con SYD985 y TDXd.

SYD985:

En el gráfico 47, podemos apreciar el resultado en el PDX28-3 del tratamiento con SYD985. Es importante considerar que este modelo de PDX no era el primero que se había generado a partir del tumor de la paciente previamente a iniciar tratamiento con SYD985. Se trataba de un PDX que había sido implantado a partir de una biopsia tomada cuando la paciente ya había sido previamente tratada con SYD985. Adicionalmente, además de progresar a este ADC de segunda generación, había progresado a otras dos líneas de tratamiento más que habían incluido un TKI y un tratamiento contra *PIK3CA* que era una diana potencialmente atacable que presentaba su tumor, con el inhibidor de PI3K, MEN1611.

En este caso, lo esperable es que se tratara de un modelo con resistencia primaria a SYD985, ya que provenía de una paciente que había presentado una respuesta inicial al tratamiento y posteriormente había progresado probablemente por la generación de una resistencia secundaria. De forma imprevista, se aprecia que este PDX28-3 presentó un incremento inicial en el volumen tumoral, pero posteriormente alcanza una reducción completa del volumen tumoral que dura unos 35 días, para posteriormente aumentar dicho volumen de manera progresiva.

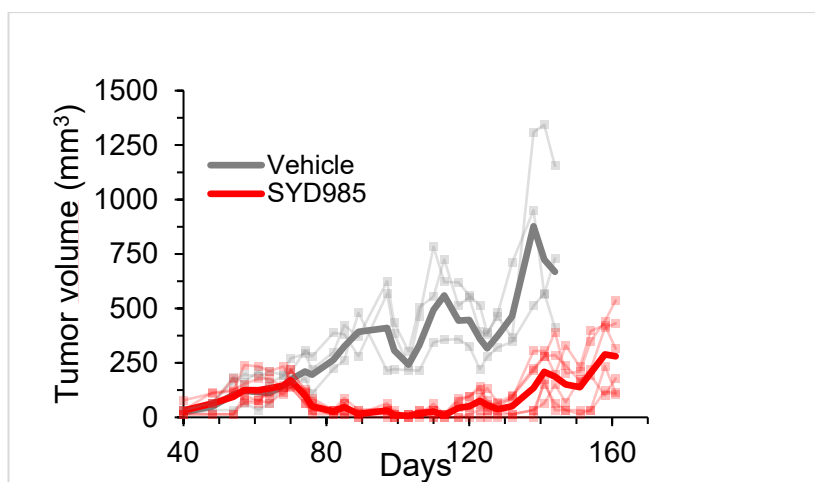


Gráfico 47. Gráfico de líneas de PDX procedente de la paciente 28 tratado con SYD985 frente a un vehículo.

T-DXd

Respecto a T-DXd, la paciente no recibió este tratamiento porque no estuvo disponible en el contexto de ensayo clínico o uso compasivo, ya que entonces era un fármaco aún en investigación no aprobado. No obstante, en el gráfico 48 podemos observar como el

PDX28-3 mostro una sensibilidad parcial al tratamiento comparado con vehículo en un modelo multirresistente. De hecho, sorprendentemente, la reducción del volumen tumoral fue inferior a la obtenida con SYD985. Sin embargo, es importante considerar que el PDX procedía de una paciente cuyo tumor había progresado en la mayoría de los casos con TTP más cortos de la media esperada de SLP a todas las terapias anti-HER2 pudiendo influir en estos resultados.

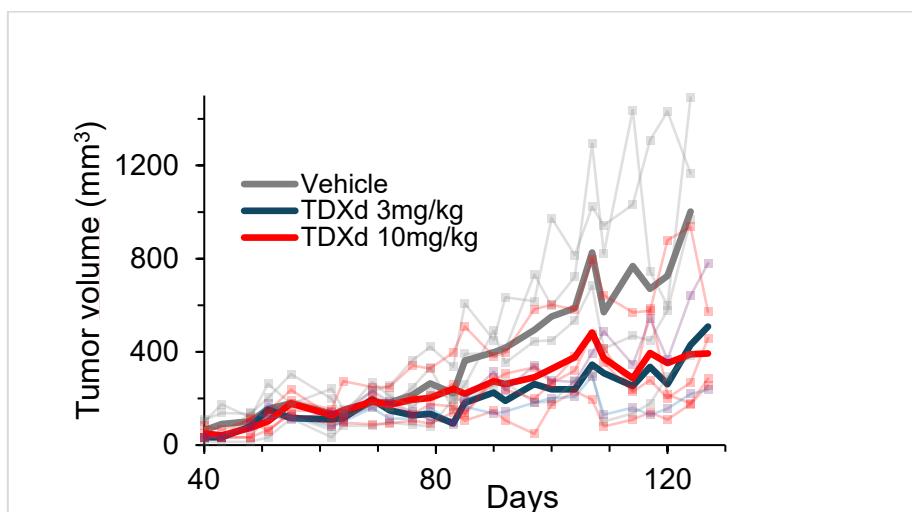


Gráfico 48. Gráfico de líneas de PDX procedente de la paciente 28 tratado con T-DXd a 2 dosis diferentes frente a un vehículo.

Por tanto, al menos en esta paciente, no se confirma la concordancia entre los resultados obtenidos con el mismo tratamiento en la paciente y el PDX derivado de su tumor. Es cierto que tanto la paciente como el PDX presentaron una respuesta completa al tratamiento con SYD985. Sin embargo, es importante considerar que el PDX28-3 tratado procedía de una muestra recogida de la paciente a la progresión no solo de SYD985, sino también de lapatinib y un inhibidor de PI3K.

Los resultados obtenidos validan la hipótesis de que se generarán modelos de PDX derivados del tumor con una tasa de éxito del 26.5%. Sin embargo, no ha sido posible estudiar las resistencias terapéuticas en estos modelos en comparación con las de los pacientes que derivan. Solamente en una paciente, se ha valorado la concordancia entre la respuesta obtenida al mismo tratamiento por el PDX derivado de su tumor. En este caso, no hubo concordancia en la respuesta esperada con SYD985. El PDX28-3 había sido generado a partir de una biopsia obtenida cuando la paciente había progresado a tratamiento y sin embargo se obtuvo respuesta en el PDX.

6. DISCUSIÓN

6.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES

Para el proyecto de búsqueda de mecanismos de resistencia a tratamiento dirigido en cáncer de mama HER2 positivo metastásico, se han incluido 107 pacientes. Todas ellas con diagnóstico de cáncer de mama metastásico (CMM) HER2 positivo en tratamiento con terapias anti-HER2 en el momento de la inclusión. Las pacientes se podían incluir en cualquier línea de tratamiento anti-HER2. Por este motivo, hay heterogeneidad en cuanto a la línea de tratamiento en la que las pacientes entran al estudio y respecto a las líneas de tratamiento recibidas antes y durante su participación en el estudio. Adicionalmente, es importante tener en consideración que la recogida de las muestras de tejido al igual que las de plasma fue prospectiva en todos los casos. El análisis de las muestras de plasma o tejido se realizó a tiempo real en el momento de la recogida de las muestras para las pacientes en las que el resultado era relevante para la toma de decisiones en el tratamiento de las pacientes. Para el resto de las pacientes, la recolección de las muestras fue también prospectiva, aunque el análisis fue retrospectivo y realizado para la inclusión de los resultados en esta tesis doctoral. Las biopsias para la obtención de tejido tumoral fueron recogidas en caso de que estuvieran clínicamente indicadas por práctica asistencial. Las muestras de plasma fueron recogidas sistemáticamente al inicio de cada tratamiento y a la progresión de este, además de que se recogieron muestras en curso de tratamiento. Por este motivo, en la mayoría de los casos, los resultados obtenidos de estas muestras no han podido ser aplicados para tomar decisiones terapéuticas en función de las alteraciones encontradas. De hecho, a diferencia del cáncer de mama luminal HER2 negativo, actualmente no hay ningún tratamiento aprobado para el cáncer de mama HER2 positivo que esté basado en alguna mutación accionable, como p.e. alpelisib para pacientes con mutaciones en PIK3CA o elacestrant en el caso de mutaciones emergentes en el gen ESR1. Según la clasificación ESCAT de ESMO para valorar la accionabilidad de alteraciones genómicas, para el CMM HER2 positivo las amplificaciones del gen ERBB2 serían las únicas con una calificación IA, es decir que su tratamiento mediante terapias específicas aumenta significativamente la supervivencia de las pacientes que la presentan.³⁴² Sin embargo, el valor del conocimiento del perfil mutacional de los tumores tiene una importancia creciente para valorar tratamientos potencialmente beneficiosos en el ámbito de la investigación de nuevas terapias y dianas terapéuticas.

De las 107 pacientes incluidas, para el análisis retrospectivo de las muestras se valoró priorizar aquellas pacientes de las cuales hubiera disponibilidad de muestras de tejido tumoral y muestras de plasma obtenidas simultáneamente antes del inicio de alguna línea de tratamiento con terapias anti-HER2. Estas muestras pareadas de tejido tumoral provenían de biopsias realizadas por motivos asistenciales y las de plasma habían sido obtenidas y almacenadas congeladas en una seroteca especialmente para su análisis genómico posterior. De las 107 pacientes incluidas había 39 que cumplían esta característica de al menos tener una muestra pareada de tejido y plasma disponible para su análisis. El motivo principal de priorizar esta subpoblación de pacientes con biopsias pareadas ha sido para analizar la concordancia de las alteraciones genómicas encontradas en tejido y plasma, ya que se trata de uno de los objetivos fundamentales

de esta investigación. De estas mismas pacientes, se han analizado además las muestras de plasma disponibles antes del inicio de cada línea de tratamiento. De esta manera es posible analizar las diferencias en las alteraciones genómicas que pudieran ir emergiendo a la progresión de cada línea de tratamiento, pudiendo orientar en posibles mecanismos de resistencia a cada terapia. Otro motivo fundamental para haber priorizado los análisis en la población de pacientes con muestras pareadas es por el valor añadido en la validación de los resultados de las biopsias líquidas no pareadas tras haber valorado la concordancia de alteraciones genómicas en tejido y plasma de las muestras pareadas de estas mismas pacientes. De este modo, es posible valorar la validez de los resultados genómicos de la biopsia líquida en ausencia de la posibilidad de obtenerlos en una muestra de tejido. Por último, se ha priorizado el análisis de las muestras de estas pacientes y no se han analizado todas las muestras disponibles de todas las pacientes incluidas en el proyecto en este momento por una limitación de recursos asociados al proyecto, aunque las muestras están almacenadas y disponibles para su uso futuro en proyectos de investigación.

En las 39 pacientes con muestras pareadas, se han identificado 54 muestras de tejido potencialmente pareadas con una muestra de plasma antes del inicio de una terapia anti-HER2. El éxito en el análisis de los resultados ha sido destacable, ya que se han analizado un total de 51 muestras (94%) y únicamente 3 fueron excluidas por no pasar control de calidad. De las correspondientes muestras de plasma pareadas se han analizado 52 de 53 (98%), ya que una muestra no pasó el control de calidad para su análisis. Adicionalmente hay 2 muestras analizadas y con resultados que provienen de la línea previa de tratamiento con respecto a la biopsia de tejido por lo que no cumplen estrictamente el criterio de apareamiento. No obstante, se ha decidido incluir los resultados de las muestras de estas pacientes a los análisis por la cercanía entre la extracción de estas en cuanto a las líneas de tratamiento y por la información adicional de las muestras secuenciales de plasma provenientes de ellas.

En el total de las 119 muestras de plasma analizadas sumando las pareadas con tejido y las secuenciales no pareadas a lo largo de las distintas terapias recibidas por las pacientes se han obtenido resultados de alteraciones genómicas de 116 (97.4%).

El alto porcentaje de biopsias que han sido analizadas y con resultados apoya la viabilidad de los análisis genómicos realizados no solo sobre las biopsias de tejido, sino también sobre las de plasma. Es destacable que, para la viabilidad de los análisis de biopsia líquida, ha sido esencial el circuito establecido para la extracción y procesamiento de plasma que se han explicado detalladamente en la metodología del proyecto. Así, es necesario tener personal de Enfermería adecuadamente entrenado para la extracción de las muestras de sangre en cada momento definido. La obtención de las muestras se realiza generalmente coincidiendo con analíticas que requieren las pacientes por motivos asistenciales para minimizar el impacto sobre ellas y optimizar los recursos. Además, es imprescindible un procesamiento adecuado del plasma, ya que es necesario que sea centrifugado y almacenado preferiblemente de manera inmediata o en un plazo máximo de 2 horas. De esta manera es posible preservar su integridad que es esencial para su análisis y obtención de resultados de calidad. Es también fundamental que las muestras sean correctamente identificadas y codificadas en su lugar de almacenamiento para facilitar el reconocimiento posterior para permitir su análisis en el laboratorio de genómica.

Hay que tener en consideración que una limitación que encontraremos recurrentemente es esta investigación es que, aunque las muestras de plasma fueron recogidas y almacenadas de manera prospectiva, los análisis realizados para este proyecto sean mayoritariamente retrospectivos. Por este motivo, no es posible valorar el tiempo que hubiera sido necesario para obtener los resultados de los análisis, si estos hubieran sido requeridos para ser utilizados sistemáticamente para una decisión terapéutica. En las pacientes en tratamiento con CMM y en particular en la población de pacientes con tumores HER2 positivos es importante minimizar en lo posible el tiempo transcurrido entre el fin de una línea de tratamiento y el inicio de la siguiente. Se trata de tumores con un perfil de agresividad considerable con diversidad de opciones terapéuticas disponibles. A este respecto, hay experiencia en nuestro centro proveniente del programa de prescreening molecular de VHIO, proyecto para el cual, todas las pacientes participantes en este proyecto habían consentido. Así, dependiendo de los análisis a realizar y el tipo de muestra sobre el que se llevan a cabo, el tiempo necesario para obtener resultados puede variar. Si se trata de IHQ/ISH los resultados pueden estar disponibles en menos de una semana, pero para resultados de paneles de NGS como los utilizados en este proyecto el tiempo necesario podría variar entre 3 y 4 semanas. A pesar del inconveniente del tiempo necesario para obtener resultados, el potencial valor de los mismos es indudable para las decisiones terapéuticas. Así, teniendo en cuenta todos los pacientes con cáncer de cualquier localización a los que se realizó un análisis genómico dentro del programa de prescreening de VHIO, hasta un 10% de ellos fue incluido en un ensayo clínico específico para la alteración encontrada.³⁴³ En el estudio SAFIRO2-BREAST se randomizaron a recibir una terapia dirigida o quimioterapia un 16% de las pacientes incluidas, basándose en los resultados de secuenciación de ADN obtenidos.³⁴⁴ No obstante, es importante considerar que se trataba de pacientes con cáncer de mama HER2 negativo. En la iniciativa AURORA, que incluía un 16% de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo, un 7% del total de las pacientes participantes recibieron una terapia dirigida según resultados genómicos.⁶³ Es también posible que se encuentren alteraciones potencialmente accionables y que no haya un tratamiento disponible en el momento de la detección, aunque su conocimiento podría permitir realizar el tratamiento específico en el futuro si estuviera disponible. Adicionalmente, es de creciente importancia para la correcta interpretación de los resultados de las alteraciones genómicas detectadas y su potencial valor en las decisiones terapéuticas, la figura de los *molecular tumor boards* o comités tumorales moleculares. Se trata de un grupo de expertos que se reúne precisamente para valorar las opciones terapéuticas en cada paciente al que se le ha realizado un test de NGS, dependiendo de las alteraciones genómicas encontradas potencialmente tributarias de un tratamiento dirigido.³⁴² El creciente interés ha impulsado iniciativas centradas en las pacientes como HOPE (SOLTI-1903) para valorar el impacto en el tratamiento de los resultados genómicos en las opciones terapéuticas con la guía de un comité tumoral molecular. Se encontraron un 54.9% de alteraciones potencialmente accionables clasificadas como ESCAT I-III entre todas las pacientes incluidas, de las cuales un 13% eran HER2 positivas.³⁴⁵

Las características de las 39 pacientes incluidas en el estudio son en general representativas de la población de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo metastásico en tratamiento activo anti-HER2 con una mediana de edad de 49 años. Se

trata además de una cohorte madura de pacientes, ya que la mediana de seguimiento desde el inicio de la primera línea de tratamiento es de 51 meses y de 34 meses si consideramos en momento en que consintieron para participar del proyecto. Además, hay un 23% de pacientes aún vivas y en seguimiento, que es una proporción bastante menor que la de las pacientes ya fallecidas. Es destacable que hay una elevada proporción de pacientes con diagnóstico de metástasis de novo, 13 pacientes que suponen un tercio del total (33%). Una posible explicación, es el avance en las terapias anti-HER2 que ha ido mejorando progresivamente con el tiempo la supervivencia y disminuyendo el riesgo de recidiva de las pacientes con diagnóstico de cáncer de mama HER2 positivo en estadio localizado. Esta mejora es atribuible a la inclusión como estándar el doble bloqueo con pertuzumab y trastuzumab combinado con quimioterapia en la neoadyuvancia además de TDM1 para aquellas pacientes que no alcanzan una pCR.³¹⁶ Otra explicación probable es la selección de pacientes por disponibilidad de muestra de tejido para su análisis pareado con una muestra de plasma obtenida simultáneamente. Hay 18 muestras de las 54 (33%) que provienen de tejido mamario, ya que es una localización muy accesible para la obtención de biopsia. De las 13 pacientes con tumores diagnosticados metastásicos de novo, solamente 2 habían sido intervenidas quirúrgicamente de sus tumores primarios. La siguiente localización más frecuente de biopsia es la hepática que supone el 26% del total, ya que es un órgano que se encuentra frecuentemente afectado con habitual accesibilidad para realizar biopsia. Otras localizaciones frecuentes de biopsia han sido las letálides cutáneas en la pared torácica que son también frecuentes en el cáncer de mama HER2 positivo metastásico, al igual que las adenopatías que si son periféricas, también son accesibles. Otras localizaciones menos accesibles como pulmón y cerebro han sido poco representadas en nuestra muestra. Para la elevada tasa de éxito en la obtención de biopsias de tejido ha sido fundamental la experiencia de los radiólogos y cirujanos que las han realizado.

Es destacable que habiendo sido un requisito para la participación en el estudio que las pacientes estuvieran en tratamiento con una terapia anti-HER2 en el momento de la inclusión, hasta un 22% de las muestras analizadas por las técnicas convencionales hayan resultado negativas para HER2. No obstante, esta situación está descrita como uno de los principales mecanismos de resistencia a los tratamientos anti-HER2, es decir, la pérdida de expresión del receptor en la membrana de la célula tumoral.¹⁸⁹ Otra posible explicación a este hallazgo podría estar en relación con la potencial heterogeneidad en la expresión de HER2 en distintas localizaciones metastásicas o incluso dentro de una misma lesión que asimismo está descrito hasta en un 40% de los casos, no solo como un factor de resistencia a terapias anti-HER2, sino también un factor pronóstico negativo.³⁴⁶

En cuanto a los tratamientos recibidos por las pacientes en enfermedad temprana, se aprecia que en la mayoría de los casos coinciden con el estándar vigente en el momento del diagnóstico de esta cohorte histórica. De todas las pacientes que hicieron tratamiento neoadyuvante con quimioterapia (54%), recibieron además trastuzumab un 64%, aunque de solamente el 29% hicieron además doble bloqueo con pertuzumab asociado. Ninguna paciente recibió un tratamiento anti-HER2 no aprobado en el contexto de enfermedad temprana. Hay que tener en consideración que no todos los

tumores primarios de las pacientes habían sido clasificados como HER2 positivos, un 27% eran de estirpe luminal A o B HER2 negativo. De todas las pacientes que hicieron tratamiento neoadyuvante, ninguna presentó una respuesta patológica completa, todas ellas presentaron enfermedad residual postneoadyuvancia. Sin embargo, solo una paciente recibió T-DM1 adyuvante debido al momento de aprobación de esta indicación de tratamiento. Es probable que todos estos factores pudieran haber impactado en el riesgo de recidiva posterior.³⁴⁷

De todas las pacientes incluidas, únicamente 8 de las 39 (21%) lo habían hecho previamente a haber recibido algún tratamiento anti-HER2 en el ámbito metastásico, y por tanto, antes de su primera línea con fármacos anti-HER2. Las demás pacientes han sido incluidas habiendo recibido ya algún tratamiento anti-HER2 para su enfermedad metastásica. En algunos casos, en pacientes que habían recibido tratamientos en otros centros, no se disponía algún dato que, por tanto, se ha omitido para los análisis. No obstante, se ha podido recoger la mayoría de la información para todos los tratamientos. La mediana de líneas de tratamientos recibidos es de 6 con un rango de 1 a 14 líneas. Un 54% de pacientes habían recibido más de 5 líneas y solamente un 13% menos de 2 líneas. Se trata por tanto de una población que en general ha recibido numerosas líneas de tratamiento. Adicionalmente, un 74% de las pacientes había sido éxitus en el momento del análisis, en todos los casos conocidos a causa de progresión de la enfermedad y en ningún caso por toxicidad asociada las terapias recibidas. Respecto a las terapias recibidas y seguimiento, como se ha referido anteriormente, se trata de una muestra de pacientes en general madura para su estudio.

En relación con los tratamientos recibidos por las pacientes en las diferentes líneas de tratamiento, reflejan la heterogeneidad que suele caracterizar a las cohortes retrospectivas. Desde su aprobación en 2013, el tratamiento considerado estándar en primera línea es la asociación de un taxano a doble bloqueo anti-HER2 con trastuzumab y pertuzumab apoyado por los resultados del EC CLEOPATRA demostrando su superioridad frente trastuzumab.³¹⁷ Sin embargo, de las pacientes incluidas, solamente habían recibido este tratamiento en primera línea un 54%. Había un 31% de pacientes que habían recibido otros tratamientos anti-HER2, con más frecuencia trastuzumab, generalmente en pacientes cuyo inicio de tratamiento en primera línea había sido previo a la aprobación de pertuzumab. Asimismo, había un 5% pacientes tratadas con T-DM1 por haber progresado precozmente tras el tratamiento adyuvante. El resto de pacientes tratadas con otros tratamientos anti-HER2, lo habían hecho en el contexto de ensayo clínico con inhibidores de tirosina quinasa en 7.7% y con trastuzumab deruxtecan (T-DXd) + pertuzumab/placebo en el 5%. Las pacientes tratadas con T-DXd en primera línea son pacientes incluidas en el ensayo clínico DESTINY-Breast09 (NCT04784715). Se corresponden con las más recientemente incluidas y por tanto con un menor seguimiento, sin poder valorar el impacto de este tratamiento en primera línea. Hay un 15.4% de pacientes que no habían seguido tratamiento anti-HER2 de inicio porque sus tumores no presentaban un fenotipo HER2 positivo en el momento de iniciar el tratamiento, aunque habían cambiado su fenotipo a HER2 positivo en líneas posteriores y por tanto fueron incluidas en el proyecto.

En la segunda línea de tratamiento, también se refleja la heterogeneidad terapéutica comentada anteriormente para la primera línea. Desde su aprobación en 2013, el tratamiento estándar a la progresión de un taxano y trastuzumab había sido T-DM1 por haber demostrado su superioridad frente a capecitabina y lapatinib en el ensayo clínico EMILIA.²⁵ En nuestra muestra de pacientes tratadas en segunda línea, lo habían recibido un 54%. Había otro 32.3% que habían recibido otros tratamientos anti-HER2, incluyendo doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab o trastuzumab en un 8.6%. Asimismo, hubo pacientes que recibieron otros ADCs como trastuzumab duocarmacina y T-DXd en un 2.9% respectivamente y un 8% de pacientes recibieron TKIs. También hubo un 14.7 % de pacientes sin tratamiento anti-HER2 por no ser consideradas HER2 positivas en este momento. Desde 2021 en que fue aprobado el uso de trastuzumab deruxtecan tras progresión a taxanos y trastuzumab, este se considera el actual estándar de tratamiento en segunda línea por haber demostrado su destacable superioridad frente a T-DM1 en el ensayo clínico DESTINY-Breast03.²⁷ El hecho de que solamente una paciente recibiera T-DXd es otro indicio de que se trata de una cohorte madura de pacientes, con un largo seguimiento posterior a la segunda línea. De hecho, la mayoría de las pacientes que reciben T-DXd en esta cohorte, lo hacen en líneas posteriores de tratamiento.

Actualmente, desde su aprobación en 2021, en el tratamiento de tercera línea estándar está establecido que correspondería a capecitabina asociado a doble bloqueo con trastuzumab y el TKI tucatinib. Esta aprobación se basa en los resultados del ensayo HER2CLIMB en el que tucatinib demostró su superioridad frente a placebo.³¹ Anteriormente, no había ningún tratamiento que se considerara como un claro referente estándar y se aceptaba como tal cualquier combinación que contuviera un tratamiento anti-HER2, habitualmente trastuzumab o lapatinib. Este hecho se refleja en la heterogeneidad de tratamientos recibidos por las pacientes. Así, en tercera línea, un 91% de las pacientes reciben tratamiento anti-HER2. El más frecuentemente encontrado en un 35% de las pacientes es trastuzumab asociado a quimioterapia, hay otro 8.8% que reciben doble bloqueo con pertuzumab. Se tratan con ADCs, T-DM1 y T-DXd, un 15% de pacientes respectivamente. Con TKI hay un 18% de pacientes tratadas incluyendo lapatinib en un 8.8%, neratinib en un 2.9% y tucatinib en un 5.9%. Así, nuestra muestra de pacientes en tercera línea contiene sobre todo pacientes tratadas según los estándares previos a la instauración del tratamiento preferido actualmente, basado en tucatinib, demostrando nuevamente la madurez de nuestra cohorte.

A medida que vamos avanzando en el número de líneas recibido por cada paciente, la heterogeneidad en los tratamientos recibidos es mayor. Adicionalmente, hay cada vez menor número de pacientes en tratamiento en cada línea ya sea porque no han progresado al tratamiento en el que se encuentran en el momento del análisis, o por éxitos que en nuestra cohorte ha sido debido a progresión tumoral en todas las pacientes incluidas de las que se dispone de dicha información. Así, el máximo número de líneas recibidas ha sido de 14 en un 5% de las pacientes incluidas. Sin tener en cuenta la línea en la que las pacientes recibieron cada tratamiento, hay un 77% de pacientes que recibieron doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab en algún momento y un 85% fueron tratadas con T-DM1. Todas las pacientes recibieron trastuzumab al menos en una ocasión. Respecto a otros ADCs, un 64% recibe T-DXd en algún momento, la mayoría en el contexto de ensayo clínico y un 26% trastuzumab duocarmacina, todas

ellas en ensayo ya que se trata de un fármaco no aprobado. Hay un 13% de pacientes que reciben zanidatamab en combinación con palbociclib, un 2.5% margetuximab en combinación con quimioterapia y en otro 2.5% MCLA-128. En estos casos se trata también de anticuerpos y combinaciones recibidas en el contexto de ensayo clínico. En relación con el tratamiento con TKIs, el más frecuentemente recibido fue lapatinib en 33% de pacientes, tucatinib en 26%, neratinib en 5% y dasatinib en 2.5%. Es importante considerar que el porcentaje medio de pacientes tratadas dentro de ensayo clínico por línea de tratamiento fue del 30% que es una proporción destacable en relación al 61% de media de las pacientes tratadas con tratamiento asistencial. Sin embargo, la proporción de pacientes que se trataron dentro de un uso compasivo fue considerablemente menor con una media del 9.25%. Es destacable la proporción de pacientes que fueron incluidas en un ensayo clínico debido a que fueron tratadas en un hospital universitario con acceso a tratamientos anti-HER2 y nuevas combinaciones en experimentación. De este modo, las pacientes pudieron beneficiarse de tratamientos que no estaban disponibles a nivel asistencial en el momento en el que los recibieron. No obstante, también hay que considerar y sopesar con las pacientes el beneficio y riesgo de cada tratamiento experimental. Hay tratamientos como el trastuzumab deruxtecan y tucatinib que han demostrado su beneficio y han sido aprobados, mientras que otros de los tratamientos que recibieron las pacientes como SYD985 no ha sido aprobados probablemente por un balance de eficacia y toxicidad desfavorable.³²⁰ Hay otros tratamientos como margetuximab o neratinib que no han sido aprobados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA), pero sí por la FDA (US. Food and Drug Administration) en este contexto, por lo que no están tampoco disponibles para su uso asistencial. Los motivos para esta discordancia en las aprobaciones por las agencias reguladoras son complejos y se alejan de los objetivos de este proyecto.

Los análisis de supervivencia reflejan la heterogeneidad respecto a los tratamientos recibidos en la muestra de pacientes incluidas a lo largo de las diferentes líneas de tratamiento. En la primera línea de tratamiento, considerando todos los tratamientos recibidos por las pacientes, la mediana de tiempo a la progresión (TTP) fue de 13.3 meses. Si consideramos el 54% de pacientes tratadas en 1L con el esquema considerado estándar de doble bloqueo anti-HER2 con trastuzumab y pertuzumab asociado a un taxano, la mediana de SLP fue de 12 meses con un rango amplio entre 9 y 25 meses. Este valor contrasta con el del EC CLEOPATRA en el que la mediana de SLP reportada para la población del estudio fue de 18.5 meses para el brazo de pertuzumab, frente a 12.4 en el de placebo. Es probable que esta diferencia encontrada en nuestra muestra de pacientes se deba a las diferencias con la población del ensayo. Entre otras posibles causas podría influir el tratamiento previo con trastuzumab en monoterapia o en combinación con pertuzumab en las pacientes que lo habían recibido en el ámbito adyuvante. En el EC CLEOPATRA habían recibido trastuzumab en el ámbito de enfermedad temprana una escasa proporción de pacientes, un 11.7% en el grupo de pertuzumab y un 10.1% en el de placebo.³¹⁷ Adicionalmente, las poblaciones de pacientes asistenciales no necesariamente cumplen todos los requisitos que eran necesarios para participar en el ensayo del que procede la indicación del tratamiento. Concretamente en el ensayo no se permitían pacientes HER2 negativas previamente tratadas en el ámbito metastásico que en algún momento hubieran cambiado a fenotipo HER2 positivo. En nuestro proyecto, un 13% de las pacientes se encontraba en esta

situación, pudiendo haber adquirido mecanismos de resistencia adicionales debido a su exposición a tratamientos previos en el contexto de enfermedad metastásica HER2 negativa. Adicionalmente, es probable que influya la escasa representación de pacientes largas respondedoras a doble bloqueo en nuestra muestra como un sesgo de selección para esta diferencia de resultados en las medianas de SLP. En la primera línea, ninguna de las pacientes ha mostrado los criterios de resistencia clínica primaria, según se han establecido en este proyecto para identificar posibles resistencias primarias a tratamiento anti-HER2. Así, todas las pacientes tratadas en primera línea con anti-HER2 han presentado una SLP mayor de 4 meses, sin haber presentado progresión como mejor respuesta. Es probable que se deba a que la mayoría de las pacientes han recibido combinaciones con QT que se suelen administrar durante al menos 6 ciclos y presentan sinergia con los tratamientos anti-HER2. Hay 2 pacientes tratadas con T-DM1 por haber progresado precozmente a tratamiento con trastuzumab en el ámbito adyuvante que han presentado una mediana de 27.5 meses de TTP que es excepcional e inesperado en este contexto, ya que la mediana de SLP en el EC EMILIA fue de 9.9 meses en las pacientes tratadas con T-DM1²⁵. Es probable que en estas pacientes la sensibilidad a la carga citotóxica de T-DM1, la emtansina, fuera excepcional, ya que no sería esperable una especial sensibilidad a los mecanismos de acción atribuidos a trastuzumab, dada la progresión precoz al mismo. Respecto a las 2 pacientes tratadas con T-DXd, ambas participan en el EC DESTINY-Breast09 (NCT04784715) que compara T-DXd + pertuzumab/placebo con el tratamiento estándar actual de combinación de taxano y doble bloqueo con trastuzumab asociado a pertuzumab. La relativamente corta PFS encontrada de 7.1 meses, se debe al escaso seguimiento de estas pacientes siguen en tratamiento, al haber sido incluidas al final del período de reclutamiento del proyecto. Los datos de este ensayo que probablemente demostrarán la superioridad de trastuzumab deruxtecan en este contexto de primera línea, aún no han sido reportados. Se han reportado datos del EC DESTINY-Breast07, que es un estudio de fase II que explora T-DXd en primera línea, con una mediana de PFS de 19.2 meses para T-DXd en monoterapia y de 20.6 meses asociando pertuzumab.³⁴⁸

En el análisis exploratorio realizado para comparar los resultados en primera línea entre pacientes tratadas con el estándar del esquema cleopatra, las tratadas con otras terapias anti-HER2 diferentes o tratadas sin tratamiento anti-HER2, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos. Sí que numéricamente hay diferencias en la SLP entre ellos con medianas de 12 meses para las 21 pacientes tratadas con el esquema cleopatra, 29 meses para las 12 pacientes que reciben otro tratamiento anti-HER2 y 20 meses para 6 pacientes las que no recibieron tratamiento anti-HER2 en primera línea. Las 6 pacientes que no recibieron tratamiento anti-HER2 son pacientes que en la primera línea habían recibido QT, hormonoterapia o inhibidor de ciclinas con fenotipo luminal B HER2 negativo. Es importante tener en consideración el escaso número de pacientes asignadas a cada grupo, además de los posibles sesgos asociados a la muestra. El beneficio de los tratamientos es mayor en primera línea cuando aún no se han generado resistencias secundarias. Adicionalmente, es posible que exista un sesgo de selección de las pacientes incluidas tratadas con trastuzumab con anterioridad a la aprobación de pertuzumab y que, por haber sido respondedoras excepcionales, hayan podido mantener una mayor sensibilidad a tratamientos posteriores y alcanzar una mayor supervivencia que ha permitido su inclusión en el estudio.

