

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>

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA GENÓMICA PARA PREDICCIÓN DE RESPUESTA A INMUNOTERAPIA Y DETERMINACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA EN PACIENTES CON CÁNCER

Tesis doctoral para optar al grado de Doctor

Elena Garralda Cabanas

Directores de la Tesis:

Dr. Josep Tabernero Caturla

Dr. Juan Martin Liberal

Tutor: Albert Selva O'Callaghan

Barcelona, 2024

“Quien no conoce nada, no ama nada. Quien no puede hacer nada, no comprende nada. Quien nada comprende, nada vale. Pero quien comprende también ama, observa, ve. Cuanto mayor es el conocimiento inherente a una cosa, más grande es el amor. Quien cree que todas las frutas maduran al mismo tiempo que las frutillas nada sabe acerca de las uvas”

Paracelso

A mis hijos, Camila y Marcos
Mi mayor fuente de amor y conocimiento

AGRADECIMIENTOS

No tengo palabras para definir lo que supone para mi terminar esta Tesis doctoral. Solamente diré, que durante mucho tiempo pensé que no lo conseguiría... Lo que si deseo manifestar es mi más profundo agradecimiento, porque esta Tesis no habría sido posible, sin el esfuerzo, el trabajo y el apoyo de muchísimas personas. A todas ellas, les quiero dar las gracias.

Al Dr. Josep Taberner, codirector de esta Tesis y mentor desde hace ya 8 años, por su confianza en mi desde el principio. Por ayudarme a crecer en mi carrera profesional e inspirarme a ser mejor profesional cada día. También por obligarme a no darme por vencida para finalizar esta Tesis.

Al Dr. Juan Martín Liberal, codirector y amigo, que vivió y participó de este proyecto desde sus inicios. Al Dr. Albert Selva, mi tutor, por su disponibilidad y facilidad para todo lo que he necesitado durante estos años.

A Rodrigo Toledo, por enseñarme a escalar montañas, incluido el haber terminado esta Tesis, pero también muchas experiencias que hemos vivido y muchas otras que estoy segura nos quedan por vivir. Bien puedo decir que, sin él, esta Tesis no existiría. Por su fuerza, tesón, generosidad, perseverancia y visión.

A Ana Belén Moreno y Alma Calahorra porque nunca he visto tanto cuidado en el detalle, siempre con una sonrisa, extrema amabilidad, disposición a hacer bien cualquier tarea y colaborar para hacer las cosas siempre mejor. También a Debayan Datta, por su tiempo, paciencia y trabajo. Un equipo magnífico.

A Kira Raskina por su trabajo y recordarme siempre que lo más importante es saber qué se quiere responder. A Armando Mel y Cristina Viaplana por ayudarme en el mar de los datos. A Guillermo Villacampa por su disposición y alegría.

A todo el personal que trabaja en la UITM, por la búsqueda de la excelencia diaria en nuestro trabajo; en especial a Oriol Miralles, Vladimir Galvao y Guzmán Alonso por haber participado activamente en esta Tesis. A Claudia Noguera, por su paciencia conmigo y su inestimable ayuda diaria. A Marta Sanz por estar detrás de la extracción de cada muestra del 360RIO. A Andrés de Kelety y Gemma Sala por su confianza desde el inicio y por su apoyo. También a los médicos que ya no trabajan en UITM, pero siempre serán parte de ella. En particular a Cinta Hierro, por su inspiración y apoyo; a Ignacio Matos por sus ideas, energía e implicación. A Jordi Rodon, porque sin él, yo nunca hubiera llegado al VHIO, y a todas las aventuras que me iba a deparar trabajar aquí.

A Enriqueta Felip, Teresa Macarulla, Ana Oaknin, Joan Carles, Cristina Saura, Judith Balmaña, Elena Elez, Eva Muñoz e Irene Braña, y a todos los miembros de sus equipos, por su apoyo constante a la UITM, comentar sus pacientes con nosotros y hacer posible nuestro trabajo diario.

A Ana Vivancos, Paolo Nuciforo, Susana Aguilar y Rodrigo Dienstmann porque la UITM no sería igual sin el equipo de prescreening molecular.

A Alex Piris y su equipo, por su ayuda diaria en el seguimiento y la ejecución de los proyectos.

A la Dra. Marta Pulido, por su ayuda en la corrección de esta Tesis doctoral (y darme el empujón que necesitaba para acabarla) y a Marta Carboneras por su ayuda en el formateo final del manuscrito.

A mis primeros mentores, Carlos Gómez Martín, quien fue la primera persona que me ayudó a confiar en mí misma en el entorno laboral y me adentró en el mundo de la investigación clínica. A Manuel Hidalgo, porque me miró a los ojos hace ya muchos años y me dijo muy serio: “Elena, piensa siempre en grande”. A Tony Tolcher y Emiliano Calvo por enseñarme y contagiarme su pasión por los ensayos fase 1.

A los pacientes y sus familias, por su enorme generosidad para participar en este proyecto de investigación. Por ser la motivación final detrás de nuestro trabajo diario. Por ser el recuerdo constante de que todavía tenemos mucho que hacer y mejorar.

A mis padres, Pureza e Ignacio, porque son un ejemplo para mí de tantísimos valores en esta vida, de esfuerzo y de trabajo, pero también de alegría, energía para afrontar las adversidades y disfrute de todas las oportunidades que tenemos. Por enseñarme que no hace falta seguir ningún molde, hacerme creer siempre en mi estrella y por mostrarme el valor de la familia de una manera tan preciosa y única. A mis hermanas, Ana, Lucía y Cristina porque son el mayor regalo que tengo en la vida y lo que más echo de menos al vivir en Barcelona. A Pupin por su cariño y energía positiva siempre.

A mis amigos y amigas, porque han vivido conmigo muchas aventuras y han sido apoyo constante. Por dejarme llorar a su lado en los momentos más duros, sabiendo que volveríamos a reír en los buenos. Por recordarme el valor

de los rizos en los momentos de dudas. Porque la vida es mucho más bonita al tenerlos en ella.

Y finalmente, a mis hijos, Camila y Marcos, por ser mi mayor inspiración, mi mayor reto y mi mayor aventura; porque en sus ojos todos los días solo veo amor y sed de conocimiento.

Amor y conocimiento, dos grandes pasiones de mi vida.

Gracias a todos.

ACRÓNIMOS Y ABREVIACIONES

CEIm	Comité de Ética de la Investigación con medicamentos
360RIO	<i>360° RESISTANCE IN INMUNOONCOLOGY</i>
ABL	<i>Abelson</i>
ALK	Del inglés, <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
BCR	Del inglés, <i>Breakpoint Cluster Region</i>
CCE	Del inglés, Cancer Core Europe
cfDNA	DNA libre circulante Del inglés, <i>circulating-free DNA</i>
CNV	Alteración en el número de copias Del inglés, <i>copy number variation</i>
CTC	Células tumorales circulantes
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
dMMR	Defectos en la reparación de errores de emparejamiento Del inglés, <i>deficient mismatch repair</i>
ECAN	Red Española de Registros de Cáncer
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico Del inglés, <i>epidermal growth factor receptor</i>
FDA	Food and Drug Administration
FDR	Tasa de falso descubrimiento Del inglés, <i>false discovery rate</i>
GRIIm-s	<i>Gustave Roussy Immune Score</i>
HRs	<i>Hazard ratio</i>
HUVH	Hospital Universitario Vall d'Hebron

IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
ICI	Inhibidores de puntos de control inmunitario Del inglés, <i>immune checkpoint inhibitors</i>
IL	Interleuquina
INE	Instituto Nacional de Estadística
iRECIST	Criterios de respuesta inmunológica en tumores sólidos Del inglés, <i>immune-Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
LMC	Leucemia mieloide crónica
MDACC	<i>MD Anderson Cancer Center</i>
MSI-H	Alta inestabilidad de microsatélites Del inglés, <i>microsatellite instability-high</i>
NCI	National Cancer Institute
NGS	Secuenciación de próxima generación Del inglés, <i>next-generation sequencing</i>
NLR	Índice neutrófilo/linfocito Del inglés, <i>Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio</i>
NSCLC	Cáncer de pulmón de célula no pequeña Del inglés, <i>non-small cell lung cancer</i>
ODysSey	Grupo de Oncology Data Science
ORR	Tasa de respuesta global Del inglés, <i>overall response rate</i>
PD	Progresión de la enfermedad Del inglés, <i>Progressive Disease</i>
PD1	Receptores de muerte programada 1

	Del inglés, <i>programmed death 1</i>
PDL1	Ligando del receptor de muerte programada 1 Del inglés, <i>programmed death-ligand 1</i>
CR	Respuesta completa Del inglés, <i>complete response</i>
PR	Respuesta parcial Del inglés, <i>partial response</i>
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumors</i>
RMH	<i>Royal Marsden Hospital</i>
SCLC	Cáncer de pulmón de célula pequeña Del inglés, <i>small cell lung cancer</i>
SD	Enfermedad estable Del inglés, <i>stable disease</i>
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión
SNC	Sistema nervioso central
TAC	Tomografía axial computarizada
TEGI	Tumores de estroma gastrointestinal
TNBC	Cáncer de mama triple negativo Del inglés, <i>triple negative breast cancer</i>
UITM	Unidad de Terapia Molecular del Cáncer
VHIO	Instituto de Oncología Vall d'Hebron
WES	Secuenciación del exoma completo Del inglés, <i>whole exome sequencing</i>
WGS	Secuenciación del genoma completo Del inglés, <i>whole genome sequencing</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de la fracción tumoral circulante de ctDNA según el tipo de tumor	86
Tabla 2. Diferencias entre los pacientes con TF circulante detectable y no detectable antes del tratamiento con inmunoterapia	89
Tabla 3. Análisis univariante de riesgos Cox para supervivencia global	94
Tabla 4. Análisis univariante de riesgos Cox estratificado para supervivencia global.....	95
Tabla 5. Análisis multivariante de riesgos Cox para supervivencia global	97
Tabla 6. Correlación entre la detección de ctDNA a nivel basal antes de iniciar el tratamiento con inmunoterapia y la mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 (A) y el beneficio clínico de los pacientes (B)	104
Tabla 7. Beneficio clínico de los cambios de ctDNA antes del tratamiento y previo al segundo ciclo (preC2) y antes de la realización del TAC	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proyecto de investigación 360° <i>RESISTANCE IN IMMUNOONCOLOGY</i> (360RIO) y del proyecto <i>Immunomics</i>	60
Figura 2. Etapas en el análisis de las muestras.	67
Figura 3. Perfiles de distribución de fragmentos obtenidos con TapeStation 4200.	69
Figura 4. Tipos tumorales en la población de estudio.	78
Figura 5. Tipos de tratamiento en monoterapia y en terapia combinada.....	80
Figura 6. Beneficio clínico (respuesta completa, parcial y estabilización > 4 meses) según los tipos de tumor.....	82
Figura 7. Número de muestras obtenidas por paciente.....	83
Figura 8. Flujo de pacientes y muestras analizadas en el proyecto <i>Immunomics</i>	84
Figura 9. Fracción tumoral circulante en los pacientes agrupados por tipo de tumor (panel superior) o en función de las categorías no detectable (TF = 0) y detectable (TF > 0).....	85
Figura 10. Gráficas del genoma completo generadas mediante el software IchorDNA.....	88
Figura 11. Curvas de supervivencia global (SG) en función de la presencia de ctDNA no detectable (ND) (en rojo) o detectable (D) (en azul).	92
Figura 12. Curvas de supervivencia libre de progresión (SLP) en función de la presencia de ctDNA no detectable (ND) (en rojo) o detectable (D) (en azul)...	93
Figura 13. Correlación entre la fracción tumoral (TF) circulante y el sumatorio de lesiones diana en la evaluación por RECIST antes de iniciar el tratamiento....	98

Figura 14. Correlación entre la fracción tumoral circulante (ctDNA) y el sumatorio de lesiones diana en la evaluación por RECIST antes del tratamiento con inmunoterapia para cada tipo de tumor.....	99
Figura 15. Correlación entre la fracción tumoral circulante (ctDNA) y el valor de LDH plasmático antes del tratamiento con inmunoterapia	100
Figura 16. Correlación entre la fracción tumoral circulante (ctDNA) antes del tratamiento y el estadio del tumor al diagnóstico.....	101
Figura 17. Fracción tumoral circulante según el sexo de los pacientes, el ECOG, la presencia de metástasis hepática, y presencia de metástasis pulmonares (excluyendo a aquellos pacientes que presentan también metástasis hepáticas).	102
Figura 18. <i>Sankey plot</i> mostrando la relación entre la detección de ctDNA antes de iniciar el tratamiento con inmunoterapia y la mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1	103
Figura 19. Curvas de Kaplan Meier mostrando las diferencias de supervivencia global entre los pacientes con las diferentes categorías de respuesta según RECIST v1.1.	107
Figura 20. Genoma completo antes del tratamiento y antes de iniciar el ciclo 2.	108
Figura 21. Curvas de Kaplan Meier mostrando las diferencias de supervivencia global entre los pacientes con cambios cualitativos del ctDNA antes del tratamiento con inmunoterapia (T0) y antes del inicio del segundo ciclo (T1).111	
Figura 22. Curvas de Kaplan Meier mostrando las diferencias de supervivencia global entre los pacientes con cambios cuantitativos del ctDNA de manera basal (T0) y previo al inicio del segundo ciclo de tratamiento (T1).	113

Figura 23. Curvas de Kaplan Meier mostrando las diferencias de supervivencia global entre los pacientes con cambios cualitativos del ctDNA de manera basal (T0) y en el momento de la realización del primer estadiaje radiológico (T1). 115

Figura 24. Curvas de Kaplan Meier mostrando las diferencias de supervivencia global entre los pacientes con cambios cuantitativos del ctDNA de manera basal (T0) y en el momento de la realización del primer estadiaje radiológico (T1). 117

Figura 25. Diagramas de caja de la relación entre los cambios de cuantificación de ctDNA y la mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 antes del segundo ciclo de tratamiento con inmunoterapia (preC2). 119

Figura 26. Diagramas de caja de la relación entre los cambios de cuantificación de ctDNA y la mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 previa al primer control radiológico (TAC) para valorar la respuesta al tratamiento. 120

ÍNDICE

RESUMEN	18
ABSTRACT.....	20
1. Introducción y fundamento	21
1.1. Incidencia y mortalidad del cáncer en España.....	22
1.2. Desarrollo clínico de nuevos fármacos en Oncología.....	24
1.3. Fases de desarrollo clínico de un fármaco	31
1.4. Factores pronósticos en ensayos clínicos en fase temprana.....	34
1.5. Evaluación de respuesta al tratamiento oncológico.....	37
1.6. La biopsia líquida	42
1.6.1. Metodología para la cuantificación de ctDNA.....	43
1.6.2. Aplicaciones clínicas de la biopsia líquida.....	45
1.6.2.1. Detección de alteraciones genómicas.....	45
1.6.2.2. Detección precoz del cáncer.....	46
1.6.2.3. Detección de enfermedad mínima residual (MRD)- estadiaje de la enfermedad localizada.....	47
1.6.2.4. Marcador pronóstico y monitorización de respuesta al tratamiento.....	48
1.7. Iniciativas en curso para integrar el ctDNA en la evaluación de respuesta tumoral.....	51
2. Hipótesis	54
3. Objetivos	56
3.1. Objetivo principal:	57
3.2. Objetivos secundarios:.....	57
4. Materiales y métodos	58

4.1. Implementación del proyecto traslacional 360° RESISTANCE in IMMUNOONCOLOGY (360RIO) e <i>Immunomics</i>	59
4.2. Selección de la población de estudio.....	61
4.2.1. Criterios de inclusión.....	62
4.2.2. Criterios de exclusión.....	62
4.3. Variables clínico-patológicas	63
4.4. Circuito de obtención de muestras biológicas.....	64
4.5. Procesamiento de las muestras.....	65
4.6. Análisis de las muestras	66
4.6.1. Extracción del DNA libre circulante	67
4.6.2. Generación de las librerías de cfDNA	69
4.6.3. Secuenciación de DNA libre circulante	70
4.7. Cuantificación del DNA tumoral (ctDNA)	70
4.8. Categorización de la fracción tumoral circulante y de ctDNA	72
4.9. Criterios de valoración de los resultados clínicos	73
4.10. Análisis estadístico	74
5. Resultados	76
5.1. Características de los pacientes y resultados oncológicos	77
5.2. Obtención y análisis de las muestras.....	82
5.3. Fracción tumoral circulante de ctDNA antes del tratamiento	84
5.4. Valor pronóstico de ctDNA antes del tratamiento respecto a las variables clínicas.....	88
5.5. Valor pronóstico de ctDNA antes del tratamiento respecto a los resultados oncológicos.....	91