El análisis de supervivencia en segunda línea como en el caso de la primera línea se encuentra influenciado por la heterogeneidad de los tratamientos recibidos por las pacientes. Si tenemos en cuenta todos los tratamientos, la mediana de tiempo a la progresión fue de 7.5 meses con un rango de 0.7 a 41 meses. El tratamiento anti-HER2 más utilizado fue T-DM1 en un 54%, ya que se corresponde con el tratamiento estándar en segunda línea en el momento en que la mayoría de las pacientes recibieron tratamiento. Para estas pacientes, la mediana de SLP fue de 7.1 meses que es menor a la reportada en el EC EMILIA que fue de 9.9 meses. Entre otros factores, es posible que puedan influenciar estos resultados las diferencias con la población del EC EMILIA donde la mayoría de las pacientes no habían recibido pertuzumab previamente a recibir tratamiento con T-DM1, mientras que una gran proporción de las pacientes incluidas en este proyecto habían recibido doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab en primera línea.²⁵ Si valoramos las pacientes tratadas con T-DM1 en el EC DESTINY-Breast03, la mediana de SLP fue de 6.8 meses y un 60%, habían recibido previamente pertuzumab.²⁸ Esta mediana es muy similar a la alcanzada en las pacientes incluidas en nuestro estudio. La mediana de SLP para las pacientes que recibieron otros tratamientos anti-HER2 fue de 8 meses, similar a la obtenida con T-DM1. Hay que tener en consideración que algunas pacientes habían recibido con mayor frecuencia combinaciones de trastuzumab y QT a nivel asistencial, pero también otros ADCs como T-DXd y trastuzumab duocarmacina, cada uno en una paciente respectivamente en el contexto de ensayo clínico. Con la definición de resistencia clínica primaria establecida para detectar posibles resistencias primarias a tratamiento anti-HER2 había un 10.3% de pacientes tratadas con T-DM1 en segunda línea que la cumplían. Es importante destacar que la muestra de pacientes representada en la segunda línea, no es representativa de la población de pacientes que inician tratamiento en la actualidad. Como se ha referenciado previamente, el tratamiento estándar actual en segunda línea para pacientes con CMM HER2 positivo es T-DXd. De las 35 pacientes de segunda línea exclusivamente una recibió tratamiento con T-DXd, alcanzando una SLP de 6.6 meses. Estos resultados son inesperados, ya que son muy inferiores a la mediana de SLP de 28,8 meses reportada con T-DXd frente a T-DM1 en el ensayo DESTINYBreast03.³²³ En el análisis exploratorio comparando T-DM1, con otros tratamientos anti-HER2 y con pacientes que no reciben tratamiento anti-HER2 en segunda línea, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en SLP entre los 3 grupos. Las medianas son muy similares, de 7.1 meses para las 19 pacientes tratadas con T-DM1, 8 meses para las 11 pacientes que siguen algún tratamiento anti-HER2 y 8 meses para las 5 pacientes que no recibieron tratamiento anti-HER2 en segunda línea. Estas medianas de SLP son inferiores a las observadas en primera línea, probablemente a causa de las resistencias adquiridas.

En el análisis de supervivencia en la tercera línea, aún se pone de manifiesto una mayor diversidad en los tratamientos que reciben las pacientes. Considerando todos los tratamientos en conjunto recibidos por las pacientes, la mediana de tiempo a la progresión fue de 6.6 meses con un rango de 1 a 30.3 meses. Se aprecia como a medida que avanzan las líneas de tratamiento, la mediana de TTP va acortándose probablemente con relación a que los tratamientos que han demostrado mayor eficacia se van priorizando en las líneas previas y a que los tumores van adquiriendo nuevas

resistencias. El tratamiento anti-HER2 más utilizado en la tercera línea fue el trastuzumab en combinación con QT en un 35% de las pacientes con una mediana de SLP de 2.8 meses, excepto en una paciente que recibió tratamiento con hormonoterapia de mantenimiento alcanzando una mediana de 9.3 meses. Este resultado indica la necesidad de establecer nuevas estrategias terapéuticas para la mayoría de las pacientes que habían sido previamente tratadas con trastuzumab. Un 18% de pacientes fueron tratadas con TKIs incluyendo lapatinib, neratinib y tucatinib, con una SLP de 8.2 meses. Este relativo aumento numérico en la SLP se debe analizar con cautela, ya que el número de pacientes tratadas es escaso, aunque podría reflejar como un cambio en el mecanismo de acción anti-HER2 podría suponer una potencial ventaja para superar resistencias adquiridas. Hay un 15% de pacientes tratadas con T-DM1 con una mediana de SLP de 4.1 meses. Estos resultados contrastan en el caso de T-DM1 con los obtenidos en el EC TH3RESA que comparó T-DM1 con el tratamiento de elección del investigador en pacientes que habían recibido al menos 2 tratamientos anti-HER2 alcanzando una mediana de PFS de 6.2 meses para T-DM1 y de 3.3 meses para el brazo control³⁴⁹. Es posible que los resultados en nuestra muestra se deban en parte al azar por el escaso número de pacientes incluidas. Adicionalmente, podría ser que influya la diferencia entre poblaciones incluyendo los tratamientos previos recibidos ya que las pacientes incluidas en el EC TH3RESA no habían sido tratadas previamente con pertuzumab. Otro 15% de pacientes fue tratada con T-DXd con una mediana de SLP de 17 meses. Todas las pacientes tratadas con T-DXd en tercera línea lo habían hecho tras tratamiento previo con T-DM1. Así, los resultados obtenidos son comparables a los del EC DESTINY-Breast01 en el que se trataron pacientes con T-DXd que hubieran progresado previamente a T-DM1 o hubieran sido intolerantes. La mediana de SLP en el ensayo fue de 16.4 meses y es muy similar a la alcanzada por nuestra muestra de pacientes. Este hecho refleja que la población a pesar del escaso número de pacientes pueda ser similar a la del ensayo, teniendo en cuenta la participación en el ensayo de pacientes incluidas en el proyecto. Además, es probable que el tratamiento con trastuzumab deruxtecan, por su diferente mecanismo de acción con un alto perfil de eficacia, sea capaz de superar las resistencias adquiridas a los tratamientos previamente recibidos por las pacientes.²⁷ Por último, 9% de las pacientes reciben taxano asociado a doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab con una SLP de 7.9 meses. Las pacientes que recibieron este esquema en tercera línea fue debido a que sus tumores habían sido previamente tratados como luminales HER2 negativos en las dos líneas previas de tratamiento y posteriormente habían cambiado su fenotipo a luminal HER2 positivo. Estas pacientes respondieron al tratamiento en la fase de inducción con taxanos y progresaron al inicio del mantenimiento con doble bloqueo y tratamiento hormonal. Probablemente refleja los mecanismos de resistencia hormonal adquiridos en líneas previas y una menor sensibilidad al tratamiento anti-HER2 que las pacientes que reciben el tratamiento en primera línea.

En el análisis exploratorio comparativo de los tratamientos agrupados recibidos en tercera línea por las pacientes, se comparan T-DM1, con T-DXd, con otros tratamientos anti-HER2 y sin tratamiento anti-HER2. Exclusivamente se encuentran diferencias estadísticamente significativas en SLP entre los 4 grupos de tratamiento para T-DXd con una p 0.045. Es llamativo, como a pesar del escaso número de pacientes representadas en el grupo de trastuzumab deruxtecan, las diferencias numéricas son tan amplias que alcanzan significación estadística. Este hecho apoya la recomendación del uso de

trastuzumab deruxtecan en cualquier paciente que a partir de la segunda línea no lo hubiera recibido previamente.³²⁴

El conjunto de los resultados obtenidos refleja el gran abanico de posibilidades de tratamiento de las pacientes gracias a todos los ensayos clínicos abiertos con nuevas terapias anti-HER2 en el hospital Vall d'Hebron, además de las opciones de tratamientos asistenciales aprobados. La mediana de supervivencia de 61 meses de todas las pacientes incluidas desde la primera línea es algo superior a la del EC Cleopatra que fue de 56.5 meses, a pesar de que la mediana de SLP ha sido menor a la esperada en las pacientes de nuestra cohorte que recibieron este tratamiento con doble bloqueo.³²¹ Todas estas opciones de tratamiento y la heterogeneidad de nuestra muestra de pacientes podrían explicar la SG encontrada. La mayoría de las pacientes incluidas en este estudio recibieron en algún momento fármacos en el contexto de ensayo clínico antes de su aprobación poniendo en valor la investigación clínica y el valor que puede aportar a las pacientes en el ámbito asistencial.

6.2. GENES MÁS FRECUENTEMENTE ALTERADOS

En la muestra de 39 pacientes, *TP53* es el gen encontrado con más mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas en al menos una muestra analizada. Se ha detectado en 35 pacientes que corresponde a un 90% de todas las pacientes. Esta mutación se ha identificado consistentemente en la mayoría de las pacientes que la presentan, de manera estable desde la primera muestra analizada independientemente de la línea en que fue extraída. Además, en casi todos los casos se ha mantenido detectable en todas las muestras analizadas de las pacientes que la presentan sugiriendo que podría tratarse de una mutación fundamental e impulsora de carcinogénesis. En este contexto, es conocida la asociación de las mutaciones germinales de *TP53* con el *síndrome de Li-Fraumeni* y la incidencia de cáncer de mama HER2 positivo. En el caso de pacientes con mutaciones germinales de *TP53* se ha evidenciado como la pérdida de su función se aprecia ya en estadios iniciales de la formación de tumores de alto grado con amplificación de *ERBB2*, sugiriendo la relación entre ambos genes y su papel como gen *driver* o impulsor.³⁵⁰ Ninguna de las pacientes incluidas en este proyecto ha sido diagnosticada de este síndrome, por lo que probablemente las mutaciones encontradas en este gen son somáticas. Por tanto, su papel en la carcinogénesis podría ser diferente al que se ha establecido en pacientes con mutaciones germinales. Respecto a la alta frecuencia de mutaciones encontradas en nuestras pacientes, es superior a la reportada en otras cohortes retrospectivas como la de Geneplus en que fue del 53.1% entre 1184 pacientes testadas.³⁵¹ Las diferencias encontradas pueden deberse entre otros factores a la diferencia en las técnicas utilizadas, a la clasificación de las variantes y a la diferencia entre las poblaciones de pacientes de las que proceden las muestras. En ambos casos se ha determinado la mutación en ctDNA, pero con secuenciación por captura selectiva en la cohorte de Geneplus y mediante NGS en nuestras pacientes. Es posible que adicionalmente pueda existir algún sesgo de selección por el menor número de pacientes incluidas. En la cohorte de pacientes antes referida, las pacientes con mutaciones en *TP53* presentaban significativamente una menor SLP que las no mutadas.³⁵¹ No es posible establecer la influencia de este gen en la resistencia a tratamiento anti-HER2 en nuestra muestra debido a su alta frecuencia y consistencia en

su detección a lo largo de las distintas líneas de las pacientes cuyos tumores presentan mutación.

Las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas en *PIK3CA* han sido las segundas encontradas en frecuencia en 20 de las pacientes incluidas que suponen un 51%. Es una incidencia mayor a la reportada en otras cohortes, como en una publicada recientemente de resultados genómicos obtenidos con Guardant360 como en nuestra muestra de pacientes. En las 42 pacientes incluidas con tumores HER2 positivos, la incidencia fue del 21% en la extracción basal.⁷² Del mismo modo que en el caso del gen *TP53*, es posible que la mayor frecuencia observada en nuestra muestra pueda ser debida a algún sesgo asociado a la selección de pacientes con muestras pareadas y al análisis genómico retrospectivo en la mayoría de los casos. Es posible que también pueda influir una diferente clasificación de las variables. En las pacientes que encontramos mutaciones en este gen, se detectan en la primera muestra analizada y se mantienen en la mayoría de los casos en los subsecuentes análisis a lo largo de las diferentes líneas de tratamiento. Este hecho sugiere que se trate de una mutación *driver* o impulsora que sea fundamental en el desarrollo y mantenimiento de los tumores que la presentan. Se trata de un gen que codifica una proteína fundamental en la vía de señalización PI3K/AKT a través del receptor HER2 y sus mutaciones pueden mantener la vía constitutivamente activada suponiendo un mecanismo de resistencia a terapias anti-HER2.^{36,68} La influencia de las mutaciones de *PIK3CA* en la resistencia a tratamientos anti-HER2 ha sido estudiada tanto en el ámbito de la enfermedad temprana como metastásica. En un reciente metaanálisis que utiliza las bases TCGA-BRCA se estudia la relación de estas mutaciones con la eficacia de los tratamientos anti-HER2. Los resultados sugieren que estas mutaciones se asocian con una estadísticamente significativa menor tasa de respuesta, SLP y una tendencia a peor SG, aunque no fue significativa. Este metaanálisis sugiere que las mutaciones de *PIK3CA* pueden contribuir a la resistencia a anticuerpos y TKIs como trastuzumab, pertuzumab y lapatinib.³⁵² Los resultados en cuanto a otras terapias como ADCs es más controvertido. En el ámbito neoadyuvante las pacientes con mutaciones de *PIK3CA* presentaron una menor probabilidad de respuesta completa patológica al tratamiento con T-DM1 y pertuzumab comparado con las que no la presentaban.²⁹⁴ Sin embargo, en pacientes con enfermedad avanzada la actividad de T-DM1 fue similar tanto en pacientes que presentaban la mutación como en las que estaba ausente.²⁸⁵ La detección de las mutaciones en *PIK3CA* tiene un valor adicional, ya que es una diana potencialmente accionable para su tratamiento específico con inhibidores PI3K, que es la proteína a la cual codifica y está constitutivamente activada en presencia de la mutación. Para las pacientes con tumores de mama HER2 negativos, esta mutación tiene asignado un ESCAT I, por haber terapias aprobadas como alpelisib que han demostrado un beneficio clínicamente significativo.³⁴² En el caso del cáncer de mama HER2 los inhibidores de PI3K no han sido aprobados por las agencias reguladoras y se encuentran en investigación por lo que se podrían clasificar como ESCAT II. Algunas de las pacientes incluidas en este proyecto en las que se habían detectado mutaciones de *PIK3CA* en tejido en el programa de prescreening de VHIO por el panel Amplicon, fueron incluidas en el ensayo clínico B-PRECISE-01. En este estudio de fase Ib se exploraba la combinación de MEN1611, un inhibidor selectivo de p110 α de PI3K con trastuzumab y fulvestrant en pacientes con mutaciones de *PIK3CA* que habían progresado a trastuzumab.³³¹ A medida que se van desarrollando nuevos inhibidores más específicos, la eficacia aumenta y la toxicidad

esperada es menor por lo que es una diana terapéutica prometedora para las pacientes con cánceres de mama HER2 positivo.

En los análisis genómicos realizados en este proyecto no ha sido posible establecer la asociación entre las mutaciones en *PIK3CA* y la resistencia primaria o secundaria a las distintas terapias anti-HER2 probablemente por las limitaciones del mismo. En un estudio prospectivo, con una muestra homogénea y un mayor número de pacientes incluidas, sería más probable encontrar posibles resistencias específicas derivadas de las mutaciones en este gen.

Los siguientes genes encontrados con más frecuencia de mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas han sido *ESR1* y *ARID1A* en 6 pacientes que suponen un 15%. La frecuencia de mutaciones encontradas en *ARID1A* contrasta con el 20% reportado en una cohorte más específica de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo no luminal.³⁵³ El gen *ARID1A* codifica una proteína que forma parte del complejo SWI/SNF, el cual está involucrado en la remodelación de la cromatina y la regulación de la expresión génica. La pérdida de función de *ARID1A*, debido a mutaciones o alteraciones epigenéticas, se ha asociado resistencia a tratamientos hormonales y de quimioterapia. Las alteraciones en este gen se han asociado además con resistencia a tratamiento anti-HER2 como trastuzumab mediante la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR entre otros posibles mecanismos.¹⁷⁷

Las mutaciones en el gen *ESR1* se han descrito como mecanismo de resistencia hormonal característico de pacientes con tumores luminales HER2 negativo.⁷³ En una publicación reciente, que reporta resultados genómicos con Guardant360 en plasma de una cohorte de pacientes con cáncer que incluye pacientes HER2 positivas, la frecuencia reportada entre 42 pacientes de las cuales solamente 13 tenían extracciones seriadas de ctDNA fue del 5%. La diferencia se puede deber a las características de las poblaciones. Hay pacientes en nuestra serie con mutación en *ESR1* cuyos tumores habían sido inicialmente de fenotipo luminal HER2 negativo. Sin embargo, hay otras pacientes que presentan mutación cuyos tumores han sido de fenotipo luminal B HER2 positivo desde el inicio.⁷² La identificación de esta mutación tiene interés, ya que puede condicionar la respuesta a tratamiento endocrino y como se ha mencionado previamente, es potencialmente accionable. De hecho, se está explorando la incorporación de terapias específicas como por ejemplo giredestrant en combinación con anti-HER2 para valorar su eficacia en tumores HER2 positivos, aunque no existe una selección por la presencia de mutación en *ESR1*.³⁵⁴

Respecto a las alteraciones genómicas más frecuentemente encontradas en variación de número de copias ha sido la amplificación de *ERBB2* en 34 pacientes, que supone el 87% del total. A pesar de que nos encontramos ante una cohorte de pacientes tratadas con terapias anti-HER2 por haber sido diagnosticadas de cáncer de mama con fenotipo tumoral HER2 positivo, hay un 13% de pacientes en las que no se ha encontrado la amplificación en ninguna de las muestras analizadas. Se han comentado previamente posibles explicaciones, como heterogeneidad tumoral, pérdida de expresión de HER2 como mecanismo de resistencia, aspectos relacionados con las técnicas de detección de la amplificación por NGS entre otros. La frecuencia de mutaciones encontradas en la cohorte previamente mencionada de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo no luminal fue de 77.8%, que es algo inferior a la evidenciada en nuestra muestra.³⁵³

El segundo gen en frecuencia en el que se han encontrado amplificaciones es *CDK12* en 12 pacientes que supone un 31% del total. Este gen codifica a la ciclina dependiente de quinasa 12 que desempeña funciones de regulación transcripcional y postranscripcional del ADN celular. El gen *CDK12* se sitúa en cromosoma 17 como *ERBB2* pudiendo encontrarse coamplificado en cánceres de mama HER2 positivos.¹⁴² Las amplificaciones de *CDK12* se han relacionado con resistencia a trastuzumab y lapatinib por activar las vías PI3K/AKT y Wnt/ β -catenina que favorece a transición epitelio mesénquima.^{143,145} En la cohorte de pacientes con tumores HER2 positivos no luminales, se encontró la amplificación en 42% de las pacientes, pudiendo nuevamente haber influido en la diferencia que se trata de una cohorte más específica.³⁵³

Las amplificaciones en los genes *CCND1* y *MYC* se han encontrado en 16 pacientes cada una, suponiendo un 41%. El gen *CCND1* codifica la proteína ciclina D1, que es esencial en la regulación del ciclo celular. Esta proteína actúa como subunidad reguladora en complejos que forma con las quinasas dependientes de ciclina (CDK4 y CDK6), facilitando la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Un estudio que valoró la amplificación por PCR encontró la amplificación en un 32% de los casos analizados que es algo inferior a la frecuencia observada en nuestra muestra. La amplificación de *CCND1* se encontraba con mayor frecuencia en las pacientes que además presentaban positividad de receptores hormonales. Esta amplificación, podría tener implicación como mecanismo de resistencia en cáncer de mama luminal HER2 negativo, aunque no se pudo demostrar que impactara en la SLP de las pacientes HER2 positivas tratadas con trastuzumab.³⁵⁵

El gen *MYC* es un oncogén conocido por su implicación en la proliferación, diferenciación celular y apoptosis, cuya amplificación puede contribuir a la progresión tumoral. Hay otras series que reportan una frecuencia de 11% que es menor a la encontrada en nuestra muestra. En una serie, el método de detección fue por qPCR y FISH que podría influir en la diferencia de resultados.³⁵⁶ En el otro estudio la determinación fue por NGS, aunque es la serie previamente mencionada que incluyó pacientes con tumores HER2 positivos no luminales, que podría impactar en las diferencias encontradas.³⁵³ Adicionalmente, se ha relacionado la amplificación de *MYC* con una mayor probabilidad de progresión a trastuzumab y peor supervivencia en las pacientes que presentaban la amplificación. Por tanto, es probable que la presencia o emergencia de la amplificación podría contribuir a la resistencia a tratamientos anti-HER2.³⁵⁶

Se ha encontrado amplificaciones con menor frecuencia en otros genes como *PIK3CA* en un 36% de pacientes, cuyas mutaciones se han estudiado ampliamente como mecanismo de resistencia a trastuzumab y otras terapias anti-HER2.³⁵² Sin embargo, la contribución de las amplificaciones de *PIK3CA* como mecanismo de resistencia, no está definido, aunque podrían contribuir dado su potencial impacto en la hiperactivación de vía de señalización de HER2 mediante PI3K/AKT.

Las alteraciones genómicas más frecuentemente encontradas han sido las mutaciones de tipo VUS. Los genes más frecuentemente mutados son *APC* en un 36% de las pacientes, *CDK12* en 31%, *ATM*, *BRCA2* y *EGFR* en 28%, *ERBB2* y *PDGFRA* en 23%, *BRCA1* y *KIT* en 21%, *MET* en 18% y *ARID1A* y *NF1* en 15%. Asimismo, encontramos alteraciones con menor frecuencia en un número considerable de genes diferentes. Es destacable que las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas en *APC* y *CDK12* se han encontrado con baja frecuencia relativamente en un 5% que corresponde a 2 pacientes

cada una. La implicación de las mutaciones patogénicas en estos genes con los mecanismos de resistencia anti-HER2 no se ha descrito, mientras que las amplificaciones de *CDK12* sí se han relacionado como se ha mencionado previamente con la resistencia a trastuzumab y lapatinib. Hay otros genes en los que se han encontrado VUS como *EGFR*, *PDGFRA*, *MET*, *ARID1A* y *NF1* cuya implicación en las vías de señalización mediante el receptor de HER2 son conocidas, así como su posible participación en la resistencia a terapias anti-HER2 anteriormente mencionadas. No obstante, el potencial papel de estas mutaciones como mecanismo de resistencia supone un desafío y se debe ir aclarando a medida que aumenta el conocimiento permitiendo su clasificación definitiva.

6.3. DETERMINADAS ALTERACIONES GENÓMICAS PODRÁN CONFERIR RESISTENCIA PRIMARIA A DETERMINADOS TRATAMIENTOS

Para testar la hipótesis de que determinadas mutaciones podrán conferir resistencia primaria al tratamiento se ha decidido establecer un criterio clínico para definirla. Para ello se han tenido varios factores en cuenta. En primer lugar, se han considerado las características que definen al cáncer de mama HER2 positivo y los tratamientos específicos disponibles para ella. Se trata de un tumor con un perfil de elevada agresividad conocido en ausencia de tratamiento específico, para el cual el desarrollo de tratamientos contra la amplificación de *ERBB2* ha contribuido a aumentar la SLP y SG de las pacientes. Los tratamientos disponibles se han ido posicionando acorde a su eficacia demostrada en ensayos clínicos aleatorizados disminuyendo la mediana de SLP a medida que las pacientes van recibiendo líneas de tratamiento consecutivas. Según el tratamiento y la línea en el que lo reciba cada paciente también se puede esperar obtener resultados diferentes. Así, la SLP esperable para cada tratamiento puede ser variable dependiendo del momento en que se administra, además de por las características intrínsecas de los tumores y las pacientes. Aun así, nos guiamos en gran medida por la evidencia científica proveniente de los ensayos clínicos para las decisiones terapéuticas individualizadas.³¹⁶ Otro factor importante que se ha tenido en consideración es la heterogeneidad de la muestra. Al tratarse de un análisis retrospectivo, aunque las pacientes hayan sido incluidas de manera prospectiva, hay variabilidad en los tratamientos recibidos, la línea en que se administran y en la valoración de la respuesta a los mismos. De hecho, al tratarse de una cohorte de pacientes tratada en un hospital universitario con acceso a ensayos clínicos hay también diferencia en la valoración de la eficacia a los tratamientos en las pacientes tratadas en este contexto o en el asistencial. En todos los casos, las pacientes han tenido una valoración de respuesta para un determinado tratamiento en un máximo de 120 días. Para la mayoría de los tratamientos anti-HER2, la mediana de SLP esperada se encontraría también se encontraría al menos cercana o superior a 120 días, aunque es esperable que sea progresivamente menor a medida que las pacientes estén más pretratadas. Además de definir este intervalo de 120 días, se ha decidido incluir la respuesta en el criterio de resistencia primaria. Así, consideramos que cualquier paciente que obtenga a un tratamiento anti-HER2 una progresión como mejor respuesta o si ha presentado una estabilización durante un tiempo < 120 días es probable que sea debido a alguna resistencia primaria que condicione este resultado.

Según este criterio, se han comparado los resultados genómicos de las muestras disponibles de tejido y plasma de las pacientes que cumplen criterios de resistencia primaria con los de las consideradas no resistentes. Se han comparado estadísticamente las variantes genómicas de tipo mutaciones (SNV) y alteraciones de número de copias (CNV) mediante el test exacto de Fisher para buscar una posible relación entre ellas y la resistencia primaria a cada tratamiento anti-HER2.

Al ser el tratamiento más habitual en primera línea, se valora en primer lugar el esquema cleopatra con taxano asociado a doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab. En nuestra muestra de pacientes, no hemos encontrado ninguna que cumpla los criterios establecidos de resistencia primaria. Por este motivo, no se ha podido establecer una comparación estadística. Teniendo en consideración que para este esquema según el ensayo CLEOPATRA del que proviene la indicación, la SLP reportada fue de 18 meses y que únicamente un 3.8% de pacientes incluidas presentó progresión como mejor respuesta, es poco probable encontrar alguna paciente con criterios de resistencia primaria.²³ En este esquema, el taxano asociado al doble bloqueo recibido por las pacientes durante al menos 3 meses contribuye a una alta tasa de respuestas con baja probabilidad de progresión durante este período inicial. Adicionalmente, el limitado tamaño muestral ha podido influir en este resultado.

La resistencia primaria se ha valorado igualmente en el grupo de pacientes tratadas con trastuzumab y quimioterapia. Considerando la totalidad de tratamientos recibidos con este esquema, un 53% cumplía el criterio clínico establecido de resistencia primaria. Este criterio ha permitido identificar que una proporción importante de pacientes presentan progresión precoz sin beneficio clínico a estas combinaciones con diferentes quimioterapias. Adicionalmente, es importante considerar que la primera línea que reciben las pacientes con CMM HER2 positivo incluye trastuzumab asociado o no a pertuzumab. Como excepción, en caso de progresión precoz a la adyuvancia con trastuzumab, las pacientes reciben en primera línea tratamiento con un ADC. Así, en todos los tratamientos evaluados en este grupo, las pacientes habrían recibido trastuzumab previamente en el contexto de la primera línea. Por tanto, al aplicar los criterios de resistencia primaria, se identifica en realidad un grupo de pacientes que probablemente presentan una resistencia adquirida que condiciona una ausencia de beneficio al tratamiento. Al comparar las variantes genómicas de las pacientes que presentan criterios de resistencia con las consideradas no resistentes, no se ha encontrado ninguna diferencia estadística. Los mecanismos de resistencia a trastuzumab son muy diversos y por lo que podrían ser distintos en cada paciente. Es posible que un mayor tamaño muestral pudiera haber contribuido a definirlos. Estos resultados, apoyan el escaso beneficio que obtienen una importante proporción de pacientes con las combinaciones de trastuzumab y quimioterapia después de la primera línea de tratamiento. El desarrollo de nuevas terapias anti-HER2, está incrementando las opciones terapéuticas tras la progresión a trastuzumab con mejor balance terapéutico que mantener trastuzumab y combinarlo con distintos agentes quimioterápicos.³¹⁶

En el análisis de mecanismos de resistencia primaria a T-DM1 se han encontrado un 30% de pacientes que cumplían los criterios establecidos. A pesar de no ser un alto número de pacientes, al comparar las variantes genómicas entre estas pacientes y las consideradas como no resistentes, se han encontrado algunas diferencias estadísticamente significativas. Entre ellas, destaca que en 2 de las 4 pacientes con

resistencia primaria se han encontrado mutaciones probablemente patogénicas en *PTEN*, mientras que ninguna de las pacientes respondedoras tenía alteración. Las mutaciones de *PTEN* pueden ser relativamente frecuentes en el cáncer de mama HER2 positivo. Adicionalmente, mutaciones en este gen se han relacionado sobre todo con la resistencia a trastuzumab y a lapatinib por la influencia de la pérdida de la función reguladora de *PTEN* en la vía de señalización de PI3K/AKT.²⁸⁴ Sin embargo, no está claro que la presencia de estas mutaciones tenga un efecto relevante como mecanismo de resistencia a T-DM1. En los estudios pivotales, estas mutaciones no se asociaron con peor pronóstico en términos de SLP y SG.^{285,286} Tampoco se ha demostrado el impacto de las mutaciones de la vía en modelos preclínicos.²⁸⁰ Es importante considerar que en el mecanismo de acción de T-DM1, es probable que tenga más importancia el efecto citotóxico de DM1 que la inhibición de la vía por mediación de trastuzumab. Así, es posible que esta mutación pueda contribuir a la resistencia, aunque parece menos probable que constituya un mecanismo principal de resistencia primaria. Las mutaciones encontradas en el gen *CDKN2A* han resultado estadísticamente significativas, aunque solamente una de ellas es probablemente patogénica y la otra es una VUS. A nivel clínico, no se han descrito las mutaciones en *CDKN2A* como mecanismo de resistencia, aunque en modelos de PDX resistentes a T-DM1 se identificó la pérdida de *CDKN2A/B* como una variante asociada a resistencia.³⁵⁷ Para las amplificaciones, se encuentra una diferencia estadísticamente significativa en el gen *RAF1*, encontrando esta variante en 2 de las 4 pacientes con criterios de resistencia primaria y en ninguna sin criterios. La amplificación en *RAF1* no se ha relacionado expresamente con la resistencia a T-DM1, aunque se ha encontrado esta alteración en modelos de cáncer de mama resistentes a antraciclinas y taxanos.³⁵⁸ Adicionalmente, *RAF1* podrían contribuir a la activación de vías alternativas a la de PI3K/AKT como RAS/RAF/MEK. Es posible por tanto que esta amplificación pudiera contribuir a la resistencia primaria encontrada en estas pacientes. En *ERBB2*, aunque no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, es destacable que en el 50% de las muestras de las pacientes resistentes estaba ausente frente al 6% de las no resistentes. Es conocido como la ausencia de la detección de HER2 y la heterogeneidad en la expresión del receptor son mecanismos de resistencia a este ADC. Ambos tienen relación con las características de T-DM1, que debido a su enlace no escindible requiere que la entrada en la célula sea mediante la unión al receptor HER2 para poder posteriormente ser procesado en el interior de la célula para liberar su carga citotóxica.^{281,295}

Por tanto, para T-DM1 encontramos que la mutación probablemente patogénica en *PTEN* y la amplificación en *RAF1* podrían contribuir a la resistencia primaria a este tratamiento. Adicionalmente, aunque no se encuentra significación estadística, hay relativamente más pacientes entre las que presentan resistencia primaria en las que no se encuentra amplificación de *ERBB2*. Sin embargo, es probable que estas alteraciones genómicas de manera aislada no sean suficientes para inducir la resistencia, dado el complejo mecanismo de acción de T-DM1 que no solamente depende de las vías de señalización de HER2, sino también de la activación de su carga citotóxica en el interior de la célula tumoral.³⁵⁹

Para valorar la resistencia primaria entre las pacientes tratadas con TDXd, únicamente encontramos 2 (8%) tratamientos que han sido clasificados como resistentes con los

criterios establecidos. No se ha encontrado ninguna alteración genómica estadísticamente diferente entre las pacientes respondedoras y no respondedoras sugestiva de contribuir a la resistencia. En el tratamiento de pacientes con cáncer de mama HER2 positivo metastásico, TDXd es la terapia anti-HER2 que ha demostrado un mayor beneficio.³¹⁶ En nuestra muestra de pacientes, había un número significativo de pacientes tratadas con TDXd en el contexto de un ensayo clínico o mediante uso compasivo, ya que aún no estaba aprobado en el momento en que lo recibieron. La notable eficacia de este ADC que contiene como carga citotóxica un potente inhibidor de topoisomerasa I con un mecanismo de acción diferente a los agentes quimioterápicos más frecuentemente utilizados, seguramente ha contribuido a los resultados obtenidos. Entre los mecanismos descritos por otros grupos relacionados con alteraciones genómicas para TDXd se encuentra la mutación del gen *SLX4* que codifica una proteína de reparación del ADN que regula endonucleasas específicas que podría influir en la resistencia a la inhibición de topoisomerasa I. Es probable que las mutaciones en *TOP1* que se han encontrado como mecanismo de resistencia con otros ADCs con inhibidores de topoisomerasa, puedan también estar presentes para TDXd, aunque aún no ha sido confirmado.³⁰⁹ Tampoco se han identificado por el momento otras mutaciones somáticas o alteraciones en número de copias en genes diferentes a ERBB2 relacionados con resistencia a tratamiento.³⁰⁹

En las pacientes tratadas con SYD985 hay 5 (50%) cuyos tratamientos han sido clasificados como con criterios de resistencia primaria de las cuales se dispone de 3 muestras para analizar. No se han observado diferencias al comparar las alteraciones genómicas encontradas en las pacientes con criterios de resistencia con las que no los cumplían. Todas las pacientes recibieron el tratamiento en el contexto de ensayo clínico, ya que este ADC no ha sido aprobado. En su estructura contiene a trastuzumab como anticuerpo anti-HER2, por lo que aunque no se han descrito mecanismos de resistencia específicos para este ADC, podría compartir los de trastuzumab. Su carga citotóxica en un alquilante de ADN por la que las mutaciones en genes relacionados con la reparación del ADN podría tener alguna relación con mecanismos de resistencia.

SYD985, al igual que otros ADCs anti-HER2, posee una estructura y mecanismo de acción complejos. Como para otros ADCs anti-HER2, dada la complejidad en su mecanismo de acción, es probable que el estudio de las alteraciones genómicas mediante técnicas de NGS sea insuficiente para definir sus mecanismos de resistencia. De hecho, para este ADC, aunque hay modelos de PDX resistentes aún están por definir sus mecanismos específicos.

Los mecanismos de resistencia de los ADCs son extremadamente complejos como sus mecanismos de acción. Limitar su estudio a explorar únicamente el perfil genómico seguramente es insuficiente para definirlos. Es fundamental considerar que cualquier alteración en el procesamiento del ADC desde el microambiente tumoral, su unión al receptor, internalización, liberación de la carga citotóxica y efecto citotóxico, podría afectar la resistencia.³⁵⁹ En este sentido, es útil integrar en los ensayos clínicos el estudio de estos mecanismos de resistencia valorando una mayor variedad de aspectos que puedan condicionar estas resistencias. En el ensayo de fase II DAISY con trastuzumab deruxtecan se valoraron cohortes de pacientes con distinta expresión de HER2, se tomaron biopsias antes del inicio y a la progresión del tratamiento. Como en nuestro

estudio se analizaron las muestras mediante NGS y adicionalmente se valoraron otros aspectos como la distribución espacial en el tumor de la expresión de HER2 y su influencia en la internalización de T-DXd.³⁰⁹ Otros estudios como SOLTI TOT-HER3 trial analizan factores genéticos determinantes de sensibilidad a tratamiento con el ADC patritumab deruxtecan considerando no únicamente el análisis genómico mediante NGS con panel VHIO-300, sino también considerando el ambiente inmune evaluando celTIL score y expresión génica mediante el estudio de mRNA.³⁶⁰

Respecto a la familia de TKi, las pacientes se encontraron 11 (42%) tratamientos clasificados como resistentes, de los cuales hay 8 (47%) muestras disponibles que cumplen criterios de resistencia primaria. Para este tratamiento no se ha encontrado ninguna variante estadísticamente significativa entre las pacientes respondedoras y no respondedoras sugestiva de contribuir a la resistencia. Las resistencias a los TKIs se han definido sobre todo para lapatinib y neratinib, mientras que las de tucatinib son menos conocidas. No obstante, los 3 inhibidores comparten mecanismos de resistencia entre sí que tienen relación en gran parte con la activación de las vías de señalización alternativas y mutaciones de resistencia que disminuyen la afinidad por el receptor.^{227,265,277} Los mecanismos de resistencia para los TKI son complejos y muy diversos, al igual que para las otras terapias anti-HER2 analizadas.

No se han identificado alteraciones genómicas para todos los tratamientos anti-HER2 evaluados que nos permitan validar la hipótesis de que determinadas alteraciones genómicas podrán conferir resistencia primaria a determinados tratamientos. Sin embargo, se han encontrado alteraciones estadísticamente significativas potencialmente relacionadas con resistencia primaria a un tratamiento anti-HER2 son la mutación probablemente patogénica en *PTEN* y la amplificación de *RAF1*, específicamente para T-DM1. Para el resto de tratamientos no se ha encontrado ninguna variable estadísticamente significativa sugestiva de contribuir a la resistencia primaria. Es importante tener en consideración limitaciones del estudio que han podido contribuir a estos resultados como el limitado número de muestras analizadas, sobre todo de pacientes con criterios de resistencia primaria a cada tratamiento entre otras. Otros aspectos a considerar son la heterogeneidad de la población y las diferentes líneas en que las pacientes han podido recibir un mismo esquema de tratamiento.

En el estudio de resistencias primarias el estudio exclusivo a nivel genómico refleja una visión parcial considerando la complejidad de los mecanismos de acción de las terapias anti-HER2. Sería fundamental incorporar otras estrategias complementarias para su estudio, incluyendo estudios de expresión génica a nivel de ARN y proteómica, estudios de metilación, interacción con el microambiente tumoral y la respuesta inmune, entre otros aspectos, aunque estos análisis quedan fuera del espectro de esta tesis doctoral.

6.4. DETERMINADAS ALTERACIONES GENÓMICAS ADQUIRIDAS PODRÁN CONFERIR RESISTENCIA ADQUIRIDA A DETERMINADOS TRATAMIENTOS

Para testar la hipótesis de que determinadas mutaciones adquiridas podrán conferir resistencia adquirida o secundaria a terapias anti-HER2, se han valorado las pacientes de las que se disponen de resultados de genómicos antes y después de un determinado tratamiento en al menos una muestra. Se consideran todas las muestras disponibles de

todas las pacientes tanto de tejido como de plasma. Dado que el número de muestras de plasma analizadas y disponibles por pacientes es mayor que el de tejido, para que la comparación de los resultados sea más fiable, se valoran los genes en los que hay solapamiento entre panel VHIO-300 y panel Guardant360 VHIO. Así, es factible valorar las posibles alteraciones genómicas que pudieran emerger y potencialmente conferir resistencia al tratamiento.

En los análisis estadísticos no se ha encontrado ninguna alteración que sea significativa y sugestiva de ser responsable de resistencia secundaria en todos los tratamientos anti-HER2 valorados.

Tanto para el tratamiento con doble bloqueo con trastuzumab y pertuzumab, como para las combinaciones con trastuzumab, no se ha encontrado ninguna alteración genómica emergente significativa en el conjunto de las pacientes y tratamientos valorados. La combinación de Trastuzumab con quimioterapia ha sido el tratamiento que más pacientes han recibido, ya que es frecuente que trastuzumab se administre en combinación con distintas quimioterapias tras la progresión en primera línea. Una importante proporción de pacientes ha mostrado una TTP < 4 meses, posiblemente porque ya habían adquirido resistencias al haberlo recibido asociado a pertuzumab en primera línea y en líneas sucesivas.

Estudiando cada caso en particular es posible encontrar mutaciones patogénicas emergentes en genes implicados en las vías de señalización de HER2 como *AKT1* o *NF1*, aunque su implicación aislada como mecanismo de resistencia adquirida es cuestionable.⁶⁸

Al valorar la posible emergencia de resistencias secundarias a tratamiento con los distintos ADCs testados, tampoco hay ninguna alteración genómica emergente significativa. Al valorar las variantes emergentes de forma individual hay casos en los que tras tratamiento con T-DM1 o T-DXd, se encuentra pérdida de la amplificación de *ERBB2* que es un mecanismo conocido de resistencia a ambos.^{281,309} En algún caso, se encuentra discordancia en la amplificación de *ERBB2* en muestras pareadas de tejido y plasma obtenidas a la progresión, pudiendo reflejar heterogeneidad de expresión que es otro mecanismo conocido de resistencia a los ADCs anti-HER2.^{295,309} No obstante, no es posible confirmar la posible implicación de estos hallazgos en la resistencia secundaria de nuestras pacientes. Para SYD985, no se ha encontrado ninguna alteración sugestiva de contribuir a la resistencia por algún mecanismo previamente descrito, ya que por el momento no se han documentado mecanismos de resistencia específicos.³¹⁵ Por último, al valorar los posibles mecanismos de resistencia secundaria a TKIs comparando las muestras disponibles de plasma y tejido antes y después de este tratamiento no se encuentra ninguna diferencia estadísticamente significativa. Valorando de manera individualizada las alteraciones emergentes tras este tratamiento, se detectan algunas que han sido descritas previamente como mecanismos de resistencia. Se detectan mutaciones patogénicas en genes implicados en las vías de señalización HER2, como *ERBB2* o *MAPK1*.⁶⁷ Tampoco es posible confirmar la posible contribución de estas alteraciones como mecanismo de resistencia adquirida en nuestra muestra de pacientes.

Para esta hipótesis, no se demuestra estadísticamente la relación de alteraciones genómicas específicas emergentes a la progresión de las distintas terapias anti-HER2 y

su implicación en la resistencia adquirida. Para interpretar estos resultados es importante considerar algunas limitaciones del estudio, como la heterogeneidad en la muestra. Adicionalmente ha podido contribuir que el número de pacientes de las que se dispone de resultados genómicos antes y después de cada tratamiento ha sido en general limitado, dificultando la posibilidad de encontrar diferencias significativas. Los mecanismos de resistencia asociados a cada tratamiento pueden ser diversos y diferentes en cada paciente, siendo otro factor adicional que dificulta el estudio estadístico. Por lo tanto, al igual que en el estudio de las resistencias primarias, la heterogeneidad en los tratamientos anti-HER2 recibidos por las pacientes, la línea en la que los reciben y la diferencia en número de líneas son factores que dificultan el análisis e interpretación de los resultados.

Es importante considerar, como se ha comentado previamente, que los mecanismos de acción de los ADCs son complejos y es probable que el análisis exclusivo del nivel genómico sea insuficiente para evaluar sus mecanismos de resistencia. Por lo tanto, no se ha evaluado la contribución de otros factores potencialmente implicados en las resistencias como el microambiente tumoral, internalización celular, procesamiento intracelular, liberación, acción de la carga citotóxica y *bystander effect* entre otros. Por lo tanto, nos encontramos nuevamente con la limitación de contar únicamente con una perspectiva parcial. Al igual que para el estudio de las resistencias primarias, para un análisis más integral de estos mecanismos de resistencia adquiridos sería necesario considerar otros aspectos además del análisis exclusivo de las alteraciones a nivel genómico. Así, otros biomarcadores a evaluar mediante técnicas diferentes serían la expresión de ARNm, la epigenética, la proteómica y considerar otros factores como el microambiente tumoral y la respuesta inmune. Sin embargo, estos análisis no están incluidos en el alcance de esta tesis doctoral.

6.5. LAS ALTERACIONES GENÓMICAS DEL ADN SERÁN CONCORDANTES ENTRE EL TEJIDO TUMORAL Y EL ctDNA EXTRAÍDOS EN UN MISMO TIEMPO

Para testar esta hipótesis se ha valorado el solapamiento de genes concordantes entre las técnicas de análisis genómico mediante secuenciación de nueva generación (NGS) disponibles en VHIO para muestras de tejido con panel VHIO-300 y de plasma con panel Guardant660 VHIO. Se dispone de 81 muestras analizadas que constituyen 42 pares de muestras, ya que en algunos casos se disponía de más de una muestra de tejido sincrónica de distintas localizaciones tumorales en la misma paciente. En la gran mayoría de casos, se dispone de una única muestra de tejido y plasma extraídas en un mismo momento. Las muestras, han sido obtenidas en diferentes líneas de tratamiento anti-HER2 encontrando el máximo número de 20 muestras analizadas en pacientes pendientes de iniciar la primera línea (pre1L). Se debe probablemente al relativo elevado número de pacientes que se han incluido con enfermedad metastásica de debut que no había sido previamente intervenida, por la accesibilidad de la enfermedad local para las biopsias de tejido. Adicionalmente, influye la necesidad asistencial de confirmar las características de la enfermedad antes de iniciar una primera línea para enfermedad metastásica. En el estudio AURORA, al comparar las muestras disponibles de tumores primarios con las de lesiones metastásicas de las mismas pacientes, hubo cambios de subtipo intrínseco en un 36%, incluyendo casos como en nuestra muestra de subtipos luminales a HER2 enriquecido.⁶³ El rango de líneas en el que se han analizado las

muestras, oscila desde pre1L llegando incluso hasta 11L. A medida que avanzamos en el número de líneas previas recibidas por las pacientes antes de las biopsias y sobre todo a partir de la 6L, hay un menor número de muestras analizadas. Es probable también la influencia de la menor proporción de pacientes supervivientes a medida que avanzan las líneas de tratamiento. La disponibilidad de biopsias de tejido en líneas avanzadas de tratamiento es probablemente debida al interés clínico en valorar posibles cambios en el tumor que puedan guiar las decisiones terapéuticas de las futuras líneas de tratamiento. En algunos casos, las biopsias pueden ser necesarias para la inclusión en ensayos clínicos que requieran la confirmación central del estatus de HER2. En otros casos, incluso pueden ser utilizadas para la determinación adicional de alguna mutación que pueda establecer el potencial beneficio clínico de una diana terapéutica, como *PIK3CA*. A pesar de la heterogeneidad en las líneas en las que se han obtenido las muestras, no debería impactar en la fiabilidad de los resultados. Es importante considerar que se trata de muestras recogidas simultáneamente antes del inicio de la línea de tratamiento, por lo cual, la contemporaneidad permite que sean comparables independientemente de la línea en la que fueron obtenidas.

Otro aspecto para considerar son las diferencias entre los paneles que se han utilizado para analizar las muestras. La mayoría de las muestras de tejido incluidas para este proyecto han sido analizadas retrospectivamente con el panel VHIO-300 y son las que se han considerado para el análisis de concordancia. Hay 12 muestras que fueron analizadas mediante el panel Amplicon VHIO en el momento en que fueron obtenidas en el programa de prescreening VHIO, con la intención de detectar alguna mutación accionable que pudiera ser tributaria de tratamiento dentro de ensayo clínico. De ellas, hay 5 que ha sido posible analizar de nuevo con panel VHIO-300, mientras que en los 7 restantes, no había tejido suficiente para ello. Las muestras de tejido de las que exclusivamente se disponía de resultados del panel Amplicon se han excluido del análisis de muestras pareadas. El motivo principal es que no disponemos de datos crudos de secuenciación como los que se obtienen en la actualidad con la NGS. Las muestras de plasma han sido todas analizadas retrospectivamente con el panel Guardant360 VHIO. Es también destacable la diferencia en el número de genes en los que cada panel tiene la capacidad de encontrar alteraciones. La tecnología del panel Amplicon, estaba limitada a la secuenciación de 62 genes, mientras que con panel VHIO-300 se ha llegado hasta el momento, en las últimas muestras analizadas hasta 435 genes diferentes. Así, podemos apreciar como a lo largo de los últimos años, en un tiempo relativamente corto, las posibilidades de obtener información genómica de los tumores a partir de muestras de tejido han ido creciendo exponencialmente acompañando a la innovación tecnológica. Es igualmente destacable, el avance en la secuenciación del ADN tumoral a partir de muestras de plasma en las que se pueda aislar ADN tumoral circulante (ctDNA), mediante paneles como Guardant360 VHIO. En las muestras de plasma se han analizado los 74 genes que permite el panel para mutaciones (SNV), 18 para alteraciones de número de copias (CNV) y 14 para fusiones. Para los análisis de solapamiento únicamente se han considerado los genes que coinciden en el panel VHIO-300 y Guardant. Para la valoración de las mutaciones, no se tienen en consideración 348 genes que se analizan exclusivamente por panel VHIO-300 y 1 gen exclusivo de Guardant360 VHIO. Para la valoración de CNV, la diferencia es aún mayor ya que el panel VHIO-300 las determina en todos los genes disponibles y Guardant360 únicamente 18 genes. Es probable que, con el tiempo, a medida de avance la tecnología de secuenciación en

plasma, se amplíen los genes que es posible detectar en el panel Guardant360. No obstante, a pesar de la importante diferencia en el número de genes y alteraciones detectadas por cada panel, es importante considerar que ambos incluyen los genes más frecuentemente asociados al cáncer de mama. Otro aspecto fundamental es que ambos incluyen los genes que son potencialmente accionables según la clasificación ESCAT de ESMO.³⁴²

En las biopsias líquidas, es importante considerar otros aspectos de su análisis genómico que las diferencian de las biopsias de tejido. Es posible que pueda haber una variabilidad en la capacidad de los tumores para liberar ctDNA, pudiendo afectar a la detectabilidad y por tanto a los resultados. Por otro lado, es también posible que, en casos de heterogeneidad tumoral, la biopsia líquida pudiera reflejarla mejor que una de tejido al tener una representación más completa que la que obtenemos en una biopsia de tejido tumoral de una única lesión. Es importante considerar adicionalmente las diferencias técnicas entre ambos paneles que puedan influir en los resultados obtenidos.

Es destacable como al considerar todas las alteraciones genómicas detectadas, en todas las muestras al menos se ha encontrado una alteración, habiendo muestras en las que incluso se ha llegado a 62. Se encuentra que hay gran variabilidad entre los resultados, la media y mediana son similares de 17.12 y 16 respectivamente con una DE de 13. Estas diferencias indican la heterogeneidad que podemos encontrar en el perfil mutacional dentro del cáncer de mama HER2 positivo metastásico entre distintos tumores y a medida que son sometidos a distintos tratamientos anti-HER2.

Al valorar la concordancia entre las SNV compatibles con variables de significado incierto (VUS), en todas las muestras la media ha sido de 6.99, la mediana de 6 con una DE de 7.02. El rango de alteraciones encontradas se encuentra entre 0 y 42. Para las VUS se encuentra una importante variabilidad que puede estar relacionada con la heterogeneidad de los tumores, tratamientos y las líneas en que fueron recibidos por las pacientes.

En las muestras pareadas de tejido y plasma se han encontrado una media de 2.57 mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas, con una mediana de 2 y una desviación estándar (DE) de 1.94. El rango de alteraciones encontradas se encuentra entre 0 y 10. Estos datos sugieren que en la mayoría de las muestras se han encontrado unas 2 mutaciones, aunque hay una variabilidad considerable ya que hay muestras que presentan un número significativamente mayor de alteraciones. No obstante, hay una menor heterogeneidad y variabilidad que la encontrada con las VUS.

De los 42 pares de muestras analizados, hay concordancia en 32 que supone el 76% con una media de 78% de genes con mutaciones compartidas. En cuanto al porcentaje de solapamiento de alteraciones encontradas por cada par de las 32 muestras que lo presentan, ha variado desde el 100% en 19 muestras al 20% en 1 muestra. Es por tanto una concordancia muy superior a la encontrada en las VUS. En todas las líneas en que hay más de un par de muestras analizadas hay al menos un par que comparte la detección de mutaciones. Respecto a la media de las mutaciones compartidas en genes por línea de tratamiento en la que se obtuvieron las muestras es elevada, encontrándose entre el 51% y 89%. Al igual que en el caso de las VUS, no se encuentra una correlación entre las líneas de tratamiento en que se recogieron las muestras y la probabilidad de encontrar muestras en las que se detecten mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas en los mismos genes por ambos paneles.

Los genes compartidos con mayor frecuencia han sido *TP53* en 25 pares de muestras y el gen *PIK3CA* en 16 pares de muestras. Ambos genes coinciden con los que se han encontrado mutados con mayor frecuencia en nuestra muestra de pacientes, siendo por tanto muy representativo del perfil de mutacional encontrado por ambas técnicas. Es también en estos genes donde se ha encontrado una frecuencia relativamente alta de mutaciones solo detectadas en tejido o en plasma, sobre todo en *TP53* en número de 8 y 5 respectivamente. El gen *ESR1*, cuya mutación emergente es conocida en el contexto de la hormonoresistencia de pacientes con tumores luminales HER2 negativos, se ha encontrado en 1 muestra pareada y en 3 de plasma, pero no en sus correspondientes pareadas de tejido.⁷³ Asimismo, hay 3 muestras de plasma en las que se encuentran mutaciones de *ERBB2* que no fueron detectadas en tejido. Tanto en el caso de las mutaciones encontradas en plasma en *ESR1*, como las de *ERBB2*, podrían estar en relación con mutaciones emergentes. Se podría explicar que exclusivamente se detecten en plasma, pero no se encuentren simultáneamente en tejido a causa de evolución clonal y heterogeneidad tumoral. De esta manera estas mutaciones podrían no estar presentes en todas las lesiones metastásicas y sí en plasma procedente de las lesiones en las que haya emergido la alteración. Este resultado apoya que la biopsia líquida en algunos casos pueda reflejar mejor el panorama mutacional de un tumor en un momento determinado, frente a la perspectiva más limitada de una biopsia obtenida de una única lesión metastásica. Esta heterogeneidad se evidencia en estudios de autopsias de pacientes con cáncer de mama donde se detecta una gran variabilidad en la expresión de HER2 entre lesiones metastásicas analizadas en una misma paciente.³⁶¹

Un aspecto interesante para tener en consideración es la capacidad de ambos paneles para detectar mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas en genes con potencial de ser dianas terapéuticas. Para valorar este aspecto, en base a la clasificación ESCAT propuesta por ESMO se ha valorado cada mutación encontrada en el contexto del cáncer de mama HER2 positivo metastásico.³⁴² Así, como ejemplo de genes que se han clasificado como ESCAT I, es decir con un tratamiento aprobado para mutaciones patogénicas encontradas en ellos, se encuentra *ESR1*. No obstante, es importante aclarar que la indicación es en pacientes con cáncer de mama luminal HER2 negativo. Para este gen, la biopsia líquida hubiera permitido encontrar sus mutaciones en todos los casos, mientras que en tejido solamente en un 25%. Así que, en caso de haber analizado únicamente tejido, en un 75% de los casos se hubiera perdido el potencial terapéutico asociado a la detección de esta mutación. De manera similar, otras mutaciones potencialmente accionables serían las detectadas en *BRCA1* también con indicación aprobada y clasificada como ESCAT I, aunque tampoco específicamente en el CMM HER2 positivo. Se ha detectado una única mutación en este gen en plasma y no en tejido. Sin embargo, para el gen *BRCA2*, también clasificado como ESCAT I, la identificación en tejido ha sido más eficiente que en plasma, ya que se detecta en 4 muestras en tejido de las cuales en 2 se identifica además en la muestra pareada de plasma. Así, es posible que para la detección de mutaciones como las de *BRCA1* y *BRCA2* pudiera influir que pueden ser germinales o somáticas. En el caso de las mutaciones germinales sería más probable encontrarlas en todas las lesiones metastásicas, pero que en plasma pudieran no detectarse en caso de tumores con baja liberación de ctDNA. Esta podría ser una potencial explicación para los casos en que las mutaciones patogénicas de *BRCA2* que no se detectan en plasma, pero sí en tejido. La situación sería distinta en mutaciones somáticas que podrían ser emergentes durante la evolución del

tumor y no estar presentes en todas las lesiones tumorales. De esta manera se podría explicar la diferencia en la detección de la mutación únicamente en plasma y no en tejido en el gen *BRCA1* correspondiente a una paciente en cuarta línea de tratamiento. Es importante considerar también que las diferencias técnicas entre ambos paneles puedan impactar en los resultados obtenidos. La fracción tumoral de la variante encontrada en plasma puede contribuir a sugerir si se trata de una mutación germinal con mayor probabilidad si se encuentra alrededor de 0.5 o si por el contrario es más baja sugiriendo que el origen de la mutación sea somático.

El gen *PIK3CA* es también una potencial diana terapéutica que ha sido clasificado como ESCAT I para el cáncer de mama luminal HER2 negativo. Sin embargo, para el cáncer de mama HER2 positivo se debería considerar ESCAT II ya que las terapias contra este gen en este contexto se encuentran actualmente en fase de ensayo clínico. Se trata además de la mutación accionable detectada con mayor frecuencia en nuestra muestra de pacientes, hasta en un 51%. La concordancia en la detección de las mutaciones en este gen en las muestras pareadas ha sido amplia, ya que hay 16 pares de muestras concordantes. Únicamente en 2 muestras solo ha habido detección en plasma y en 1 exclusivamente en tejido. Para la detección de *PIK3CA*, ambos métodos han sido capaces de captar la mayoría de las mutaciones simultáneamente. Las discordancias han sido poco frecuentes, aunque la biopsia líquida ha identificado más mutaciones totales que la de tejido. Así, para estas mutaciones ambos métodos parecen ser fiables. Otro gen que se podría clasificar como ESCAT II es *PTEN*, cuya frecuencia mutacional ha sido baja. Todas sus mutaciones han sido detectables en plasma, en 3 muestras, de las cuales 2 también se encuentran en tejido, pero 1 de ellas fue indetectable por este método. Se trata de otro gen cuya detección en biopsia líquida ha sido más rentable que en tejido, posiblemente como en otros genes por tratarse potencialmente de una mutación emergente no presente en todas las lesiones metastásicas, aunque sí detectable en ctDNA.

Las mutaciones en el gen *ERBB2* son también potencialmente accionables para pacientes con tumores HER2 negativos. Sin embargo, en el caso de pacientes con tumores que además presentan amplificación de este gen, tienen indicación para recibir tratamientos con potencial beneficio, como los TKIs anti-HER2. La detección de *ERBB2* ha sido exclusiva de muestras de plasma y en ningún caso se ha encontrado en las muestras pareadas de tejido, lo que sugiere de nuevo que se pueda tratar de una mutación emergente. Un ejemplo de un gen clasificado como ESCAT III es *ARID1A* que se ha detectado en 5 muestras de plasma, de las cuales 3 eran pareadas con tejido. Sin embargo, no se ha encontrado de manera exclusiva en ninguna muestra de tejido.

Considerando todas las mutaciones con potencial de tratamiento específico, la biopsia líquida ha presentado un nivel de detección mayor en la mayoría de los casos comparada con la de tejido.

Nuestros datos son concordantes con un estudio similar que comparó la selección de tratamiento basado en el genotipado de tumores de mama metastásico mediante tejido o basado en muestras de plasma. Utilizaron una plataforma institucional de 91 genes para el análisis de tejido y Guardant360 para el de plasma. En las pacientes en que se hicieron ambos tests de forma pareada en el tiempo, se encontraron más mutaciones accionables en ctDNA que en tejido, como hemos encontrado en nuestra muestra. Respecto al tratamiento con una terapia específica, a diferencia de nuestro estudio, que al ser retrospectivo no se ha valorado, la recibieron más pacientes basándose en los

resultados de biopsia líquida (50%) que en los de tejido (36.8%). Encontraron concordancia en ≥ 1 mutación por ambas técnicas en el 36.7% de las pacientes, mientras que en nuestro estudio la concordancia ha sido del 76% para las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas. Esta diferencia podría atribuirse a diferencias en las técnicas utilizadas, en las características de las muestras y pacientes, así como a una posible diferente clasificación de las variables encontradas. Es importante tener en consideración que, en la cohorte referida, había escasa representación de pacientes HER2 positivas. Se analizaron 22 muestras de plasma de las cuales 19 mostraron mutaciones de las que 12 eran accionables. Había 10 pacientes HER2 positivas en la cohorte de tejido, todas con mutaciones de las cuales únicamente una era accionable. Solamente hubo una paciente HER2 positiva con muestras pareadas de tejido y plasma.⁷¹

Estos resultados apoyan la creciente incorporación de la determinación del perfil mutacional tumoral en plasma en comparación con tejido. En nuestro estudio, el análisis de las muestras de plasma al ser retrospectivo no ha influido en las decisiones terapéuticas de las pacientes. No obstante, el análisis prospectivo de algunas muestras de tejido dentro del proyecto de prescreening VHIO, permitió identificar pacientes con mutaciones de *PIK3CA* candidatas a ensayo clínico.

De los 38 pares de muestras que presentan alteraciones de tipo VUS, encontramos solapamiento solamente en 8 de ellas que supone un 21% con una media de 34.98% de genes compartidos. Podemos considerar que la concordancia para las VUS entre tejido y plasma es relativamente baja.

La concordancia en las VUS también es muy heterogénea considerando las líneas de tratamiento previamente recibidas y el número de muestras disponibles. La media máxima de genes compartidos es de 60% en 6L y la máxima proporción de muestras con genes compartidos en 3L con un 67% (2 muestras de 3).

Los genes compartidos con mayor frecuencia han sido APC en 4 pares de muestras. En 2 pares de muestras los genes *PIK3CA*, *CDK12* y *RB1*. En 1 par de muestras *ARID1A*, *CDK6*, *EGFR* y *NTRK1*. Estos genes se encuentran entre los que sus VUS han sido identificadas con mayor frecuencia en todas las muestras pareadas analizadas independientemente de que se encontraran en ambas muestras o únicamente en tejido o en plasma. No obstante, si valoramos todas las VUS que han sido encontradas en un panel y no en el otro, son significativamente más numerosas en ambos paneles en comparación con las compartidas. Es destacable que se aprecian diferencias importantes no únicamente entre los genes encontrados con VUS, sino en la frecuencia de VUS encontradas por cada técnica. Así, por ejemplo se encuentra una VUS en *ERBB2* en tejido, frente a 9 en plasma y se encuentran 6 VUS en *NF1* en tejido y ninguna en plasma. En otros genes como *ARID1A* y *CDK12* la frecuencia es similar. Sin embargo, a pesar de esta heterogeneidad, en tejido y plasma se encuentra un número similar de genes diferentes con VUS no detectados por la otra técnica en las correspondientes muestras pareadas, 30 genes en tejido frente a 28 en plasma.

Para interpretar los resultados de las VUS, es importante considerar que no disponemos de suficiente información acerca de su efecto deletéreo o no sobre el gen en que se detectan. Aunque en el momento actual no sea conocido su posible impacto sobre la proteína que codifican, es posible que en el futuro se pudieran llegar a clasificar como benignas o patogénicas. Su estudio es por tanto fundamental para aclarar su papel y

posible contribución a la carcinogénesis y resistencia primaria o secundaria a las terapias anti-HER2. Dada la alta frecuencia y variabilidad de las VUS y que actualmente no contribuyen a decisiones terapéuticas, la baja concordancia obtenida entre los hallazgos de tejido y plasma no debería ser motivo para desestimar ninguna de las dos técnicas de NGS en favor de la otra. Probablemente es más bien un reflejo de la complementariedad de ambas.

En la valoración de todas las alteraciones de tipo amplificaciones en genes que se solapan entre el panel VHIO-300 y Guardant360 VHIO encontradas en las 81 muestras analizadas, la media es de 5.90 con una mediana de 4 y una desviación estándar (DE) de 6.19. Así, para las amplificaciones, ocurre como para el resto de las alteraciones genómicas valoradas previamente. Encontramos una distribución con gran variabilidad entre las muestras analizadas con muchas muestras con un número menor de amplificaciones, mientras que en algunas muestras se encuentran en un elevado número.

El solapamiento general para las amplificaciones en los 40 pares de muestras de tejido y plasma en las que se ha encontrado esta alteración genómica se encuentra en 26 (65%) de ellos con una media de genes compartidos del 60.83%. Estos resultados sugieren que para las amplificaciones hay un nivel de concordancia elevado entre tejido y plasma, tanto en proporción de muestras como en genes compartidos que presentan estas alteraciones. El número de genes con amplificaciones compartidas en los 26 pares de muestras fue escaso, entre 1 y 2.

El nivel de muestras con concordancia ha sido alto en general independientemente de la línea de tratamiento en que se encontraba la paciente cuando se extrajeron las muestras, oscilando entre el 40% de coincidencia en 2L y en 100% en 7L, 8L, 9L y 11L. No obstante, las líneas en las que hay 100% de concordancia al ser líneas más avanzadas, había únicamente 1 o 2 muestras pareadas.

Teniendo en cuenta que se trata de una cohorte de pacientes con tumores HER2 positivos avanzados en tratamiento con terapias anti-HER2, es esperable que el gen amplificado con mayor frecuencia sea precisamente *ERBB2*. De hecho, se encuentra la amplificación de *ERBB2* en 23 pares de muestras. Hay 4 muestras de plasma y no en las correspondientes pareadas de tejido en las que se encuentra amplificación de *ERBB2*. De ellas, en 3 pacientes a la progresión de la primera línea y en 1 tras la tercera línea. Es posible que la discordancia pudiera deberse a heterogeneidad tumoral o también a diferencias técnicas entre ambos paneles a la hora de clasificar el número de copias como amplificación. La amplificación de *ERBB2* se encuentra exclusivamente en tejido en 8 muestras extraídas desde previamente a la primera línea hasta la sexta línea. Esta diferencia podría ser explicada porque el tumor libere escaso ctDNA, ya que en 7 de las muestras no se detecta ninguna otra amplificación en plasma, mientras que en tejido se detectan amplificaciones en entre 2 y 4 genes diferentes. El siguiente gen en frecuencia es *CCND1* con amplificación en 5 muestras pareadas. Se ha encontrado discordancia en la amplificación en 5 muestras de plasma y 3 de tejido. La amplificación de *PIK3CA* solamente se ha detectado en una muestra pareada, pero ha sido frecuente encontrarla de manera aislada en 6 muestras de plasma y 2 de tejido. La amplificación en *MYC* se ha encontrado solamente en una muestra pareada, aunque estaba presente en 5 muestras de plasma y 8 de tejido. El último gen que se ha encontrado amplificado en una muestra pareada es *CDK6* con discordancia en 6 muestras de plasma y 1 de tejido. Hay otros

genes como *FGFR1* que se ha encontrado amplificado exclusivamente en 7 muestras de tejido, sin representación en plasma. El gen *CDK4* se ha detectado en 5 muestras de plasma y ninguna de tejido. Excepto para alguna muestra en la que se haya determinado el HER2 por ISH para confirmar un resultado de IHQ equívoco, para todo el resto de amplificaciones no se ha confirmado su presencia por ninguna otra técnica. Por lo tanto, las diferencias generales encontradas en la detección de amplificaciones entre tejido y plasma de todos estos genes, se puede deber a los factores anteriormente expuestos para *ERBB2*.

La única amplificación clasificada como ESCAT I en cáncer de mama es precisamente la amplificación de *ERBB2* ya que ha demostrado ampliamente ser una diana terapéutica contra la cual hay disponibles tratamientos específicos aprobados que aumentan la supervivencia de las pacientes.³¹⁶ Aunque esta amplificación sea detectable en tejido y plasma mediante técnicas genómicas, el beneficio de las terapias anti-HER2 se ha definido basándose en la determinación de HER2 en tejido por técnicas de IHQ e ISH. De hecho, la determinación de HER2 en cáncer de mama por estas técnicas está perfectamente estandarizada según las guías de ASCO/CAP que se han ido actualizando periódicamente.^{10,43} De momento, en su última actualización, no se ha contemplado la posibilidad de establecer una equivalencia y estandarización con técnicas genómicas para la determinación de la amplificación de *ERBB2* y predicción de beneficio a tratamiento anti-HER2. Es frecuente basar la decisión terapéutica para pacientes HER2 positivas en resultados de biopsias de tejido no contemporáneas por no disponer de la posibilidad de realizar una nueva biopsia de tejido. Adicionalmente, incluso ante la negativización de HER2 por IHQ/ISH, habitualmente se decide mantener el tratamiento anti-HER2 para cubrir la posible heterogeneidad tumoral que pueda no ser reflejada en la biopsia. A medida que aumenta la sensibilidad y especificidad en las técnicas genómicas, se debería considerar la inclusión de los resultados de amplificación de *ERBB2* en las decisiones terapéuticas de las pacientes, aunque se requieren estudios randomizados que validen su utilidad. Las discordancias entre las técnicas genómicas para la determinación de la amplificación de *ERBB2* se discutirán adicionalmente en un apartado específico.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que hay concordancia entre las alteraciones genómicas detectadas en tejido y plasma en muestras pareadas extraídas en un mismo momento antes del inicio de una terapia anti-HER2 sobre todo para las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas en las que se encuentra una coincidencia en el 78% de los genes. Sin embargo, en las VUS es la alteración donde se observan las mayores diferencias entre ambas técnicas, con una menor coincidencia en los genes compartidos, que desciende al 32%. Es probable que todas estas VUS vayan siendo progresivamente recalificadas para poder determinar su contribución o no al fenotipo tumoral, progresión y potencial implicación en la resistencia a tratamiento. Respecto a las alteraciones en número de copias y sobre todo en las amplificaciones se ha encontrado coincidencia en un número significativo de muestras con un 61% de genes compartidos. No obstante, hay un importante número de variantes que solamente han sido identificadas por uno de los paneles en cada par de muestras pareadas. La tecnología de NGS aplicada a las muestras de tejido y plasma ha mostrado en conjunto complementariedad ofreciendo una amplia visión del perfil mutacional de los tumores en el momento de la obtención de las muestras. Teniendo en consideración la valoración de las variantes según la clasificación de ESCAT de ESMO, la biopsia líquida frente a la

de tejido ha detectado más variantes potencialmente accionables. En el caso de mutaciones que puedan ser emergentes en genes como *ESR1* o *ERBB2*, la biopsia líquida ha sido más eficiente que la de tejido para detectarlas. Este hecho apoya el creciente uso de esta tecnología de NGS sobre plasma para ser aplicada en decisiones terapéuticas por las ventajas asociadas frente al NGS sobre tejido. Entre ellas destaca la mayor facilidad y menor riesgo en la obtención de la muestra y la posibilidad de obtener una visión más panorámica de la totalidad del perfil genómico del tumor. La ventaja principal de NGS sobre tejido radica en la capacidad de testar una mayor cantidad de genes y alteraciones genómicas, para las cuales la tecnología NGS en plasma es aún más limitada. Adicionalmente, estos resultados ponen en evidencia la complementariedad de ambas técnicas de análisis de variantes genómicas por NGS.