5.6. Análisis multivariante de la detección de ctDNA antes del tratamiento como factor independiente de supervivencia global	93
5.7. Correlación entre la cantidad de ctDNA antes del tratamiento y otras variables clínicas	97
5.8. Correlación entre ctDNA detectable antes del tratamiento y mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1	102
5.9. Relación entre los cambios de ctDNA tras el inicio del tratamiento y la supervivencia global	105
5.9.1. Cambios precoces antes del segundo ciclo de tratamiento	109
5.9.2. Cambios más tardíos coincidentes con el primer estadiaje tumoral radiológico.....	113
5.10. Cambios en la cuantificación de ctDNA y mejor respuesta tumoral radiológica medida por RECIST v1.1.....	117
6. Discusión	121
7. Conclusiones.....	140
8. Líneas futuras de investigación.....	143
9. Bibliografía.....	147
10. Anexos	172
10.1. Anexo 1. Aprobación de CEIm HUVH del proyecto 360 RIO	173
10.2. Anexo 2. Hoja actual del consentimiento informado del proyecto 360 RIO.....	174
10.3. Anexo 3. Aprobación del CEIm HUVH del proyecto Immunomics	183
10.4. Anexo 4. Circuito de obtención de muestras de plasma del proyecto 360 RIO.....	184

10.5. Anexo 5. Listado de ensayos clínicos fase 1 de inmunoterapia de los
pacientes participantes del proyecto *Immunomics* 188

RESUMEN

El descubrimiento de la inmunoterapia ha supuesto una revolución en el tratamiento del cáncer, sin embargo, una proporción alta de pacientes continua sin responder por lo que la investigación de nuevas dianas terapéuticas no ha parado de crecer en los últimos años, lo que se refleja en el aumento de los ensayos fase 1 en este campo. Sin embargo, en el momento actual existen pocos marcadores predictivos de respuesta al tratamiento con inmunoterapia y en la mayoría de los ensayos no se contempla ningún biomarcador para guiar la inclusión de los pacientes. La selección de pacientes y la monitorización precoz de respuesta al tratamiento es por tanto de particular interés para poder optimizar el desarrollo clínico de estos fármacos. La incorporación de la biopsia líquida, que permite estudiar el DNA tumoral circulante (ctDNA) en el plasma de los pacientes, ha demostrado tener un alto valor en la clínica al mostrar una alta correlación con el perfil mutacional del tejido tumoral, obteniéndose las muestras de manera mínimamente invasiva. Recientemente, se están evaluando otras posibles aplicaciones de la biopsia líquida, entre ellas el valor del ctDNA como marcador pronóstico y predictivo de respuesta a la inmunoterapia. En esta Tesis doctoral demostramos el valor pronóstico de la detección de ctDNA mediante la secuenciación a baja cobertura del genoma completo, tanto con respecto a la supervivencia global como a la supervivencia libre de progresión. Asimismo, ponemos de manifiesto el potencial valor predictivo de respuesta a la inmunoterapia en ensayos clínicos fase 1. Finalmente, se confirma cómo la cuantificación de los cambios de ctDNA durante el tratamiento se correlaciona con la supervivencia, respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 y el

beneficio clínico de los pacientes. Todos estos hallazgos tienen relevancia científica y, lo que es más importante, su aplicabilidad en la práctica clínica.

ABSTRACT

The discovery of immunotherapy has caused a revolution in cancer treatment. However, a high proportion of patients still do not respond, leading to a continuous increase in the development of new therapeutic targets to harness the immune system, as reflected in the increase of the number of phase 1 clinical trials in this field. Currently, there are very few predictive biomarkers of response to immunotherapy, and in most trials, patients are included without any enrichment biomarker to guide treatment. Therefore, patient selection and early monitoring of treatment response are of particular interest to optimize the clinical development of these drugs. The development of liquid biopsy, which allows the study of circulating tumor DNA (ctDNA) in patients' plasma, has proven to be of high value in the clinic by showing a strong correlation with the mutational profile of tumor tissue in a minimally invasive manner. Recently, other possible applications of liquid biopsy are being evaluated, including the value of ctDNA as a prognostic and predictive biomarker of response to immunotherapy. In this Phd work we demonstrate the prognostic value of low-coverage whole-genome sequencing ctDNA detection for both overall survival and progression-free survival. Additionally, we observe the potential predictive value of response to immunotherapy in phase 1 clinical trials. Finally, we demonstrate how the quantification of ctDNA changes during treatment correlates with patients' survival, radiological response measured by RECIST v1.1, and clinical benefit. All these findings are scientifically relevant, but most importantly, they could be applicable in clinical practice.

1. Introducción y fundamento

1.1. Incidencia y mortalidad del cáncer en España

El cáncer sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Según la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer, se estima que en 2020 se diagnosticaron alrededor de 18,1 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, excluyendo los tumores cutáneos no melanoma. Se prevé que esta cifra aumente hasta 28 millones de nuevos casos por año en el 2040 (1, 2).

En España, el cáncer representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Según estimaciones de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), en el año 2023 se diagnosticaron aproximadamente 279.260 casos de cáncer en nuestro país (3). Entre los tipos de cáncer más frecuentes diagnosticados durante este año destacan el cáncer colorrectal, de mama, pulmón, próstata y vejiga. Otros tipos de cáncer menos frecuentes incluyen el linfoma no Hodgkin, el cáncer de páncreas, el cáncer renal, el melanoma, los cánceres de cabeza y cuello, así como los cánceres de cuerpo uterino, estómago e hígado. Estas cifras subrayan la importancia de la investigación en oncología para abordar esta enfermedad de manera efectiva.

En las últimas décadas, el número absoluto de casos de cáncer diagnosticados en España ha experimentado un incremento notable. Este aumento se atribuye a varios factores, entre ellos el crecimiento de la población, que ha aumentado de aproximadamente 38.850.000 habitantes en 1990 a 47.326.687 habitantes en 2021. Además, el envejecimiento progresivo de la población ha contribuido significativamente, dado que la edad es un factor de riesgo fundamental en el desarrollo de la enfermedad. Asimismo, la exposición

a diversos factores de riesgo, como son el consumo de tabaco, el alcohol, la contaminación ambiental, la obesidad y el sedentarismo, han jugado un papel muy importante en este aumento de la incidencia. Asimismo, en algunos tipos de cáncer, como en el colorrectal, mama, cérvix o próstata, también se ha observado un incremento debido a una detección precoz derivada de programas de cribado, lo que ha determinado un aumento en la identificación de casos en etapas tempranas (2).

La carga global del cáncer sigue siendo una preocupación importante a nivel mundial, con aproximadamente 9,9 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad en 2020, según datos proporcionados por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC). Se proyecta un aumento en la mortalidad por cáncer en los próximos años, con estimaciones que sugieren que podría superar los 16 millones de casos en el año 2040 (2).

En España, se espera un aumento significativo en la mortalidad por cáncer, pasando de alrededor de 112.000 casos en 2020 a más de 159.000 en 2040. Datos recientes del Instituto Nacional de Estadística (INE) indican que en el año 2021 se produjeron 450.744 defunciones en España, con una disminución del 8,7% en la tasa bruta de mortalidad respecto al año anterior. Una vez más, los tumores representaron la segunda causa de muerte en el país, siendo responsables del 25,2% de los fallecimientos, con un ligero aumento del 0,8% en comparación con el año anterior, solo superados por las enfermedades cardiovasculares (4, 5).

En el desglose por género, los tumores continuaron siendo la principal causa de mortalidad en los varones en España en 2021, seguidos de las enfermedades cardiovasculares e infecciosas. En las mujeres, las enfermedades

cardiovasculares ocuparon el primer lugar, seguidas de los tumores y las enfermedades infecciosas. La supervivencia neta a 5 años del diagnóstico de pacientes diagnosticados entre 2008 y 2013 en España fue del 55,3% en los varones y del 61,7% en mujeres. Estas diferencias en la supervivencia global entre sexos probablemente se deban a diferencias en la prevalencia de ciertos tipos de tumores en cada sexo (2).

A pesar de estos desafíos, la supervivencia de los pacientes con cáncer en España es comparable a la de otros países europeos. Se ha observado un aumento en la supervivencia en las últimas décadas, y es esperable que esta tendencia continúe en el futuro.

1.2. Desarrollo clínico de nuevos fármacos en Oncología

A pesar de los notables avances científicos logrados en los últimos años, el cáncer continúa representando una importante causa de morbimortalidad. Hasta finales de los años 90, la quimioterapia era prácticamente la única opción terapéutica disponible para abordar esta enfermedad. Sin embargo, desde entonces, numerosas investigaciones a nivel molecular y celular han permitido profundizar en la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo del cáncer, lo que se ha traducido en cambios de paradigma en el abordaje terapéutico de muchos tumores.

Hanahan y Weinberg (6-8) han descrito y resumido lo que hoy entendemos como las 14 características distintivas de la célula neoplásica y de su microambiente. Estas características incluyen: 1) la capacidad de las células cancerosas para proliferar de manera ilimitada, 2) la supresión de señales que

inhiben el crecimiento celular, 3) la habilidad para evadir el sistema inmunológico, 4) la capacidad de replicación indefinida, 5) la promoción de un microambiente proinflamatorio, 6) la capacidad de invasión y por ende la capacidad de formar metástasis, 7) la inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), 8) la inestabilidad genómica que conduce a la acumulación de daños en el DNA, 9) la resistencia a la muerte celular programada (apoptosis), 10) la alteración de los mecanismos de regulación energética de la célula, 11) la reprogramación epigenética, 12) la relación con el microbioma, 13) la plasticidad fenotípica y 14) la capacidad de senescencia. La comprensión más detallada de estos procesos biológicos subyacentes en la génesis del cáncer ha allanado el camino para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y ha llevado indudablemente a una mejora en el tratamiento de la enfermedad.

El reconocimiento de las características tumorales marca un enfoque revolucionario en la biología molecular del cáncer, cuyo objetivo actual se centra en desarrollar fármacos que, en su mayor parte, son capaces de inhibir específicamente algunas de estas capacidades adquiridas que distinguen a las células tumorales de las células normales. Otro grupo de fármacos están dirigidos a contrarrestar propiedades del microambiente tumoral que son favorables para el crecimiento de las células neoplásicas. Este cambio ha generado dos grandes avances en el desarrollo de nuevos fármacos. Por un lado, ha surgido el auge de las terapias dirigidas molecularmente, que se centran en inhibir los oncogenes tumorales responsables de activar los mecanismos implicados en la carcinogénesis. Estas terapias están diseñadas para interferir con las vías de señalización específicas que promueven el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas (9).

Por otra parte, se ha observado un aumento exponencial en el desarrollo de fármacos en el campo de la inmunoterapia. Estos fármacos tienen el objetivo de restaurar la respuesta inmunológica normal del organismo que ha sido suprimida o evadida por el tumor. La inmunoterapia incluye una variedad de dianas terapéuticas, como los inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI; del inglés, *immune checkpoint inhibitors*), las terapias adoptivas de células T y las vacunas terapéuticas, que intentan potenciar la respuesta inmunitaria del paciente contra las células cancerosas (10).

Volviendo al primer punto, el desarrollo del mesilato de imatinib, una pequeña molécula que inhibe selectivamente la actividad de la tirosina quinasa de BCR-ABL (*Breakpoint Cluster Region-Abelson*) y c-kit, representa un hito significativo en la terapia del cáncer. Fue el primer fármaco dirigido aprobado para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) en pacientes con traslocación entre los cromosomas 9 y 22 (cromosoma Filadelfia). En estos pacientes, la fusión génica BCR-ABL resultante de la traslocación, actúa como un marcador predictivo de la respuesta al imatinib (11). Posteriormente, los resultados positivos de los ensayos clínicos desarrollados con imatinib en pacientes con tumores del estroma gastrointestinal (TEGI) metastásicos y con alteraciones en c-kit, confirmaron que la inhibición de vías de señalización específicas, vitales para la proliferación y supervivencia del tumor, era una estrategia terapéutica eficaz (12, 13).

Estos hallazgos sentaron las bases del paradigma de los fármacos dirigidos y el inicio de una nueva etapa en el tratamiento del cáncer: “la oncología de precisión”. Sin embargo, es importante señalar que el desarrollo de imatinib representó un largo camino, ya que transcurrieron casi 41 años desde el

descubrimiento del cromosoma Filadelfia hasta la aprobación de un fármaco para la inhibición de su diana específica por parte de las agencias reguladoras (14).

Sin embargo, desde entonces el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos se ha acelerado de forma notable (15). Un ejemplo emblemático es el crizotinib, que en un tiempo récord de 3 años desde su descubrimiento fue aprobado en 2011 para tratar el cáncer de pulmón no microcítico en pacientes con una fusión en el gen *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) (16). Este ejemplo inicia también una nueva etapa en la aprobación de fármacos, ya que por primera vez en la historia de la oncología moderna se aprueba un fármaco sin disponer de los resultados de un ensayo fase 3 aleatorizado, ilustrando cómo los ensayos clínicos bien diseñados desde sus fases iniciales pueden acelerar significativamente el proceso de desarrollo de un fármaco y la introducción de nuevas terapias en la clínica, especialmente en el contexto de tumores con mal pronóstico y limitadas opciones de tratamiento (17, 18).

La aprobación de crizotinib en una población seleccionada de pacientes también muestra el potencial de la investigación traslacional para traducir descubrimientos científicos en beneficios tangibles para los pacientes con cáncer. De hecho, el éxito de algunos de los agentes dirigidos actualmente utilizados en el campo de la Oncología ha puesto en evidencia precisamente que el uso eficiente de este tipo de medicamentos está determinado en gran medida por la disponibilidad de biomarcadores predictivos apropiados (19). Los biomarcadores predictivos son características biológicas de la célula maligna (proteínas, fragmentos de DNA, etc) que se pueden determinar objetivamente y que actúan como indicadores de la respuesta farmacológica que puede presentar el paciente a un medicamento concreto (20). El avance en las

modernas técnicas de secuenciación genómica ha permitido la identificación progresiva de nuevas alteraciones moleculares, inductoras de la carcinogénesis en los distintos tipos tumorales, algunas con clara relevancia terapéutica, constituyendo la base de la medicina oncológica de precisión.

A parte de las terapias dirigidas molecularmente, otro campo en creciente desarrollo ha sido la inmunoterapia. Sin lugar a duda en la última década la irrupción de la inmunoterapia, sobre todo de los ICI, principalmente los inhibidores de los receptores de muerte programada 1 (PD1; del inglés, *programmed death 1*), del ligando del receptor de muerte programada 1 (PDL1; del inglés, *programmed death-ligand 1*) y frente al receptor del antígeno 4 de linfocito T citotóxico (CTLA4; del inglés, *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), han supuesto una auténtica revolución en el campo terapéutico (21, 22). Varios ensayos clínicos fase 3 han mostrado un aumento de la supervivencia en los pacientes que reciben este tipo de anticuerpos, ya sea en monoterapia o en combinación, frente a la quimioterapia convencional y actualmente forman parte del tratamiento estándar en múltiples tumores (23-28). Sin embargo, la tasa de respuesta objetiva a estos tratamientos de manera global es solo del 20% y pocos pacientes consiguen respuestas duraderas en el tiempo, ya que la mayoría de los respondedores también generan resistencia al tratamiento a largo plazo (29). Asimismo, en los tumores fríos (con un fenotipo inmunológico con ausencia de linfocitos infiltrantes de tumor o donde estos están excluidos en la periferia y no pueden ser efectivos), la tasa de respuesta es todavía más baja y los beneficios de estas terapias todavía son limitados (30). Esto ha hecho que se estén investigando múltiples estrategias para activar el sistema inmunológico de estos pacientes y transformar los tumores fríos en calientes, como pueden

ser combinaciones de distintos fármacos y nuevos tipos de moléculas, incluyendo los biespecíficos, los *T cell engagers*, distintas citoquinas, terapias agonistas y otras terapias que buscan activar la inmunidad innata, entre otras. El arsenal de nuevas dianas de inmunoterapia no ha parado de crecer en los últimos años (31, 32).

A diferencia de las terapias moleculares dirigidas, uno de los principales retos en el área de la inmunoterapia sigue siendo la falta de marcadores establecidos predictivos de respuesta frente a dichos tratamientos. Se están realizando multitud de esfuerzos para valorar la aplicación de diferentes marcadores predictivos y se están utilizando múltiples estrategias que se basan en diferentes tecnologías (secuenciación del DNA/RNA tumoral, inmunohistoquímica, análisis de la sangre y del microbioma fecal entre otros) (32). Inicialmente, se insistió en el análisis del PDL1, ya que la expresión de PDL1 se correlacionó favorablemente con la respuesta tumoral en pacientes con melanoma y cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC; del inglés, *non-small cell lung cancer*) que recibieron tratamiento con inmunoterapia. Sin embargo, cabe destacar que existen respuestas tumorales en pacientes con PDL1 negativo (33). Por ello, aunque el análisis de PDL1 puede ayudar a seleccionar a ciertos pacientes, existen muchas limitaciones con este biomarcador. Por otro lado, múltiples estudios han demostrado el potencial valor del análisis genómico del tumor para evaluar marcadores predictivos de respuesta (34-36), así como mecanismos de resistencia primarios y secundarios (37-39).

En un hito histórico para la Oncología, en 2017, pembrolizumab se convirtió en el primer fármaco en recibir la aprobación de la agencia reguladora

de medicamentos de Estados Unidos (FDA; del inglés, *Food and Drug Administration*) de manera agnóstica al tipo de tumor (20). Esta aprobación innovadora permitió el tratamiento de cualquier tipo de tumor, independientemente de su origen, siempre y cuando presentara un biomarcador predictivo validado: alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H; del inglés, *microsatellite instability-high*) o defectos en la reparación de errores de emparejamiento (dMMR; del inglés, *deficient mismatch repair*). La aprobación acelerada de pembrolizumab se basó en datos recopilados de solo 149 pacientes MSI-H/dMMR, quienes participaron en cinco ensayos clínicos no aleatorizados diferentes. Estos datos mostraron una tasa de respuesta objetiva (ORR; del inglés, *overall response rate*) del 39,6% en este subgrupo de pacientes (40). Este avance representó un cambio significativo en la forma en que se aborda y trata el cáncer, al ofrecer una terapia efectiva dirigida a un biomarcador específico independientemente del tipo de tumor. Posteriormente en el 2020, se aprobaría también el uso de pembrolizumab en aquellos pacientes que presentaran una alta carga mutacional de manera agnóstica de tumor. Esta aprobación fue respaldada por los resultados del ensayo KEYNOTE 158, donde pacientes con alta carga mutacional de nueve subtipos histológicos presentaron una tasa de respuestas al tratamiento del 29%, siendo el porcentaje de respuestas mantenidas más de 12 meses del 57% (41).

A pesar de estos resultados, aplicables a la selección de una minoría de pacientes, existe actualmente una ausencia real de otros biomarcadores que guíen el uso de inmunoterapia en la práctica clínica. Esto hace que sea fundamental obtener muestras biológicas de los pacientes que reciben este tipo

de tratamiento para poder estudiar mejor diferentes biomarcadores y guiar el desarrollo clínico de los nuevos fármacos.

1.3. Fases de desarrollo clínico de un fármaco

El desarrollo clínico de un fármaco en Oncología desde la investigación preclínica en el laboratorio hasta su aprobación para uso en pacientes se ha realizado tradicionalmente en diferentes fases que tienen diferentes objetivos. Los ensayos clínicos fase 3 son grandes estudios de registro aleatorizados donde se compara el tratamiento estándar con el tratamiento experimental, siendo el objetivo principal evaluar el impacto del tratamiento experimental en la supervivencia global (SG) o la supervivencia libre de progresión (SLP) de los pacientes. Los ensayos clínicos fase 2 son ensayos clínicos de un tamaño más reducido, pueden ser aleatorizados o no, y su objetivo principal es evaluar la eficacia medida como ORR o SLP (42). Los ensayos fase 1 supondrían la entrada de un fármaco a la clínica desde el laboratorio. El objetivo principal de los ensayos clínicos fase 1 ha sido clásicamente evaluar la tolerabilidad y toxicidad de un fármaco, identificar la dosis máxima tolerada, así como la dosis recomendada para el desarrollo posterior del fármaco. La actividad antitumoral, medida a través de la tasa objetiva de crecimiento suele ser un objetivo secundario en estos ensayos clínicos fase 1 (43, 44). En los últimos años, y con la irrupción de las nuevas terapias, la optimización de la dosis elegida (dosis y esquema de administración) es un tema muy debatido donde la relación dosis-toxicidad, pero también dosis-eficacia, tienen que ser ampliamente estudiadas para poder determinar correctamente cuál es el esquema de tratamiento idóneo. Este hecho requiere nuevos diseños que permitan establecer de una manera

más óptima la dosis y vuelven a suscitar el debate del diseño de los ensayos fases 1 en auge entre la comunidad científica (45).

En cualquier caso, tanto la irrupción de la inmunoterapia como de las terapias dirigidas ha hecho que el número de ensayos clínicos en Oncología haya ido creciendo de manera exponencial en la última década, y esto es particularmente cierto de los ensayos clínicos en fase temprana (10, 46). En un estudio publicado por el servicio de Oncología Médica del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, se describe como la unidad de ensayos fase 1 ha aumentado el número de estudios y pacientes, de 13 estudios en el año 2010 con menos de 100 pacientes, a más de 200 ensayos y 300 pacientes en el año 2020. De estos ensayos, más de la mitad eran con fármacos de inmunoterapia (47). Datos más actuales muestran que esta tendencia se ha mantenido con 239 ensayos fase 1 abiertos en el año 2022 y 647 pacientes incluidos, de los cuales 265 siguen siendo inmunoterapia (datos internos no publicados).

A lo largo de estos últimos 10 años hemos asistido a una clara transformación en la aprobación de los fármacos en Oncología, con un particular énfasis en los ensayos clínicos en fase temprana. La irrupción de los biomarcadores supone una revolución en los ensayos clínicos fase 1 con tasas de respuesta en pacientes seleccionados cercanas al 70% y con aprobaciones de los organismos reguladores a partir de los ensayos tempranos sin requerir la realización inicial de los ensayos fase 3 aleatorizados (48).

Es evidente que los estudios fase 1 están adquiriendo un papel cada vez más relevante en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos, ya que se enriquecen con la participación de poblaciones específicas definidas por biomarcadores exploratorios preespecificados. Esta estrategia permite identificar

tendencias y señales que pueden ser cruciales para definir subpoblaciones o subgrupos de pacientes que responderán de manera más efectiva a los tratamientos (49-52). De manera similar, los mecanismos de resistencia a estas terapias dirigidas están siendo descritos precozmente como resultado de la investigación traslacional realizada en los ensayos fase 1 (53, 54). Esta interacción entre la investigación clínica y traslacional está permitiendo el desarrollo simultáneo de agentes dirigidos y la identificación de sus biomarcadores predictivos óptimos, lo que contribuye decisivamente a asegurar su uso adecuado y eficaz en la práctica clínica (55). Este enfoque integrado está acercando cada vez más la investigación clínica y traslacional, lo que resulta en una mayor precisión y eficacia en el desarrollo y la implementación de las terapias. Esta colaboración estrecha entre ambos campos es fundamental para avanzar en la medicina y mejorar los resultados para los pacientes con cáncer y otras enfermedades.

Protocolos de investigación que permiten la obtención de muestras de pacientes, como biopsias de tejido tumoral, muestras de sangre o incluso autopsias en caliente, se están implementando con éxito en paralelo a los ensayos clínicos (56). Estas iniciativas traslacionales están diseñadas para generar líneas celulares y xenoinjertos derivados directamente de pacientes (PDXs), así como para facilitar la obtención de muestras biológicas de alto valor. El análisis de estas muestras mediante técnicas de ultra-secuenciación resulta crucial para avanzar en el conocimiento de una vía de señalización específica y sus agentes dirigidos (54, 57). Estas estrategias traslacionales son fundamentales para comprender mejor la biología subyacente de los tumores y para identificar posibles biomarcadores predictivos de respuesta a terapias

dirigidas. Además, la generación de líneas celulares y modelos de xenoinjerto derivados de pacientes proporcionan herramientas experimentales importantes para probar la eficacia de nuevos tratamientos y comprender los mecanismos de resistencia. En conjunto, estos enfoques contribuyen significativamente al desarrollo de terapias más efectivas y personalizadas para el tratamiento del cáncer y de otras enfermedades.

La situación sigue siendo muy diferente en aquellos fármacos y en ensayos fase 1 donde no se dispone de un biomarcador para la selección de pacientes, tal como sucede en la mayoría de los ensayos de inmunoterapia actualmente en curso. La tasa de respuesta en estos ensayos no guiados por biomarcador es generalmente inferior al 20% (58). Tampoco hay que olvidar que existe un riesgo asociado a la participación en un ensayo clínico y la probabilidad de presentar un efecto adverso secundario al tratamiento considerado grado 3 (grado severo) o superior es del 10-20% (59). Por tanto, la selección de pacientes continúa siendo uno de los procesos más relevantes de los estudios fase 1 porque es necesario establecer un equilibrio adecuado entre la posible toxicidad y el beneficio clínico potencial para los pacientes. Este aspecto es todavía más relevante si se considera, que en la mayoría de los casos, se trata de una población vulnerable y refractaria a los tratamientos convencionales (60).

1.4. Factores pronósticos en ensayos clínicos en fase temprana

En los últimos 15 años se han desarrollado y evaluado múltiples factores e índices pronósticos (61, 62) para valorar la probabilidad de supervivencia de los pacientes que participan en ensayos clínicos en fase temprana. El primer índice pronóstico validado fue desarrollado por la unidad de ensayos clínicos fase 1 del hospital Royal Marsden (RMH; del inglés, Royal Marsden Hospital) en

Londres (63). Inicialmente generaron un modelo basándose en una cohorte retrospectiva de 214 pacientes que posteriormente se validó en 78 pacientes. Se estableció el RMH score basado en tres marcadores pronósticos: la concentración plasmática de albumina y de lactato deshidrogenasa (LDH) y el número de órganos con metástasis. Posteriormente el RMH score fue validado por el MD Anderson Cancer Center (MDACC) en EE. UU., creando un nuevo score por la adición de dos nuevos factores pronósticos: la puntuación de la escala de estado general del paciente oncológico (ECOG-PS; del inglés, *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*) y el tumor primario de origen gastrointestinal (64). Ambos scores pronósticos incluyeron principalmente a pacientes que habían recibido tratamiento con quimioterapia o terapias dirigidas.

Con el auge de la inmunoterapia varios grupos académicos han desarrollado scores específicos para estimar el pronóstico de los pacientes incluidos en ensayos con inmunoterapia. En este contexto, la unidad de ensayos clínicos fase 1 del Instituto Gustave Roussy en Paris publicaba en el 2017 un índice específico, el *Gustave Roussy Immune Score* (GRIm-s), para evaluar el pronóstico de pacientes tratados con inmunoterapia en fase temprana (65). En este estudio se analizaba una cohorte retrospectiva de 155 pacientes, validándose posteriormente en una cohorte prospectiva en 113 pacientes. El estudio se basó en el RMH score y se incluyeron otras variables clínicas de manera dicotómica, que incluían la edad, el ECOG, el sexo, el valor de la LDH, la albumina, el número de metástasis, la hemoglobina, plaquetas, ratio neutrófilo-linfocito, el tipo de tratamiento (combinación o monoterapia), así como el número de líneas previas de tratamiento. Tras el análisis estadístico solo tres valores tuvieron un impacto negativo en la SG: el valor de la LDH más alto de la

normalidad, la disminución de la albumina < 35 g/L y el índice neutrófilo/linfocito (NLR; del inglés, *Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio*) superior a 6. Seguidamente, el grupo de desarrollo precoz de fármacos del MDACC publicaba la evaluación de diferentes marcadores pronósticos en una cohorte interna de 172 pacientes tratados con inmunoterapia (66). Tras el análisis estadístico se encontraron siete factores clínicos asociados a una peor supervivencia: la edad de más de 52 años, el ECOG mayor de 1, la LDH mayor de 0,75 veces el límite superior de la normalidad, la cifra de plaquetas superior a 300.000 células/mm³, el número total de neutrófilos superior a 4,9 x 10⁹/L, el valor absoluto de linfocitos inferior a 1,8 x 10⁹/l y la presencia de metástasis hepáticas. En un contexto similar, la unidad de fases 1 del Princess Margaret Cancer Center en Toronto publicó también su propio índice pronóstico basado en datos de 192 pacientes tratados en 13 ensayos clínicos de inmunoterapia (67). Tras el análisis estadístico encontraron tres factores asociados a un peor pronóstico: ECOG mayor que 1, más de 2 localizaciones metastásicas y valores de albumina por debajo del límite de la normalidad. Más recientemente, la unidad de ensayos clínicos fase 1 del Hospital Universitario Vall d'Hebron en Barcelona ha desarrollado una herramienta pronóstica denominada PIPO en la cual se evaluaban factores pronósticos ya descritos en otros índices pronósticos, aunque en este caso los factores se analizaban de forma continua, en vez de dicotómica, para no perder información, con la finalidad de estimar la probabilidad de muerte a los 3 meses. La herramienta fue validada en una cohorte de 558 pacientes, de los cuales 362 habían recibido tratamiento con inmunoterapia (68).

A pesar de la publicación de todos estos scores pronósticos, su implementación en las distintas unidades de desarrollo temprano de fármacos

sigue siendo baja, y su utilidad sigue siendo limitada para valorar el pronóstico individual de un paciente concreto. Por ello, es necesario incorporar nuevos marcadores pronósticos. Este hecho es particularmente relevante en los ensayos de inmunoterapia en los que, como ya se ha descrito, no existen actualmente marcadores predictivos de respuesta y los tratamientos se continúan administrando de forma no seleccionada.

1.5. Evaluación de respuesta al tratamiento oncológico

En los pacientes con cáncer metastásico, la medición de la carga tumoral en un momento determinado puede ayudar a evaluar la efectividad de una terapia y a acelerar el desarrollo de nuevos fármacos prometedores (69). La valoración de la respuesta al tratamiento es un campo en desarrollo, pero la elaboración de pautas de consenso como los criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos (RECIST; del inglés, *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*), basados en la captura de imágenes de manera repetida a lo largo del curso de la enfermedad y donde se evalúan los cambios en las medidas de las lesiones diana, han proporcionado un lenguaje común y universal para poder evaluar la eficacia de ciertos tratamientos (69, 70). De tal manera, un paciente que presenta la aparición de nuevas lesiones diana o un crecimiento de las lesiones diana de un 20% o superior se considera que esta en progresión de la enfermedad (PD; del inglés, *progressive disease*). Por el contrario, un paciente que presente un descenso del diámetro de las lesiones superior o igual al 30% se define como respuesta parcial (PR; del inglés, *partial response*) y los pacientes que tengan cambios en las lesiones dianas comprendidas entre el crecimiento del 20% y un descenso del 30% se considera que tienen una

enfermedad estable (SD; del inglés, *stable disease*). La desaparición de las lesiones diana y no diana constituiría una respuesta completa (CR; del inglés, *complete response*). Inicialmente RECIST estaba destinado para evaluar la respuesta preliminar de fármacos en fase temprana (y no para la aprobación de fármacos por las agencias reguladoras o para guiar el tratamiento de los pacientes). Sin embargo, en el momento actual y dada la dificultad de realizar ensayos que tengan como objetivo principal evaluar la SG o calidad de vida, múltiples tratamientos se están aprobando por las agencias reguladoras utilizando objetivos como la eficacia medida por SLP o tasa de respuesta (ambas medidas basadas en RECIST v1.1) (71). Esta circunstancia supone un reto en sí misma, dada la dificultad de establecer hasta qué punto se trata de objetivos reales u objetivos subrogados de la SG (72).