6.6. LAS ALTERACIONES GENÓMICAS DEL ADN PODRÁN SER DISCORDANTES ENTRE MUESTRAS DE ctDNA EXTRAÍDAS EN DISTINTAS LÍNEAS DE TRATAMIENTO

Para testar esta hipótesis se ha valorado la diferencia entre las alteraciones genómicas encontradas en plasma con panel Guardant360 VHIO disponibles de cada paciente a medida que va recibiendo distintas líneas de tratamiento. Se tienen adicionalmente en consideración el número de muestras disponibles de plasma analizadas en cada una de las 39 pacientes incluidas. Se dispone de ≤ 2 muestras en 51% de pacientes y de ≥ 3 muestras en 49% llegando a un máximo de 7 muestras en una paciente. Es esperable que el número de muestras disponibles por paciente pudiera impactar en la probabilidad de encontrar alguna discordancia en las alteraciones genómicas encontradas a lo largo de la evolución clonal de cada tumor expuesto progresivamente a diferentes terapias anti-HER2. Se ha ido valorando para cada tipo de alteración genómica la influencia del número de muestras disponibles por cada paciente en la variabilidad de la concordancia de las alteraciones encontradas.

Para las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas únicamente se han encontrado unos coeficientes de correlación que sugieren una asociación moderada-fuerte estadísticamente significativa entre las pacientes de las que se dispone de 2 muestras que son 13 en total. En este caso es posible que el tener un mayor número de pacientes haya permitido encontrar diferencias, ya que este tipo de mutaciones se detectan en significativo menor número que las de tipo VUS. A partir de las pacientes de las que se dispone de 3 o más muestras, los coeficientes de correlación indican asociaciones en general débiles e incluso en algunos casos negativas sin alcanzar ninguna significación estadística. Estos resultados probablemente reflejan la mayor estabilidad de las mutaciones patogénicas a lo largo de las líneas de tratamiento y la menor frecuencia de estas que dificulta encontrar diferencias.

Para las VUS, en la paciente con 7 muestras disponibles encontramos que hay unos coeficientes de correlación elevados por los diferentes métodos y que algunos de ellos son estadísticamente significativos, aunque no hay concordancia entre todos ellos. En las 3 pacientes de las que se dispone de 6 muestras hay una importante variación en los coeficientes de correlación dependiendo del test aplicado en algún caso con significación estadística. La asociación se pierde a partir de las pacientes de las que disponemos de 5 o menos muestras. A pesar de la variabilidad encontrada, los

resultados sugieren que para las pacientes con más muestras disponibles la asociación es elevada en la detección de un incremento de VUS a lo largo de las líneas de tratamiento. Existe la limitación del escaso número de pacientes incluidas con más de 6 muestras. Es importante considerar que hay más posibilidad de encontrar nuevas alteraciones genómicas de tipo VUS que de otras mutaciones, ya que en general se han encontrado con mayor frecuencia en las muestras analizadas.

Para las amplificaciones no se ha encontrado ninguna correlación ni significación estadística que apoye su variabilidad a lo largo de las diferentes líneas que reciben las pacientes, independientemente del número de muestras disponibles para cada una de ellas. Es importante considerar que el panel de Guardant360 recoge amplificaciones en 18 genes diferentes, que es un número relativamente bajo. Además, se trata de pacientes que en su mayoría presentan amplificación de *ERBB2* en las muestras analizadas. Es destacable que, en la paciente con 7 muestras disponibles, los coeficientes de correlación son relativamente altos y negativos sugiriendo más bien una pérdida de genes con amplificación a lo largo de las líneas de tratamiento. Es importante tener en cuenta que en ningún caso se alcanza la significación estadística.

Los análisis estadísticos realizados para testar la hipótesis de que las mutaciones en el ADN tumoral podrán variar en cada paciente a lo largo de las diferentes líneas de tratamiento no han sido concluyentes. Es probable que haya influido el número de pacientes incluidas y la escasa representación de pacientes con más de 3 muestras analizadas disponibles. Los resultados sugieren que puede haber mayor variabilidad en un tipo de variantes genómicas que en otras. Así, parece encontrarse una mayor variabilidad en las VUS que pueden ser más numerosas y frecuentes que en las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas. Respecto a las amplificaciones, el panel Guardant360 VHIO de NGS utilizado ha podido influir en el resultado, ya que valora un número limitado de genes en comparación con los testados con el panel VHIO-300 en tejido. Otro factor que puede influir en los resultados y en la variabilidad de la detección de las diferentes alteraciones a lo largo de las líneas de tratamiento en cada paciente es la diferente capacidad de liberación de ctDNA por los tumores. Este factor es variable dependiendo de la respuesta al tratamiento previo y carga tumoral presente en cada momento en que se extrae la muestra de plasma.

Los resultados obtenidos para validar la hipótesis de que las alteraciones genómicas podrán ser discordantes en ctDNA de una misma paciente a lo largo de las diferentes líneas de tratamiento ha sido variable dependiendo de las variantes genómicas evaluadas. Para las VUS se han encontrado diferencias en las pacientes de las que había más muestras disponibles. Sin embargo, en las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas las diferencias se han establecido en las pacientes con 2 muestras disponibles. En el caso de las amplificaciones, no se han encontrado diferencias. Estas discrepancias pueden deberse en parte a la escasa representación de pacientes con múltiples muestras disponibles. Otro factor puede ser dependiente de la heterogeneidad presente entre las pacientes que componen nuestra muestra. No obstante, el caso propuesto ilustra la variabilidad en las variantes que se han encontrado a lo largo de las diferentes líneas de tratamiento en las 7 muestras analizadas en esta paciente. Hay mutaciones que se han mantenido estables como en *PIK3CA* y *TP53*, mientras que la detección de otras ha sido variable como en *ERBB2*, *KRAS*, *PTEN* y *RHOA*.

Se aprecia un mayor número de mutaciones de nueva aparición que emergen tras la última línea de tratamiento recibida por la paciente coincidiendo con la mayor carga tumoral y presión terapéutica. En las amplificaciones ha habido mayor variabilidad, siendo destacable la pérdida en ERBB2 tras el tratamiento con T-DXd.

6.7. LA DETERMINACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DE *ERBB2* EN ctDNA SERÁ FACTIBLE COMO PREDICTOR DE BENEFICIO A TRATAMIENTO ANTI-HER2

Los métodos convencionales de IHQ e ISH son los únicos que están validados para determinar la positividad de HER2 y definir las pacientes con potencial beneficio a las terapias anti-HER2¹⁰. Esta hipótesis valora la posibilidad de que la amplificación de ERBB2 determinada mediante NGS en plasma con panel Guardant360 VHIO o en tejido con panel VHIO-300 sea predictora de beneficio a tratamiento anti-HER2.

Se ha testado esta hipótesis en base a los resultados de amplificación de ERBB2 obtenidos en cada muestra de plasma comparando el TTP entre las pacientes que la presentan frente a las que no, ajustado por línea de tratamiento recibido. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas que apoyen esta hipótesis. Adicionalmente, se ha valorado la relación entre el número de copias de ERBB2 detectado en plasma como variable continua y el TTP ajustado a línea de tratamiento. Tampoco se ha encontrado una correlación estadísticamente significativa entre las dos variables.

Asimismo, se ha testado la hipótesis según los resultados de amplificación de *ERBB2* obtenidos por NGS en las muestras de tejido ajustando por línea de tratamiento. Los resultados no han sido estadísticamente significativos teniendo en cuenta la amplificación y tampoco valorando el número de copias como una variable continua. Por tanto, nuestros resultados no apoyan que la determinación de la amplificación de *ERBB2* por técnicas de NGS, sea predictor de respuesta al tratamiento anti-HER2.

Para interpretar estos resultados negativos hay que tener en consideración que, en nuestra muestra de pacientes, todas ellas han sido consideradas como HER2 positivas por técnicas de IHQ/ISH en algún momento. Para realizar los análisis se ha tenido en consideración el resultado de la amplificación de ERBB2 o número total de copias detectadas del gen en cada muestra. En las muestras de plasma hay factores que pueden influir en la detección de la amplificación de *ERBB2* que podrían estar relacionados con la capacidad del tumor de liberar ctDNA y aspectos técnicos del panel Guardant360. Así, tras presentar respuesta al tratamiento previo que condicione una reducción importante de la carga tumoral podríamos encontrar en algunos casos posibles falsos negativos en los que no se detecte la amplificación que afecten a los resultados. Otro aspecto relevante es que el tamaño de la muestra de pacientes incluidas haya podido influir en la posibilidad de encontrar diferencias entre ambos grupos. Adicionalmente existe heterogeneidad entre los tratamientos recibidos y la línea en que han sido administrados que puede haber contribuido a los resultados obtenidos.

Hay otras técnicas como la espectrometría de masas (MS) que se ha utilizado para determinar cuantitativamente los niveles absolutos de la proteína HER2 en muestras de tejido de cáncer de mama que han mostrado correlación con resultados de IHQ e ISH. Un estudio en tumores de mama procedentes de 277 pacientes correlacionó los niveles de expresión más altos de HER2 detectados en tejido por MS con una mayor probabilidad de beneficiarse de terapias anti-HER2, como trastuzumab, con una mayor

supervivencia en comparación con niveles más bajos de expresión.⁴⁹ Este estudio sería comparable con la determinación del número de copias como variable continua ya que utiliza la expresión proteica de HER2 como una variable continua. Sin embargo, una diferencia fundamental es que, al tratarse de diferentes técnicas, es posible que no haya una correlación directa entre el número de copias de *ERBB2* detectado por NGS y un mayor nivel de proteína HER2 resultante en el tumor. Asimismo, se ha relacionado la mayor expresión de niveles de ARNm de *ERBB2* con mejor respuesta y supervivencia al tratamiento con T-DM1.⁵⁹ Hay un estudio en cáncer gástrico HER2 positivo que relaciona de manera retrospectiva que los pacientes cuyos tumores presentan un mayor número de copias de *ERBB2* determinadas en tejido, alcanzaban una mejor SLP y SG que los que presentaban menor número de copias. En este caso, a diferencia de nuestro estudio, analizan muestras procedentes de 327 pacientes que todos han recibido el tratamiento anti-HER2 en el contexto de un ensayo clínico randomizado.³⁶² Este estudio apoya que el mejor contexto para testar esta hipótesis es en un ensayo aleatorizado que permita controlar mejor los posibles sesgos.

Por lo tanto, no podemos confirmar que la amplificación de *ERBB2* será factible como predictor de beneficio a tratamiento anti-HER2. Sin embargo, es probable que las limitaciones de nuestro estudio hayan influido en este resultado al tratarse de un estudio retrospectivo, con un número limitado de pacientes y heterogeneidad en los tratamientos administrados. Para confirmar los resultados se debería valorar la asociación de la amplificación de *ERBB2* determinada por NGS en tejido y en plasma en el contexto de ensayos clínicos aleatorizados.

6.8. LA AMPLIFICACIÓN DE *ERBB2* PODRÁ SER DISCORDANTE ENTRE TEJIDO TUMORAL Y ctDNA

Los únicos métodos validados para determinar la amplificación de HER2 son las técnicas convencionales de IHQ e ISH.¹⁰ En las muestras de tejido disponibles de las pacientes incluidas se ha determinado HER2 por técnicas convencionales de IHQ e ISH y se ha determinado el H-Score de HER2. Asimismo, se ha valorado en tejido mediante panel VHIO-300 y en plasma mediante Guardant360 VHIO la amplificación y número de copias de *ERBB2*. Se trata de muestras pareadas, es decir, recogidas en un mismo momento en cada paciente antes del inicio de una línea de tratamiento. Se establece la hipótesis de que la amplificación de HER2 podría ser discordante entre tejido tumoral y ctDNA. Para testarla, se valora la concordancia entre todas las técnicas disponibles para determinar la amplificación de *ERBB2*.

En la comparación entre los resultados obtenidos con panel VHIO-300 y con Guardant360, se ha encontrado una concordancia total en la amplificación de *ERBB2* por NGS en los 42 pares de muestras de tejido y plasma en 71% de ellos, en 23 pares amplificado y en 7 no amplificado. Se han encontrado por tanto 12 muestras discordantes. La correlación entre ambas técnicas ha sido moderada y estadísticamente significativa según el test de Fisher, aunque no llega a la significación con Chi cuadrado. La discordancia más frecuente, ocurrida en 8 muestras, ha sido encontrar la amplificación en tejido y no en su correspondiente muestra pareada. Una posible explicación es la diferencia en la capacidad de detección de ambas técnicas. En la biopsia líquida es importante la cantidad de ctDNA liberado por el tumor en el plasma que puede

depender de la carga tumoral. En caso de ser escasa podrían no detectarse algunas variantes presentes en el tumor. También el nivel de detección puede estar relacionado con la calidad de la muestra de plasma. Otro aspecto que considerar es que pudiera ser diferente la clasificación de la variante según el número de copias detectadas de *ERBB2*. Así, sería posible que fuera considerada como amplificación en tejido y como ganancia en número de copias sin llegar a la categoría de amplificación en plasma. En las 4 muestras restantes en las que ha habido discordancia, la amplificación se ha detectado en plasma y no en tejido. En esta situación la causa más probable sería que debido a heterogeneidad tumoral, la biopsia líquida pudiera detectar mejor el panorama global del tumor, frente a la visión parcial de la biopsia. Estos resultados sugieren la validez de la hipótesis de que la amplificación podrá ser discordante entre ambas técnicas ya que en hasta un 29% de las muestras testadas no hay resultados concordantes. Existe la limitación del número de muestras analizadas, aunque nuestro estudio tiene un mayor número de muestras pareadas procedentes de pacientes HER2 positivas que otros estudios reportados.^{70,72}

Si consideramos la correlación entre el número de copias de *ERBB2* detectado en las muestras pareadas de tejido y plasma por panel VHIO-300 y por Guardant360 VHIO, se encuentra que existe una asociación moderada estadísticamente significativa entre ambas. Esta correlación, aunque significativa estadísticamente no permite definir la precisión en la amplificación del gen *ERBB2*, únicamente expresa la asociación entre ambas técnicas.

Adicionalmente, se ha valorado la concordancia de la amplificación de *ERBB2* en 42 muestras de tejido por técnicas genómicas mediante panel VHIO-300 y en las mismas muestras se ha determinado HER2 mediante técnicas validadas de IHQ/ISH siguiendo las guías ASCO/CAP.¹⁰ Se ha encontrado concordancia total en la amplificación en un 83% estando presente por ambas técnicas, en 28 muestras y en 7 no se encuentra la amplificación. En 3 muestras discordantes hay amplificación mediante técnicas genómicas, pero no en las convencionales. Hay 4 muestras en las que la amplificación se encuentra por IHQ/ISH, pero no por panel VHIO-300. La correlación estadística encontrada es significativa con una asociación moderada-fuerte entre ambas. Es probable que las discordancias se deban a las diferencias intrínsecas de ambas técnicas, ya que se trata de las mismas muestras. Nuestros resultados contrastan con los reportados por un estudio que comparó la determinación del estatus de HER2 a partir de la medida del número de copias del gen *ERBB2* por NGS con los métodos estándar en 90 muestras de tejido de cáncer de mama. La concordancia encontrada para la positividad de HER2 llegó hasta el 98.4% con la IHQ/ISH considerando un número de copias de *ERBB2* estimado por NGS a partir de 3.2.⁵¹ En otro estudio, se utilizó una plataforma informática personalizada que comparó los resultados obtenidos por NGS con los de IHQ/ISH de 213 pacientes con cáncer de mama para establecer el estado de *ERBB2*. El nivel de concordancia fue también muy alto alcanzando un 98.4%.⁵² Una limitación es que se trata de estudios en los que no se reporta una validación prospectiva del punto de corte que obtuvieron para llegar a una correlación tan elevada entre ambas técnicas.

Al comparar entre si la variable H-Score de la IHQ de HER2 como variable continua con la presencia o ausencia de la amplificación de *ERBB2* en tejido determinada por NGS con panel VHIO-300, se ha establecido una correlación estadísticamente significativa. Sin

embargo, si comparamos el H-Score y el número de copias de *ERBB2* como variable continua analizado por panel VHIO-300, la correlación no es significativa entre ambos. Es posible que la discordancia en estos resultados tenga relación con los niveles de expresión de la proteína HER2. Así, en el primer caso a medida que tenemos mayor nivel de expresión de HER2 por IHQ reflejado por un mayor H-Score es más probable que el panel VHIO-300 detecte un número de copias en rango de amplificación. No obstante, en el segundo caso, es posible que un mayor número de copias de *ERBB2* no se relacione con una mayor expresión de los niveles de la proteína en el tumor.

Se valora también la concordancia en la amplificación de *ERBB2* en las 42 muestras pareadas mediante panel Guardant360 VHIO en plasma y con IHQ/ISH en tejido respectivamente. Se ha encontrado concordancia total en la amplificación en el 69%, estando presente en 22 muestras y no encontrando amplificación en 5 muestras. Se han encontrado 5 muestras discordantes en las que hay amplificación de *ERBB2* en plasma, pero no en tejido. Hay 10 muestras en las que la amplificación se encuentra en tejido, pero no en plasma. Para estas dos técnicas encontramos una asociación débil entre ellas que no es estadísticamente significativa. Las discordancias podrían ser debidas a heterogeneidad tumoral en el caso de las muestras amplificadas en plasma y no el tejido. La situación contraria, podría ser debida a poca liberación de ctDNA a plasma por el tumor. En ambos casos, es posible que hayan influido la diferencias entre ambas técnicas. Nuestros resultados contrastan con los de un estudio valoró retrospectivamente la correlación entre la sobreexpresión de HER2 determinada IHQ/ISH con la ganancia en número de copias de *ERBB2* valorada por NGS en plasma con Guardant360. Definieron el valor predictivo positivo (VPP) de NGS comparada con la IHQ/ISH a partir de muestras de 176 pacientes con distintos tipos tumorales incluyendo cáncer de mama. El VPP para determinar la positividad de HER2 comparado con las técnicas convencionales fue de hasta el 97% para ctDNA y que bajó al 93% si las muestras no eran pareadas.⁵⁴ Hay que considerar que en nuestro estudio hemos valorado la correlación existente entre ambas técnicas de detección de la amplificación de HER2, mientras que este estudio define el VPP. Aunque no son directamente comparables el VPP reportado es muy elevado sugiriendo una baja probabilidad de encontrar falsos positivos en comparación a la baja correlación que hemos encontrado entre los resultados de IHQ/ISH y Guardant360 en nuestras muestras.

Adicionalmente se ha valorado la correlación entre el H-score de HER2 y el número de copias de *ERBB2* obtenido en la muestra pareada correspondiente de plasma analizada con Guardant360 VHIO sin apreciar tampoco una correlación estadísticamente significativa entre ambas. En este caso, al igual que con los resultados obtenidos al correlacionar el número de copias de *ERBB2* obtenido en tejido con el H-score, es posible que un mayor número de copias de *ERBB2* en plasma tampoco se relacione con una mayor expresión de los niveles de la proteína en el tumor.

Los resultados obtenidos al comparar la amplificación de *ERBB2* en tejido y plasma por las distintas técnicas, contribuyen a validar la hipótesis de que podrá ser discordante en las muestras pareadas. No obstante, considerando el conjunto de los resultados comparando la correlación de las técnicas genómicas para valorar la amplificación de *ERBB2* con las convencionales para valorar la positividad de HER2 sugiere que aunque en algunos casos haya discordancia en los resultados, existe complementariedad entre

ellas. La concordancia entre la amplificación de *ERBB2* determinada por NGS y por técnicas convencionales en las mismas muestras de tejido es la que ha mostrado una mayor concordancia. No se puede establecer una equivalencia entre unas y otras, ya que cada una aporta una visión diferente de una misma alteración. Se necesitan más estudios prospectivos que ayuden a posicionar estas diferentes técnicas genómicas para determinar la amplificación de *ERBB2*, preferiblemente en el ámbito de ensayos clínicos aleatorizados que permitan controlar mejor los posibles sesgos. En definitiva, el objetivo de todas estas técnicas es realizar una adecuada valoración de HER2 que permita predecir el potencial beneficio de las terapias anti-HER2 para las pacientes.

6.9. LA GENERACIÓN DE MODELOS DE PDX DERIVADOS DE TUMOR PUEDE SER INFORMATIVA PARA ESTUDIOS DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS ANTI-HER2

Un objetivo secundario planteado es la generación de modelos murinos derivados de tumor (PDX) a partir de biopsias realizadas por motivos asistenciales en las pacientes que consintieran para ello. Para testar esta hipótesis se han considerado las pacientes incluidas desde el inicio en el proyecto, entre las que están incluidas las pacientes de las que proceden las muestras pareadas. Se obtuvieron 49 biopsias para su implantación en modelos de PDX. De ellas, el 41% proceden de una biopsia pareada analizada para el proyecto. La proporción de biopsias de pacientes implantadas en PDX procedentes de una biopsia pareada es relativamente elevada en relación con el total de pacientes incluidas en el proyecto. Probablemente es debido a un sesgo de selección, ya que precisamente se han priorizado para su análisis dentro del proyecto a las pacientes de las que se disponía de material procedente de una biopsia de tejido. Las 49 biopsias implantadas proceden de 36 pacientes, ya que ha habido pacientes de las que se han implantado biopsias en PDX hasta en 3 momentos diferentes. En estas pacientes con más de una biopsia implantada ha influido la accesibilidad de esta, procediendo en la mayoría de los casos del tumor primario, adenopatías locorregionales o de lesiones cutáneas. Había un 29% de biopsias procedentes de pacientes cuyos tumores tenían un fenotipo luminal B HER2 positivo, mientras que el 71% restantes provenían de tumores HER2 positivos no luminales.

La viabilidad en la implantación de los PDX ha sido del 26.5%, obteniendo un total de 13 modelos de PDX. En las biopsias procedentes del fenotipo luminal B HER2 positivo el éxito de implantación fue del 16%, mientras que en las no luminales llegó hasta el 31%. La tasa de éxito es similar a la obtenida en otros grupos de investigación. En un estudio en donde reportan la tasa de éxito en la implantación de PDX en cáncer de mama, ésta llegó al 27.4%, prácticamente superponible a la obtenida en nuestro estudio. Es importante tener en consideración que, dependiendo del fenotipo tumoral, la tasa de generación de PDX tras la implantación puede ser muy diferente. Así, en el estudio previamente mencionado, varió desde un 51,3% para el cáncer de mama triple negativo, el 26,5% para tumores HER2 positivos, el 5,0% para luminal B y un 0% para el subtipo luminal A. Una diferencia importante entre ambos estudios es la procedencia de las muestras. Todas nuestras biopsias proceden de pacientes con enfermedad metastásica, mientras que en el estudio mencionado provenían de pacientes que participaban en el ensayo BEAUTY de quimioterapia neoadyuvante. Además, las biopsias se obtuvieron en dos momentos, antes del inicio del tratamiento y en pacientes con enfermedad residual

tras neoadyuvancia. De hecho, en las pacientes ya tratadas, la tasa de éxito fue menor, bajando al 17.1%.³⁶³ A pesar, de estas diferencias, los resultados son similares. Es probable que la agresividad del fenotipo tumoral influya en estos resultados ya que hemos apreciado una mayor tasa de éxito entre las muestras procedentes de pacientes con tumores HER2 positivos no luminales que en las luminales.

Al inicio del proyecto se había planificado explorar la consolidación del estudio de resistencias terapéuticas en los modelos viables de PDX que se hubieran generado de las pacientes. Además, se valoraría la concordancia de la respuesta obtenida a las mismas terapias recibidas por las pacientes tras administrárselas a los PDX de cuyos tumores derivaran. Estos objetivos no han sido explorados por diversos motivos. Entre ellos podemos mencionar el decalaje temporal entre la implantación de la muestra en el PDX y la generación de un modelo viable, que en algunos casos puede ser de meses. Otro factor que considerar es la disponibilidad de las mismas terapias que recibieron las pacientes en el laboratorio para su administración posterior en los modelos de PDX, ya que no todas están disponibles. Es también fundamental obtener la financiación necesaria para la fase experimental.

Se ha logrado generar PDX a partir de biopsias tumorales procedentes de los tumores de nuestras pacientes. Sin embargo, no ha sido posible confirmar la hipótesis de que los PDX podrían ayudar a predecir la respuesta en estas. Únicamente se ha valorado en una paciente sin obtener los resultados esperables. No obstante, la utilidad de los modelos de PDX para el desarrollo preclínico de terapias anti-HER2 y estudio de mecanismos de resistencia es indudable. Los PDX han contribuido al estudio de estos mecanismos de resistencia generando nueva evidencia que ha ayudado a la mejor comprensión de los mismos. La investigación preclínica realizada en el laboratorio con la ayuda de estos modelos de experimentación generados a partir de los tumores de nuestras pacientes ha derivado en la extensión del conocimiento y publicación de nuevos mecanismos de resistencia a terapias anti-HER2 y posibles estrategias para superarlos.^{314,315}

7. CONCLUSIONES

1. No se han identificado alteraciones genómicas sugestivas de conferir resistencia primaria ni adquirida a todos los tratamientos anti-HER2 evaluados. Se encuentra que la mutación probablemente patogénica en PTEN y la amplificación de RAF1 podrían estar relacionadas con la resistencia primaria a T-DM1.

2. Se encuentran diferencias en la concordancia de las alteraciones genómicas analizadas en muestras pareadas obtenidas en un mismo tiempo mediante NGS en tejido con el panel VHIO-300 y en plasma con el panel Guardant360 VHIO dependiendo del tipo de alteración. Para las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas se encuentra la mayor coincidencia con una media de un 78% genes compartidos. Para las VUS se encuentra una variabilidad amplia con una media de genes compartidos de 32%. Para las amplificaciones se encuentra una coincidencia moderada con 61% de genes compartidos.

Las discordancias en las alteraciones genómicas analizadas en las muestras de plasma con el panel Guardant360 VHIO en las distintas líneas de tratamiento anti-HER2 recibido por las pacientes han sido variables dependiendo del tipo de alteraciones genómicas evaluadas. Para las mutaciones patogénicas y probablemente patogénicas las diferencias se han identificado en las pacientes con 2 muestras disponibles. Para las mutaciones clasificadas como VUS se han apreciado diferencias en las pacientes de las que se disponía de 6 y 7 muestras. Para las amplificaciones no se ha encontrado correlación en ningún caso.

La amplificación de *ERBB2* ha mostrado discordancia en las muestras pareadas analizadas mediante NGS en tejido con panel VHIO-300 y en plasma con panel Guardant360. La amplificación de *ERBB2* ha mostrado concordancia en las mismas muestras de tejido determinada por NGS y por técnicas convencionales de IHQ/ISH.

3. No se ha encontrado una correlación entre la presencia o ausencia de la amplificación de *ERBB2*, evaluada mediante NGS en tejido con el panel VHIO-300 o en plasma con el panel Guardant360 VHIO y el tiempo hasta la progresión de las pacientes tratadas con terapias anti-HER2.

4. Se han generado modelos de PDX viables derivados de los tumores de las pacientes en el 26.5% de los casos. No ha sido posible evaluar la consolidación del estudio de resistencias terapéuticas de nuestra muestra de pacientes en estos modelos.

8. FUTURAS DIRECCIONES

El alcance de la biopsia líquida en la identificación de resistencias primarias y adquiridas a tratamientos anti-HER2 ha sido limitado en nuestro estudio. Nos hemos encontrado con limitaciones que incluyen el tamaño muestral y diseño retrospectivo, que son potencialmente superables realizando un estudio prospectivo que incremente el número de pacientes. Adicionalmente, es esencial considerar que por diversidad de terapias anti-HER2 y la complejidad de los mecanismos de resistencia asociadas a estas, requieren para su estudio una perspectiva más integral.

En el futuro, se debería considerar para la investigación de las resistencias a terapias anti-HER2 la incorporación de otros biomarcadores con potencial implicación en los mecanismos de resistencia mediante el análisis de la expresión de ARNm, la epigenética y la proteómica, incluyendo además otros aspectos como el microambiente tumoral y el sistema inmune. Asimismo, por la diversidad en los mecanismos de acción de cada fármaco, es fundamental el estudio prospectivo de los mecanismos de sensibilidad y resistencia mediante un programa de análisis de biomarcadores individualizado en el contexto de ensayos clínicos.