Los criterios RECIST v1.1 fueron validados inicialmente en una cohorte de más de 6.500 pacientes en tratamiento con quimioterapia (69) y posteriormente validados en una cohorte de 23.359 pacientes con terapias dirigidas (73). La irrupción de la inmunoterapia ha significado un nuevo reto en la evaluación de respuesta al tratamiento a causa de la aparición de nuevos patrones de respuesta radiológica, no descritos anteriormente con la quimioterapia o las terapias dirigidas (74). El principal patrón de respuesta atípico de la inmunoterapia es el fenómeno de “pseudoprogresión”. Este hecho se describió originalmente en pacientes con melanoma metastásico tratados con ipilimumab y progresión de la enfermedad siguiendo los criterios RECIST v1.1, ya sea por la aparición de nuevas lesiones o crecimiento de las lesiones diana, pero que posteriormente presentaban una regresión tumoral (75). Tras esta primera observación, múltiples ensayos clínicos han descrito este fenómeno en

diferentes histologías tumorales, con una variabilidad en la incidencia que oscila del 3,7-8,3% en melanoma (76, 77), 1,8-6,9% en cáncer de pulmón de célula no pequeña (25, 78-80), 2,8-8,8% en carcinoma de células renales (81, 82) y 1,3-1,8% en los tumores de cabeza y cuello (83). Se postula que la pseudoprogresión puede ser un fenómeno debido a la infiltración tumoral por linfocitos ocasionada por el mecanismo de acción de estos fármacos, y que se manifestaría inicialmente como un aumento del tamaño de las lesiones o la aparición de micrometástasis, previamente indetectables en las pruebas de imagen. Actualmente sigue sin existir consenso en el criterio para definir la pseudoprogresión, aunque en la mayoría de los estudios se considera como una progresión tumoral por RECIST v1.1 seguida de respuesta parcial subsiguiente al mantener el fármaco tras la progresión.

Este hecho tiene una trascendencia importante, ya que la aparición de la progresión tumoral marca la fecha de la SLP según los criterios RECIST v1.1 y, por tanto, el beneficio real de la inmunoterapia podría estar siendo infraestimado al utilizar estas medidas. De hecho, se considera que éste podría ser el mecanismo que explicaría por qué ciertos ensayos de inmunoterapia no presentan un beneficio en SLP o el beneficio obtenido es menor, aunque luego sí que se aprecia un beneficio en la SG de los pacientes.

Debido a que los criterios RECIST v1.1 pueden infravalorar el beneficio de la inmunoterapia y la aparición de pseudoprogresión, se han desarrollado nuevos criterios específicos para evaluar la eficacia de estos fármacos (84-86). El propio grupo de trabajo RECIST ha propuesto una variación publicando los criterios de respuesta inmunológica en tumores sólidos (iRECIST; del inglés, *Immune-Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) (87). La principal

novedad es la posibilidad de poder continuar con el tratamiento tras determinar la primera progresión de la enfermedad, confirmándose en una evaluación posterior al menos transcurridas 4 semanas, siempre y cuando no exista un deterioro clínico del paciente.

Existen ventajas e inconvenientes referentes al uso de RECIST v1.1 para valorar la eficacia de las diferentes terapias. La ventaja principal es que se trata de un método objetivo, está estandarizado y utiliza equipos de imagen convencionales disponibles en la mayoría de los entornos clínicos. Como tal, RECIST v1.1 se puede aplicar de manera transversal por diferentes instituciones, ensayos clínicos y tipos de tumores (69). A diferencia de otros criterios de evaluación de respuesta, RECIST v1.1 se desarrolló y validó utilizando datos reales de pacientes en ensayos clínicos, mediante el trabajo de un equipo colaborativo multidisciplinar académico (y no exclusivamente como una recomendación de expertos, pero sin basarse en datos estadísticos). Las principales limitaciones derivan del hecho de que el método esté sujeto a la interpretación humana (lo que puede determinar cierta variabilidad en la selección de las lesiones diana y medición entre diferentes evaluadores) (88). Además, en la categoría definida como estabilización de la enfermedad, que técnicamente abarca cambios en las medidas de entre +19% a -29%, cabe la posibilidad de no poder definir si la falta de cambio en el tamaño del tumor es atribuible al efecto terapéutico de un fármaco o al crecimiento indolente del tumor debido a su biología e independiente de la respuesta al tratamiento. Esto es particularmente importante en los ensayos clínicos en fase temprana en los que por su diseño no existe un brazo comparador.

Otro aspecto de interés es que no todos los pacientes presentan lesiones que puedan ser consideradas medibles según los criterios RECIST v1.1. Por ejemplo, las lesiones óseas se consideran no medibles, excepto si existe un componente de partes blandas asociado, de manera que puede no haber enfermedad medible por RECIST en tumores en los que la afectación metastásica sea principalmente ósea (como el cáncer de mama o el de próstata). Esto significa que muchos pacientes, con buen estado general, frecuentemente no puedan ser incluidos en ensayos clínicos en fase temprana tan solo por ausencia de lesiones medibles por RECIST. Finalmente, la inmunoterapia plantea desafíos particulares y la creación de guías específicas como son el iRECIST (87). Sin embargo y a diferencia de los criterios RECIST v1.1, iRECIST todavía no está validado y las medidas derivadas de ellos no son de momento objetivos principales de los estudios. En el momento actual la gran mayoría de ensayos de inmunoterapia permiten continuar el tratamiento tras la progresión por RECIST v1.1. Sin embargo, la aplicación de las medidas de iRECIST se hace de manera irregular y no homogénea debido en parte a la falta de validación. Actualmente y desde el grupo de trabajo RECIST, se están recogiendo datos de ensayos de inmunoterapia para poder validar estas guías, aunque el hecho de compartir datos clínicos tiene serias complejidades y la iniciativa, aunque de suma importancia, está siendo difícil de ejecutar. Por otra parte, también se plantea cómo poder incorporar las nuevas tecnologías a la evaluación de respuesta, tales como la radiómica (89) o los cambios dinámicos del DNA libre circulante (cfDNA; del inglés, *circulating-free DNA*) para superar estas limitaciones (90).

1.6. La biopsia líquida

En las últimas décadas hemos sido testigos de una expansión inusitada de las opciones terapéuticas para los pacientes oncológicos. Este aumento de terapias disponibles ha ido acompañado de un creciente interés en desarrollar enfoques de tratamiento más personalizados y estrategias para obtener el perfil molecular de los tumores de manera más dinámica y eficaz.

El término “biopsia líquida” hace referencia a la búsqueda de biomarcadores en fluidos biológicos, tradicionalmente la sangre como el más representativo. Este enfoque ofrece una alternativa a los métodos tradicionales más invasivos, tales como la biopsia tumoral (91, 92). Es importante recordar que las biopsias con aguja gruesa no están exentas de complicaciones (93) y por ello, disponer de métodos alternativos que permitan obtener información molecular del tumor es altamente relevante. La biopsia líquida también puede solucionar cuestiones como la heterogeneidad tumoral (94-96), así como proporcionar un método que permite la valoración repetida y secuencial a lo largo del curso de la enfermedad para monitorizar los cambios ocurridos por el tratamiento o por la evolución del tumor (97, 98).

El término cfDNA hace referencia a los fragmentos de DNA que están fuera de las células y se pueden detectar en los fluidos corporales (99). La presencia de cfDNA se describió por primera vez por Mandel y Mateis en 1948 (100) y posteriormente su origen y significado se estudiaron de manera intermitente durante la siguiente década. En el plasma sanguíneo el cfDNA está típicamente constituido por fragmentos de DNA bicatenario de aproximadamente 140-170 pares de base (pb) de longitud que en su mayoría se originan de leucocitos. En el individuo sano la cantidad en plasma tiende a oscilar entre 1 y

10 ng/mL, aunque puede variar en determinadas situaciones o condiciones clínicas como son el ejercicio, traumatismos, las infecciones o el cáncer (101, 102). Los niveles elevados de cfDNA en pacientes con cáncer se describieron por primera vez en 1977 (103) y su potencial aplicación en la clínica fue reconocida en 1994 cuando se detectó la presencia de fragmentos del gen *RAS* en la sangre de los pacientes (104, 105). El DNA circulante tumoral (ctDNA) se refiere a la porción de cfDNA que se origina en las células tumorales, normalmente tiene un tamaño menor de 145 pb y es responsable de que las concentraciones de cfDNA sean mayores en los pacientes con cáncer (106). Varios estudios han confirmado el alto nivel de concordancia entre las alteraciones genómicas encontradas en el DNA circulante tumoral (ctDNA; del inglés, *circulating tumour DNA*) y en la biopsia de tejido tumoral. Sin embargo, la biología subyacente del ct/cf DNA no es bien conocida, así como tampoco los mecanismos de liberación de ctDNA, existiendo varias hipótesis que incluyen la apoptosis de las células tumorales, la liberación directa o la secreción por parte de los macrófagos después de la fagocitosis de células tumorales o en menor medida por la liberación de células tumorales circulantes (CTC) (107-109).

1.6.1. Metodología para la cuantificación de ctDNA

En general, existen dos enfoques para estudiar el ctDNA en la sangre. El primero implica buscar mutaciones específicas del tumor o regiones genómicas predefinidas (estrategia dirigida). Este tipo de análisis se basa en el uso de procedimientos muy sensibles que incluyen técnicas basadas en la PCR, como la PCR digital en gotas (ddPCR) o el BEAMing-PCR, así como en métodos basados en secuenciación de próxima generación (NGS; del inglés, *next-*

generation sequencing), como el SafeSeqS o el TamSeq. Estos métodos se basan en el principio de interrogar un número limitado de mutaciones conocidas y tienen una sensibilidad aceptable y una alta especificidad. Los métodos basados en la PCR se utilizan, por ejemplo, para detectar mutaciones activadoras del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; del inglés, *epidermal growth factor receptor*) en pacientes con cáncer de pulmón, así como para detectar las mutaciones de resistencia que se generan cuando los pacientes reciben fármacos inhibidores de EGFR (110). Los métodos basados en NGS permiten detectar diferentes tipos de alteraciones, incluidas mutaciones, pequeñas deleciones, reordenamientos o alteraciones en el número de copias. En general estas estrategias requieren la disponibilidad de información previa del genoma del tumor y permiten detectar alteraciones que ocurren con una frecuencia alélica del 0,01% con una alta especificidad (99).

El segundo enfoque (estrategia no dirigida) tiene como objetivo proporcionar un análisis de mutaciones o alteraciones del número de copias (CNV; del inglés, *copy number variation*) del exoma o de todo el genoma mediante secuenciación del exoma (WES; del inglés, *whole exome sequencing*) o del genoma completo (WGS; del inglés, *whole genome sequencing*). Estos métodos no requieren el conocimiento previo del genoma y permiten identificar cambios que pueden ocurrir durante el tratamiento, pero con una menor sensibilidad que las técnicas anteriores. Los trabajos efectuados en los últimos años han permitido aumentar la sensibilidad, pudiéndose detectar alteraciones con frecuencia alélica del 0,2% (98, 111). Asimismo, se han desarrollado diferentes algoritmos bioinformáticos para incrementar la sensibilidad y especificidad (112). La principal ventaja de estas técnicas es que permiten

obtener una información más completa al poder interrogar de manera simultánea y no sesgada múltiples alteraciones presentes en el cáncer.

1.6.2. Aplicaciones clínicas de la biopsia líquida

La biopsia líquida y, en concreto, la cuantificación de ctDNA son áreas de gran interés y creciente investigación en el contexto tanto del diagnóstico, como del tratamiento del cáncer.

1.6.2.1. Detección de alteraciones genómicas

Múltiples estudios han demostrado que las variaciones genéticas descritas en el ctDNA reflejan los cambios mutacionales del tejido tumoral (113, 114). Aunque la especificidad puede acercarse al 100%, la sensibilidad es generalmente menor y depende de la alteración específica (115). Se han publicado una alta tasa de concordancia (cerca al 80%) entre el perfil mutacional de oncogenes diana (*KRAS*, *NRAS*, *PI3KCA*, *BRAF*, *EGFR*) del ctDNA y el tejido tumoral de pacientes con cáncer colorrectal (116), cáncer de pulmón (117) y cáncer de mama (118). En 2014, la FDA aprobó una prueba de biopsia líquida aplicable al cáncer de pulmón (detección por PCR en tiempo real de alteraciones en *EGFR*) para poner de manifiesto mutaciones de *EGFR* asociadas a respuesta al tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa, como erlotinib y osimertinib (119). Un metaanálisis describió una sensibilidad del 61-67% y una especificidad del 90 al 95,9% para la determinación de la mutación en sangre (120). Actualmente esta aplicación del ctDNA es la que está más

implementada en la clínica y tiene más datos que demuestran la validez analítica y clínica de las pruebas de ctDNA.

1.6.2.2. **Detección precoz del cáncer**

El concepto de poder diagnosticar el cáncer antes de la aparición de los síntomas o incluso antes de detectar la enfermedad mediante las diferentes pruebas de imagen es sumamente atractivo y ha captado el interés de la industria farmacéutica, clínicos e investigadores académicos. Uno de los hitos logrados ha sido la reciente aparición de técnicas ultrasensibles dirigidas a identificar mutaciones, alteraciones en el número de copias o cambios en la metilación del ctDNA presentes en cantidades muy bajas (generalmente inferiores al 0,1%) en el plasma de los sujetos (121, 122). Sin embargo, a pesar de los múltiples avances tecnológicos, el reto sigue siendo importantísimo. El número de alteraciones genéticas potenciales de un tumor puede ser altísimo y muy heterogéneo. Por ello, como se desconoce el perfil molecular del tumor que está oculto, es preciso desarrollar paneles amplios con alta sensibilidad y especificidad (122-124). Por ejemplo, una prueba con una especificidad del 99% aplicada a 10 millones de individuos, daría lugar a 100.000 falsos positivos, con el coste y la ansiedad que ello conllevaría, por lo que la especificidad también es un elemento clave en este contexto (125). El problema todavía es más complejo, ya que estudios recientes han demostrado que en la población más envejecida pueden existir mutaciones en los genes diana sin que haya un cáncer subyacente, principalmente debido a procesos de hematopoyesis clonal en los leucocitos (126, 127). Recientemente se están investigando las técnicas de metilación para tratar de superar estas limitaciones (128). También será

importante validar estas estrategias en el marco de los actuales programas de cribado (129). Por ejemplo, en el cáncer de colon, el Epi proColon es una prueba de sangre que evalúa la detección de la metilación del gen Septina 9 (mS9) (130). Esta prueba ha sido aprobada por la FDA para realizar cribado de cáncer de colon en pacientes con riesgo medio de desarrollar cáncer de colon que declinen realizarse una colonoscopia.

1.6.2.3. Detección de enfermedad mínima residual (MRD)- estadiaje de la enfermedad localizada

Tradicionalmente el estadiaje de un tumor se basa en el grado de diferenciación, localización y extensión del tumor primario en el área local, la afectación de los ganglios linfáticos y la aparición de metástasis en órganos a distancia. Este estadiaje permite al clínico realizar una evaluación del pronóstico del paciente y plantear estrategias individualizadas de tratamiento. Las técnicas de biopsia líquida también permiten la detección de enfermedad (molecularmente) metastásica en el contexto de una enfermedad localizada, ampliando el conocimiento del riesgo de que el paciente presente una recaída. En este campo las aplicaciones clínicas podrían tener un gran impacto y serían similares a los cambios que ya han ocurrido en el tratamiento de las leucemias y otros tumores hematológicos. La principal dificultad radica en disponer de una técnica con la mayor sensibilidad posible, aunque ya existen estudios prueba de concepto que demuestran su factibilidad. En un estudio pionero, Diehl et al. (131) fueron los primeros investigadores en demostrar que en aquellos pacientes operados de un cáncer colorrectal en los que se detectaba ctDNA después de la cirugía, el riesgo de recaída al año era notablemente mayor que en aquellos

pacientes en los que no se detectaba. Sin embargo, un metaanálisis publicado recientemente indicaba que la mayoría de los estudios analizados presentaban una sensibilidad y especificidad modestas, de modo que todavía se necesitan futuros ensayos clínicos que validen la aplicación clínica de este tipo de estrategias (132).

1.6.2.4. Marcador pronóstico y monitorización de respuesta al tratamiento

Tal como se ha descrito, la biología básica del ctDNA no se conoce con exactitud, incluyendo un conjunto de factores que regulan el vertido del cf/ctDNA al torrente sanguíneo, así como su eliminación. A nivel general, sin embargo, diferentes estudios muestran que el nivel de ctDNA parece ser un factor pronóstico en múltiples tipos de tumores, a menudo independiente de otros factores pronósticos clínicos ya existentes (118, 133). Esto implicaría que la incapacidad para detectar ctDNA (es decir un resultado negativo de la prueba), podría ser un valor informativo y clínicamente relevante (134). Sin embargo, la fracción de ctDNA puede diferir en pacientes con una presentación clínica similar y algunos tumores como por ejemplo el cáncer renal presentan una pequeña cantidad de ctDNA en plasma, incluso en sus fases más avanzadas, a pesar de ser tumores altamente vascularizados (135). Además, los mecanismos intrínsecos de la variación natural diaria o semanal del cf/ctDNA se desconocen, aunque parece que se trata de un proceso muy dinámico (136). Otras incógnitas incluyen el grado en que la eliminación normal de cfDNA fluctúa en relación con el tratamiento, el trauma, la dieta, el ejercicio y otros factores fisiológicos, incluida la respuesta inmune a la infección o la vacunación (137).

El hecho de que la fracción de ctDNA en la sangre se correlacione en cierta medida con la extensión de la enfermedad (especialmente cuando el tumor está progresando) sugiere que los cambios en la cinética en la fracción de ctDNA podrían ayudar a monitorizar la respuesta clínica a los tratamientos, así como complementar la evaluación de respuesta medida por RECIST v1.1 (138-140). Este aspecto sería particularmente relevante, dado que las pruebas de biopsia líquida son relativamente poco invasivas y no requieren ningún tipo de radiación. En la actualidad existe la posibilidad de diseñar ensayos clínicos que evalúen la opción de cambiar el tratamiento en base a un cambio en la fracción de ctDNA (141), para ayudar en la búsqueda de señal de eficacia o de dosis recomendada en ensayos en fase temprano o incluso la posibilidad de validar los cambios de ctDNA como marcador subrogado de beneficio en SG (142).

Diferentes estudios retrospectivos o estudios prospectivos con tamaños muestrales limitados efectuados en distintos tumores, indican que los cambios en la fracción de ctDNA se asocian con resultados clínicos a largo plazo y a la evaluación de la respuesta tumoral por RECIST v1.1 (143-146). Por ejemplo, dos estudios en cáncer urotelial avanzado indican que las disminuciones de ctDNA durante la inmunoterapia se asocian a una respuesta completa o parcial (147, 148). En cáncer de próstata metastásico resistente a la castración, la disminución profunda de la fracción de ctDNA después de 4 semanas de tratamiento con inhibidores androgénicos está fuertemente asociada con una SLP y una SG más prolongada, independiente de otros marcadores pronósticos incluyendo los cambios en la concentración plasmática del antígeno prostático específico (PSA) durante el tratamiento (149, 150). En el ensayo FASTTAC2 donde los pacientes con NSCLC recibían quimioterapia con o sin inhibidores de la vía de EGFR,

aquellos pacientes con una estabilidad de la enfermedad y una fracción baja de ctDNA también presentaron una mejoría en la SLP y SG (151). De manera similar en NSCLC, varios ensayos clínicos con inhibidores del punto de control inmune (ICI) han subrayado el vínculo entre las disminuciones del ctDNA durante el tratamiento y mejores resultados (152-155). Asimismo, en pacientes con melanoma tratados con ICI, la detección de ctDNA frente a la no detección después de 12 semanas de tratamiento, distinguía la pseudoprogresión de una verdadera progresión con alta sensibilidad y especificidad (156). Finalmente, en un ensayo prospectivo que actualmente está siendo completado, el ensayo MONDRIAN (NCT04720729), los cambios en el ctDNA están fuertemente asociados con la tasa de SLP a los 6 meses en pacientes con cáncer de mama tratadas en segunda línea.

Sin embargo, a pesar de estos resultados prometedores todavía son muchas las cuestiones que tienen que ser aclaradas para la implementación en la práctica y la demostración de una validez analítica y clínica del ctDNA en la evaluación de respuesta. La medición precisa de los cambios de la fracción de ctDNA son más complejos de medir que los cambios relativos del diámetro del tumor. Fundamentalmente, no hay datos suficientes para cada tipo de tumor y con cada tipo de tratamiento para entender el valor real de la medición de ctDNA a nivel basal y qué grado de cambio de ctDNA es clínicamente significativo (157). Aunque hasta la fecha, la mayoría de los estudios se han centrado en la eliminación del ctDNA en plasma, esta métrica binaria depende del ensayo (es decir se basa en la sensibilidad específica de la prueba en concreto con el que se esté realizando la medición), siendo posible que los cambios relativos en la

fracción de ctDNA también puedan ser clínicamente significativos (140). Es fundamental que los estudios futuros puedan aclarar estas incógnitas.

1.7. Iniciativas en curso para integrar el ctDNA en la evaluación de respuesta tumoral

En la actualidad y dado el interés del tema, varios consorcios están trabajando para ayudar a estandarizar las pruebas de biopsia líquida y poder armonizar los resultados (158, 159). Es evidente que todavía faltan estudios adicionales y el análisis conjunto de nuevos resultados para evaluar el impacto y la medida en que el ctDNA se podría integrar en la evaluación de respuesta (157). La Sociedad Europea de Biopsia Líquida está formada por 69 instituciones del mundo académico y la industria farmacéutica, cuyo objetivo es fomentar la introducción de la biopsia líquida en la práctica clínica (160). *Friends of Cancer Research*, otro consorcio constituido por un equipo multidisciplinar de estadísticos, médicos e investigadores del mundo académico, la industria y las agencias reguladoras, ha lanzado un proyecto, llamado ctMoniTR, para acelerar diferentes investigaciones clínicas que evalúan el valor del ctDNA y la respuesta tumoral. En el primer paso de este proyecto un primer análisis de 200 pacientes con NSCLC ha demostrado resultados prometedores (152) y actualmente se están analizando más de 3.000 pacientes en ocho tipos de tumores tratados con inmunoterapia o inhibidores de la tirosina quinasa en 22 ensayos clínicos diferentes. Los primeros resultados presentados en julio de 2023 analizaban pacientes con NSCLC tratados con inhibidores de tirosina quinasa y sugerían que la eliminación total de cfDNA durante el curso de tratamiento (es decir ausencia de detección de ctDNA durante el tratamiento) estaba asociada a una

SLP y SG más favorable. Es importante destacar que la combinación de ctDNA y categorías de primera evaluación de respuesta basada en RECIST no ha conseguido estratificar a los pacientes de manera más precisa que usando la variable de ctDNA exclusivamente (161). Los siguientes pasos de este proyecto, incluye validar estos resultados en otros tumores y con otros tipos de tratamiento. Es posible que sea un desafío poder armonizar los resultados, al tratarse de estudios diferentes con diferentes metodologías.

Otros grandes ensayos de medicina de precisión realizados a través del *National Cancer Institute* (NCI) en EE. UU., como por ejemplo el NCI MATCH, ofrecen una oportunidad ideal para evaluar la eficacia de diferentes terapias de manera agnóstica de tumor basándose en la presencia de un biomarcador. Si bien NCI MATCH incluyó algunos objetivos exploratorios en torno a la cuantificación de ctDNA durante el tratamiento, los resultados iniciales se han visto limitados por la escasez de muestras recogidas. Actualmente los protocolos se han corregido para facilitar la disponibilidad de muestras de plasma en la mayoría de las cohortes abiertas (162).

A nivel europeo, cabe destacar el esfuerzo realizado por el consorcio *Cancer Core Europe* (CCE), del cual el Instituto de Oncología del Hospital Vall d'Hebron forma parte (163), concretamente en referencia al ensayo clínico *Basket of Baskets* (BOB). Se trata de un ensayo académico en que se evalúan diferentes agentes dirigidos en poblaciones de pacientes seleccionados molecularmente (49, 164). Todos los brazos incluyen la detección de ctDNA durante el curso de tratamiento y la correlación con la respuesta. El primer módulo de este ensayo ha valorado el uso de atezolizumab (un fármaco inhibidor del control inmune) en población molecularmente seleccionada (165). Asimismo,

desde el consorcio se está liderando el proyecto europeo DART (investigadora principal del proyecto: Elena Garralda), donde una de las áreas de trabajo consiste específicamente en integrar el ctDNA con otros biomarcadores de respuesta, incluyendo la imagen, así como nuevas tecnologías como la proteómica o la radiómica (166).

Finalmente, desde el grupo de trabajo RECIST se está evaluando cómo se podría integrar la información del ctDNA en los propios criterios RECIST v1.1. (90). Tras una reunión multidisciplinar, se han establecido unas guías orientativas y recomendaciones al respecto (pendiente de publicación).

En resumen, la determinación del ctDNA tendrá un papel cada vez más relevante en el marco de los ensayos clínicos en fase temprana. Los estudios que contribuyan a proporcionar más datos sobre el valor del ctDNA como variable pronóstica predictora de respuesta de los diferentes tratamientos oncológicos serán esenciales para el progreso científico en este campo de investigación.

2. Hipótesis

Las hipótesis establecidas fueron las siguientes:

1. Los pacientes con tumores sólidos avanzados que reciben tratamiento de inmunoterapia en ensayos clínicos fase 1 y presentan un ctDNA elevado tienen peores resultados (SG y SLP) que los pacientes con un ctDNA indetectable.
2. La determinación del ctDNA antes de iniciar el tratamiento con inmunoterapia constituye un marcador analítico independiente del pronóstico clínico de los pacientes.
3. La identificación y cuantificación del ctDNA se asocia con factores clínicos específicos de los pacientes.
4. La identificación de un ctDNA elevado antes de iniciar el tratamiento de inmunoterapia está asociada a una peor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 y a un menor beneficio clínico.
5. Existe una correlación entre los cambios dinámicos en la cuantificación de ctDNA durante el tratamiento de inmunoterapia y la supervivencia global de los pacientes.
6. Existe una correlación entre los cambios dinámicos en la cuantificación de ctDNA durante el tratamiento de inmunoterapia y la valoración de la mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 y el beneficio clínico de los pacientes.

3. Objetivos

3.1. **Objetivo principal:**

Determinar el valor del análisis de ctDNA como marcador pronóstico de SG y SLP en pacientes en ensayos clínicos fase 1 que reciben inmunoterapia.

3.2. **Objetivos secundarios:**

1. Determinar si la detección de ctDNA antes de iniciar el tratamiento se comporta como un factor predictivo independiente en un modelo pronóstico de regresión logística.
2. Valorar si existen diferencias clínicas entre los pacientes según la detección y cuantificación de ctDNA antes de iniciar el tratamiento.
3. Valorar si existen diferencias entre la mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 y la tasa de beneficio clínico entre los pacientes con ctDNA detectable y no detectable antes de iniciar el tratamiento.
4. Determinar si los cambios en la cuantificación de ctDNA antes de recibir el segundo ciclo de tratamiento (2-4 semanas del inicio de la inmunoterapia) o en el momento del primer control radiológico (6-8 semanas del inicio de la inmunoterapia) influyen en la SG, y se relacionan con la respuesta tumoral radiológica medida por RECIST v1.1 y el beneficio clínico de los pacientes.

4. Materiales y métodos

La Unidad de Terapia Molecular del Cáncer (UITM) del Departamento de Oncología Médica del Hospital Vall d'Hebron y del Instituto de Oncología Vall d'Hebron (VHIO), es una Unidad de ensayos fase 1 para el desarrollo clínico de nuevos fármacos. Los pacientes con tumores sólidos avanzados, refractarios y en progresión, para los que no existe un tratamiento convencional disponible, son derivados a la UITM para valorar su posible inclusión en un ensayo fase 1.

4.1. Implementación del proyecto traslacional 360° RESISTANCE in IMMUNOONCOLOGY (360RIO) e *Immunomics*

Con el objetivo de generar una colección de muestras de pacientes con cáncer avanzado tratados con distintos fármacos de inmunoterapia en ensayos fase 1 desarrollados en la UITM, desde el año 2018 hasta enero del 2024, se ha desarrollado un protocolo de investigación, denominado *360° RESISTANCE IN IMMUNOONCOLOGY (360RIO)* (Figura 1). Dicho protocolo tiene como finalidad establecer una plataforma traslacional para obtener muestras seriadas (biopsias tumorales pre-, en curso y post- tratamiento, muestras de plasma, así como células mononucleares de sangre periférica (PBMC) heces y saliva) en diferentes momentos de la enfermedad oncológica para mejorar la definición de los marcadores pronósticos y predictivos de respuesta a fármacos de inmunoterapia, así como identificar mecanismos de resistencia.

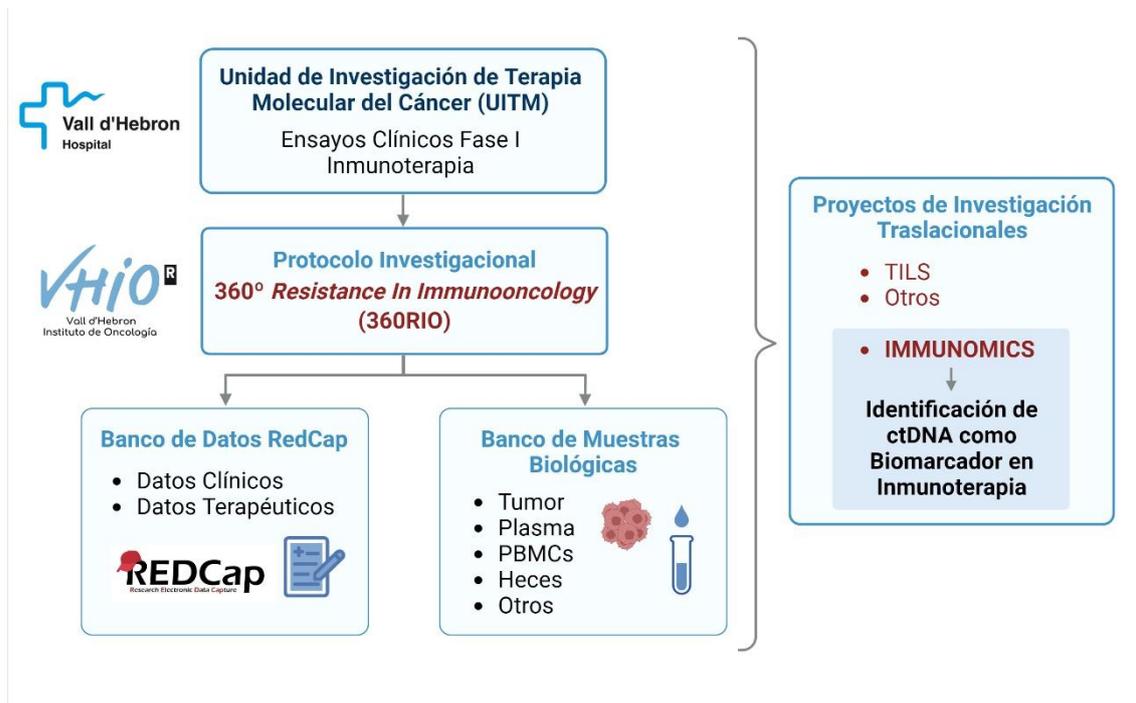


Figura 1. Esquema del proyecto de investigación 360° RESISTANCE IN IMMUNOONCOLOGY (360RIO) y del proyecto Immunomics.

Este estudio se ha efectuado de acuerdo con la normativa del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), implementando el consentimiento informado específico del proyecto 360° RESISTANCE INMUNO-ONCOLOGIA (360RIO): *Aplicación de un modelo de investigación traslacional para estudiar predictores de respuesta/toxicidad, y mecanismos de resistencia en pacientes tratados con inmunoterapia*" PR(AG)252/2016 aprobado por el CEIm HUVH (última versión V4.1 del 5 enero de 2024). En el Anexo 1 se adjunta la aprobación del CEIm HUVH del proyecto y en el Anexo 2 hoja actual del consentimiento informado.

Para la realización de esta Tesis doctoral se analizaron las muestras de plasma de los pacientes incluidos en el proyecto de investigación 360RIO en colaboración con el grupo *Biomarcadores y análisis clonal del cáncer* del VHIO

(investigador principal: Rodrigo Toledo, VHIO). El proyecto “*Immunomics: desarrollo de una plataforma genómica para la predicción de respuesta a inmunoterapia en pacientes con Cáncer PR(AG)321/2018*” recibió aprobación del IRB HUVH en Julio de 2018 (Anexo 3). Todos los pacientes que participan del proyecto *Immunomics* habían firmado la hoja de consentimiento informado del 360RIO.