No obstante, es indudable la utilidad creciente del estudio de ctDNA, ya que permite monitorizar las alteraciones genómicas en tiempo real a lo largo de los tratamientos, evitando realizar procedimientos invasivos. Adicionalmente, facilita la búsqueda de alteraciones potencialmente accionables que puedan predecir un beneficio para las pacientes ayudando a guiar las decisiones terapéuticas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. May 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
2. SEOM. Las cifras del cáncer en España 2022. https://seom.org/images/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESPANA_2022.pdf
3. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*. 2011;5(1):5-23. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003>
4. Prat A, Pineda E, Adamo B, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. Nov 2015;24 Suppl 2:S26-35. doi:10.1016/j.breast.2015.07.008
5. Gnant M, Thomssen C, Harbeck N. St. Gallen/Vienna 2015: A Brief Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care (Basel)*. Apr 2015;10(2):124-30. doi:10.1159/000430488
6. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. Jul 10 2010;28(20):3271-7. doi:10.1200/jco.2009.25.9820
7. Guarneri V, Conte P. Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy. *Oncologist*. Jul 2009;14(7):645-56. doi:10.1634/theoncologist.2009-0078
8. Creighton CJ. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics*. 2012;6:289-97. doi:10.2147/btt.S29923
9. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*. Jun 9 2020;22(1):61. doi:10.1186/s13058-020-01296-5
10. Wolff AC, Somerfield MR, Dowsett M, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: ASCO–College of American Pathologists Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41(22):3867-3872. doi:10.1200/jco.22.02864
11. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, et al. Quantitative Association Between HER-2/neu and Steroid Hormone Receptors in Hormone Receptor-Positive Primary Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(2):142-153. doi:10.1093/jnci/95.2.142
12. Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med*. Jan 2011;135(1):55-62. doi:10.5858/2010-0454-rar.1
13. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*. Dec 6-12 1984;312(5994):513-6. doi:10.1038/312513a0
14. Filho OM, Viale G, Stein S, et al. Impact of HER2 Heterogeneity on Treatment Response of Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer: Phase II Neoadjuvant Clinical Trial of T-DM1 Combined with Pertuzumab. *Cancer Discov*. Oct 2021;11(10):2474-2487. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-1557

15. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. Jan 9 1987;235(4785):177-82. doi:10.1126/science.3798106
16. Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 15 1992;89(22):10578-82. doi:10.1073/pnas.89.22.10578
17. Moody SE, Sarkisian CJ, Hahn KT, et al. Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis. *Cancer Cell*. Dec 2002;2(6):451-61. doi:10.1016/s1535-6108(02)00212-x
18. Shepard HM, Lewis GD, Sarup JC, et al. Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic. *J Clin Immunol*. May 1991;11(3):117-27. doi:10.1007/bf00918679
19. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. Mar 15 2001;344(11):783-92. doi:10.1056/nejm200103153441101
20. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol*. Nov 20 2014;32(33):3744-52. doi:10.1200/jco.2014.55.5730
21. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. Oct 20 2005;353(16):1659-72. doi:10.1056/NEJMoa052306
22. Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM, Sliwkowski MX. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell*. Apr 2004;5(4):317-28. doi:10.1016/s1535-6108(04)00083-2
23. Baselga J, Cortés J, Kim SB, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. Jan 12 2012;366(2):109-19. doi:10.1056/NEJMoa1113216
24. Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res*. Nov 15 2008;68(22):9280-90. doi:10.1158/0008-5472.Can-08-1776
25. Verma S, Miles D, Gianni L, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. Nov 8 2012;367(19):1783-91. doi:10.1056/NEJMoa1209124
26. Ogitani Y, Aida T, Hagihara K, et al. DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DM1. *Clin Cancer Res*. Oct 15 2016;22(20):5097-5108. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2822
27. Modi S, Saura C, Yamashita T, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. Feb 13 2020;382(7):610-621. doi:10.1056/NEJMoa1914510
28. Cortés J, Kim SB, Chung WP, et al. Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer. *N Engl J Med*. Mar 24 2022;386(12):1143-1154. doi:10.1056/NEJMoa2115022

29. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. Dec 28 2006;355(26):2733-43. doi:10.1056/NEJMoa064320
30. Oliveira M, Garrigós L, Assaf JD, Escrivá-de-Romaní S, Saura C. Neratinib plus capecitabine for the treatment of advanced HER2-positive breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. Sep 2020;20(9):731-741. doi:10.1080/14737140.2020.1807947
31. Murthy RK, Loi S, Okines A, et al. Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. Feb 13 2020;382(7):597-609. doi:10.1056/NEJMoa1914609
32. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells*. 1998;16(6):413-28. doi:10.1002/stem.160413
33. de Bono JS, Rowinsky EK. The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol Med*. 2002;8(4 Suppl):S19-26. doi:10.1016/s1471-4914(02)02306-7
34. Kovacs E, Zorn JA, Huang Y, Barros T, Kuriyan J. A Structural Perspective on the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Annual Review of Biochemistry*. 2015;84(1):739-764. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034402
35. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res*. Mar 10 2003;284(1):2-13. doi:10.1016/s0014-4827(02)00105-2
36. Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*. Apr 2009;21(2):177-84. doi:10.1016/j.ceb.2008.12.010
37. Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer*. Jul 12 2012;12(8):553-63. doi:10.1038/nrc3309
38. Szabó A, Szöllosi J, Nagy P. Coclustering of ErbB1 and ErbB2 revealed by FRET-sensitized acceptor bleaching. *Biophys J*. Jul 7 2010;99(1):105-14. doi:10.1016/j.bpj.2010.03.061
39. Bragin PE, Mineev KS, Bocharova OV, Volynsky PE, Bocharov EV, Arseniev AS. HER2 Transmembrane Domain Dimerization Coupled with Self-Association of Membrane-Embedded Cytoplasmic Juxtamembrane Regions. *Journal of Molecular Biology*. 2016/01/16/ 2016;428(1):52-61. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.007>
40. Nagy P, Jenei A, Kirsch AK, Szöllösi J, Damjanovich S, Jovin TM. Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *Journal of Cell Science*. 1999;112(11):1733-1741. doi:10.1242/jcs.112.11.1733
41. Fehrenbacher L, Cecchini RS, Geyer CE, Jr., et al. NSABP B-47/NRG Oncology Phase III Randomized Trial Comparing Adjuvant Chemotherapy With or Without Trastuzumab in High-Risk Invasive Breast Cancer Negative for HER2 by FISH and With IHC 1+ or 2. *J Clin Oncol*. Feb 10 2020;38(5):444-453. doi:10.1200/jco.19.01455
42. Escrivá-de-Romaní S, Saura C. The change of paradigm in the treatment of HER2-positive breast cancer with the development of new generation antibody-drug conjugates. *Cancer Drug Resist*. 2023;6(1):45-58. doi:10.20517/cdr.2022.52
43. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*. Jul 10 2018;36(20):2105-2122. doi:10.1200/jco.2018.77.8738

44. Xie S, Wang Y, Gong Z, et al. Liquid Biopsy and Tissue Biopsy Comparison with Digital PCR and IHC/FISH for HER2 Amplification Detection in Breast Cancer Patients. *J Cancer*. 2022;13(3):744-751. doi:10.7150/jca.66567
45. Mugoni V, Ciani Y, Quaini O, et al. Integrating extracellular vesicle and circulating cell-free DNA analysis using a single plasma aliquot improves the detection of HER2 positivity in breast cancer patients. *J Extracell Biol*. Sep 2023;2(9):e108. doi:10.1002/jex2.108
46. Yeung KT, Wang Y, Jones S, et al. ERBB2 (HER2) gene amplification concordance analysis of circulating tumor cells and tumor tissue in patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41(16_suppl):e13047-e13047. doi:10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.e13047
47. Lopes C, Piai P, Chícharo A, et al. HER2 Expression in Circulating Tumour Cells Isolated from Metastatic Breast Cancer Patients Using a Size-Based Microfluidic Device. *Cancers*. 2021;13(17):4446.
48. Caro GD, Lam E, Bourdon D, et al. Liquid biopsy identification of ERBB2 amplified and HER2 expressing metastatic breast cancer: Comparison and combination of cell and cell-free platforms. *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41(16_suppl):3061-3061. doi:10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.3061
49. Nuciforo P, Thyparambil S, Aura C, et al. High HER2 protein levels correlate with increased survival in breast cancer patients treated with anti-HER2 therapy. *Mol Oncol*. Jan 2016;10(1):138-147. doi:10.1016/j.molonc.2015.09.002
50. Kennedy JJ, Whiteaker JR, Kennedy LC, et al. Quantification of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 by Immunopeptide Enrichment and Targeted Mass Spectrometry in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded and Frozen Breast Cancer Tissues. *Clin Chem*. Jul 6 2021;67(7):1008-1018. doi:10.1093/clinchem/hvab047
51. Nakamura K, Aimonio E, Oba J, et al. Estimating copy number using next-generation sequencing to determine ERBB2 amplification status. *Med Oncol*. Mar 12 2021;38(4):36. doi:10.1007/s12032-021-01482-1
52. Ross DS, Zehir A, Cheng DT, et al. Next-Generation Assessment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (ERBB2) Amplification Status: Clinical Validation in the Context of a Hybrid Capture-Based, Comprehensive Solid Tumor Genomic Profiling Assay. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2017;19(2):244-254. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.09.010
53. Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA, et al. Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140712. doi:10.1371/journal.pone.0140712
54. Shah AN, Sunderraj A, Finkelman B, et al. Positive predictive value of ERBB2 copy number gain by tissue or circulating tumor DNA next-generation sequencing across advanced cancers. *Oncotarget*. 2022;13:273-280. doi:10.18632/oncotarget.28188
55. Liang DH, Ensor JE, Liu ZB, et al. Cell-free DNA as a molecular tool for monitoring disease progression and response to therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. Jan 2016;155(1):139-49. doi:10.1007/s10549-015-3635-5
56. Rossi G, Mu Z, Rademaker AW, et al. Cell-Free DNA and Circulating Tumor Cells: Comprehensive Liquid Biopsy Analysis in Advanced Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(3):560-568. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-17-2092

57. Odegaard JI, Vincent JJ, Mortimer S, et al. Validation of a Plasma-Based Comprehensive Cancer Genotyping Assay Utilizing Orthogonal Tissue- and Plasma-Based Methodologies. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(15):3539-3549. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-17-3831
58. Shpektor D, Dargahi D, Samiotakis A, et al. Abstract CT278: ERBB2 amplification detected in ctDNA as a surrogate for tumor tissue FISH analysis of HER2 status in a phase 1 study with zanidatamab for the treatment of locally advanced or metastatic HER2 expressing cancers. *Cancer Research*. 2023;83(8_Supplement):CT278-CT278. doi:10.1158/1538-7445.Am2023-ct278
59. Brasó-Maristany F, Griguolo G, Chic N, et al. HER2DX ERBB2 mRNA expression in advanced HER2-positive breast cancer treated with T-DM1. *J Natl Cancer Inst*. Mar 9 2023;115(3):332-336. doi:10.1093/jnci/djac227
60. Torres ES, Villacampa G, Pascual T, et al. 7P Independent validation of HER2DX ERBB2 mRNA score to predict HER2-positive (HER2+), HER2-low and HER2-0 status in breast cancer. *ESMO Open*. 2023;8(1)doi:10.1016/j.esmoop.2023.101231
61. Zhang X, Lu S, Li H, et al. Abstract P1-05-27: Liquid Biopsy for HER2 Status Assessment in Breast Cancer Using Surrogate DNA Methylation Markers. *Cancer Research*. 2023;83(5_Supplement):P1-05-27-P1-05-27. doi:10.1158/1538-7445.Sabcs22-p1-05-27
62. Nourieh M, Vibert R, Saint-Ghislain M, Cyrta J, Vincent-Salomon A. Next-generation sequencing in breast pathology: real impact on routine practice over a decade since its introduction. *Histopathology*. Jan 2023;82(1):162-169. doi:10.1111/his.14794
63. Aftimos P, Oliveira M, Irrthum A, et al. Genomic and Transcriptomic Analyses of Breast Cancer Primaries and Matched Metastases in AURORA, the Breast International Group (BIG) Molecular Screening Initiative. *Cancer Discovery*. 2021;11(11):2796-2811. doi:10.1158/2159-8290.Cd-20-1647
64. Klocker EV, Hasenleithner S, Bartsch R, et al. Clinical applications of next-generation sequencing-based ctDNA analyses in breast cancer: defining treatment targets and dynamic changes during disease progression. *Mol Oncol*. Jun 12 2024;doi:10.1002/1878-0261.13671
65. Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol*. Sep 1 2018;29(9):1895-1902. doi:10.1093/annonc/mdy263
66. Caballero C, Irrthum A, Goulioti T, Cameron D, Norton L, Piccart M. International research to address the challenges of metastatic breast cancer: the AURORA Program (BIG 14-01). *NPJ Breast Cancer*. May 23 2023;9(1):42. doi:10.1038/s41523-023-00548-9
67. Smith AE, Ferraro E, Safonov A, et al. HER2 + breast cancers evade anti-HER2 therapy via a switch in driver pathway. *Nat Commun*. Nov 18 2021;12(1):6667. doi:10.1038/s41467-021-27093-y
68. Ferraro E, Safonov A, Chen Y, et al. Abstract P4-02-01: Efficacy of HER2 ADCs against HER2 inhibitor resistance alterations in the PI3K and MAPK pathways in HER2-positive breast cancer. *Cancer Research*. 2023;83(5_Supplement):P4-02-01-P4-02-01. doi:10.1158/1538-7445.Sabcs22-p4-02-01

69. Zill OA, Banks KC, Fairclough SR, et al. The Landscape of Actionable Genomic Alterations in Cell-Free Circulating Tumor DNA from 21,807 Advanced Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(15):3528-3538. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-17-3837
70. Oliveira M, Bellet M, Suñol A, et al. Concordance of genomic alterations (GA) in synchronous tumor biopsies (tBx) and circulating tumor (ct) DNA from metastatic breast cancer (MBC) patients (pts). *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(15_suppl):1073-1073. doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.1073
71. Vidula N, Niemierko A, Malvarosa G, et al. Tumor Tissue- versus Plasma-based Genotyping for Selection of Matched Therapy and Impact on Clinical Outcomes in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2021;27(12):3404-3413. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-20-3444
72. Bar Y, Keenan JC, Niemierko A, et al. Genomic spectrum of actionable alterations in serial cell free DNA (cfDNA) analysis of patients with metastatic breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. Apr 11 2024;10(1):27. doi:10.1038/s41523-024-00633-7
73. Turner NC, Kingston B, Kilburn LS, et al. Circulating tumour DNA analysis to direct therapy in advanced breast cancer (plasmaMATCH): a multicentre, multicohort, phase 2a, platform trial. *Lancet Oncol*. Oct 2020;21(10):1296-1308. doi:10.1016/S1470-2045(20)30444-7
74. Martínez-Sáez O, Pascual T, Brasó-Maristany F, et al. Circulating tumor DNA dynamics in advanced breast cancer treated with CDK4/6 inhibition and endocrine therapy. *NPJ Breast Cancer*. Feb 3 2021;7(1):8. doi:10.1038/s41523-021-00218-8
75. Kurzrock R, Childress M, Li W, et al. Abstract 1209: Tumor informed circulating tumor DNA monitoring for early treatment response and survival outcomes on trastuzumab + pertuzumab. *Cancer Research*. 2024;84(6_Supplement):1209-1209. doi:10.1158/1538-7445.Am2024-1209
76. Allegretti M, Fabi A, Giordani E, et al. Liquid biopsy identifies actionable dynamic predictors of resistance to Trastuzumab Emtansine (T-DM1) in advanced HER2-positive breast cancer. *Mol Cancer*. Nov 29 2021;20(1):151. doi:10.1186/s12943-021-01438-z
77. Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Control Release*. Sep 15 2010;146(3):264-75. doi:10.1016/j.jconrel.2010.04.009
78. Carter P, Presta L, Gorman CM, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 15 1992;89(10):4285-9. doi:10.1073/pnas.89.10.4285
79. Vivekanandhan S, Knutson KL. Resistance to Trastuzumab. *Cancers (Basel)*. Oct 19 2022;14(20)doi:10.3390/cancers14205115
80. Lu Y, Zi X, Pollak M. Molecular mechanisms underlying IGF-I-induced attenuation of the growth-inhibitory activity of trastuzumab (Herceptin) on SKBR3 breast cancer cells. *Int J Cancer*. Jan 20 2004;108(3):334-41. doi:10.1002/ijc.11445
81. Junttila TT, Akita RW, Parsons K, et al. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell*. May 5 2009;15(5):429-40. doi:10.1016/j.ccr.2009.03.020
82. Diwanji D, Trenker R, Thaker TM, et al. Structures of the HER2–HER3–NRG1β complex reveal a dynamic dimer interface. *Nature*. 2021/12/01 2021;600(7888):339-343. doi:10.1038/s41586-021-04084-z

83. Gaborit N, Larbouret C, Vallaghe J, et al. Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) to analyze the disruption of EGFR/HER2 dimers: a new method to evaluate the efficiency of targeted therapy using monoclonal antibodies. *J Biol Chem*. Apr 1 2011;286(13):11337-45. doi:10.1074/jbc.M111.223503
84. Zhao J, Mohan N, Nussinov R, Ma B, Wu WJ. Trastuzumab Blocks the Receiver Function of HER2 Leading to the Population Shifts of HER2-Containing Homodimers and Heterodimers. *Antibodies*. 2021;10(1):7.
85. Lin YZ, Clinton GM. A soluble protein related to the HER-2 proto-oncogene product is released from human breast carcinoma cells. *Oncogene*. Apr 1991;6(4):639-43.
86. Liu PCC, Liu X, Li Y, et al. Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*. 2006/06/01 2006;5(6):657-664. doi:10.4161/cbt.5.6.2708
87. Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J, Baselga J. Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res*. Mar 15 1999;59(6):1196-201.
88. Molina MA, Sáez R, Ramsey EE, et al. NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. Feb 2002;8(2):347-53.
89. Christianson TA, Doherty JK, Lin YJ, et al. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res*. Nov 15 1998;58(22):5123-9.
90. Köstler WJ, Schwab B, Singer CF, et al. Monitoring of serum Her-2/neu predicts response and progression-free survival to trastuzumab-based treatment in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. Mar 1 2004;10(5):1618-24. doi:10.1158/1078-0432.ccr-0385-3
91. Fornier MN, Seidman AD, Schwartz MK, et al. Serum HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate. *Ann Oncol*. Feb 2005;16(2):234-9. doi:10.1093/annonc/mdi059
92. Jeong J, Shin JH, Li W, et al. MAL2 mediates the formation of stable HER2 signaling complexes within lipid raft-rich membrane protrusions in breast cancer cells. *Cell Rep*. Dec 28 2021;37(13):110160. doi:10.1016/j.celrep.2021.110160
93. Wymant JM, Sayers EJ, Muir D, Jones AT. Strategic Trastuzumab Mediated Crosslinking Driving Concomitant HER2 and HER3 Endocytosis and Degradation in Breast Cancer. *J Cancer*. 2020;11(11):3288-3302. doi:10.7150/jca.32470
94. Maadi H, Soheilifar MH, Choi WS, Moshtaghian A, Wang Z. Trastuzumab Mechanism of Action; 20 Years of Research to Unravel a Dilemma. *Cancers (Basel)*. Jul 15 2021;13(14)doi:10.3390/cancers13143540
95. Ram S, Kim D, Ober RJ, Ward ES. The level of HER2 expression is a predictor of antibody-HER2 trafficking behavior in cancer cells. *MAbs*. 2014;6(5):1211-9. doi:10.4161/mabs.29865
96. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*. Aug 2004;6(2):117-27. doi:10.1016/j.ccr.2004.06.022

97. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, et al. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol*. Oct 2010;177(4):1647-56. doi:10.2353/ajpath.2010.090885
98. Ghosh R, Narasanna A, Wang SE, et al. Trastuzumab Has Preferential Activity against Breast Cancers Driven by HER2 Homodimers. *Cancer Research*. 2011;71(5):1871-1882. doi:10.1158/0008-5472.Can-10-1872
99. Campbell MR, Ruiz-Saenz A, Zhang Y, et al. Extensive conformational and physical plasticity protects HER2-HER3 tumorigenic signaling. *Cell Rep*. Feb 1 2022;38(5):110285. doi:10.1016/j.celrep.2021.110285
100. Lane HA, Beuvink I, Motoyama AB, Daly JM, Neve RM, Hynes NE. ErbB2 Potentiates Breast Tumor Proliferation through Modulation of p27Kip1-Cdk2 Complex Formation: Receptor Overexpression Does Not Determine Growth Dependency. *Molecular and Cellular Biology*. 2000/05/01 2000;20(9):3210-3223. doi:10.1128/MCB.20.9.3210-3223.2000
101. Filipits M, Dafni U, Gnant M, et al. Association of p27 and Cyclin D1 Expression and Benefit from Adjuvant Trastuzumab Treatment in HER2-Positive Early Breast Cancer: A TransHERA Study. *Clin Cancer Res*. Jul 1 2018;24(13):3079-3086. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-17-3473
102. Ichikawa T, Sato F, Terasawa K, et al. Trastuzumab produces therapeutic actions by upregulating miR-26a and miR-30b in breast cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(2):e31422. doi:10.1371/journal.pone.0031422
103. Papadakis E, Robson N, Yeomans A, et al. A combination of trastuzumab and BAG-1 inhibition synergistically targets HER2 positive breast cancer cells. *Oncotarget*. Apr 5 2016;7(14):18851-64. doi:10.18632/oncotarget.7944
104. Carpenter RL, Lo HW. Regulation of Apoptosis by HER2 in Breast Cancer. *J Carcinog Mutagen*. 2013;2013(Suppl 7)doi:10.4172/2157-2518.S7-003
105. Henson ES, Hu X, Gibson SB. Herceptin sensitizes ErbB2-overexpressing cells to apoptosis by reducing antiapoptotic Mcl-1 expression. *Clin Cancer Res*. Feb 1 2006;12(3 Pt 1):845-53. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-05-0754
106. Boone JJ, Bhosle J, Tilby MJ, Hartley JA, Hochhauser D. Involvement of the HER2 pathway in repair of DNA damage produced by chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Ther*. Nov 2009;8(11):3015-23. doi:10.1158/1535-7163.Mct-09-0219
107. Pietras RJ, Poen JC, Gallardo D, Wongvipat PN, Lee HJ, Slamon DJ. Monoclonal antibody to HER-2/neureceptor modulates repair of radiation-induced DNA damage and enhances radiosensitivity of human breast cancer cells overexpressing this oncogene. *Cancer Res*. Mar 15 1999;59(6):1347-55.
108. Chakraborty AK, Mehra R, Digiovanna MP. Co-targeting ER and HER family receptors induces apoptosis in HER2-normal or overexpressing breast cancer models. *Anticancer Res*. Mar 2015;35(3):1243-50.
109. Sorace AG, Quarles CC, Whisenant JG, et al. Trastuzumab improves tumor perfusion and vascular delivery of cytotoxic therapy in a murine model of HER2+ breast cancer: preliminary results. *Breast Cancer Res Treat*. Jan 2016;155(2):273-84. doi:10.1007/s10549-016-3680-8
110. Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature*. Mar 21 2002;416(6878):279-80. doi:10.1038/416279b

111. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer*. Jan 30 2006;94(2):259-67. doi:10.1038/sj.bjc.6602930
112. Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol*. Jun 2019;105(6):1319-1329. doi:10.1002/jlb.Mr0718-269r
113. Muraro E, Comaro E, Talamini R, et al. Improved Natural Killer cell activity and retained anti-tumor CD8(+) T cell responses contribute to the induction of a pathological complete response in HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *J Transl Med*. Jun 27 2015;13:204. doi:10.1186/s12967-015-0567-0
114. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. Jan 2008;8(1):34-47. doi:10.1038/nri2206
115. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γ1, Fc γ2, Fc γ3, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γ1. *J Biol Chem*. Mar 2 2001;276(9):6591-604. doi:10.1074/jbc.M009483200
116. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc γ3-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc γ3, independently of the Fc γ3-48L/R/H phenotype. *Blood*. Aug 1 1997;90(3):1109-14.
117. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. Apr 2000;6(4):443-6. doi:10.1038/74704
118. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, et al. Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms and Clinical Efficacy of Trastuzumab-Based Therapy in Patients With HER-2/neu-Positive Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(11):1789-1796. doi:10.1200/jco.2007.14.8957
119. Tamura K, Shimizu C, Hojo T, et al. FcγR2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol*. Jun 2011;22(6):1302-1307. doi:10.1093/annonc/mdq585
120. Hurvitz SA, Betting DJ, Stern HM, et al. Analysis of Fcγ receptor 3A and 2A polymorphisms: lack of correlation with outcome in trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. Jun 15 2012;18(12):3478-86. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-11-2294
121. Rugo HS, Im SA, Cardoso F, et al. Margetuximab Versus Trastuzumab in Patients With Previously Treated HER2-Positive Advanced Breast Cancer (SOPHIA): Final Overall Survival Results From a Randomized Phase 3 Trial. *J Clin Oncol*. Jan 10 2023;41(2):198-205. doi:10.1200/JCO.21.02937
122. Shi Y, Fan X, Deng H, et al. Trastuzumab triggers phagocytic killing of high HER2 cancer cells in vitro and in vivo by interaction with Fcγ receptors on macrophages. *J Immunol*. May 1 2015;194(9):4379-86. doi:10.4049/jimmunol.1402891
123. Tsao LC, Crosby EJ, Trotter TN, et al. CD47 blockade augmentation of trastuzumab antitumor efficacy dependent on antibody-dependent cellular phagocytosis. *JCI Insight*. Dec 19 2019;4(24)doi:10.1172/jci.insight.131882

124. Bettadapur A, Miller HW, Ralston KS. Biting Off What Can Be Chewed: Trogocytosis in Health, Infection, and Disease. *Infection and Immunity*. 2020;88(7):10.1128/iai.00930-19. doi:doi:10.1128/iai.00930-19
125. Velmurugan R, Challa DK, Ram S, Ober RJ, Ward ES. Macrophage-Mediated Trogocytosis Leads to Death of Antibody-Opsonized Tumor Cells. *Mol Cancer Ther*. Aug 2016;15(8):1879-89. doi:10.1158/1535-7163.Mct-15-0335
126. Suzuki E, Kataoka TR, Hirata M, et al. Trogocytosis-mediated expression of HER2 on immune cells may be associated with a pathological complete response to trastuzumab-based primary systemic therapy in HER2-overexpressing breast cancer patients. *BMC Cancer*. Feb 6 2015;15:39. doi:10.1186/s12885-015-1041-3
127. Tsao LC, Crosby EJ, Trotter TN, et al. Trastuzumab/pertuzumab combination therapy stimulates antitumor responses through complement-dependent cytotoxicity and phagocytosis. *JCI Insight*. Mar 22 2022;7(6)doi:10.1172/jci.insight.155636
128. Taylor C, Hershman D, Shah N, et al. Augmented HER-2 specific immunity during treatment with trastuzumab and chemotherapy. *Clin Cancer Res*. Sep 1 2007;13(17):5133-43. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-07-0507
129. Norton N, Fox N, McCarl CA, et al. Generation of HER2-specific antibody immunity during trastuzumab adjuvant therapy associates with reduced relapse in resected HER2 breast cancer. *Breast Cancer Res*. Jun 14 2018;20(1):52. doi:10.1186/s13058-018-0989-8
130. Knutson KL, Clynes R, Shreeder B, et al. Improved Survival of HER2+ Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab and Chemotherapy Is Associated with Host Antibody Immunity against the HER2 Intracellular Domain. *Cancer Res*. Jul 1 2016;76(13):3702-10. doi:10.1158/0008-5472.Can-15-3091
131. Gall VA, Philips AV, Qiao N, et al. Trastuzumab Increases HER2 Uptake and Cross-Presentation by Dendritic Cells. *Cancer Res*. Oct 1 2017;77(19):5374-5383. doi:10.1158/0008-5472.Can-16-2774
132. Kono K, Sato E, Naganuma H, et al. Trastuzumab (Herceptin) enhances class I-restricted antigen presentation recognized by HER-2/neu-specific T cytotoxic lymphocytes. *Clin Cancer Res*. Apr 1 2004;10(7):2538-44. doi:10.1158/1078-0432.ccr-03-0424
133. Morales-Guadarrama G, García-Becerra R, Méndez-Pérez EA, García-Quiroz J, Avila E, Díaz L. Vasculogenic Mimicry in Breast Cancer: Clinical Relevance and Drivers. *Cells*. Jul 12 2021;10(7)doi:10.3390/cells10071758
134. Hori A, Shimoda M, Naoi Y, et al. Vasculogenic mimicry is associated with trastuzumab resistance of HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res*. Aug 6 2019;21(1):88. doi:10.1186/s13058-019-1167-3
135. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*. Aug 21 2009;138(4):645-659. doi:10.1016/j.cell.2009.06.034
136. Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, et al. Immune-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition In vivo Generates Breast Cancer Stem Cells. *Cancer Research*. 2009;69(7):2887-2895. doi:10.1158/0008-5472.Can-08-3343
137. Espinosa-Sánchez A, Suárez-Martínez E, Sánchez-Díaz L, Carnero A. Therapeutic Targeting of Signaling Pathways Related to Cancer Stemness. *Front Oncol*. 2020;10:1533. doi:10.3389/fonc.2020.01533

138. Magnifico A, Albano L, Campaner S, et al. Tumor-Initiating Cells of HER2-Positive Carcinoma Cell Lines Express the Highest Oncoprotein Levels and Are Sensitive to Trastuzumab. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(6):2010-2021. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-08-1327
139. Rodríguez CE, Berardi DE, Abrigo M, Todaro LB, Bal de Kier Joffé ED, Fiszman GL. Breast cancer stem cells are involved in Trastuzumab resistance through the HER2 modulation in 3D culture. *J Cell Biochem*. Feb 2018;119(2):1381-1391. doi:10.1002/jcb.26298
140. Grudzien P, Lo S, Albain KS, et al. Inhibition of Notch signaling reduces the stem-like population of breast cancer cells and prevents mammosphere formation. *Anticancer Res*. Oct 2010;30(10):3853-67.
141. Li Y, Chu J, Feng W, et al. EPHA5 mediates trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancers through regulating cancer stem cell-like properties. *Faseb j*. Apr 2019;33(4):4851-4865. doi:10.1096/fj.201701561RRRR
142. Lui GYL, Grandori C, Kemp CJ. CDK12: an emerging therapeutic target for cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 2018;71(11):957-962. doi:10.1136/jclinpath-2018-205356
143. Li H, Wang J, Yi Z, et al. CDK12 inhibition enhances sensitivity of HER2+ breast cancers to HER2-tyrosine kinase inhibitor via suppressing PI3K/AKT. *Eur J Cancer*. Mar 2021;145:92-108. doi:10.1016/j.ejca.2020.11.045
144. Choi HJ, Jin S, Cho H, et al. CDK12 drives breast tumor initiation and trastuzumab resistance via WNT and IRS1-ErbB-PI3K signaling. *EMBO Rep*. Oct 4 2019;20(10):e48058. doi:10.15252/embr.201948058
145. Wu Y, Ginther C, Kim J, et al. Expression of Wnt3 Activates Wnt/ β -Catenin Pathway and Promotes EMT-like Phenotype in Trastuzumab-Resistant HER2-Overexpressing Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Research*. 2012;10(12):1597-1606. doi:10.1158/1541-7786.Mcr-12-0155-t
146. Hartman ZC, Yang X-Y, Glass O, et al. HER2 Overexpression Elicits a Proinflammatory IL-6 Autocrine Signaling Loop That Is Critical for Tumorigenesis. *Cancer Research*. 2011;71(13):4380-4391. doi:10.1158/0008-5472.Can-11-0308
147. Marotta LLC, Almendro V, Marusyk A, et al. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44+CD24- stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *The Journal of Clinical Investigation*. 07/01/ 2011;121(7):2723-2735. doi:10.1172/JCI44745
148. Jiang L, Ren L, Chen H, et al. NCAPG confers trastuzumab resistance via activating SRC/STAT3 signaling pathway in HER2-positive breast cancer. *Cell Death Dis*. Jul 18 2020;11(7):547. doi:10.1038/s41419-020-02753-x
149. Koziel JE, Herbert BS. The telomerase inhibitor imetelstat alone, and in combination with trastuzumab, decreases the cancer stem cell population and self-renewal of HER2+ breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. Feb 2015;149(3):607-18. doi:10.1007/s10549-015-3270-1
150. Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer*. Feb 1 2017;16(1):31. doi:10.1186/s12943-017-0597-8
151. Daverey A, Drain AP, Kidambi S. Physical Intimacy of Breast Cancer Cells with Mesenchymal Stem Cells Elicits Trastuzumab Resistance through Src Activation. *Sci Rep*. Sep 8 2015;5:13744. doi:10.1038/srep13744

152. Qiu Y, Yang L, Liu H, Luo X. Cancer Stem Cell-Targeted Therapeutic Approaches for Overcoming Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Stem Cells*. 2021;39(9):1125-1136. doi:10.1002/stem.3381
153. Zhao Y, Liu H, Liu Z, et al. Overcoming Trastuzumab Resistance in Breast Cancer by Targeting Dysregulated Glucose Metabolism. *Cancer Research*. 2011;71(13):4585-4597. doi:10.1158/0008-5472.Can-11-0127
154. Lenz G, Hamilton A, Geng S, et al. t-Darpp Activates IGF-1R Signaling to Regulate Glucose Metabolism in Trastuzumab-Resistant Breast Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(5):1216-1226. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-17-0824
155. Gale M, Li Y, Cao J, et al. Acquired Resistance to HER2-Targeted Therapies Creates Vulnerability to ATP Synthase Inhibition. *Cancer Research*. 2020;80(3):524-535. doi:10.1158/0008-5472.Can-18-3985
156. Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, et al. Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 20 2004;101(29):10715-20. doi:10.1073/pnas.0403390101
157. Vazquez-Martin A, Fernandez-Real JM, Oliveras-Ferraros C, et al. Fatty acid synthase activity regulates HER2 extracellular domain shedding into the circulation of HER2-positive metastatic breast cancer patients. *Int J Oncol*. 2009/12/01 2009;35(6):1369-1376. doi:10.3892/ijo_00000455
158. Cordero A, Kanojia D, Miska J, et al. FABP7 is a key metabolic regulator in HER2+ breast cancer brain metastasis. *Oncogene*. Sep 2019;38(37):6445-6460. doi:10.1038/s41388-019-0893-4
159. Feng WW, Wilkins O, Bang S, et al. CD36-Mediated Metabolic Rewiring of Breast Cancer Cells Promotes Resistance to HER2-Targeted Therapies. *Cell Rep*. Dec 10 2019;29(11):3405-3420.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.11.008
160. Ligorio F, Di Cosimo S, Verderio P, et al. Predictive Role of CD36 Expression in HER2-Positive Breast Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Trastuzumab. *J Natl Cancer Inst*. Dec 8 2022;114(12):1720-1727. doi:10.1093/jnci/djac126
161. Luque-Cabal M, García-Tejido P, Fernández-Pérez Y, Sánchez-Lorenzo L, Palacio-Vázquez I. Mechanisms behind the Resistance to Trastuzumab in HER2-Amplified Breast Cancer and Strategies to Overcome It. *Clinical Medicine Insights: Oncology*. 2016;10s1:CMO.S34537. doi:10.4137/cmo.S34537
162. Gallardo A, Lerma E, Escuin D, et al. Increased signalling of EGFR and IGF1R, and deregulation of PTEN/PI3K/Akt pathway are related with trastuzumab resistance in HER2 breast carcinomas. *British Journal of Cancer*. 2012/04/01 2012;106(8):1367-1373. doi:10.1038/bjc.2012.85
163. DiGiovanna MP, Stern DF, Edgerton SM, Whalen SG, II DM, Thor AD. Relationship of Epidermal Growth Factor Receptor Expression to ErbB-2 Signaling Activity and Prognosis in Breast Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(6):1152-1160. doi:10.1200/jco.2005.09.055
164. Diermeier S, Horváth G, Knuechel-Clarke R, Hofstaedter F, Szöllosi J, Brockhoff G. Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp Cell Res*. Apr 1 2005;304(2):604-19. doi:10.1016/j.yexcr.2004.12.008

165. Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res.* Jun 1 2002;62(11):3151-8.
166. Ueda S, Tsuda H, Sato K, et al. Alternative tyrosine phosphorylation of signaling kinases according to hormone receptor status in breast cancer overexpressing the insulin-like growth factor receptor type 1. *Cancer Science.* 2006;97(7):597-604. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00228.x>
167. Nahta R, Yuan LXH, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ. Insulin-like Growth Factor-I Receptor/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Heterodimerization Contributes to Trastuzumab Resistance of Breast Cancer Cells. *Cancer Research.* 2005;65(23):11118-11128. doi:10.1158/0008-5472.Can-04-3841
168. Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL, III, Sweeney C. Met Receptor Contributes to Trastuzumab Resistance of Her2-Overexpressing Breast Cancer Cells. *Cancer Research.* 2008;68(5):1471-1477. doi:10.1158/0008-5472.Can-07-5962
169. Takeda T, Yamamoto H, Kanzaki H, et al. Yes1 signaling mediates the resistance to Trastuzumab/Lap atinib in breast cancer. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171356. doi:10.1371/journal.pone.0171356
170. Zhuang G, Brantley-Sieders DM, Vaught D, et al. Elevation of Receptor Tyrosine Kinase EphA2 Mediates Resistance to Trastuzumab Therapy. *Cancer Research.* 2010;70(1):299-308. doi:10.1158/0008-5472.Can-09-1845
171. Liang K, Esteva FJ, Albarracin C, et al. Recombinant human erythropoietin antagonizes trastuzumab treatment of breast cancer cells via Jak2-mediated Src activation and PTEN inactivation. *Cancer Cell.* Nov 16 2010;18(5):423-35. doi:10.1016/j.ccr.2010.10.025
172. Liu D, Yang Z, Wang T, et al. β 2-AR signaling controls trastuzumab resistance-dependent pathway. *Oncogene.* Jan 7 2016;35(1):47-58. doi:10.1038/onc.2015.58
173. Wang Y-C, Morrison G, Gillihan R, et al. Different mechanisms for resistance to trastuzumab versus lapatinib in HER2- positive breast cancers - role of estrogen receptor and HER2 reactivation. *Breast Cancer Research.* 2011/11/28 2011;13(6):R121. doi:10.1186/bcr3067
174. Kwon YS, Nam KS, Kim S. Tamoxifen overcomes the trastuzumab-resistance of SK-BR-3 tumorspheres by targeting crosstalk between cytoplasmic estrogen receptor α and the EGFR/HER2 signaling pathway. *Biochem Pharmacol.* Aug 2021;190:114635. doi:10.1016/j.bcp.2021.114635
175. Liu S, Xie SM, Liu W, et al. Targeting CXCR4 abrogates resistance to trastuzumab by blocking cell cycle progression and synergizes with docetaxel in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res.* Jun 6 2023;25(1):62. doi:10.1186/s13058-023-01665-w
176. Mukund K, Alva-Ornelas JA, Maddox AL, et al. Molecular Atlas of HER2+ Breast Cancer Cells Treated with Endogenous Ligands: Temporal Insights into Mechanisms of Trastuzumab Resistance. *Cancers (Basel).* Jan 27 2024;16(3)doi:10.3390/cancers16030553
177. Berns K, Sonnenblick A, Gennissen A, et al. Loss of ARID1A Activates ANXA1, which Serves as a Predictive Biomarker for Trastuzumab Resistance. *Clinical Cancer Research.* 2016;22(21):5238-5248. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-15-2996
178. Silva-Oliveira R, Pereira FF, Petronilho S, et al. Clinical Significance of ARID1A and ANXA1 in HER-2 Positive Breast Cancer. *J Clin Med.* Dec 2 2020;9(12)doi:10.3390/jcm9123911

179. Arribas J, Baselga J, Pedersen K, Parra-Palau JL. p95HER2 and Breast Cancer. *Cancer Research*. 2011;71(5):1515-1519. doi:10.1158/0008-5472.Can-10-3795
180. Sperinde J, Jin X, Banerjee J, et al. Quantitation of p95HER2 in Paraffin Sections by Using a p95-Specific Antibody and Correlation with Outcome in a Cohort of Trastuzumab-Treated Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(16):4226-4235. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-10-0410
181. Goh CW, Zhang L, Chi W-R, et al. Abstract P5-02-53: P95HER2 Expression in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancer Research*. 2023;83(5_Supplement):P5-02-53-P5-02-53. doi:10.1158/1538-7445.Sabcs22-p5-02-53
182. Castiglioni F, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM, Balsari A, Ménard S. Role of exon-16-deleted HER2 in breast carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. Mar 2006;13(1):221-32. doi:10.1677/erc.1.01047
183. Marchini C, Gabrielli F, Iezzi M, et al. The human splice variant $\Delta 16$ HER2 induces rapid tumor onset in a reporter transgenic mouse. *PLoS One*. Apr 29 2011;6(4):e18727. doi:10.1371/journal.pone.0018727
184. Castagnoli L, Ladomery M, Tagliabue E, Pupa SM. The d16HER2 Splice Variant: A Friend or Foe of HER2-Positive Cancers? *Cancers*. 2019;11(7):902.
185. Alajati A, Sausgruber N, Aceto N, et al. Mammary Tumor Formation and Metastasis Evoked by a HER2 Splice Variant. *Cancer Research*. 2013;73(17):5320-5327. doi:10.1158/0008-5472.Can-12-3186
186. Turpin J, Ling C, Crosby EJ, et al. The ErbB2 Δ Ex16 splice variant is a major oncogenic driver in breast cancer that promotes a pro-metastatic tumor microenvironment. *Oncogene*. Nov 24 2016;35(47):6053-6064. doi:10.1038/onc.2016.129
187. Huynh FC, Jones FE. MicroRNA-7 Inhibits Multiple Oncogenic Pathways to Suppress HER2 $\Delta 16$ Mediated Breast Tumorigenesis and Reverse Trastuzumab Resistance. *PLOS ONE*. 2014;9(12):e114419. doi:10.1371/journal.pone.0114419
188. Mitra D, Brumlik MJ, Okamgba SU, et al. An oncogenic isoform of HER2 associated with locally disseminated breast cancer and trastuzumab resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2009;8(8):2152-2162. doi:10.1158/1535-7163.Mct-09-0295
189. Ocaña A, Amir E, Pandiella A. HER2 heterogeneity and resistance to anti-HER2 antibody-drug conjugates. *Breast Cancer Research*. 2020/01/31 2020;22(1):15. doi:10.1186/s13058-020-1252-7
190. Seol H, Lee HJ, Choi Y, et al. Intratumoral heterogeneity of *HER2* gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Modern Pathology*. 2012;25(7):938-948. doi:10.1038/modpathol.2012.36
191. Lee HJ, Seo AN, Kim EJ, et al. HER2 Heterogeneity Affects Trastuzumab Responses and Survival in Patients With HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*. 2014;142(6):755-766. doi:10.1309/ajcpirl4guvgk3yx
192. Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, et al. Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res*. Dec 1 2009;15(23):7381-8. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1735
193. Citri A, Kochupurakkal BS, Yarden Y. The achilles heel of ErbB-2/HER2: regulation by the Hsp90 chaperone machine and potential for pharmacological intervention. *Cell Cycle*. Jan 2004;3(1):51-60.