4.2. Selección de la población de estudio

La población de estudio estaba formada por pacientes con diferentes tipos de tumores sólidos, en estadio avanzado y progresión confirmada tras su última línea de tratamiento, que eran candidatos para ser tratados con un fármaco de inmunoterapia en algún ensayo clínico fase 1 llevado a cabo en la UITM.

La inclusión en uno u otro ensayo dependía del cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión específico de cada ensayo clínico, así como de la disponibilidad de cada ensayo clínico de incluir pacientes en ese momento concreto en el que se estaba valorando al paciente individual. En el momento de la firma del consentimiento informado correspondiente a cada uno de dichos ensayos, en paralelo se le ofrecía al paciente la posibilidad de participar en el proyecto traslacional asociado, 360RIO. Todos los pacientes incluidos en el proyecto firmaron de manera voluntaria el consentimiento específico del 360RIO además del consentimiento específico de cada ensayo. Para todos los pacientes se disponía de datos epidemiológicos y clínico-patológicos en curso de estudio accesibles a través de las bases de datos digitales del hospital con el sistema SAP (*Systems, Applications, Products in Data Processing*).

4.2.1. Criterios de inclusión

- Pacientes con tumores sólidos metastásicos en progresión tras su última línea de tratamiento.
- Pacientes candidatos a recibir tratamiento de inmunoterapia en la UITM.
- Buen estado general, ECOG 0-1.
- Parámetros de función renal y hepática adecuados.
- Esperanza de vida estimada superior a 3 meses.
- Ausencia de toxicidades significativas de tratamientos previos.
- Ausencia de enfermedad cardiovascular, pulmonar u otras patologías que en opinión del investigador pudieran dificultar el cumplimiento del protocolo.
- En caso de tratamiento con corticosteroides, las dosis debían ser iguales o inferiores a 10 mg/día de prednisona o equivalente.
- Firma del consentimiento informado específico del ensayo y del proyecto 360RIO.

4.2.2. Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión incluían el no cumplimiento de cualquier criterio de inclusión, además de los pacientes con tumores cerebrales primarios que fueron excluidos específicamente del proyecto *Immunomics*, debido a la escasa capacidad de dichos tumores de originar metástasis periféricas fuera del sistema nervioso central (CNA) y la baja presencia de ctDNA en sangre (118).

4.3. Variables clínico-patológicas

Para la recogida de datos se utilizó la base de datos REDCap (*Research Electronic Data Capture*). Se trata de una plataforma online diseñada para la captura de datos electrónicos y una metodología de flujo de trabajo para diseñar bases de datos de investigación de ensayos clínicos e investigación traslacional.

Para cada paciente, se recogieron los siguientes datos:

- Datos epidemiológicos: fecha de nacimiento, sexo.
- Datos de patología molecular: tipo tumoral y subtipo histológico, localización del tumor primario, estadiaje en el momento del diagnóstico.
- Datos clínicos: número de líneas previas para el tratamiento de la enfermedad metastásica, tratamiento previo con fármacos de inmunoterapia y mejor respuesta al mismo, fecha de la firma del consentimiento informado del ensayo fase 1 específico, número de órganos afectados por metástasis, localización de las metástasis en el momento de inclusión del ensayo clínico, diámetro de las lesiones diana en la evaluación RECIST antes de iniciar el tratamiento, parámetros analíticos en el momento de inclusión en el ensayo clínico (LDH, recuento de linfocitos, recuento de neutrófilos), tipo de ensayo en el que participa (monoterapia o combinación), tipo fármaco(s) recibido y fecha de la primera dosis, respuesta radiológica en la primera evaluación de respuesta, mejor respuesta radiológica alcanzada y porcentaje de cambio en las lesiones diana, fecha de la progresión (clínica o radiológica), fecha del último control y/o del fallecimiento (si fuera aplicable). La eficacia a los tratamientos se evaluó de acuerdo con los criterios de RECIST v1.1. El

beneficio clínico se definió como el control de la enfermedad durante un periodo mínimo de 4 meses.

- Datos traslacionales: fecha de la firma del consentimiento informado específico del proyecto 360RIO, fecha de obtención de las muestras de plasma y cantidad de ctDNA medido como fracción tumoral circulante a partir de la secuenciación del genoma completo a baja cobertura. Para todas las muestras biológicas obtenidas en los distintos momentos de la enfermedad, se recogió su referencia de codificación para facilitar la trazabilidad posterior.

4.4. Circuito de obtención de muestras biológicas

Para llevar a cabo este proyecto se desarrolló un circuito específico para la obtención de las muestras biológicas de los pacientes incluidos en los ensayos fase 1. Dicho circuito denominado “circuito VHIO de muestras de plasma 360^o RIO” establecido en colaboración con el personal de enfermería de la UITM-VHIO y el personal del laboratorio del grupo de “Biomarcadores y dinámica clonal” del VHIO consistía en la implementación de un protocolo clínico de recogida de muestras de plasma de los pacientes para el análisis de ctDNA.

El documento fuente generado especificaba la cantidad de muestra a extraer, su procesamiento, codificación y conservación adecuada (Anexo 4). Las muestras se obtuvieron en situación basal (antes de iniciar el tratamiento con inmunoterapia) y antes de recibir cada ciclo de tratamiento (cada 2-3 o 4 semanas, según el protocolo específico de cada ensayo en que el paciente estuviera participando). Se obtuvieron entre 10 mL y 20 mL de sangre periférica en tubos especiales diseñados para preservar la calidad y cantidad de ctDNA

(*Cell-Free DNA BCT*[®], Streck, La Vista, NE, USA). En todos los casos, las muestras se recogieron antes de la administración de cada ciclo de tratamiento el día que el paciente acudía al hospital. Tras la obtención de las muestras, los tubos fueron preservados en la nevera de la UITM. Tres veces a la semana (lunes, martes, viernes), los miembros del laboratorio del grupo de “Biomarcadores y dinámica clonal” del VHIO recogían los tubos con las muestras de sangre para su procesamiento.

4.5. Procesamiento de las muestras

La separación de la fracción de plasma se llevó a cabo de forma uniforme en un periodo máximo de 24 horas desde la extracción de la muestra hasta el fraccionamiento, en una sala pre-PCR (previa a la reacción en cadena de la polimerasa, PCR), limpia de productos de amplificación para evitar posibles contaminaciones, y en campanas de flujo laminar dotadas con filtros HEPA (del inglés *High Efficiency Particle Arresting*). Para la separación de la fracción de plasma, los tubos fueron centrifugados una primera vez a 300 g durante 20 minutos. Una vez fraccionada la sangre en plasma, capa leucocitaria y hematíes, el plasma fue transferido a un tubo cónico de 15 mL para una segunda centrifugación a 2000 g durante 20 minutos. A su vez, la capa leucocitaria de la sangre fue conservada en un criovial de 2,0 mL para uso futuro en otros proyectos. Después de la segunda centrifugación, a 2000 g durante 20 minutos, el plasma fue separado en crioviales en alícuotas de 1 mL. A cada muestra se le asignó un código único, que permitía relacionarla con un código pseudo-anonimizado de cada paciente, ciclo de tratamiento y fecha de la obtención de la muestra. Los crioviales se congelaron inmediatamente a -80°C hasta su

procesamiento. La información de la localización de los tubos en el congelador de -80°C fue entonces incluida en un banco de datos con acceso restringido al personal de laboratorio autorizado.

4.6. Análisis de las muestras

Se analizaron las muestras de plasma a nivel basal (antes de iniciar el tratamiento) y antes del inicio del segundo ciclo de tratamiento (2, 3 o 4 semanas desde el comienzo del tratamiento con inmunoterapia según el protocolo específico) con el fin de disponer de un análisis en una fase temprana del tratamiento con inmunoterapia. También se analizaron las muestras obtenidas en el momento del tiempo más cercano a la realización de la primera tomografía axial computarizada (TAC) de reevaluación de la enfermedad tumoral (6-8 semanas desde el inicio de la inmunoterapia).

El análisis de las muestras incluía los siguientes procesos: extracción del DNA libre circulante, generación de las librerías de cfDNA, secuenciación de DNA libre circulante, análisis bioinformático y cuantificación del DNA tumoral (ctDNA), y categorización de la fracción tumoral circulante y del ctDNA (Figura 2).

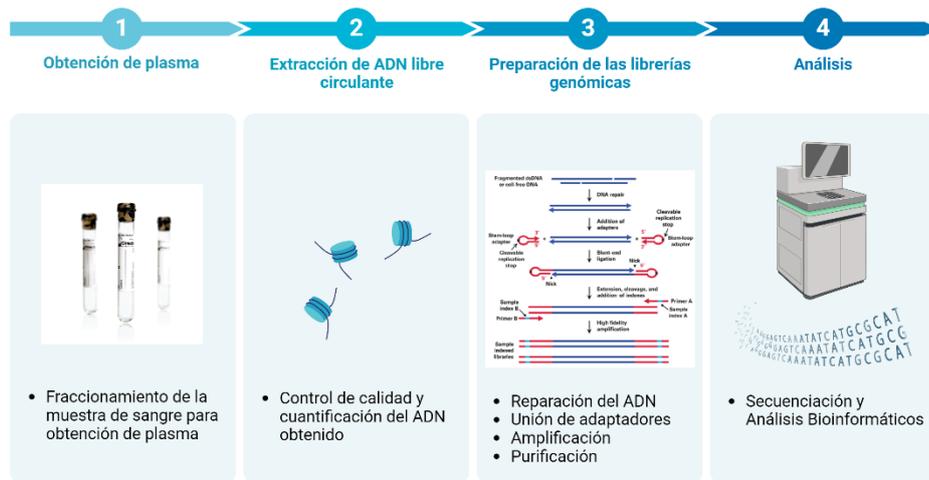


Figura 2. Etapas en el análisis de las muestras.

4.6.1. Extracción del DNA libre circulante

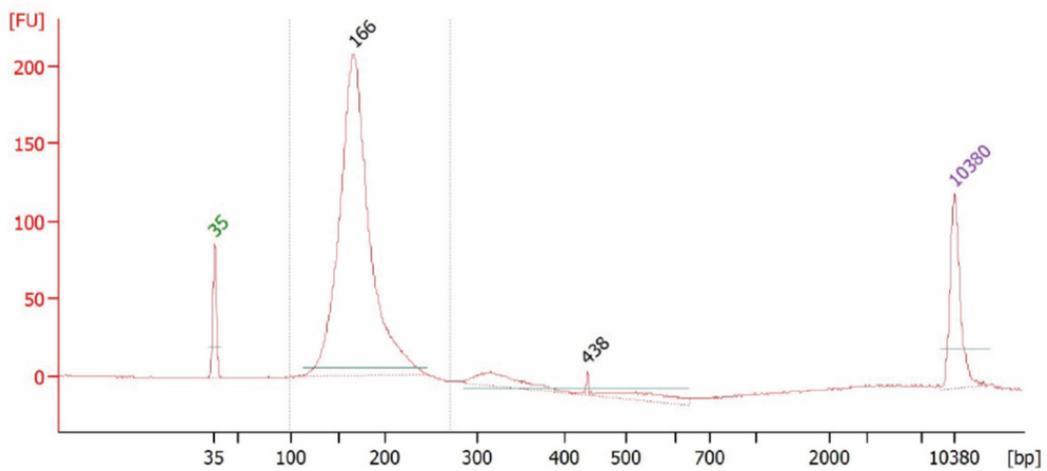
La extracción del DNA circulante se efectuó siguiendo la metodología del laboratorio de “Biomarcadores y dinámica clonal” del VHIO publicada previamente (167-170). Se utilizó únicamente 1 mL de plasma para el proceso de extracción del DNA a fin de preservar muestras para estudios futuros y en base a que 1 mL era una cantidad suficiente ya que los pacientes con cáncer metastásico generalmente presentan una cantidad elevada de cfDNA en sangre.

Las alícuotas de plasma congeladas fueron descongeladas a temperatura ambiente y cfDNA total, de origen tumoral y no tumoral, fue extraído utilizando el kit *QIAamp Circulating Nucleic Acid* (Qiagen, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez extraído, la cuantificación del cfDNA se realizó mediante el kit de ensayo *Qubit dsDNA HS (High Sensitivity)* (Thermo Fisher Scientific, USA). En este punto, el cfDNA podría presentar contaminación de DNA germinal en el caso de que hubiese habido una mala preservación de la

integridad de las células nucleadas de la sangre (mayoritariamente linfocitos), por lo que en los casos con valores inusualmente altos de cfDNA, se realizó un paso adicional de control de calidad con *TapeStation 4200* consistente en el análisis del tamaño de los fragmentos, para asegurar que la muestra no contenía contaminación de DNA germinal. Se pudo distinguir la extracción específica del cfDNA por su tamaño de 150-170 pares de bases frente al DNA germinal cuyo tamaño es de varios kilobases (Figura 3).

A

Perfil de distribución de fragmentos de ADN libre circulante



B

Perfil de distribución de fragmentos de librería genómica generada a partir de ADN libre circulante

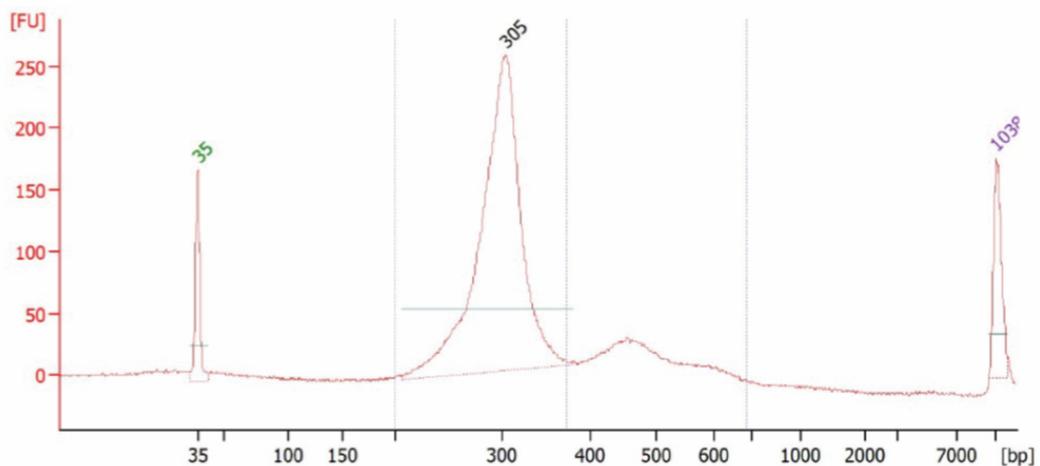


Figura 3. Perfiles de distribución de fragmentos obtenidos con TapeStation 4200. A) Perfil de distribución de fragmentos de DNA libre circulante (cfDNA). Los fragmentos que se encuentran en mayor abundancia son los que tienen en torno a 166 pares de bases. B) Perfil de distribución de fragmentos de librería genómica resultante del proceso de construcción de librerías en el que se usa como material de partida el DNA libre circulante (cfDNA). Los fragmentos que se encuentran en mayor abundancia son los que tienen en torno a 305 pares de bases, resultado de la adición de adaptadores e índices en el proceso de la construcción de la librería.

4.6.2. Generación de las librerías de cfDNA

Para la secuenciación, se usaron las moléculas de cfDNA sin previa fragmentación ya que presentan naturalmente un perfil fragmentado y de pequeño tamaño. Las librerías genómicas se prepararon manualmente por la misma persona (Ana Belén Moreno, VHIO) utilizando hasta 15 ng de cfDNA usando el kit *ThruPLEX Plasma-seq* (*Rubicon Genomics Inc, USA*; actualmente comercializado como *SMARTer ThruPLEX plasma-seq kit* por *Takara Bio, Otsu, Japón*).