194. Scaltriti M, Serra V, Normant E, et al. Antitumor Activity of the Hsp90 Inhibitor IPI-504 in HER2-Positive Trastuzumab-Resistant Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2011;10(5):817-824. doi:10.1158/1535-7163.Mct-10-0966
195. Modi S, Stopeck A, Linden H, et al. HSP90 Inhibition Is Effective in Breast Cancer: A Phase II Trial of Tanespimycin (17-AAG) Plus Trastuzumab in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Progressing on Trastuzumab. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(15):5132-5139. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-11-0072
196. Park JM, Kim Y-J, Park S, et al. A novel HSP90 inhibitor targeting the C-terminal domain attenuates trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer. *Molecular Cancer*. 2020/11/20 2020;19(1):161. doi:10.1186/s12943-020-01283-6
197. Sauvage F, Messaoudi S, Fattal E, Barratt G, Vergnaud-Gauduchon J. Heat shock proteins and cancer: How can nanomedicine be harnessed? *J Control Release*. Feb 28 2017;248:133-143. doi:10.1016/j.jconrel.2017.01.013
198. Hamel S, Bouchard A, Ferrario C, et al. Both t-Darpp and DARPP-32 can cause resistance to trastuzumab in breast cancer cells and are frequently expressed in primary breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. Feb 2010;120(1):47-57. doi:10.1007/s10549-009-0364-7
199. Belkhiri A, Dar AA, Peng DF, et al. Expression of t-DARPP Mediates Trastuzumab Resistance in Breast Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(14):4564-4571. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-08-0121
200. Nagy P, Friedländer E, Tanner M, et al. Decreased Accessibility and Lack of Activation of ErbB2 in JIMT-1, a Herceptin-Resistant, MUC4-Expressing Breast Cancer Cell Line. *Cancer Research*. 2005;65(2):473-482. doi:10.1158/0008-5472.473.65.2
201. Workman HC, Miller JK, Ingalla EQ, et al. The membrane mucin MUC4 is elevated in breast tumor lymph node metastases relative to matched primary tumors and confers aggressive properties to breast cancer cells. *Breast Cancer Research*. 2009/09/18 2009;11(5):R70. doi:10.1186/bcr2364
202. Mercogliano MF, De Martino M, Venturutti L, et al. TNF α -Induced Mucin 4 Expression Elicits Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. Feb 1 2017;23(3):636-648. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-16-0970
203. Li G, Zhao L, Li W, et al. Feedback activation of STAT3 mediates trastuzumab resistance via upregulation of MUC1 and MUC4 expression. *Oncotarget*. Sep 30 2014;5(18):8317-29. doi:10.18632/oncotarget.2135
204. Pályi-Krek Z, Barok M, Isola J, Tammi M, Szöllosi J, Nagy P. Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *Eur J Cancer*. Nov 2007;43(16):2423-33. doi:10.1016/j.ejca.2007.08.018
205. Chaganty BKR, Qiu S, Gest A, et al. Trastuzumab upregulates PD-L1 as a potential mechanism of trastuzumab resistance through engagement of immune effector cells and stimulation of IFN γ secretion. *Cancer Letters*. 2018/08/28/ 2018;430:47-56. doi:<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.05.009>
206. Zheng G, Guo Z, Li W, et al. Interaction between HLA-G and NK cell receptor KIR2DL4 orchestrates HER2-positive breast cancer resistance to trastuzumab. *Signal Transduct Target Ther*. Jun 23 2021;6(1):236. doi:10.1038/s41392-021-00629-w
207. Loi S, Giobbie-Hurder A, Gombos A, et al. Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-

- arm, multicentre, phase 1b-2 trial. *Lancet Oncol.* Mar 2019;20(3):371-382. doi:10.1016/s1470-2045(18)30812-x
208. Darwich A, Silvestri A, Benmehbarek M-R, et al. Paralysis of the cytotoxic granule machinery is a new cancer immune evasion mechanism mediated by chitinase 3-like-1. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 2021;9(11):e003224. doi:10.1136/jitc-2021-003224
209. Zazo S, González-Alonso P, Martín-Aparicio E, et al. Autocrine CCL5 Effect Mediates Trastuzumab Resistance by ERK Pathway Activation in HER2-Positive Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2020;19(8):1696-1707. doi:10.1158/1535-7163.Mct-19-1172
210. Tan MCB, Goedegebuure PS, Belt BA, et al. Disruption of CCR5-Dependent Homing of Regulatory T Cells Inhibits Tumor Growth in a Murine Model of Pancreatic Cancer1. *The Journal of Immunology.* 2009;182(3):1746-1755. doi:10.4049/jimmunol.182.3.1746
211. Mamidi S, Cinci M, Hasmann M, Fehring V, Kirschfink M. Lipoplex mediated silencing of membrane regulators (CD46, CD55 and CD59) enhances complement-dependent anti-tumor activity of trastuzumab and pertuzumab. *Molecular Oncology.* 2013;7(3):580-594. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.02.011>
212. Nahta R, Hung M-C, Esteva FJ. The HER-2-Targeting Antibodies Trastuzumab and Pertuzumab Synergistically Inhibit the Survival of Breast Cancer Cells. *Cancer Research.* 2004;64(7):2343-2346. doi:10.1158/0008-5472.Can-03-3856
213. Gerratana L, Bonotto M, Bozza C, et al. Pertuzumab and breast cancer: another piece in the anti-HER2 puzzle. *Expert Opin Biol Ther.* Mar 2017;17(3):365-374. doi:10.1080/14712598.2017.1282944
214. Bianchini G, Pusztai L, Pienkowski T, et al. Immune modulation of pathologic complete response after neoadjuvant HER2-directed therapies in the NeoSphere trial. *Ann Oncol.* Dec 2015;26(12):2429-36. doi:10.1093/annonc/mdv395
215. Zhang Y, Wu S, Zhuang X, et al. Identification of an Activating Mutation in the Extracellular Domain of HER2 Conferring Resistance to Pertuzumab. *OncoTargets and Therapy.* 2019/12/30 2019;12(null):11597-11608. doi:10.2147/OTT.S232912
216. Hutcheson I, Barrow D, Hasmann M, Nicholson R. Induction of erbB3/EGFR heterodimers mediates resistance to pertuzumab in a tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cell line. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2007;6(11_Supplement):A118-A118.
217. Wuerkenbieke D, Wang J, Li Y, Ma C. miRNA-150 downregulation promotes pertuzumab resistance in ovarian cancer cells via AKT activation. *Arch Gynecol Obstet.* Nov 2015;292(5):1109-16. doi:10.1007/s00404-015-3742-x
218. Irie H, Kawabata R, Fujioka Y, et al. Acquired resistance to trastuzumab/pertuzumab or to T-DM1 in vivo can be overcome by HER2 kinase inhibition with TAS0728. *Cancer Science.* 2020;111(6):2123-2131. doi:<https://doi.org/10.1111/cas.14407>
219. Hanker AB, Estrada MV, Bianchini G, et al. Extracellular Matrix/Integrin Signaling Promotes Resistance to Combined Inhibition of HER2 and PI3K in HER2+ Breast Cancer. *Cancer Research.* 2017;77(12):3280-3292. doi:10.1158/0008-5472.Can-16-2808

220. Sanz-Álvarez M, Luque M, Morales-Gallego M, et al. Generation and Characterization of Trastuzumab/Pertuzumab-Resistant HER2-Positive Breast Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci*. Dec 22 2023;25(1)doi:10.3390/ijms25010207
221. Gaibar M, Novillo A, Romero-Lorca A, et al. FGFR1 Amplification and Response to Neoadjuvant Anti-HER2 Treatment in Early HER2-Positive Breast Cancer. *Pharmaceutics*. 2022;14(2):242.
222. Krzyscik MA, Hristova K. Abstract 1917: HER2-FGFR1 interaction induced by bispecific molecules: A novel strategy for treating breast cancer. *Cancer Research*. 2024;84(6_Supplement):1917-1917. doi:10.1158/1538-7445.Am2024-1917
223. Alasmari MM. A Review of Margetuximab-Based Therapies in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. Dec 21 2022;15(1)doi:10.3390/cancers15010038
224. Schlam I, Nunes R, Lynce F. Profile of Margetuximab: Evidence to Date in the Targeted Treatment of Metastatic HER2-positive Breast Cancer. *Onco Targets Ther*. 2022;15:471-478. doi:10.2147/ott.S272197
225. Weisser NE, Sanches M, Escobar-Cabrera E, et al. An anti-HER2 biparatopic antibody that induces unique HER2 clustering and complement-dependent cytotoxicity. *Nat Commun*. Mar 13 2023;14(1):1394. doi:10.1038/s41467-023-37029-3
226. DiPeri TP, Evans KW, Wang B, et al. Co-clinical Trial of Novel Bispecific Anti-HER2 Antibody Zanidatamab in Patient-Derived Xenografts. *Cancer Discov*. May 1 2024;14(5):828-845. doi:10.1158/2159-8290.Cd-23-0838
227. Voigtlaender M, Schneider-Merck T, Trepel M. Lapatinib. *Recent Results Cancer Res*. 2018;211:19-44. doi:10.1007/978-3-319-91442-8_2
228. Wood ER, Truesdale AT, McDonald OB, et al. A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res*. Sep 15 2004;64(18):6652-9. doi:10.1158/0008-5472.Can-04-1168
229. Xia W, Liu LH, Ho P, Spector NL. Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene*. Jan 22 2004;23(3):646-53. doi:10.1038/sj.onc.1207166
230. Gril B, Palmieri D, Bronder JL, et al. Effect of lapatinib on the outgrowth of metastatic breast cancer cells to the brain. *J Natl Cancer Inst*. Aug 6 2008;100(15):1092-103. doi:10.1093/jnci/djn216
231. Lin NU, Winer EP. New targets for therapy in breast cancer: small molecule tyrosine kinase inhibitors. *Breast Cancer Res*. 2004;6(5):204-10. doi:10.1186/bcr919
232. Burris HA, 3rd. Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib. *Oncologist*. 2004;9 Suppl 3:10-5. doi:10.1634/theoncologist.9-suppl_3-10
233. D'Amato V, Raimondo L, Formisano L, et al. Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer. *Cancer Treat Rev*. Dec 2015;41(10):877-83. doi:10.1016/j.ctrv.2015.08.001
234. Sergina NV, Rausch M, Wang D, et al. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature*. Jan 25 2007;445(7126):437-41. doi:10.1038/nature05474

235. Jiang Y, Zou L, Lu W-Q, Zhang Y, Shen A-G. Foxo3a Expression Is a Prognostic Marker in Breast Cancer. *PLOS ONE*. 2013;8(8):e70746. doi:10.1371/journal.pone.0070746
236. Garrett JT, Olivares MG, Rinehart C, et al. Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(12):5021-5026. doi:10.1073/pnas.1016140108
237. Paulson AK, Linklater ES, Berghuis BD, et al. MET and ERBB2 are coexpressed in ERBB2+ breast cancer and contribute to innate resistance. *Mol Cancer Res*. Sep 2013;11(9):1112-21. doi:10.1158/1541-7786.Mcr-13-0042
238. Chen CT, Kim H, Liska D, Gao S, Christensen JG, Weiser MR. MET activation mediates resistance to lapatinib inhibition of HER2-amplified gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther*. Mar 2012;11(3):660-9. doi:10.1158/1535-7163.Mct-11-0754
239. Zhang Y-X, Knyazev PG, Cheburkin YV, et al. AXL Is a Potential Target for Therapeutic Intervention in Breast Cancer Progression. *Cancer Research*. 2008;68(6):1905-1915. doi:10.1158/0008-5472.Can-07-2661
240. Liu L, Greger J, Shi H, et al. Novel Mechanism of Lapatinib Resistance in HER2-Positive Breast Tumor Cells: Activation of AXL. *Cancer Research*. 2009;69(17):6871-6878. doi:10.1158/0008-5472.Can-08-4490
241. Hegde PS, Rusnak D, Bertiaux M, et al. Delineation of molecular mechanisms of sensitivity to lapatinib in breast cancer cell lines using global gene expression profiles. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2007;6(5):1629-1640. doi:10.1158/1535-7163.Mct-05-0399
242. Elster N, Cremona M, Morgan C, et al. A preclinical evaluation of the PI3K alpha/delta dominant inhibitor BAY 80-6946 in HER2-positive breast cancer models with acquired resistance to the HER2-targeted therapies trastuzumab and lapatinib. *Breast Cancer Res Treat*. Jan 2015;149(2):373-83. doi:10.1007/s10549-014-3239-5
243. Brady SW, Zhang J, Tsai MH, Yu D. PI3K-independent mTOR activation promotes lapatinib resistance and IAP expression that can be effectively reversed by mTOR and Hsp90 inhibition. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(3):402-11. doi:10.1080/15384047.2014.1002693
244. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Colomer R, Brunet J, Menendez JA. Low-scale phosphoproteome analyses identify the mTOR effector p70 S6 kinase 1 as a specific biomarker of the dual-HER1/HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib (Tykerb) in human breast carcinoma cells. *Ann Oncol*. Jun 2008;19(6):1097-109. doi:10.1093/annonc/mdm589
245. Roskoski R, Jr. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res*. Apr 2015;94:9-25. doi:10.1016/j.phrs.2015.01.003
246. Rexer BN, Ham AJ, Rinehart C, et al. Phosphoproteomic mass spectrometry profiling links Src family kinases to escape from HER2 tyrosine kinase inhibition. *Oncogene*. Oct 6 2011;30(40):4163-74. doi:10.1038/onc.2011.130
247. Formisano L, Nappi L, Rosa R, et al. Epidermal growth factor-receptor activation modulates Src-dependent resistance to lapatinib in breast cancer models. *Breast Cancer Res*. May 5 2014;16(3):R45. doi:10.1186/bcr3650
248. Marra A, Selenica P, Zhu Y, et al. CCNE1 amplification as marker of poor prognosis and novel therapeutic target in advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2024;42(16_suppl):1040-1040. doi:10.1200/JCO.2024.42.16_suppl.1040

249. Xiang B, Chatti K, Qiu H, et al. Brk is coamplified with ErbB2 to promote proliferation in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 26 2008;105(34):12463-8. doi:10.1073/pnas.0805009105
250. Allen-Petersen BL, Carter CJ, Ohm AM, Reyland ME. Protein kinase C δ is required for ErbB2-driven mammary gland tumorigenesis and negatively correlates with prognosis in human breast cancer. *Oncogene*. Mar 6 2014;33(10):1306-15. doi:10.1038/onc.2013.59
251. Park SH, Ito K, Olcott W, Katsyv I, Halstead-Nussloch G, Irie HY. PTK6 inhibition promotes apoptosis of Lapatinib-resistant Her2(+) breast cancer cells by inducing Bim. *Breast Cancer Res*. Jun 19 2015;17(1):86. doi:10.1186/s13058-015-0594-z
252. Stuhlmiller Timothy J, Miller Samantha M, Zawistowski Jon S, et al. Inhibition of Lapatinib-Induced Kinome Reprogramming in ERBB2-Positive Breast Cancer by Targeting BET Family Bromodomains. *Cell Reports*. 2015/04/21/ 2015;11(3):390-404. doi:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.037>
253. Moody SE, Schinzel AC, Singh S, et al. PRKACA mediates resistance to HER2-targeted therapy in breast cancer cells and restores anti-apoptotic signaling. *Oncogene*. Apr 16 2015;34(16):2061-71. doi:10.1038/onc.2014.153
254. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature*. Jul 26 2012;487(7408):505-9. doi:10.1038/nature11249
255. Sato Y, Yashiro M, Takakura N. Heregulin induces resistance to lapatinib-mediated growth inhibition of HER2-amplified cancer cells. *Cancer Science*. 2013;104(12):1618-1625. doi:<https://doi.org/10.1111/cas.12290>
256. Xia W, Petricoin EF, 3rd, Zhao S, et al. An heregulin-EGFR-HER3 autocrine signaling axis can mediate acquired lapatinib resistance in HER2+ breast cancer models. *Breast Cancer Res*. 2013;15(5):R85. doi:10.1186/bcr3480
257. Fagan DH, Yee D. Crosstalk between IGF1R and estrogen receptor signaling in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. Dec 2008;13(4):423-9. doi:10.1007/s10911-008-9098-0
258. Xia W, Bacus S, Hegde P, et al. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(20):7795-7800. doi:10.1073/pnas.0602468103
259. Giuliano M, Hu H, Wang Y-C, et al. Upregulation of ER Signaling as an Adaptive Mechanism of Cell Survival in HER2-Positive Breast Tumors Treated with Anti-HER2 Therapy. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(17):3995-4003. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-14-2728
260. O'Keefe K, Elliott A, Livasy C, et al. HER2 alterations and prognostic implications in all subtypes of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(16_suppl):1041-1041. doi:10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.1041
261. Petrelli F, Tomasello G, Barni S, Lonati V, Passalacqua R, Ghidini M. Clinical and pathological characterization of HER2 mutations in human breast cancer: a systematic review of the literature. *Breast Cancer Res Treat*. Nov 2017;166(2):339-349. doi:10.1007/s10549-017-4419-x
262. Zuo W-J, Jiang Y-Z, Wang Y-J, et al. Dual Characteristics of Novel HER2 Kinase Domain Mutations in Response to HER2-Targeted Therapies in Human Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(19):4859-4869. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-15-3036

263. Wetterskog D, Shiu KK, Chong I, et al. Identification of novel determinants of resistance to lapatinib in ERBB2-amplified cancers. *Oncogene*. Feb 20 2014;33(8):966-76. doi:10.1038/onc.2013.41
264. Huynh TK, Huang CH, Chen JY, et al. miR-221 confers lapatinib resistance by negatively regulating p27(kip1) in HER2-positive breast cancer. *Cancer Sci*. Oct 2021;112(10):4234-4245. doi:10.1111/cas.15107
265. Xuhong JC, Qi XW, Zhang Y, Jiang J. Mechanism, safety and efficacy of three tyrosine kinase inhibitors lapatinib, neratinib and pyrotinib in HER2-positive breast cancer. *Am J Cancer Res*. 2019;9(10):2103-2119.
266. Seyhan AA, Varadarajan U, Choe S, Liu W, Ryan TE. A genome-wide RNAi screen identifies novel targets of neratinib resistance leading to identification of potential drug resistant genetic markers. *Mol Biosyst*. Apr 2012;8(5):1553-70. doi:10.1039/c2mb05512k
267. Breslin S, Lowry MC, O'Driscoll L. Neratinib resistance and cross-resistance to other HER2-targeted drugs due to increased activity of metabolism enzyme cytochrome P4503A4. *Br J Cancer*. Feb 28 2017;116(5):620-625. doi:10.1038/bjc.2016.445
268. Hanker AB, Brewer MR, Sheehan JH, et al. An Acquired HER2(T798I) Gatekeeper Mutation Induces Resistance to Neratinib in a Patient with HER2 Mutant-Driven Breast Cancer. *Cancer Discov*. Jun 2017;7(6):575-585. doi:10.1158/2159-8290.Cd-16-1431
269. Marín A, Mamun AA, Patel H, et al. Acquired Secondary HER2 Mutations Enhance HER2/MAPK Signaling and Promote Resistance to HER2 Kinase Inhibition in Breast Cancer. *Cancer Res*. Sep 15 2023;83(18):3145-3158. doi:10.1158/0008-5472.Can-22-3617
270. Sudhan DR, Guerrero-Zotano A, Won H, et al. Hyperactivation of TORC1 Drives Resistance to the Pan-HER Tyrosine Kinase Inhibitor Neratinib in HER2-Mutant Cancers. *Cancer Cell*. Feb 10 2020;37(2):183-199.e5. doi:10.1016/j.ccell.2019.12.013
271. Al-Akhrass H, Conway JRW, Poulsen ASA, et al. A feed-forward loop between SorLA and HER3 determines heregulin response and neratinib resistance. *Oncogene*. Feb 2021;40(7):1300-1317. doi:10.1038/s41388-020-01604-5
272. Shinde A, Kulkoyluoglu C, Cotel E, Chen H, et al. Transglutaminase-2 mediates acquisition of neratinib resistance in metastatic breast cancer. *Mol Biomed*. Jun 22 2022;3(1):19. doi:10.1186/s43556-022-00079-y
273. Takeda T, Yamamoto H, Suzawa K, et al. YES1 activation induces acquired resistance to neratinib in HER2-amplified breast and lung cancers. *Cancer Sci*. Mar 2020;111(3):849-856. doi:10.1111/cas.14289
274. Karakas B, Ozmay Y, Basaga H, Gul O, Kutuk O. Distinct apoptotic blocks mediate resistance to panHER inhibitors in HER2+ breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2018/08/01/ 2018;1865(8):1073-1087. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.05.002>
275. O'Brien NA, Huang HKT, McDermott MSJ, et al. Tucatinib has Selective Activity in HER2-Positive Cancers and Significant Combined Activity with Approved and Novel Breast Cancer-Targeted Therapies. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2022;21(5):751-761. doi:10.1158/1535-7163.Mct-21-0847
276. Liao F-T, Gordon T, Liu CC, et al. Abstract P1-13-17: Hyperactivation of the EGFR pathway is associated with resistance to tucatinib in HER2-positive breast cancer

- models. *Cancer Research*. 2023;83(5_Supplement):P1-13-17-P1-13-17. doi:10.1158/1538-7445.Sabcs22-p1-13-17
277. Veeraraghavan J, Mistry R, Nanda S, et al. Abstract 1911: HER2 L755S mutation is associated with acquired resistance to lapatinib and neratinib, and confers cross-resistance to tucatinib in HER2-positive breast cancer models. *Cancer Research*. 2020;80(16_Supplement):1911-1911. doi:10.1158/1538-7445.Am2020-1911
278. Tsuchikama K, An Z. Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein & Cell*. 2016;9(1):33-46. doi:10.1007/s13238-016-0323-0
279. Hunter FW, Barker HR, Lipert B, et al. Mechanisms of resistance to trastuzumab emtansine (T-DM1) in HER2-positive breast cancer. *Br J Cancer*. Mar 2020;122(5):603-612. doi:10.1038/s41416-019-0635-y
280. Loganzo F, Tan X, Sung M, et al. Tumor Cells Chronically Treated with a Trastuzumab–Maytansinoid Antibody–Drug Conjugate Develop Varied Resistance Mechanisms but Respond to Alternate Treatments. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2015;14(4):952-963. doi:10.1158/1535-7163.Mct-14-0862
281. Sakai H, Tsurutani J, Iwasa T, et al. HER2 genomic amplification in circulating tumor DNA and estrogen receptor positivity predict primary resistance to trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer*. Sep 2018;25(5):605-613. doi:10.1007/s12282-018-0861-9
282. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res*. Jun 15 2001;61(12):4744-9.
283. Sung M, Tan X, Lu B, et al. Caveolae-Mediated Endocytosis as a Novel Mechanism of Resistance to Trastuzumab Emtansine (T-DM1). *Mol Cancer Ther*. Jan 2018;17(1):243-253. doi:10.1158/1535-7163.Mct-17-0403
284. Loibl S, Majewski I, Guarneri V, et al. PIK3CA mutations are associated with reduced pathological complete response rates in primary HER2-positive breast cancer: pooled analysis of 967 patients from five prospective trials investigating lapatinib and trastuzumab. *Ann Oncol*. Aug 2016;27(8):1519-25. doi:10.1093/annonc/mdw197
285. Baselga J, Lewis Phillips GD, Verma S, et al. Relationship between Tumor Biomarkers and Efficacy in EMILIA, a Phase III Study of Trastuzumab Emtansine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. Aug 1 2016;22(15):3755-63. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-15-2499
286. Kim S-B, Wildiers H, Krop IE, et al. Relationship between tumor biomarkers and efficacy in TH3RESA, a phase III study of trastuzumab emtansine (T-DM1) vs. treatment of physician's choice in previously treated HER2-positive advanced breast cancer. *International Journal of Cancer*. 2016;139(10):2336-2342. doi:<https://doi.org/10.1002/ijc.30276>
287. Phillips GD, Fields CT, Li G, et al. Dual targeting of HER2-positive cancer with trastuzumab emtansine and pertuzumab: critical role for neuregulin blockade in antitumor response to combination therapy. *Clin Cancer Res*. Jan 15 2014;20(2):456-68. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-13-0358
288. Perez EA, Barrios C, Eiermann W, et al. Trastuzumab emtansine with or without pertuzumab versus trastuzumab with taxane for human epidermal growth factor

- receptor 2-positive advanced breast cancer: Final results from MARIANNE. *Cancer*. Nov 15 2019;125(22):3974-3984. doi:10.1002/cncr.32392
289. Hurvitz SA, Martin M, Jung KH, et al. Neoadjuvant Trastuzumab Emtansine and Pertuzumab in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: Three-Year Outcomes From the Phase III KRISTINE Study. *J Clin Oncol*. Sep 1 2019;37(25):2206-2216. doi:10.1200/JCO.19.00882
290. Gianni L, Bianchini G, Valagussa P, et al. Abstract S6-7: Adaptive immune system and immune checkpoints are associated with response to pertuzumab (P) and trastuzumab (H) in the NeoSphere study. *Cancer Research*. 12/17 2012;72:S6-7. doi:10.1158/0008-5472.SABCS12-S6-7
291. Müller P, Kreuzaler M, Khan T, et al. Trastuzumab emtansine (T-DM1) renders HER2+ breast cancer highly susceptible to CTLA-4/PD-1 blockade. *Sci Transl Med*. Nov 25 2015;7(315):315ra188. doi:10.1126/scitranslmed.aac4925
292. Emens LA, Esteva FJ, Beresford M, et al. Trastuzumab emtansine plus atezolizumab versus trastuzumab emtansine plus placebo in previously treated, HER2-positive advanced breast cancer (KATE2): a phase 2, multicentre, randomised, double-blind trial. *Lancet Oncol*. Oct 2020;21(10):1283-1295. doi:10.1016/S1470-2045(20)30465-4
293. Waks AG, Keenan TE, Li T, et al. Phase Ib study of pembrolizumab in combination with trastuzumab emtansine for metastatic HER2-positive breast cancer. *J Immunother Cancer*. Oct 2022;10(10)doi:10.1136/jitc-2022-005119
294. de Haas SL, Slamon DJ, Martin M, et al. Tumor biomarkers and efficacy in patients treated with trastuzumab emtansine + pertuzumab versus standard of care in HER2-positive early breast cancer: an open-label, phase III study (KRISTINE). *Breast Cancer Res*. Jan 11 2023;25(1):2. doi:10.1186/s13058-022-01587-z
295. Gebhart G, Lamberts LE, Wimana Z, et al. Molecular imaging as a tool to investigate heterogeneity of advanced HER2-positive breast cancer and to predict patient outcome under trastuzumab emtansine (T-DM1): the ZEPHIR trial. *Ann Oncol*. Apr 2016;27(4):619-24. doi:10.1093/annonc/mdv577
296. Austin CD, De Mazière AM, Pisacane PI, et al. Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Mol Biol Cell*. Dec 2004;15(12):5268-82. doi:10.1091/mbc.e04-07-0591
297. Baldassarre T, Truesdell P, Craig AW. Endophilin A2 promotes HER2 internalization and sensitivity to trastuzumab-based therapy in HER2-positive breast cancers. *Breast Cancer Res*. Oct 3 2017;19(1):110. doi:10.1186/s13058-017-0900-z
298. Sung M, Tan X, Lu B, et al. Caveolae-Mediated Endocytosis as a Novel Mechanism of Resistance to Trastuzumab Emtansine (T-DM1). *Molecular Cancer Therapeutics*. 2018;17(1):243-253. doi:10.1158/1535-7163.Mct-17-0403
299. Chung YC, Chang CM, Wei WC, Chang TW, Chang KJ, Chao WT. Metformin-induced caveolin-1 expression promotes T-DM1 drug efficacy in breast cancer cells. *Sci Rep*. Mar 2 2018;8(1):3930. doi:10.1038/s41598-018-22250-8
300. Wang H, Wang W, Xu Y, et al. Aberrant intracellular metabolism of T-DM1 confers T-DM1 resistance in human epidermal growth factor receptor 2-positive gastric cancer cells. *Cancer Sci*. Jul 2017;108(7):1458-1468. doi:10.1111/cas.13253
301. Ríos-Luci C, García-Alonso S, Díaz-Rodríguez E, et al. Resistance to the Antibody-Drug Conjugate T-DM1 Is Based in a Reduction in Lysosomal Proteolytic Activity. *Cancer Res*. Sep 1 2017;77(17):4639-4651. doi:10.1158/0008-5472.Can-16-3127

302. Erickson HK, Park PU, Widdison WC, et al. Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. *Cancer Res.* Apr 15 2006;66(8):4426-33. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4489
303. Hamblett KJ, Jacob AP, Gurgel JL, et al. SLC46A3 Is Required to Transport Catabolites of Noncleavable Antibody Maytansine Conjugates from the Lysosome to the Cytoplasm. *Cancer Res.* Dec 15 2015;75(24):5329-40. doi:10.1158/0008-5472.Can-15-1610
304. Kinneer K, Meekin J, Tiberghien AC, et al. SLC46A3 as a Potential Predictive Biomarker for Antibody-Drug Conjugates Bearing Noncleavable Linked Maytansinoid and Pyrrolobenzodiazepine Warheads. *Clin Cancer Res.* Dec 15 2018;24(24):6570-6582. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-18-1300
305. Li G, Guo J, Shen B-Q, et al. Mechanisms of Acquired Resistance to Trastuzumab Emtansine in Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2018;17(7):1441-1453. doi:10.1158/1535-7163.Mct-17-0296
306. Kovtun YV, Audette CA, Mayo MF, et al. Antibody-maytansinoid conjugates designed to bypass multidrug resistance. *Cancer Res.* Mar 15 2010;70(6):2528-37. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3546
307. Sabbaghi M, Gil-Gomez G, Guardia C, et al. Defective Cyclin B1 Induction in Trastuzumab-emtansine (T-DM1) Acquired Resistance in HER2-positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* Nov 15 2017;23(22):7006-7019. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0696
308. Saatci Ö, Borgoni S, Akbulut Ö, et al. Targeting PLK1 overcomes T-DM1 resistance via CDK1-dependent phosphorylation and inactivation of Bcl-2/xL in HER2-positive breast cancer. *Oncogene.* Apr 2018;37(17):2251-2269. doi:10.1038/s41388-017-0108-9
309. Mosele F, Deluche E, Lusque A, et al. Trastuzumab deruxtecan in metastatic breast cancer with variable HER2 expression: the phase 2 DAISY trial. *Nat Med.* Aug 2023;29(8):2110-2120. doi:10.1038/s41591-023-02478-2
310. Bruni S, Mauro F, Naveiro S, et al. Abstract PO2-18-05: Blocking soluble TNF to Improve potency of trastuzumab deruxtecan by increasing internalization and antitumor innate immune response in a resistant HER2-positive breast cancer model. *Cancer Research.* 2024;84(9_Supplement):PO2-18-05-PO2-18-05. doi:10.1158/1538-7445.Sabcs23-po2-18-05
311. Iwata TN, Ishii C, Ishida S, Ogitani Y, Wada T, Agatsuma T. A HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate, Trastuzumab Deruxtecan (DS-8201a), Enhances Antitumor Immunity in a Mouse Model. *Mol Cancer Ther.* Jul 2018;17(7):1494-1503. doi:10.1158/1535-7163.Mct-17-0749
312. Elgersma RC, Coumans RG, Huijbregts T, et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Duocarmycin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate SYD985. *Mol Pharm.* Jun 1 2015;12(6):1813-35. doi:10.1021/mp500781a
313. van der Lee MM, Groothuis PG, Ubink R, et al. The Preclinical Profile of the Duocarmycin-Based HER2-Targeting ADC SYD985 Predicts for Clinical Benefit in Low HER2-Expressing Breast Cancers. *Mol Cancer Ther.* Mar 2015;14(3):692-703. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0881-T
314. Nadal-Serrano M, Moranco B, Escrivá-de-Romaní S, et al. The Second Generation Antibody-Drug Conjugate SYD985 Overcomes Resistances to T-DM1. *Cancers (Basel).* Mar 13 2020;12(3)doi:10.3390/cancers12030670

315. Duro-Sánchez S, Nadal-Serrano M, Lalinde-Gutiérrez M, et al. Therapy-Induced Senescence Enhances the Efficacy of HER2-Targeted Antibody-Drug Conjugates in Breast Cancer. *Cancer Res.* Dec 16 2022;82(24):4670-4679. doi:10.1158/0008-5472.CAN-22-0787
316. Vega Cano KS, Marmolejo Castañeda DH, Escrivá-de-Romaní S, Saura C. Systemic Therapy for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: Current and Future Trends. *Cancers (Basel).* Dec 22 2022;15(1)doi:10.3390/cancers15010051
317. Baselga J, Swain SM. CLEOPATRA: a phase III evaluation of pertuzumab and trastuzumab for HER2-positive metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer.* Dec 1 2010;10(6):489-91. doi:10.3816/CBC.2010.n.065
318. Chan A, Delaloge S, Holmes FA, et al. Neratinib after trastuzumab-based adjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer (ExteNET): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* Mar 2016;17(3):367-377. doi:10.1016/s1470-2045(15)00551-3
319. Rugo HS, Im SA, Cardoso F, et al. Efficacy of Margetuximab vs Trastuzumab in Patients With Pretreated ERBB2-Positive Advanced Breast Cancer: A Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* Apr 01 2021;7(4):573-584. doi:10.1001/jamaoncol.2020.7932
320. Saura Manich C, O'Shaughnessy J, Aftimos PG, et al. LBA15 - Primary outcome of the phase III SYD985.002/TULIP trial comparing [vic-]trastuzumab duocarmazine to physician's choice treatment in patients with pre-treated HER2-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *Annals of Oncology.* 2021;32((suppl_5)):S1283-S1346. doi:10.1016/annonc/annonc741
321. Swain SM, Miles D, Kim SB, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* Apr 2020;21(4):519-530. doi:10.1016/s1470-2045(19)30863-0
322. Dieras V, Miles D, Verma S, et al. Trastuzumab emtansine versus capecitabine plus lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer (EMILIA): a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* Jun 2017;18(6):732-742. doi:10.1016/S1470-2045(17)30312-1
323. Hurvitz SA, Hegg R, Chung WP, et al. Trastuzumab deruxtecan versus trastuzumab emtansine in patients with HER2-positive metastatic breast cancer: updated results from DESTINY-Breast03, a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* Jan 14 2023;401(10371):105-117. doi:10.1016/S0140-6736(22)02420-5
324. Gennari A, Andre F, Barrios CH, et al. ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* Dec 2021;32(12):1475-1495. doi:10.1016/j.annonc.2021.09.019
325. Kaufman PA, Neuberger E, Schwartz NRM, et al. Real-world patient characteristics, treatment patterns, and clinical outcomes associated with tucatinib therapy in HER2-positive metastatic breast cancer. *Front Oncol.* 2023;13:1264861. doi:10.3389/fonc.2023.1264861
326. Lee K-S, Wang X, Im YH, et al. Zanidatamab (zani), a HER2-targeted bispecific antibody, in combination with docetaxel as first-line (1L) therapy for patients (pts) with advanced HER2-positive breast cancer: Preliminary results from a phase 1b/2 study.

- Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(16_suppl):1031-1031.
doi:10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.1031
327. Escrivá-de-Romani S, Cejalvo JM, Alba E, et al. Abstract LBO1-04: Primary results from a phase 2a study of zanidatamab (zani) + palbociclib (palbo) + fulvestrant (fulv) in HER2+/HR+ metastatic breast cancer (mBC). *Cancer Research*. 2024;84(9_Supplement):LBO1-04-LBO1-04. doi:10.1158/1538-7445.Sabcs23-lbo1-04
328. Ciruelos E, Villagrasa P, Pascual T, et al. Palbociclib and Trastuzumab in HER2-Positive Advanced Breast Cancer: Results from the Phase II SOLTI-1303 PATRICIA Trial. *Clin Cancer Res*. Nov 15 2020;26(22):5820-5829. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-0844
329. Saura C, Oliveira M, Feng YH, et al. Neratinib Plus Capecitabine Versus Lapatinib Plus Capecitabine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Previously Treated With ≥ 2 HER2-Directed Regimens: Phase III NALA Trial. *J Clin Oncol*. Sep 20 2020;38(27):3138-3149. doi:10.1200/JCO.20.00147
330. André F, Nadal JC, Denys H, et al. LBA18 Final overall survival (OS) for abemaciclib plus trastuzumab +/- fulvestrant versus trastuzumab plus chemotherapy in patients with HR+, HER2+ advanced breast cancer (monarchHER): A randomized, open-label, phase II trial. *Annals of Oncology*. 2022;33:S1386-S1387.
doi:10.1016/j.annonc.2022.08.013
331. Piccart M, Hennequin A, Borrego MR, et al. Abstract PD18-05: MEN1611, a PI3K inhibitor, combined with trastuzumab \pm fulvestrant for HER2+/PIK3CA mutant advanced or metastatic breast cancer: updated safety and efficacy results from the ongoing phase 1b study (B-PRECISE-01). *Cancer Research*. 2023;83(5_Supplement):PD18-05-PD18-05. doi:10.1158/1538-7445.Sabcs22-pd18-05
332. Oliveira M, Ciruelos EM, Morales Murillo S, et al. LBA3 SOLTI-1507 IPATHER: Primary results of the phase Ib study of ipatasertib (IPAT) and dual anti-HER2 therapy with trastuzumab and pertuzumab (HP) in patients (pts) with *PIK3CA* mutant (mut) HER2+ advanced breast cancer (ABC). *ESMO Open*. 2024;9doi:10.1016/j.esmoop.2024.103480
333. McClelland RA, Finlay P, Walker KJ, et al. Automated quantitation of immunocytochemically localized estrogen receptors in human breast cancer. *Cancer Res*. Jun 15 1990;50(12):3545-50.
334. Wickham H, François R. *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. 2014.
335. Girlich HWaDVaM. tidy: Tidy Messy Data. <https://tidyr.tidyverse.org>
336. Henry HWaL. purrr: Functional Programming Tools. <https://purrr.tidyverse.org/>
337. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York; 2016.
338. Kassambara A. ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.6.0. 	<https://rpkgs.datanovia.com/ggpubr/>
339. Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. Sep 15 2016;32(18):2847-9.
doi:10.1093/bioinformatics/btw313
340. Larsson J. eulerr: Area-Proportional Euler and Venn Diagrams with Ellipses. 2024;
341. Mayakonda A, Lin DC, Assenov Y, Plass C, Koeffler HP. Maftools: efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer. *Genome Res*. Nov 2018;28(11):1747-1756. doi:10.1101/gr.239244.118

342. Mosele MF, Westphalen CB, Stenzinger A, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with advanced cancer in 2024: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. Jul 2024;35(7):588-606. doi:10.1016/j.annonc.2024.04.005
343. Dienstmann R, Garralda E, Aguilar S, et al. Evolving Landscape of Molecular Prescreening Strategies for Oncology Early Clinical Trials. *JCO Precis Oncol*. 2020;4doi:10.1200/po.19.00398
344. Andre F, Filleron T, Kamal M, et al. Genomics to select treatment for patients with metastatic breast cancer. *Nature*. Oct 2022;610(7931):343-348. doi:10.1038/s41586-022-05068-3
345. Pascual T, Seguí E, Olivera-Salguero R, et al. Abstract PO4-14-02: Enhancing Informative Outcomes with Liquid Biopsy in a Real-World Population of Patients with Advanced Breast Cancer: Analysis of the SOLTI-1903 HOPE Study. *Cancer Research*. 2024;84(9_Supplement):PO4-14-02-PO4-14-02. doi:10.1158/1538-7445.Sabcs23-po4-14-02
346. Hou Y, Nitta H, Li Z. HER2 Intratumoral Heterogeneity in Breast Cancer, an Evolving Concept. *Cancers*. 2023;15(10):2664.
347. Huober J, van Mackelenbergh M, Schneeweiss A, et al. Identifying breast cancer patients at risk of relapse despite pathological complete response after neoadjuvant therapy. *npj Breast Cancer*. 2023/04/07 2023;9(1):23. doi:10.1038/s41523-023-00525-2
348. Andre F, Hamilton EP, Loi S, et al. DESTINY-Breast07: Dose-expansion interim analysis of T-DXd monotherapy and T-DXd + pertuzumab in patients with previously untreated HER2+ mBC. *Journal of Clinical Oncology*. 2024;42(16_suppl):1009-1009. doi:10.1200/JCO.2024.42.16_suppl.1009
349. Krop IE, Kim SB, González-Martín A, et al. Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice for pretreated HER2-positive advanced breast cancer (TH3RESA): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. Jun 2014;15(7):689-99. doi:10.1016/s1470-2045(14)70178-0
350. Packwood K, Martland G, Sommerlad M, et al. Breast cancer in patients with germline TP53 pathogenic variants have typical tumour characteristics: the Cohort study of TP53 carrier early onset breast cancer (COPE study). *J Pathol Clin Res*. Jul 2019;5(3):189-198. doi:10.1002/cjp2.133
351. Liu B, Yi Z, Guan Y, et al. Molecular landscape of mutations in breast cancer and their utility for predicting the response to HER-targeted therapy in HER2 amplification-positive and HER2 mutation-positive amplification-negative patients. *Cancer Medicine*. 2022;11(14):2767-2778. doi:<https://doi.org/10.1002/cam4.4652>
352. Chen H, Hu X, Wang D, Wang Y, Yu Y, Yao H. Association of PIK3CA mutation with outcomes in HER2-positive breast cancer treated with anti-HER2 therapy: A meta-analysis and bioinformatic analysis of TCGA-BRCA data. *Translational Oncology*. 2023/11/01/ 2023;37:101738. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2023.101738>
353. Ma G, Huo B, Shen Y, et al. Genomic Alterations Correlated to Trastuzumab Resistance and Clinical Outcomes in HER2+/HR- Breast Cancers of Patients Living in Northwestern China. *J Cancer*. 2024;15(14):4467-4476. doi:10.7150/jca.84832
354. Kuemmel S, Harper-Wynne C, Park YH, et al. heredERA Breast Cancer: a phase III, randomized, open-label study evaluating the efficacy and safety of giredestrant plus the fixed-dose combination of pertuzumab and trastuzumab for subcutaneous

injection in patients with previously untreated HER2-positive, estrogen receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *BMC Cancer*. May 24 2024;24(1):641. doi:10.1186/s12885-024-12179-9

355. Mountzios G, Kotoula V, Kolliou GA, et al. Cyclin D1 differential activation and its prognostic impact in patients with advanced breast cancer treated with trastuzumab. *ESMO Open*. 2019;4(2):e000441. doi:10.1136/esmoopen-2018-000441

356. Gogas H, Kotoula V, Alexopoulou Z, et al. MYC copy gain, chromosomal instability and PI3K activation as potential markers of unfavourable outcome in trastuzumab-treated patients with metastatic breast cancer. *J Transl Med*. May 17 2016;14(1):136. doi:10.1186/s12967-016-0883-z

357. Plasko G, Flores J, Simonson A, et al. Abstract P1-13-03: Establishment and characterization of two T-DM1-resistant, ER+/HER2+ breast XPDX models developed sequentially from the same patient with differential in vivo sensitivity to trastuzumab deruxtecan (DS-8201a). *Cancer Research*. 2023;83(5_Supplement):P1-13-03-P1-13-03. doi:10.1158/1538-7445.Sabcs22-p1-13-03

358. Davis JM, Navolanic PM, Weinstein-Oppenheim CR, et al. Raf-1 and Bcl-2 Induce Distinct and Common Pathways That Contribute to Breast Cancer Drug Resistance1. *Clinical Cancer Research*. 2003;9(3):1161-1170.

359. Guidi L, Pellizzari G, Tarantino P, Valenza C, Curigliano G. Resistance to Antibody-Drug Conjugates Targeting HER2 in Breast Cancer: Molecular Landscape and Future Challenges. *Cancers (Basel)*. Feb 10 2023;15(4)doi:10.3390/cancers15041130

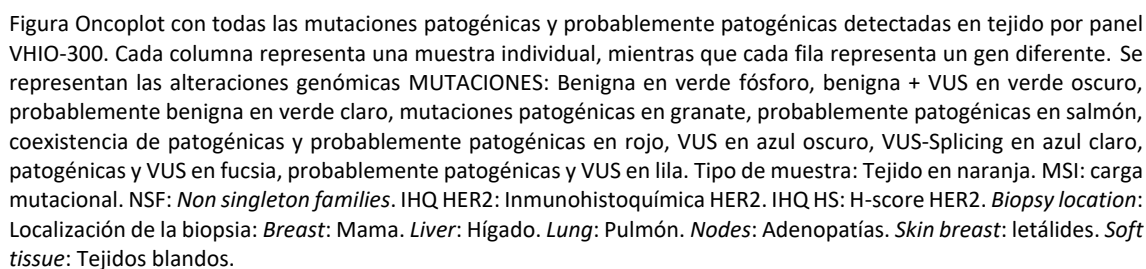
360. Brasó-Maristany F, Falato C, Martínez-Sáez O, et al. Abstract P5-02-31: Genetic determinants of response to patritumab deruxtecan (HER3-DXd) in hormone receptor-positive/HER2-negative (HR+/HER2-) breast cancer: a correlative analysis from SOLTI TOT-HER3 trial. *Cancer Research*. 2023;83(5_Supplement):P5-02-31-P5-02-31. doi:10.1158/1538-7445.Sabcs22-p5-02-31

361. Geukens T, De Schepper M, Richard F, et al. Intra-patient and inter-metastasis heterogeneity of HER2-low status in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*. Jul 2023;188:152-160. doi:10.1016/j.ejca.2023.04.026

362. Pietrantonio F, Manca P, Bellomo SE, et al. HER2 Copy Number and Resistance Mechanisms in Patients with HER2-positive Advanced Gastric Cancer Receiving Initial Trastuzumab-based Therapy in JACOB Trial. *Clin Cancer Res*. Feb 1 2023;29(3):571-580. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-22-2533

363. Yu J, Qin B, Moyer AM, et al. Establishing and characterizing patient-derived xenografts using pre-chemotherapy percutaneous biopsy and post-chemotherapy surgical samples from a prospective neoadjuvant breast cancer study. *Breast Cancer Research*. 2017/12/06 2017;19(1):130. doi:10.1186/s13058-017-0920-8

10.1. ONCOPLOT DE TODAS LAS MUTACIONES PATOGENICAS Y PROBABLEMENTE PTOGENICAS DETECTADAS EN TEJIDO POR PANEL VHIO-300



[illegible]

250

251

10.4. ONCOPLOT DE TODAS LAS MUTACIONES DETECTADAS EN PLASMA POR GUARDANT360 VHIO

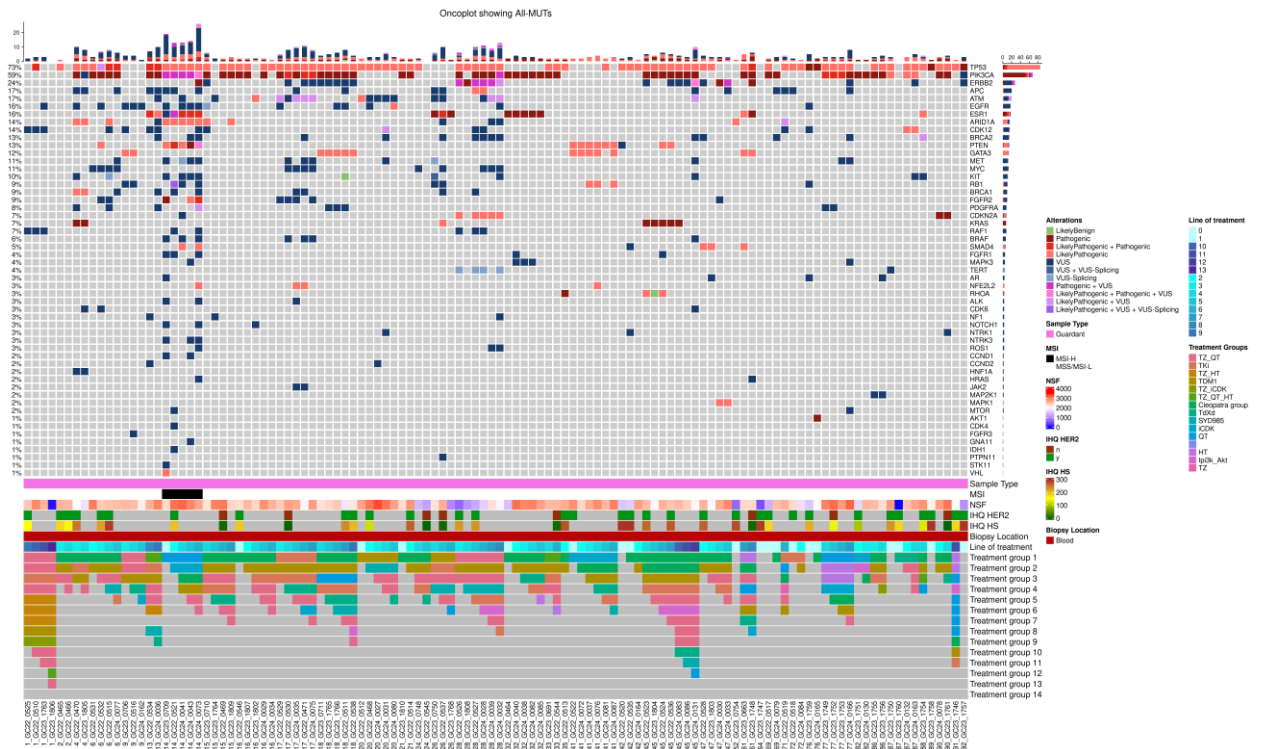


Figura Oncoplot con todas las mutaciones detectadas en tejido por panel VHIO-300. Cada columna representa una muestra individual, mientras que cada fila representa un gen diferente. Se representan las alteraciones genómicas MUTACIONES: Benigna en verde fósforo, benigna + VUS en verde oscuro, probablemente benigna en verde claro, mutaciones patogénicas en granate, probablemente patogénicas en salmón, coexistencia de patogénicas y probablemente patogénicas en rojo, VUS en azul oscuro, VUS-Splicing en azul claro, patogénicas y VUS en fucsia, probablemente patogénicas y VUS en lila. Tipo de muestra: Tejido en naranja. MSI: carga mutacional. Tipo de muestra: Tejido en naranja. MSI: carga mutacional. NSF: *Non singleton families*. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. *Biopsy location*: Localización de la biopsia: *Breast*: Mama. *Liver*: Hígado. *Lung*: Pulmón. *Nodes*: Adenopatías. *Skin breast*: letálides. *Soft tissue*: Tejidos blandos.

10.5. ONCOPLOT DE TODAS LAS CNV ENCONTRADAS EN PLASMA POR GUARDANT360 VHIO

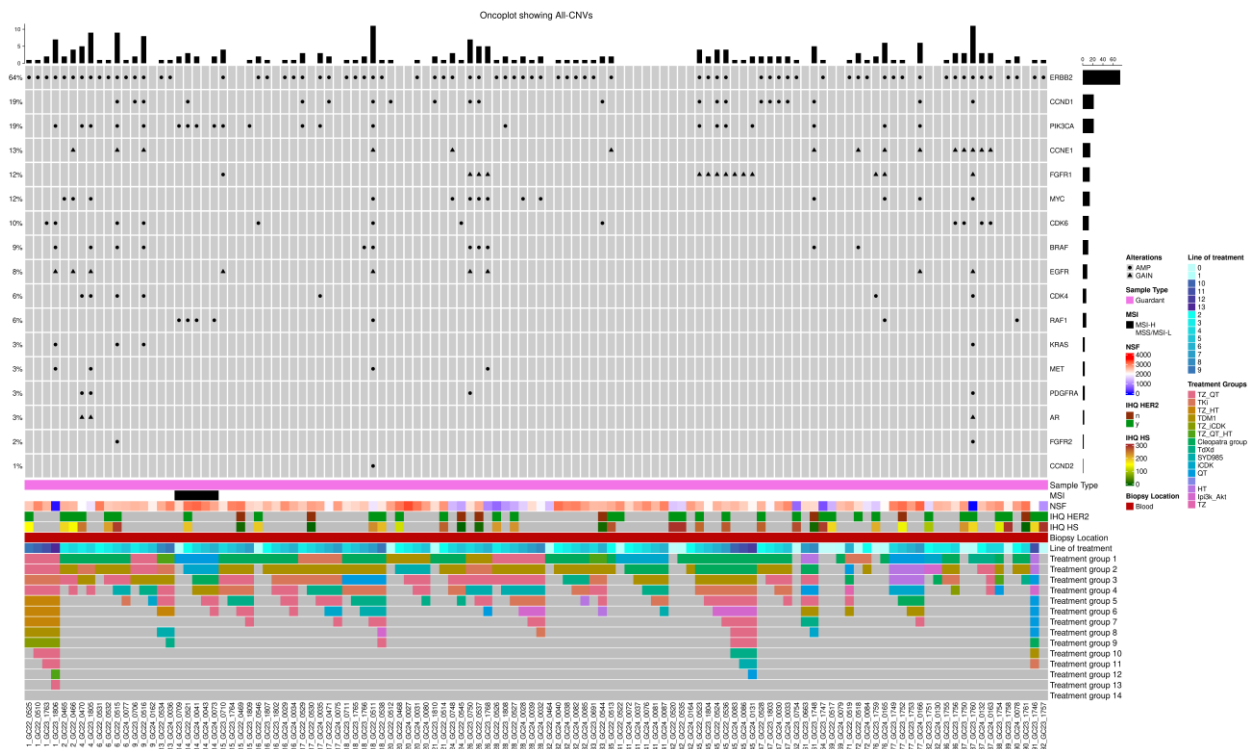


Figura Oncoplot con todas las alteraciones en número de copias detectadas en plasma por panel Guardant360 VHIO. Cada columna representa una muestra individual, mientras que cada fila representa un gen diferente. Se representan las alteraciones genómicas: amplificación con un punto, ganancia con un triángulo y pérdida con un cuadrado. Tipo de muestra: Tejido en naranja, plasma en rosa. MSI: carga mutacional. Tipo de muestra: Tejido en naranja. MSI: carga mutacional. NSF: *Non singleton families*. IHQ HER2: Inmunohistoquímica HER2. IHQ HS: H-score HER2. *Biopsy location*: Localización de la biopsia: *Breast*: Mama. *Liver*: Hígado. *Lung*: Pulmón. *Nodes*: Adenopatías. *Skin breast*: letálides. *Soft tissue*: Tejidos blandos.

10.6. DOCUMENTO APROBACIÓN CEIM VALL D'HEBRON



INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS Y COMISIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON

Dra. Esther Cucurull Folguera, Secretaria en funciones del COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS del Hospital Universitari Vall d'Hebron,

CERTIFICA

Que el Comité de Ética de Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario Vall d'Hebron, en el cual la Comisión de proyectos de investigación está integrada, se reunió en sesión ordinaria nº 608 el pasado 02/02/2024 y evaluó el proyecto de investigación **PR(AG)28/2024** promotor Vall Hebrón Institute of Oncology (VHIO) y titulado *"Mecanismos de resistencia a tratamiento dirigido en cáncer de mama HER2 positivo metastásico."* que tiene como investigador principal al Dr. SANTIAGO IGNACIO ESCRIBA DE ROMANÍ MUÑOZ del Servicio de Oncología de nuestro Centro.

Versión de documentos

Memoria de Proyecto	versión 1 de Enero 2024
Solicitud de dispensa CI exitus	versión con fecha 20.12.2023
PR(AG)20-2019_HIP-CI UNICA MAMA	versión 2020_v08
HIP/CI – CI preescrining (PR AG)147-2009)	versión Julio 2022

El resultado de la evaluación fue el siguiente:

Aprobado

El Comité tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el Real Decreto 1090/2015, y su composición actual es la siguiente:

- **Presidente:**
IGNACIO FERREIRA GONZÁLEZ - Médico
- **Vicepresidente:**
JUDITH SANCHEZ RAYA - Médico
- **Secretario:**
MIREIA NAVARRO SEBASTIAN - Química
- **Vocales:**
LLUIS ARMADANS GIL - Médico
- FERNANDO AZPIROZ VIDAUR - Médico

- VALENTINA BALASSO - Médico
- INES M DE TORRES RAMÍREZ - Médico
- ELADIO FERNÁNDEZ LIZ - Farmacéutico Atención Primaria
- INMACULADA FUENTES CAMPS - Médico Farmacólogo
- JAUME GUARDIA MASSÓ - Médico
- JUAN CARLOS HORTAL IBARRA - Profesor de Universidad
- MARIA LUJAN IAVECCHIA - Médico Farmacólogo
- ALEXIS RODRIGUEZ GALLEGO - Médico Farmacólogo
- PILAR SUNÉ MARTÍN - Farmacéutica Hospital
- ESPERANZA ZURIGUEL PEREZ - Personal de Enfermería
- ANA BELÉN ESTÉVEZ RODRÍGUEZ - Abogada experta en protección de datos
- SANTIAGO ESCRIVÀ DE ROMANÍ MUÑOZ - Médico
- ANTONIO MORENO GALDÓ - Médico
- ESTHER CUCURULL FOLGUERA - Médico Farmacólogo
- SERGI MORALES FERNANDEZ - Abogado
- NURIA FERNÁNDEZ HIDALGO - Médico
- CLARA GRAU CORRAL - Médico

En dicha reunión del Comité de Ética de Investigación con Medicamentos se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

En el caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, éste se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.

ESTHER
CUCURULL
FOLGUERA

Firmado digitalmente por ESTHER
CUCURULL FOLGUERA
DN: cn=ESTHER CUCURULL
FOLGUERA, o=ESTHER,
serialNumber=IDCES-3747788Q,
cn=ESTHER CUCURULL FOLGUERA
Ubicación: la ubicación de su firma aquí
Fecha: 2024.02.07 15:26:16+01'00'
Post PDF Reader Version: 11.1.0

Dra .Esther Cucurull Folguera

Secretaria técnica en funciones CEIM HUVH

10.7. CONSENTIMIENTOS INFORMADOS

- CONSENTIMIENTO INFORMADO PERFIL GENÉTICO DE TUMORES DE PACIENTES CANDIDATOS RECIBIR TRATAMIENTO EN EL VHIO: MUESTRAS RECOGIDAS DURANTE EL PRESCREENING Y AL MOMENTO DE LA PROGRESIÓN

HOJA INFORMATIVA PARA EL ESTUDIO: PERFIL GENÉTICO DE TUMORES DE PACIENTES CANDIDATOS RECIBIR TRATAMIENTO EN EL VHIO: MUESTRAS RECOGIDAS DURANTE EL PRESCREENING Y AL MOMENTO DE LA PROGRESIÓN (PR (AG) 147-2009)

Proyecto de investigación titulado: PERFIL GENÉTICO DE TUMORES DE PACIENTES CANDIDATOS A RECIBIR TRATAMIENTO: MUESTRAS RECOGIDAS DURANTE EL PRESCREENING Y AL MOMENTO DE LA PROGRESIÓN.

Investigador principal: Dra. Elena Garralda

Co-investigadores: Dra. Ana Vivancos, Dr. Paolo Nuciforo y Dra. Susana Aguilar.

Servicio: VHIO

Objetivos:

Le solicitamos su participación en este proyecto para investigar alteraciones moleculares y genéticas del cáncer. Este conocimiento permite valorar opciones terapéuticas dirigidas, investigar su posible impacto en el comportamiento del tumor y/o la relación con la respuesta a los tratamientos.

El ADN es un elemento que está presente en todas sus células, porque lo ha recibido de sus progenitores y lleva un código en forma de "genes" que determina sus características físicas personales, como el color de ojos, de piel, etc. Las diferencias entre unas personas y otras nos pueden ayudar a explicar por qué algunas desarrollan unas enfermedades y otras no. Una mutación es una alteración en un gen. La acumulación de varias mutaciones puede dar lugar a la aparición de tumores. Es importante resaltar que la mayoría de las mutaciones en los tumores no son heredadas, sino que son adquiridas a lo largo del tiempo, en el propio tumor.

El objetivo de este estudio es identificar ciertas alteraciones genéticas en el tejido sobrante tumoral de su diagnóstico o biopsia (mutaciones específicas del tumor). El conocimiento de estas mutaciones tumorales puede ser importante para intentar predecir el comportamiento del tumor y determinar el mejor tratamiento. Adicionalmente, se reconoce que la biología del cáncer puede cambiar significativamente con el tiempo. Es por ello por lo que el desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en muestras de sangre es de gran interés.

Elaboración de perfil genético:

Su participación en el estudio de alteraciones moleculares y genéticas del cáncer supone que elaboraremos un perfil derivado de las pruebas realizadas y es por ello por lo que precisamos que usted dé su consentimiento por escrito. VHIO realizará un perfil genético con la finalidad de intentar predecir el comportamiento del tumor e investigar sobre las mejores alternativas terapéuticas asociadas a su patología.

Para interpretar las mutaciones del tumor, a veces es necesario compararlas con alteraciones heredadas en los mismos genes. Por lo tanto, puede que solicitemos una muestra de tejido normal, como la sangre o la saliva, para complementar el análisis.

Procedimientos del estudio:

Le solicitaremos su autorización para la utilización de sus muestras de tumor que están conservadas en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron. En el caso que estas muestras se encuentren en el servicio de Anatomía Patológica de otro centro asistencial, le pedimos su autorización para reclamarlas y poder utilizarlas.

En los pacientes que no dispongan de muestra suficiente para realizar el estudio del tumor o que

Versión: Julio 2022

se considere medicamente necesario, se realizará una biopsia de la lesión tumoral o metastásica accesible.

- 1) La biopsia inicial de la lesión tumoral o metastásica se realizará en aquellos pacientes que no dispongan de muestra suficiente para realizar el perfil molecular del tumor o bien que la situación clínica del paciente requiera un análisis molecular actualizado en el momento de iniciar la terapia molecular dirigida. El perfil molecular permitirá al paciente acceder a un tratamiento dirigido a la alteración molecular detectada (*target therapy*).
- 2) Se realizará(n) biopsia(s) en el momento de la progresión en aquellos pacientes tratados con terapias dirigidas en función del perfil molecular y que se han beneficiado de ellas, pero luego esas lesiones dejaron de responder; de este modo se podrá estudiar la resistencia a fármacos y, posiblemente, seleccionar una terapia adicional basada en los resultados del nuevo análisis.

En todo caso, se realizarán biopsias en aquellos pacientes en que no hay riesgo significativo con el procedimiento y en que los parámetros clínicos y de laboratorio del paciente han sido evaluados por el médico de referencia. Dicha biopsia también debe ser aprobada por el servicio de Radiología o Cirugía.

Alternativamente, es posible estudiar el ADN tumoral circulante, que es un material que desprenden las células tumorales a la sangre, y del que se puede extraer información de alteraciones genéticas. Si se diera la circunstancia de poder realizarse dicho análisis, especialmente cuando no es posible obtener una biopsia del tumor o metástasis, se le solicitará una muestra de sangre (biopsia líquida).

De las muestras se extraerá el ADN tumoral para estudiar la presencia de alteraciones genéticas mediante técnicas de secuenciación de última generación, capaces de analizar un gran número de genes. Así mismo se analizarán otras características moleculares de los tumores, incluyendo análisis de la expresión de los genes o de las proteínas.

Para realizar un estudio de las alteraciones genéticas tumorales en profundidad, a veces se precisa compararlas con un control interno del/de la paciente, para lo cual es posible que se le solicite una muestra de tejido normal, como la sangre, la saliva u otro material biológico, siempre que sea material sobrante en el caso de utilizar una técnica invasiva. En ella se realizará la misma técnica de secuenciación en profundidad de los genes que se analicen en el tumor. El objetivo es identificar qué alteraciones están solo presentes en el tumor. Sin embargo, puede ocurrir que en este análisis se identifiquen alteraciones genéticas que son heredables y que pudieran tener relevancia médica para usted o su familia. Si así fuera y según el hallazgo, le referiríamos a la unidad de cáncer familiar o a la de genética clínica.