El primer paso consistía en la reparación de cfDNA y producción de moléculas con extremos romos. En el segundo paso, se unían los adaptadores al extremo 5' de cfDNA, dejando una abertura en el extremo 3'. Los adaptadores están diseñados de forma que no se unen entre sí, por lo que la eficiencia de la reacción es mayor. En el paso final, se extendían los extremos 3' para completar la síntesis del fragmento, añadiéndose los índices mediante una amplificación. Posteriormente, se realizó una purificación basada en la unión reversible del cfDNA a bolas paramagnéticas. Las moléculas de DNA mayores de 100 pares de bases se unían a la superficie de la perla y se lavaban todas las impurezas

(cebadores, nucleótidos, sales y enzimas). Finalmente, se realizó el análisis cualitativo (análisis del tamaño de la librería, usando el equipamiento *TapeStation* 4200) y el análisis cuantitativo (Qubit). Se consideraron como correctos los perfiles amplificados de aproximadamente 300 pares de bases, lo que correspondía aproximadamente a 150 pares de bases del material de partida (cfDNA), a los que se añadían otros 150 pares de bases correspondientes al tamaño de los adaptadores y los índices usados en el proceso de construcción de la librería genómica para la secuenciación (Figura 3).

4.6.3. Secuenciación de DNA libre circulante

Una vez realizados los análisis de calidad, las librerías genómicas se agruparon a una concentración final de 10 nM para la secuenciación de genoma completo a baja profundidad. Con el objetivo de obtener la secuenciación del genoma completo a coberturas entre 0.5X y 1.0X, se realizaron los cálculos para obtener 0.8 Gb a 1 Gb de secuenciación en cada una de las muestras. Las carreras de secuenciación se realizaron en plataformas Illumina HiSeqX o Novaseq6000 en el modo de síntesis de 150 pares de bases en doble dirección (*pair end*).

4.7. Cuantificación del DNA tumoral (ctDNA)

Para determinar la presencia de ctDNA, los archivos generados en la secuenciación (FASTQ) se analizaron utilizando el pipeline ichorCNA (171). Este análisis incluía varios pasos fundamentales, ya descritos anteriormente por el grupo (168), consistentes en los siguientes:

1. Control de calidad de los datos brutos. Se realizó un control de calidad de los archivos FASTQ (172) para evaluar la calidad de las bases y eliminar lecturas de baja calidad que pudieran influir en la precisión del análisis.
2. Eliminación de las bases de datos correspondientes a los adaptadores usando la herramienta Cutadapt (173).
3. Mapeo de lecturas para el cual las lecturas de secuenciación se alinearon o “mapearon” a un genoma de referencia utilizando el algoritmo de alineación Burrows-Wheeler Aligner (174). Este proceso permitió ubicar las lecturas en el genoma de referencia para identificar las regiones genómicas.
4. Marcado de lecturas duplicadas debidas al proceso de amplificación mediante la herramienta Picard Markduplicates (175) y se eliminación de las mismas.
5. División del genoma en regiones no superpuestas de 1Mb. Las lecturas alineadas se contaron en función de la superposición dentro de cada región utilizando la herramienta “HMMCopy” (<http://compbio.bccrc.ca/software/hmmcopy/>)
6. Normalización de los recuentos para corregir los sesgos de contenido de GC y mapeabilidad, utilizando el paquete de R “HMMCopy”.
7. Medición de la fracción tumoral circulante (TF, del inglés *tumor fraction*) para predecir segmentos de alteraciones de número de copias y estimar la fracción tumoral.

4.8. Categorización de la fracción tumoral circulante y de ctDNA

Para cuantificar el TF circulante de ctDNA, es decir, la cantidad del DNA circulante de origen tumoral se usó el software IchorCNA, aplicando la metodología y los modelos probabilísticos descritos por Adalsteinsson et al. (166). Dicho software utiliza un modelo probabilístico, implementado como modelo oculto de Markov (HMM), para segmentar simultáneamente el genoma y predecir alteraciones del número de copias. Valores positivos de TF circulante indican la presencia de DNA tumoral circulante. Una TF de 10% significa que un 10% del DNA circulante total de la muestra tiene origen tumoral, lo que es un valor considerado relativamente alto (171). Por otro lado, el valor de la TF circulante puede llegar a ser extremadamente alto en algunas muestras de pacientes con cáncer metastásico, por ejemplo, mayor del 50%. Sin embargo, la interpretación de los resultados puede ser más complicada cuando los valores son iguales a cero, porque estos resultados pueden ser reales (e indicar la ausencia de ctDNA en la sangre del paciente) o falsos negativos por la limitación de la sensibilidad de la técnica. El límite de detección de la técnica de IchorCNA es de aproximadamente un 3% (166), lo que implica que algunos casos con TF circulante = 0 podrían tener niveles bajos de ctDNA que son indetectables por la técnica. De acuerdo con los resultados obtenidos, las muestras se clasificaron en dos grupos: a) grupo no detectable incluyendo las muestras con ausencia de detección de ctDNA (TF = 0) y b) grupo detectable con TF > 0.

Las categorías de respuesta molecular se establecieron de acuerdo con las publicaciones recientes del Consorcio *Friends for Cancer Research* (152, 161) y en base de la detección y cuantificación de TF en los distintos momentos evaluados: T0: antes de iniciar el tratamiento con inmunoterapia; T1: antes del

primer ciclo de inmunoterapia o en el momento de primer control radiológico con TAC.

Para el análisis cualitativo se establecieron cuatro categorías:

1. ND/ND- Si la TF no era detectable en ninguno de los momentos (T0, T1)
2. D/ND- Si la TF era detectable en T0 y no detectable en T1.
3. ND/D- Si la TF era no detectable en T0 y detectable en T1.
4. D/D- Si la TF era detectable en T0 y en T1.

Para establecer la relación entre los cambios cuantitativos de la TF y la supervivencia, se definieron las siguientes categorías:

1. Disminución de ctDNA, es decir, disminución de ctDNA del > 50% de T0 a T1 (y aquellos pacientes con ctDNA detectable en T0 y no detectable en T1).
2. Aumento de ctDNA, es decir, aumento de ctDNA del > 20% de T0 a T1 (y aquellos pacientes con ctDNA no detectable en T0 y detectable en T1).
3. Intermedia, es decir, cambios de ctDNA entre el 20% de aumento y un 50% de disminución de T0 a T1.
4. No detectable, es decir, cuando el TF = 0 en T0 y en T1.

4.9. Criterios de valoración de los resultados clínicos

El criterio de valoración principal fue la SG, definida como el tiempo entre la fecha de inicio del tratamiento hasta muerte o último seguimiento. Los criterios de valoración secundarios fueron los siguientes: a) SLP, definida como el tiempo de inicio de tratamiento hasta la primera fecha de progresión por RECIST,

progresión clínica o muerte, y b) beneficio clínico, definido como el porcentaje de pacientes con respuesta completa, parcial o estabilidad de la enfermedad durante más de 4 meses.

4.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en colaboración con el Grupo de *Oncology Data Science* (ODysSey) y Estadística del VHIO. Se ha realizado un análisis descriptivo de las distintas variables clínico-patológicas, moleculares y traslacionales de los pacientes incluidos en el proyecto *Immunomics-360RIO*. Las variables categóricas se expresan en frecuencias y porcentajes, mientras que las variables cuantitativas se expresan mediante la mediana y el rango intercuartílico (Q1-Q3). Para evaluar si existían diferencias basales entre los pacientes con TF detectable o no detectable antes del inicio del tratamiento (T0), se utilizó el test de ji-cuadrado o de Kruskal-Wallis en función de las categorías categórica o continua de las variables. Para controlar el error de falso positivo global (error de tipo I) para rechazar la hipótesis nula al realizar comparaciones múltiples, se aplicó la corrección de la tasa de falso descubrimiento (FDR; del inglés, *false discovery rate*). Para el estudio de la relación entre la cantidad de ctDNA y otras variables, se utilizó el valor de la TF como una variable continua, calculando la mediana, la media y el rango. La correlación entre variables continuas se cuantificó mediante el coeficiente de correlación de rango de Kendall (tau, τ).

El análisis de supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan-Meier, aplicando el log-rank test para las comparaciones estadísticas de las curvas de supervivencia. Se ajustaron modelos univariantes de Cox con riesgos

proporcionales para la obtención del *hazard ratio* (HRs) con un intervalo de confianza (IC) del 95%. Para evaluar si la variable TF tenía un valor pronóstico consistente en todos los subgrupos, se estimó la HR de manera univariante entre los subgrupos definidos, y los resultados se presentan visualmente mediante un *forest plot*. Adicionalmente, se ajustó un modelo multivariante para detectar los factores pronósticos que se asociaban a la SG de manera independiente. Para construir el modelo multivariante, se utilizó la regresión de LASSO (*least absolute shrinkage and selection operator*) con lambda óptima para seleccionar las variables a incluir en el modelo. Este método permite controlar por la colinealidad que pueda existir entre diferentes factores pronósticos y seleccionar modelos multivariantes parsimoniosos. El modelo multivariante se estratificó por tipo tumoral para ajustar por las diferencias en el pronóstico entre tumores. No se realizó imputación de datos faltantes y la significación estadística se definió con un error alfa del 0,05 (bilateral). Se utilizó el programa de "R" (versión 4.3.3) para el análisis de los datos.

5. Resultados

5.1. Características de los pacientes y resultados oncológicos

Durante el periodo de estudio (2018-2022), un total de 2.812 pacientes con cáncer fueron incluidos en algún ensayo clínico fase 1 de la UITM. De ellos 537 pacientes (19,1%) recibieron tratamiento con inmunoterapia, firmaron el consentimiento informado y cumplieron los criterios de inclusión para participar en el estudio traslacional 360RIO (RESISTANCE In IMMUNOONCOLOGY): *“Aplicación de un modelo traslacional para estudiar la eficacia, los mecanismos de resistencia y la heterogeneidad tumoral en pacientes tratados con fármacos de inmunoterapia”*. Los primeros 282 pacientes de este grupo fueron incluidos de forma consecutiva en el proyecto *“Immunomics: desarrollo de una plataforma genómica para la predicción de respuesta a inmunoterapia en pacientes con Cáncer”* y constituyen la población de estudio de la presente Tesis doctoral.

El 49,3% de los pacientes incluidos fueron mujeres y la mediana de edad en el momento de la inclusión en el ensayo era de 61 años (rango 18-87). Todos los pacientes tenían un tumor sólido en fase avanzada y habían recibido una media de 3 líneas de tratamiento previamente (rango 0-13). El 41,1% de los pacientes había sido tratado con inmunoterapia y el 47,2% tenía metástasis hepáticas.

Los tipos tumorales (Figura 4) fueron tumores digestivos (n = 108), de los cuales 78 eran tumores colorrectales (8 de ellos con inestabilidad de microsatélites y 1 con una mutación de POLE), tumores cutáneos (n = 33), principalmente melanoma (n = 30), tumores de cabeza y cuello (n = 29), tumores torácicos, de los cuales 18 eran NSCLC, y 10 mesoteliomas, así como también se incluyeron tumores ginecológicos (n = 24) (6 cáncer de endometrio, 2 de ellos con inestabilidad de microsatélites), cáncer de mama (n = 29), principalmente

tumores con cáncer de mama triple negativo (TNBC; del inglés, *triple negative breast cancer*) (n = 20), tumores genitourinarios (n = 23) y un menor número de otros tipos tumorales.

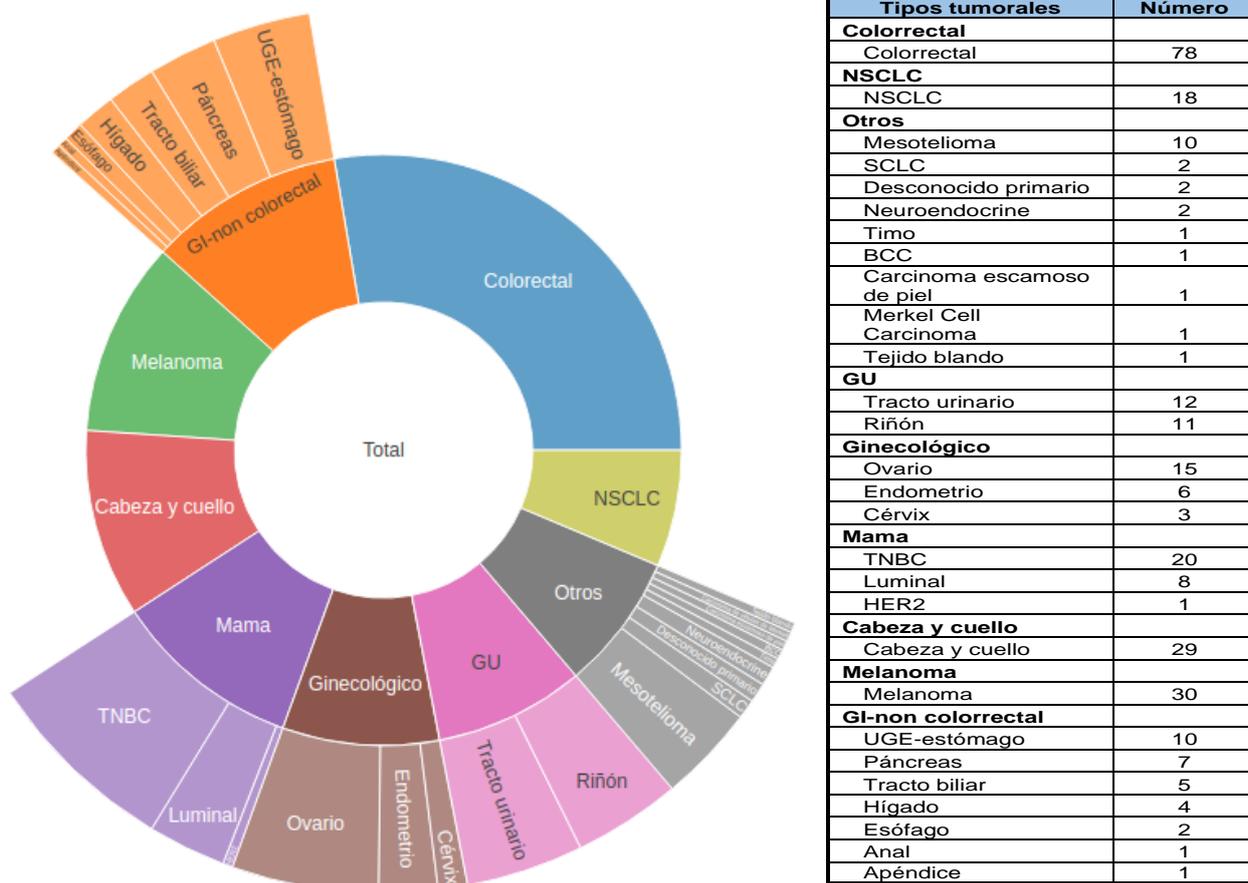
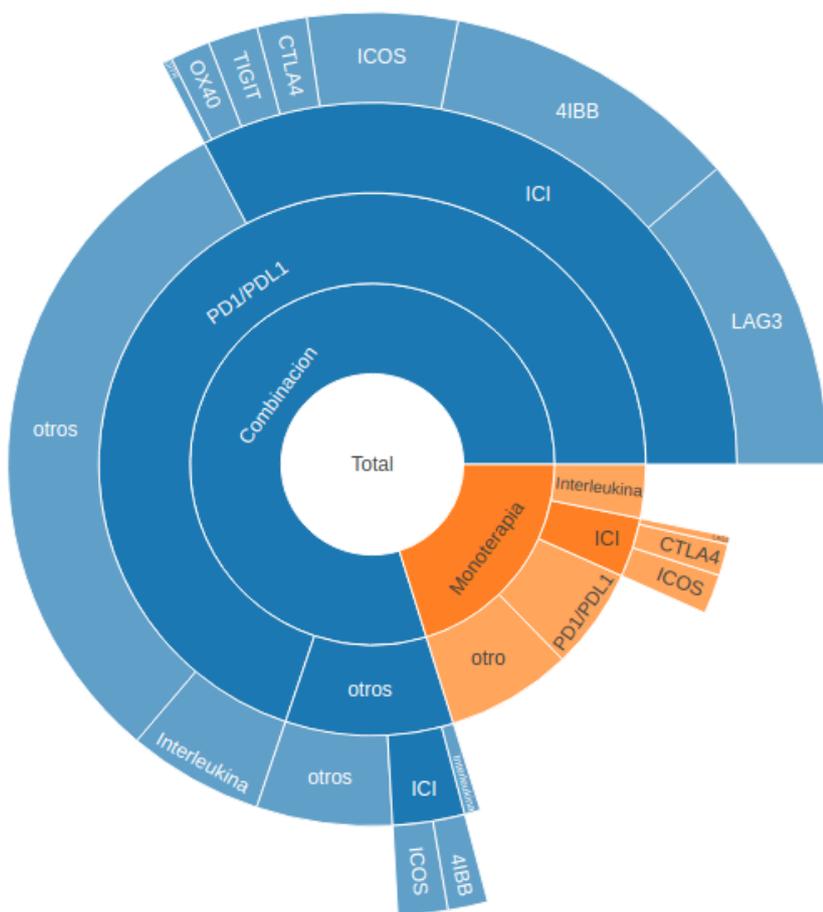


Figura 4. Tipos tumorales en la población de estudio. NSCLC: cáncer de pulmón de célula no pequeña; SCLC: Cáncer de pulmón de célula pequeña; BCG: carcinoma basocelular; GU: tumores genitourinarios; TNBC: tumor triple negativo de mama; HER2: cáncer de mama HER2-positivo; GI-no colorrectal: tumores gastrointestinales no colorrectales.