La participación en este proyecto no garantiza que usted pueda ser incluido en un protocolo con una terapia dirigida, porque hay situaciones en que no encontramos ninguna alteración molecular que pueda ser diana para dicho tratamiento. Además, en esta situación el equipo médico decidirá, juntamente con el paciente, la posibilidad de inclusión en distintos ensayos clínicos disponibles en la unidad.

Otras implicaciones de la información obtenida en el estudio:

Aunque sea poco probable, podría ocurrir que se obtenga información genética no directamente relacionada con el objetivo primario del análisis, pero que se considere clínicamente relevante

Versión: Julio 2022

aprobación de los comités éticos correspondientes. Cabe advertir que, a pesar de que para compartir su información genética en una base de datos de otros grupos se tomen medidas adicionales para evitar que dicha información se pueda relacionar con la identidad de cada paciente, esta posibilidad no puede ser completamente descartada.

Una vez finalizada la investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación con las mismas, el responsable de la colección podrá:

- a) Destruir la muestra sobrante una vez finalizada la investigación.
- b) Conservar la muestra de forma seudonimizada para la utilización en futuros proyectos relacionados con esta línea de investigación. La seudonimización supone la codificación de las muestras y los datos identificativos que custodia su médico del estudio.
- c) Ceder la muestra de forma gratuita a un biobanco, siempre que se facilite información sobre el mismo y sobre las posibles finalidades de uso de la muestra, en cuyo caso se le solicitará de nuevo su consentimiento.
- d) Utilizar la muestra para una línea de investigación relacionada con la inicialmente propuesta, incluso por un tercero mediante transmisión gratuita, en cuyo caso se le solicitará de nuevo su consentimiento.

Protección de datos de carácter personal:

De acuerdo con la normativa vigente sobre protección de datos de carácter personal, los datos personales que se obtengan serán los necesarios para cubrir los fines del estudio descritos en el apartado anterior. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre, y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en el caso de urgencia médica o requerimiento legal. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada por métodos informáticos en condiciones de seguridad por el Hospital Universitario Vall d'Hebron y/o por el VHIO. El acceso a dicha información quedará restringido al personal expresamente autorizado para ello (incluidos terceros), solamente para el desarrollo de los objetivos científicos anteriormente descritos y sujeto a la obligación de mantener la confidencialidad de la información. Hospital Universitario Vall d'Hebron y VHIO informan que con la firma del presente documento el paciente otorga el consentimiento explícito para el tratamiento de datos genéticos y datos clínicos relacionados con su tratamiento oncológico. Dicho consentimiento constituye la base jurídica del mencionado tratamiento.

Sólo se transmitirán a terceros autorizados los datos genéticos y moleculares recogidos para el estudio, sin que ello incluya nombre y apellidos, iniciales, dirección, o nº de la seguridad social. VHIO participa en diversos proyectos de investigación con entidades de alto prestigio internacional. Por este motivo, VHIO informa que podría transferir o compartir sus datos con otros investigadores dentro o fuera del Espacio Económico Europeo. Dicha transferencia está legitimada por la existencia de cláusulas tipo de protección de datos. En cualquier caso, los destinatarios de los datos no tendrán acceso al código que permite relacionar sus datos con usted; solo su médico o el personal del Hospital tienen acceso a esta clave.

Puede que la legislación en algunos de estos países no sea tan estricta como la de su país. Por lo tanto, sus datos pueden estar expuestos a un riesgo ligeramente más alto de pérdida de confidencialidad. En ese caso, VHIO se asegurará de que las transferencias de datos respeten sus derechos y confidencialidad. Todos los destinatarios de datos firmarán/aceptarán un Acuerdo de

Versión: Julio 2022

Transferencia de los Datos o un acuerdo de términos de uso equivalente en el que aceptarán, entre otras cosas, no intentar volver a identificar a los participantes de la investigación. Asimismo, VHIO garantizará que se establezcan las protecciones necesarias para mantener la confidencialidad de sus datos y garantizar la protección de su privacidad y no permitirá que sus datos se crucen con otras bases de datos que pudieran permitir su identificación.

Además, en el caso de actividades que podrían suponer mayores riesgos (por ejemplo, el envío de datos a un tercero o a otro país), VHIO aplicará una protección adicional, como por ejemplo el cifrado de datos. El cifrado es el proceso de codificación de mensajes o información para que solo partes autorizadas puedan acceder a estos, y que aquellas que no estén autorizadas no puedan hacerlo. En el caso de que se produzca tal transmisión, será para los mismos objetivos científicos anteriormente descritos y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la normativa vigente en nuestro país.

La conservación de las muestras del estudio se realizará como una colección individualizada con nº de registro C0003435 a nombre del Dr. Josep Tabernero Caturla. Dicha conservación se realizará por el periodo de tiempo de duración del estudio y se mantendrán almacenadas por un período de 10 años posterior al término del mismo.

El responsable del tratamiento de los datos de carácter personal obtenidos para el estudio es: Fundación Privada Instituto de Investigación Oncológica de Vall d'Hebron. Sus datos de contacto son: C\Natzaret 115, 08035, Barcelona. El Delegado de Protección de Datos designado por dicho responsable de tratamiento es: Profesional Group Conversia SLU. Sus datos de contacto son: Avinguda del Mas Pins, 150, 17457 Riudellots de la Selva, Girona.

De acuerdo con la normativa vigente sobre protección de datos de carácter personal podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, limitación de tratamiento, supresión, portabilidad, de no ser objeto de decisiones individualizadas y oposición, dirigiendo su petición a la dirección postal Hospital Universitario Vall d'Hebron, Paseo del Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035 - España y/o a la Fundación Privada Instituto de Investigación Oncológica de Vall d'Hebron, C\Natzaret 115 Barcelona 08035 - España. Tiene igualmente el derecho a interponer una reclamación ante la Agencia Española de Protección de Datos (www.aepd.es), en caso de considerarlo oportuno.

Derecho de revocación del consentimiento:

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria y para ello es necesario que usted dé su consentimiento por escrito. Si usted decide no participar en el estudio, su asistencia médica estará igualmente garantizada y puede cancelar su participación cuando lo desee.

Si cambia de opinión después de dar su consentimiento para la utilización de su muestra de tejido, puede retirarlo mediante una petición escrita a las direcciones especificadas en el último párrafo del apartado anterior.

Si tiene dudas o preguntas referentes a su participación puede ponerse en contacto con el Dra. Elena Garraída (+ 34 93 2744846).

Versión: Julio 2022

para su salud, o la de su familia en caso de alteraciones heredables. Si es así, infórmese a través de su médico sobre las implicaciones de dicha información. En caso de que prefiera no ser informado, su decisión se respetará.

La información obtenida puede ser relevante también para sus familiares. Es decisión personal suya informarles, algo que nosotros le recomendamos, con el fin de que si ellos lo desean puedan acudir a una consulta especializada en cáncer familiar o de genética clínica, donde les informarán sobre el significado clínico de la alteración identificada. En el caso de que usted desee que se informe a sus familiares directamente, le solicitamos que nos facilite la identidad de una persona de contacto a estos efectos.

Molestias y posibles riesgos:

Participar en este estudio no le causará ninguna molestia si hay material tumoral suficiente archivado para los análisis. No obstante, en el caso de que hubiera que realizar una biopsia por falta de material, la realización de ésta podrá causarle molestias en la zona de la punción. Asimismo, no se puede descartar la posibilidad de que aparezcan complicaciones secundarias a la punción donde se realice la biopsia, como pueden ser hematomas o pequeñas hemorragias.

La extracción de la muestra de sangre no entraña riesgos adicionales a los ya esperados tras una extracción convencional de sangre: dolor, hematoma y excepcionalmente infección en el punto de extracción.

La gran mayoría de personas no tiene una alteración genética heredable, pero en caso de identificarse puede ocasionar preocupación. Le referiremos a la consulta de cáncer familiar o de genética clínica, según el hallazgo, para su confirmación y manejo médico.

Lugar de realización del análisis:

Las muestras de tumor serán analizadas en el servicio de Oncología Molecular (Fundación Privada Instituto de Investigación Oncológica de Vall-Hebron (VHIO)). Los estudios genéticos se realizarán en el Laboratorio de Genómica del Cáncer del VHIO o en centros especializados en secuenciación de última generación.

Uso futuro de las muestras y resultados de los análisis moleculares:

El instituto de investigación oncológica de Vall d'Hebron (VHIO) coopera con otros centros nacionales e internacionales líderes a nivel mundial en la investigación sobre el cáncer. Le pedimos su consentimiento para que los resultados de los análisis de su muestra puedan ser agrupados con los datos provenientes de diferentes centros de investigación con el objetivo de obtener una comprensión mayor del cáncer. Los datos siempre serán confidenciales y estarán guardados en bases de datos seguras que cumplen con la normativa sobre protección de datos de carácter personal, tanto nacionales como internacionales. Cabe advertir que, a pesar de que para compartir su información genética en una base de datos pública se tomen medidas adicionales para evitar que dicha información se pueda relacionar con la identidad de cada paciente, esta posibilidad no puede ser completamente descartada.

Además, le pedimos su consentimiento para que autorice al investigador a almacenar su muestra para realizar otros estudios que tengan por objetivo investigar distintos aspectos biológicos del cáncer (genética, molecular, microbioma, proteómica etc.). Si autoriza que el material biológico se utilice en estas investigaciones, sus datos se mantendrán codificados (seudonimizados) a fin de preservar la confidencialidad en su utilización, tal como prevé la legislación vigente. Las muestras serán utilizadas en futuros proyectos de este grupo de investigación o bien de otros grupos, dedicados a la investigación oncológica, siempre tras la

Versión: Julio 2022

**HOJA INFORMATIVA PARA EL ESTUDIO: PERFIL GENÉTICO DE TUMORES DE PACIENTES
CANDIDATOS RECIBIR TRATAMIENTO EN EL VHIO: MUESTRAS RECOGIDAS DURANTE EL
PRESCREENING Y AL MOMENTO DE LA PROGRESIÓN (PR (AG) 147-2009)**

Yo, _____, he leído la hoja de información que se me ha entregado y he entendido los objetivos del estudio de alteraciones moleculares y genéticas del cáncer, así como de los riesgos y beneficios potenciales de mi participación en él.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He hablado con _____ (nombre del investigador).

Comprendo que mi participación es voluntaria.

- Estoy de acuerdo en participar según las condiciones y los procedimientos establecidos y entiendo que puedo cancelar mi participación cuando lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Análisis de muestra tumoral archivada

☐ DOY ☐ NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda realizarse el estudio sobre posibles alteraciones moleculares y genéticas relacionadas con el cáncer en mi muestra de tejido en el Laboratorio de Genómica del Cáncer del VHIO o en centros especializados en secuenciación de última generación. Mi tejido y el ADN de la muestra tumoral se identificarán con un número codificado (seudonimizado) y mi identidad se mantendrá en secreto.

☐ DOY ☐ NO DOY permiso para que los investigadores soliciten mis muestras al servicio de Anatomía Patológica de otros centros asistenciales, en caso de que no se encuentren en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

Biopsia tumoral

☐ DOY ☐ NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda realizarse una biopsia de la lesión tumoral o de la metástasis antes de iniciar y/o al finalizar una terapia molecular dirigida, si fuera necesario.

Biopsia líquida

☐ DOY ☐ NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda recogerse sangre y secuenciar mi ADN tumoral circulante, en el Laboratorio de Genómica del Cáncer del VHIO o en centros especializados en secuenciación de última generación, para identificar mutaciones tumorales en sangre, siempre que sea posible.

Estudios moleculares subsecuentes y compartir resultados

☐ DOY ☐ NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que mi muestra tumoral se almacene para utilizarla en otros estudios de investigación sobre alteraciones moleculares

Versión: Julio 2022

y genéticas relacionadas con el cáncer. Mi tejido y las muestras derivadas se identificarán con un número codificado (seudonimizado) y mi identidad se mantendrá en secreto.

☐ DOY ☐ NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que los datos clínicos relacionados con el tratamiento oncológico sean compartidos, juntamente con las alteraciones moleculares y genéticas del tumor, para fines de investigación. Los datos serán compartidos de forma codificada (seudonimizada) para mantener la confidencialidad.

Hallazgos secundarios y análisis complementarios

☐ DOY ☐ NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda recogerse sangre, saliva u otro material biológico y secuenciar mi ADN de tejido normal para depurar las variaciones normales de mi genoma en el tumor.

Si se identificara información molecular o genética no directamente relacionada con el objetivo del análisis y que se considere clínicamente relevante para su salud o la de su familia,

☐ DOY ☐ NO DOY permiso para que me comuniquen a mi esta información.

☐ DOY ☐ NO DOY permiso para que comuniquen a un familiar esta información, en caso de no poder acudir a recogerlos.

Autorizo a _____ con datos de contacto
_____ a
recibir información de los resultados de mi participación en este proyecto.
A dicho familiar se le preguntará si desea conocer la información.

☐ DOY ☐ NO DOY mi consentimiento a **TODAS LAS OPCIONES** expuestas anteriormente

Firmas

Paciente

Fecha

Familiar, representante legal o Testigo

Fecha

Investigador

Fecha

Versión: Julio 2022

Consentimiento informado DISEÑO MOLECULAR DEL TRATAMIENTO PERSONALIZADO DEL CÁNCER DE MAMA (PR(AG) 20-2019).

2020_v08

HOJA INFORMATIVA PARA EL DISEÑO MOLECULAR DEL TRATAMIENTO PERSONALIZADO DEL CÁNCER DE MAMA

Línea de investigación sobre:

Identificación de nuevos biomarcadores tumorales de diagnóstico, predictivos de respuesta y resistencia a terapias personalizadas en cáncer de mama

La presente hoja informativa pretende informar sobre los distintos proyectos de investigación en cáncer de mama previamente aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Vall d'Hebrón (Anexo I):

Servicio: Oncología.

Investigador de contacto: Enrique Javier Arenas Lahuerta

Objetivos

Le solicitamos su participación en una serie de proyectos de investigación cuya finalidad es la creación de una colección de muestras biológicas que permita la investigación e identificación de marcadores predictivos de respuesta, su posible implicación pronóstica, y su impacto en la respuesta/resistencia a diferentes tratamientos oncológicos.

Entre estos tratamientos se incluye la inmunoterapia que constituye una de las estrategias terapéuticas más prometedoras en el campo de la oncología. Este tipo de terapias se basan en favorecer la acción anti-tumoral del sistema inmune del propio paciente.

Asimismo, se incluyen tratamientos dirigidos a diferentes dianas terapéuticas identificadas en la célula como dianas para frenar el crecimiento tumoral. En estos casos es muy importante entender las alteraciones del tumor a tiempo real tanto en tejido como en la sangre.

El proyecto también incluye investigar los mecanismos genéticos que provocan una resistencia a los tratamientos dirigidos contra el cáncer causado por mutaciones en los genes *BRCA*, así como investigar nuevos tratamientos mediante el uso de trasplantes de muestras de tumor en ratones.

Se extraerá el ADN tumoral para estudiar la presencia de alteraciones genéticas mediante técnicas de secuenciación de última generación, capaces de analizar un gran número de genes. Asimismo, se analizarán otras características moleculares de los tumores, incluyendo análisis del ARN o de las proteínas.

También se solicita autorización para obtener una muestra de sangre. Las células de la muestra de sangre representan un tejido normal del cual se obtienen ADN, ARN o proteínas normales, no tumorales. Éstos se utilizan para compararlos con los extraídos de las muestras tumorales, a fin de distinguir correctamente las alteraciones moleculares propias del tumor de las pequeñas diferencias que puede tener cualquier célula normal del paciente.

Además de las células no tumorales, la sangre puede contener ADN tumoral circulante constituyendo así una forma de biopsia líquida. Se recogerá el plasma para analizar el ADN tumoral circulante.

Finalmente, de la sangre también se aislarán las células mononucleares (PBMCs) que permitirán tanto el cultivo in vitro de las células linfocitarias presentes en el tumor, como la reconstitución del sistema inmune del paciente en un ratón.

En el presente proyecto nos proponemos la generación de modelos experimentales como herramientas para predecir las respuestas a terapias en cáncer. Para ello se utilizarán modelos tumorales en cultivos 3D y en ratones.

Debe saber que su participación es totalmente voluntaria y puede rechazarla si lo desea. Si usted decide no participar, su asistencia médica estará igualmente garantizada, puesto que el presente proyecto forma parte de una investigación independiente y paralela a la misma.

Introducción

Herramientas moleculares

El ADN es un elemento que está presente en todas sus células, porque lo ha heredado de sus padres y lleva un código en forma de "genes" que determina sus características físicas personales, como el color de ojos, de piel, etc. Las diferencias entre unas personas y otras nos pueden ayudar a explicar por qué algunas desarrollan unas enfermedades y otras no.

En cáncer, el tumor adquiere alteraciones moleculares que, en parte, explican su anormal funcionamiento. El conocimiento de estas alteraciones en los genes es importante para intentar predecir el comportamiento del tumor y determinar el mejor tratamiento.

Los análisis moleculares para estrategias de tratamiento estratificados se basan generalmente en muestras de tumores primarios de archivo, sin embargo, se reconoce que la biología de los cánceres puede cambiar significativamente con el tiempo. Es por ello que, también el desarrollo de pruebas basadas en sangre con relevancia clínica es de gran interés.

Por otro lado, existen evidencias claras de la relevancia de la presencia de células inmunitarias en el lecho tumoral en el pronóstico del tumor, pero se desconoce qué tipo de linfocitos están presentes en el tumor y como se correlaciona la presencia de las diferentes poblaciones linfocitarias con el resultado del tratamiento. Además, la presencia y acción de las células del sistema inmune son de gran relevancia para los tratamientos basados en inmunoterapia, ya que la efectividad de estos fármacos se basa en favorecer la actividad antitumoral de las propias células inmunitarias del paciente.

Modelos experimentales

Hasta la fecha, se han conseguido desarrollar una amplia variedad de modelos experimentales que permiten valorar la efectividad de distintos tipos de terapias antineoplásicas. Estos modelos preclínicos incluyen los cultivos en 3D de las células tumorales, conocidos como organoides, y los tumores implantados en ratón, conocidos como PDX (Patient-Derived Xenografts, Xenoinjertos Derivados de Pacientes).

Los modelos PDX constituyen una de las mejores herramientas, ya que permiten reproducir la misma enfermedad del paciente en un ratón y evaluar así la efectividad de diversos fármacos adecuados al tipo de cáncer del paciente.

En el caso de las inmunoterapias, la utilización de modelos PDX debe combinarse con la implantación de las células del sistema inmune humanas en el mismo ratón en el cual se implantan las células del tumor, son los denominados modelos humanizados de PDX. Las células del sistema inmune pueden ser procedentes de donantes de sangre sanos obtenidas a través del Banc de Sang i Teixits o del propio paciente (modelo autólogo).

En el presente proyecto proponemos la generación de modelos experimentales que permitan evaluar en el laboratorio la acción de fármacos mediante la generación de organoides y/o la implantación del tumor del paciente en ratones para la generación de PDX o modelos humanizados de PDX.

¿En qué consiste su participación en el estudio?

Mediante el presente documento y de acuerdo con las normas bioéticas y la legislación vigente (Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y la Normativa vigente de Protección de datos personales), solicitamos su consentimiento para:

1. Obtener un fragmento de tumor primario extraído en el momento del diagnóstico de su tumor y/o en la operación para su uso en modelos experimentales y realizar un análisis molecular exhaustivo, siempre y cuando el servicio de Anatomía Patológica determine que no es necesario para el diagnóstico del paciente.
2. Realizar biopsias de tumores primarios y metástasis de una lesión accesible antes del inicio del tratamiento y/o de posteriores metástasis para su uso en modelos experimentales y realizar un análisis molecular exhaustivo, en caso de que clínicamente esté indicada la realización de las mismas. Dicha biopsia/ intervención, además, deberá ser aprobada por el servicio de Radiología (cuando se realiza guiada por tomografías o ecografías), Cirugía o el que corresponda.
3. Realizar la extracción de muestra/s de sangre (30ml), con la finalidad de obtener linfocitos, células tumorales circulantes, y plasma para poder realizar un análisis molecular posterior que permita conocer datos genéticos de tejido sano o de su biopsia líquida que se podrán comparar con los tumorales, así como otros usos experimentales vinculados al proyecto. Dicha extracción

se realizará en Hospital de Día de Oncología o en la Unidad de Investigación en Terapia Molecular del cáncer (UITM) del Hospital Vall d'Hebrón bajo la coordinación del investigador principal del estudio.

4. Realizar la extracción de muestra/s de sangre excepcionales (100ml), con la finalidad de obtener linfocitos para poder realizar estudios en modelos autólogos de PDX humanizados.
5. De la muestra tumoral adicional obtenida, utilizar parte de la misma para implantarla en ratones. Mediante este procedimiento, se podrán realizar investigaciones más representativas del cáncer sobre nuevos tratamientos para su tumor.
6. Parte de la muestra tumoral adicional puede ser utilizada para la generación de cultivos primarios u organoides derivados tanto de las células inmunitarias presentes en el tumor, como de las células tumorales. Estos modelos permitirán testar mayor número de terapias para evaluar la respuesta de su tumor.
7. Esta muestra tumoral puede ser analizada a nivel de DNA, RNA y proteínas con el fin de identificar factores relacionados con la evolución tras el tratamiento observada en los modelos generados en los ratones.
8. La muestra de sangre extraída será utilizada para comparar las alteraciones moleculares y/o genéticas identificadas en el tumor y también puede ser utilizada para separar las células plasmáticas e implantarlas también en el ratón para la generación de modelos humanizados de PDX, así como para el cultivo de células inmunitarias que infiltran el tumor.
9. De estar disponibles, utilizar sus muestras de tumor que están conservadas en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebrón. En el caso que estas muestras se encuentren en el servicio de Anatomía Patológica o colección de otro centro asistencial, le pedimos su autorización para reclamarlas y poder utilizarlas.
10. Permitir que sus datos clínicos relacionados con el tratamiento oncológico y vinculados a los correspondientes proyectos de investigación anteriormente enumerados sean compartidos, conjuntamente con sus datos moleculares, para fines de investigación.

Beneficios:

Es posible que de su participación en este estudio no se obtenga un beneficio directo. Sin embargo, la identificación de posibles factores pronósticos y/o predictivos del cáncer podría beneficiar en un futuro a otros pacientes que lo sufren, así como contribuir a un mejor conocimiento y tratamiento de esta enfermedad.

Procedimientos del estudio:

Aprovechando la extracción de tumor primario en cirugía o las biopsias obligatorias para su diagnóstico o evaluación sobre la participación en estudios clínicos, se podrá obtener muestra tumoral extra. Se realizarán biopsias tumorales solamente en aquellas pacientes donde clínicamente esté indicada la realización de las mismas.

Las muestras obtenidas serán utilizadas, en parte, para realizar un análisis molecular exhaustivo y también para ser implantadas en ratones con el objetivo de generar un modelo experimental que permita reconstruir la enfermedad del paciente y evaluar la respuesta a las terapias aplicadas.

Se realizará una extracción de 100 ml adicionales de sangre para separar las células plasmáticas e implantarlas en el ratón, en aquellos pacientes que sea clínicamente posible. Con este procedimiento se pretende generar un modelo experimental que permita reproducir la enfermedad del paciente y la respuesta de su sistema inmune a las terapias aplicadas.

También se utilizará su muestra/s de sangre con la finalidad de obtener ADN y poder realizar un análisis molecular posterior que permita conocer datos genéticos de tejido sano que se podrán comparar con los tumorales, así como otros usos experimentales vinculados al proyecto.

Molestias y posibles riesgos:

La realización de la biopsia podrá causarle molestias en la zona de la punción. Tampoco se puede descartar la posibilidad de que aparezcan complicaciones secundarias a la punción, que dependerán de la zona u órgano donde se realice la biopsia, como pueden ser hematomas o hemorragias, dolor local y/o sobreinfección. Este procedimiento no supone un riesgo añadido ya que la muestra se obtiene como parte de su rutina diagnóstica o participación en un estudio clínico.

La extracción/es de sangre le puede provocar una sensación de ardor en el punto en el que se introduce la aguja en la piel y ocasionar un pequeño hematoma o una leve infección que desaparece en pocos días. Más raramente puede aparecer mareo en el momento de la extracción de sangre.

Lugar de realización del análisis e implantación en el ratón:

Las muestras de tumor serán procesadas en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebrón, y en los laboratorios del VHIO y centros colaboradores adscritos al proyecto. Los estudios genéticos se realizarán en el Laboratorio de Genómica del Cáncer (VHIO) o en centros especializados en secuenciación de última generación. Los cultivos primarios u organoides se podrían analizar en centros especializados para determinar la actividad antitumoral de nuevos medicamentos.

Protección de datos personales:

De acuerdo con la normativa vigente europea y nacional de Protección de Datos de Carácter Personal, los datos personales que se obtengan serán los necesarios para cubrir los fines del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre, y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en el caso de urgencia médica o requerimiento legal. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada por métodos informáticos en condiciones de seguridad por el Dr. Josep Tabernero Caturia. El acceso a dicha información quedará restringido al personal de base de datos, designado al efecto o a otro personal autorizado que estará obligado a mantener la confidencialidad de la información.

De acuerdo con los derechos que le confiere la normativa vigente en Protección de datos de Carácter Personal podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, limitación de tratamiento, supresión, portabilidad y oposición, dirigiendo su petición al investigador principal del estudio o al Delegado de protección de datos.

Sólo se transmitirán a terceros los datos recogidos para el estudio, que en ningún caso contendrán información como nombre y apellidos, iniciales, dirección, o nº de la seguridad social. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

Se adoptarán las medidas pertinentes para garantizar la protección de su privacidad y no se permitirá que sus datos se crucen con otras bases de datos que pudieran permitir su identificación.

Implicaciones de la información obtenida en el estudio:

Si decide participar en el estudio, es posible que en el análisis de sus muestras biológicas se obtenga información relevante para su salud o la de su familia. De acuerdo con la legislación vigente, tiene derecho a ser informado de los datos genéticos que se obtengan en el curso del estudio.

Si quiere conocer los datos genéticos relevantes para su salud que se obtengan, infórmese a través de su médico sobre las implicaciones que esta información puede tener para su persona y su familia. Esta información se le comunicará si lo desea; en caso de que prefiera no ser informado, su decisión será respetada.

En el caso en que se produzca transferencia de sus datos codificados fuera de la UE a las entidades de nuestro grupo, a prestadores de servicios o a investigadores científicos que colaboren con nosotros, sus datos quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos u otros mecanismos establecidos por las autoridades de protección de datos. Si quiere saber más al respecto, puede contactar al/ a la Delegado de Protección de Datos del promotor dpo.cliente@conversia.es,

Uso futuro de las muestras:

Le pedimos su consentimiento para que autorice al investigador a almacenar su muestra sobrante para realizar otros estudios genéticos relacionados con el cáncer. Si autoriza que el material biológico se utilice en estas investigaciones, sus datos se mantendrán codificados a fin de garantizar la confidencialidad en su utilización, tal como prevé la legislación vigente.

La conservación de estas muestras se realizará como una colección individualizada con nº de registro C0003435 a nombre del Dr. Josep Tabernero Caturia. Estas muestras, como ya se le ha informado serán utilizadas con el objetivo de realizar este estudio, así como la finalidad de poder participar en futuros estudios de este grupo de investigación o bien de otros grupos, dedicados a la investigación oncológica, siempre tras la aprobación de los comités de ética de la investigación correspondientes. La

conservación de estas muestras se realizará por el periodo de tiempo de duración del estudio y se mantendrán almacenadas por un período de 10 años posterior al término del mismo.

Derecho de revocación del consentimiento:

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria y para ello es necesario que usted dé su consentimiento por escrito. Si usted decide no participar en el estudio, su asistencia médica estará igualmente garantizada y puede cancelar su participación cuando lo desee.

Si cambia de opinión después de dar su consentimiento para la utilización de su muestra de tejido, puede retirarlo.

Si tiene dudas o preguntas referentes a su participación puede ponerse en contacto con el Dr. Enrique Javier Lahuerta (Tel. 93 254 34 50 Ext. 8665).

Si cambia de opinión después de dar su consentimiento para la utilización de su muestra de tejido, puede retirarlo. Puede ejercer sus derechos como interesado dirigiendo su petición al correo electrónico lopdvhio@vhio.net

Le informamos que puede contactar con el Delegado de Protección de Datos de VHIO, dirigiéndose por escrito a la dirección de correo dpo.ciente@conversia.es o al teléfono 902877192

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PARA EL DISEÑO MOLECULAR DEL
TRATAMIENTO PERSONALIZADO DEL CÁNCER DE MAMA**

Yo, _____, he leído la hoja de información que se me ha entregado y he entendido los objetivos del estudio de alteraciones oncogénicas, así como de los riesgos y beneficios potenciales de mi participación en él.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He hablado con: _____ (nombre del investigador).

Comprendo que mi participación es voluntaria. Estoy de acuerdo en participar según las condiciones y los procedimientos establecidos y entiendo que puedo cancelar mi participación cuando lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

☐ DOY ☐ NO DOY mi consentimiento voluntariamente para:

- Realizar el estudio sobre posibles alteraciones moleculares relacionadas con el cáncer en mi muestra de tejido tumoral obtenida en cirugía de tumor primario o metástasis, o por medio de biopsia extra.
- Generar un modelo de PDX y/o PDX humanizado con dichas muestras.
- Derivar cultivos primarios obtenidos de muestra de tejido normal adyacente al tumor.
- Extraer muestra/s de mi sangre (30ml) con la finalidad de realizar el análisis de posibles alteraciones moleculares relacionadas con el cáncer o con la finalidad de secuenciar mi ADN de tejido normal para depurar las variaciones normales de mi genoma en el tumor.
- Extraer muestra/s de mi sangre (100ml) con la finalidad de generar un PDX humanizado con dicha muestra.
- Realizar la expansión y caracterización de las células inmunitarias y/o tumorales extraídas de mi muestra tumoral para la generación de modelos de cultivo y organoides in vitro.
- Almacenar mi muestra para utilizarla en otros estudios sobre alteraciones moleculares relacionados con el cáncer. Mi muestra y el ADN obtenido se identificarán con un número codificado y mi identidad se mantendrá en secreto.
- Compartir datos clínicos relacionados con el tratamiento oncológico, conjuntamente con las alteraciones moleculares y genéticas del tumor, para fines de investigación. Los datos serán compartidos de forma codificada para mantener la confidencialidad.
- Que los investigadores soliciten mis muestras al servicio de Anatomía Patológica de otros centros asistenciales, en caso que no se encuentren en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebrón.
- Que los investigadores se pongan en contacto conmigo para recabar información adicional relacionada con el objetivo de estas investigaciones.

Entiendo que es poco probable que mi participación en los estudios efectuados tenga implicaciones directas para mi salud. No obstante, si la información obtenida tuviera una importancia directa para el desarrollo de enfermedades en mí o en mi familia, doy permiso para que me comuniquen esta información o para que comuniquen a un familiar esta información, en caso de no poder acudir a recogerlos.

Autorizo a _____ con DNI _____ y datos de contacto _____ a recibir información de los resultados de mi participación en este proyecto.

Paciente, Familiar, representante legal o Testigo (señalar)

Fecha

Investigador

Fecha

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PARA EL DISEÑO MOLECULAR DEL
TRATAMIENTO PERSONALIZADO DEL CÁNCER DE MAMA**

Yo, _____, he leído la hoja de información que se me ha entregado y he entendido los objetivos del estudio de alteraciones oncogénicas, así como de los riesgos y beneficios potenciales de mi participación en él.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He hablado con: _____ (nombre del investigador).

Comprendo que mi participación es voluntaria. Estoy de acuerdo en participar según las condiciones y los procedimientos establecidos y entiendo que puedo cancelar mi participación cuando lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

☐ DOY ☐ NO DOY mi consentimiento voluntariamente para:

- Realizar el estudio sobre posibles alteraciones moleculares relacionadas con el cáncer en mi muestra de tejido tumoral obtenida en cirugía de tumor primario o metástasis, o por medio de biopsia extra.
- Generar un modelo de PDX y/o PDX humanizado con dichas muestras.
- Derivar cultivos primarios obtenidos de muestra de tejido normal adyacente al tumor.
- Extraer muestra/s de mi sangre (30ml) con la finalidad de realizar el análisis de posibles alteraciones moleculares relacionadas con el cáncer o con la finalidad de secuenciar mi ADN de tejido normal para depurar las variaciones normales de mi genoma en el tumor.
- Extraer muestra/s de mi sangre (100ml) con la finalidad de generar un PDX humanizado con dicha muestra.
- Realizar la expansión y caracterización de las células inmunitarias y/o tumorales extraídas de mi muestra tumoral para la generación de modelos de cultivo y organoides in vitro.
- Almacenar mi muestra para utilizarla en otros estudios sobre alteraciones moleculares relacionados con el cáncer. Mi muestra y el ADN obtenido se identificarán con un número codificado y mi identidad se mantendrá en secreto.
- Compartir datos clínicos relacionados con el tratamiento oncológico, conjuntamente con las alteraciones moleculares y genéticas del tumor, para fines de investigación. Los datos serán compartidos de forma codificada para mantener la confidencialidad.
- Que los investigadores soliciten mis muestras al servicio de Anatomía Patológica de otros centros asistenciales, en caso que no se encuentren en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebrón.
- Que los investigadores se pongan en contacto conmigo para recabar información adicional relacionada con el objetivo de estas investigaciones.

Entiendo que es poco probable que mi participación en los estudios efectuados tenga implicaciones directas para mi salud. No obstante, si la información obtenida tuviera una importancia directa para el desarrollo de enfermedades en mí o en mi familia, doy permiso para que me comuniquen esta información o para que comuniquen a un familiar esta información, en caso de no poder acudir a recogerlos.

Autorizo a _____ con DNI _____ y datos de contacto _____ a recibir información de los resultados de mi participación en este proyecto.

Paciente, Familiar, representante legal o Testigo (señalar)

Fecha

Investigador

Fecha