El número total de ensayos clínicos fase 1 de inmunoterapia fue de 65 que se describen en el Anexo 5. Las dianas terapéuticas se detallan en la Figura 5. En total, 57 pacientes recibieron un fármaco en monoterapia, de los cuales 17

pacientes recibieron un fármaco contra PD1/PDL1, 10 pacientes un tratamiento frente a otro ICI (ICOS, CTLA4 y LAG3), 9 pacientes fueron tratados con una interleucina (IL2, IL15), y 21 pacientes recibieron una terapia frente otro mecanismo de la respuesta inmune (TLR7, STING, FOXP3, CSF1R, BTN3A, A2A, CD25, TGFb). Un total de 225 pacientes (89,8%) recibieron tratamiento de combinación, de los cuales 64 fueron en un formato biespecífico (los pacientes que recibieron biespecíficos fueron considerados en el grupo de combinación a pesar de recibir un fármaco solo, al tener el fármaco 2 dianas terapéuticas) y 161 con la combinación de 2 fármacos o más (incluidos 3 pacientes que recibieron un biespecífico y la combinación de otro fármaco inhibidor del control del punto inmunitario). De los pacientes que recibieron tratamiento en combinación, 197 (87,5%) recibieron un fármaco que inhibía PD1/PDL1. La segunda diana de inhibición en estos pacientes fue otro ICI en 92 casos, una interleucina en 17 y fármacos con otros mecanismos de acción en 88. El segundo ICI en estos pacientes estaba dirigido a inhibidores como LAG3 (n = 32) y TIGIT (n = 5) o fármacos del tipo agonista contra 4IBB (n = 30), OX40 (n = 4) o ICOS (n = 15).



Combinación	225
PD1/PDL1	197
ICI	92
4IBB	30
CTLA4	5
GITR	1
ICOS	15
LAG3	32
OX40	4
TIGIT	5
Interleucina	17
Otros	88
Otros	28
ICI	9
4IBB	4
ICOS	5
Interleucina	2
Otros	17
Monoterapia	57
PD1/PDL1	17
ICI	10
CTLA4	4
ICOS	5
LAG3	1
Interleucina	9
Otro	21

Figura 5. Tipos de tratamiento en monoterapia y en terapia combinada.

La mediana de SG fue de 9,6 meses (IC 95% 8,5-11,9) y la SLP de 2 meses (IC 95% 1,9-2,6). Un total de 40 pacientes (14,2%) presentaron una supervivencia menor de 90 días desde su inclusión en el ensayo clínico. La mayoría de los casos había finalizado el tratamiento por progresión confirmada de la enfermedad (n = 243), 18 casos por progresión clínica de la enfermedad, 7 casos habían interrumpido definitivamente el tratamiento por causa de una toxicidad inaceptable presentada al fármaco, 8 habían completado el número de ciclos establecido por el protocolo, 1 de ellos había decidido retirar el

consentimiento del ensayo en el que participaba de forma voluntaria y 1 había terminado el tratamiento por decisión del investigador principal. En el momento del análisis solamente 4 pacientes continuaban en curso del tratamiento de inmunoterapia y en 10 casos no había evidencia de progresión de la enfermedad. Un paciente se perdió durante el seguimiento y no se dispone del dato de SG.

En cuanto a la evolución de los pacientes en el curso de su tratamiento, el 46,5% presentó progresión de la enfermedad como mejor respuesta (142 pacientes, 131 progresión por RECIST v1.1 y 11 pacientes progresión clínica que no fue documentada por TAC dado el rápido deterioro clínico). Un total de 114 pacientes presentaron estabilización de la enfermedad, de los cuales en 36 (31,6%) fue mayor de 4 meses. Se documentó una respuesta completa en 4 pacientes y parcial en 22, con una tasa de respuesta del 9,2% (26/282) y una tasa de beneficio clínico del 22,0% (62/282).

La Figura 6 ilustra el beneficio clínico en los diferentes tipos de tumor. El tipo tumoral que presentó una tasa mayor de beneficio clínico fue el de cabeza cuello, con un beneficio clínico del 37%. Es importante destacar que, de los 29 pacientes con este tipo de tumor, 21 no habían recibido inmunoterapia previa. El tipo tumoral con una tasa de beneficio clínico menor fue el cáncer colorrectal, con una tasa de beneficio clínico del 12%. La tasa de respuesta en los pacientes que recibieron monoterapia fue de 8,6%, con una tasa de beneficio clínico del 20,7% y la tasa de respuesta de los pacientes que recibieron tratamiento combinado fue de 9,4% con una tasa de beneficio clínico del 22,3%. La tasa de respuesta en los pacientes que recibieron un fármaco contra PD1/PDL1 (ya sea en monoterapia o en combinación) fue de 11,7%, con una tasa de beneficio

clínico del 23,9%, mientras que en los pacientes que no recibieron un fármaco contra PD1/PDL1 fue de 1,4% con una tasa de beneficio clínico del 15,9%.

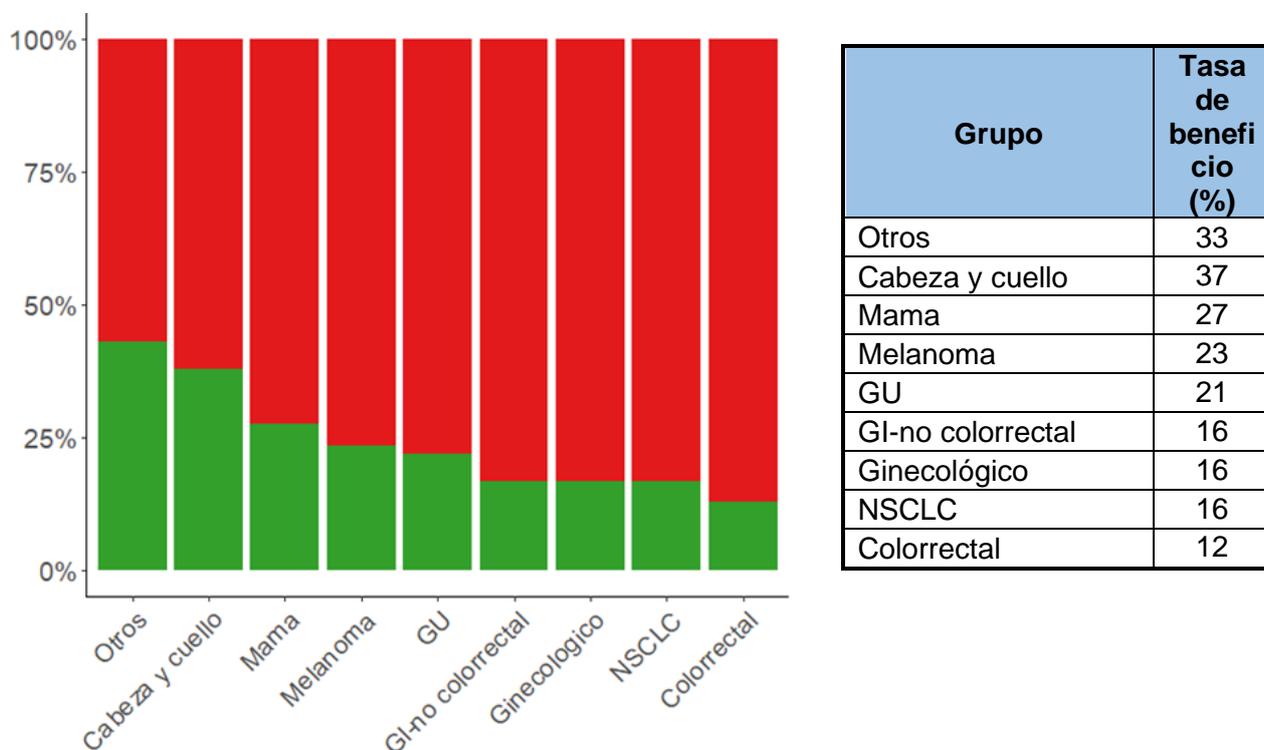


Figura 6. Beneficio clínico (respuesta completa, parcial y estabilización > 4 meses) según los tipos de tumor (color verde: beneficio clínico, color rojo: ausencia de beneficio; otros tumores: mesotelioma, SCLC, tumor desconocido primario, neuroendocrinos, timo, carcinoma escamoso cutáneo, tumor basocelular, carcinoma de Merkel, sarcoma de tejidos blandos).

5.2. Obtención y análisis de las muestras

Se recogieron un total de 2.154 muestras de plasma correspondientes a los 282 pacientes incluidos en el proyecto *Immunomics*. El número de muestras extraídas por paciente se resume en la Figura 7.

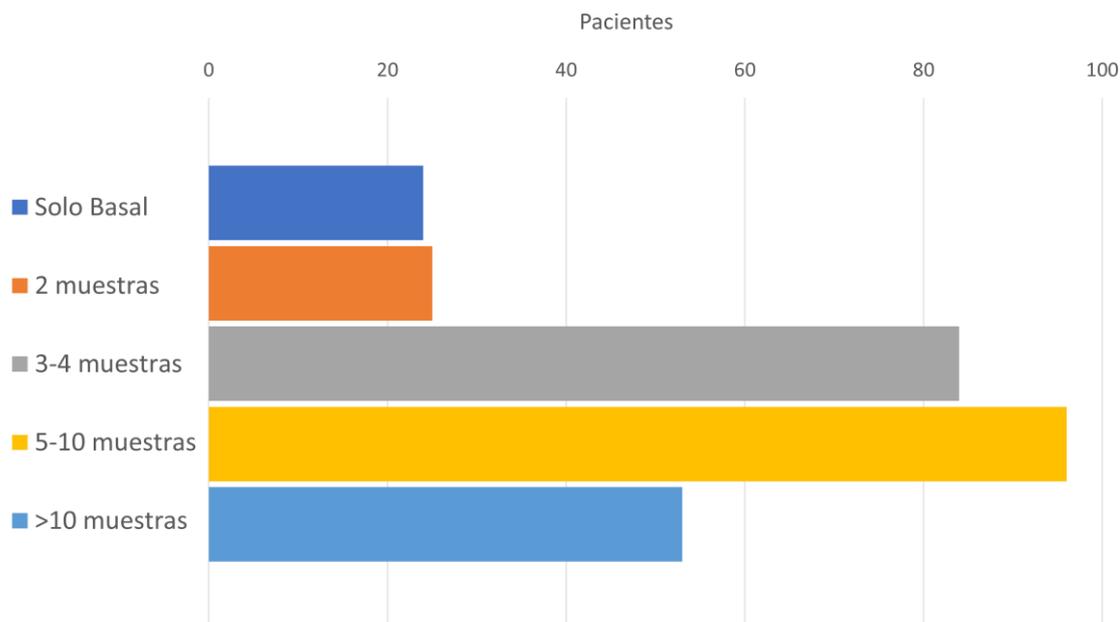


Figura 7. Número de muestras obtenidas por paciente. Basal: T0 antes de empezar la inmunoterapia.

De los 282 pacientes, se analizó una muestra de plasma obtenida a nivel basal (antes de iniciar el tratamiento de inmunoterapia) para la determinación de ctDNA. Posteriormente se analizaron 215 muestras de plasma de pacientes obtenidas antes de recibir el ciclo 2 de tratamiento (preC2), que corresponde a las 2, 3 o 4 semanas de empezar el tratamiento según el protocolo específico. En los 67 pacientes en los que no se analizó una muestra de plasma preC2, los motivos fueron por deterioro clínico del paciente en 9, problemas técnicos que impidieron obtener un resultado evaluable en 17 y fallo del circuito en 41 (generalmente porque la enfermera de investigación no era conocedora de que el paciente recibía tratamiento en ese momento y no se obtuvo la muestra). De los 215 pacientes en los que se analizaron el ctDNA preC2, en 195 casos (90,7%) se analizó una muestra posterior que correspondía al tiempo más

cercano a la realización del primer TAC para reevaluar la enfermedad, lo que en la práctica significaba prácticamente antes del inicio del tercer ciclo de tratamiento con inmunoterapia. El flujo de los pacientes y las muestras analizadas se resumen en la Figura 8.

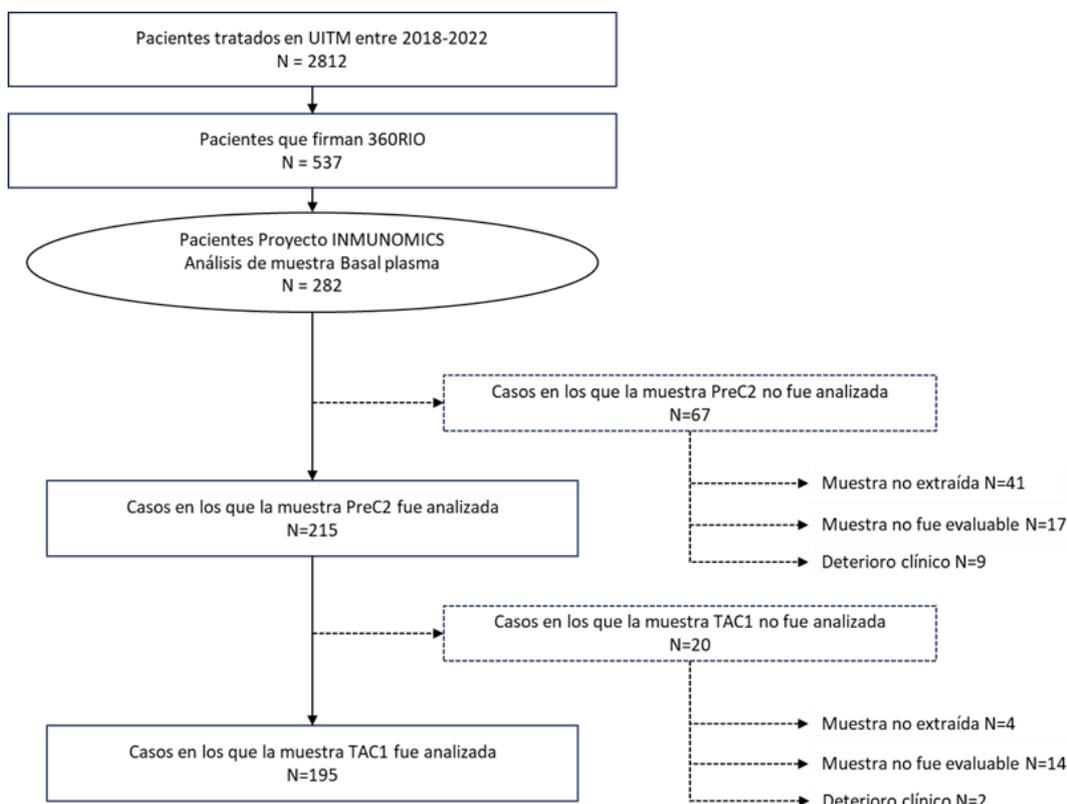


Figura 8. Flujo de pacientes y muestras analizadas en el proyecto *Immunomics*.

5.3. Fracción tumoral circulante de ctDNA antes del tratamiento

De los 282 pacientes, en 61,7% se obtuvo un valor de TF detectable (> 0). La media de la TF circulante global en la población de estudio fue de 15%, con una mediana del 8,7% (rango 0-86,1%). En 129 casos (45,7%) el TF fue $> 10\%$, reflejando el estadio avanzado de la enfermedad en los participantes en ensayos

fase 1. La Figura 9 muestra la proporción de pacientes con TF circulante detectable, así como su distribución en cada tipo de tumor.

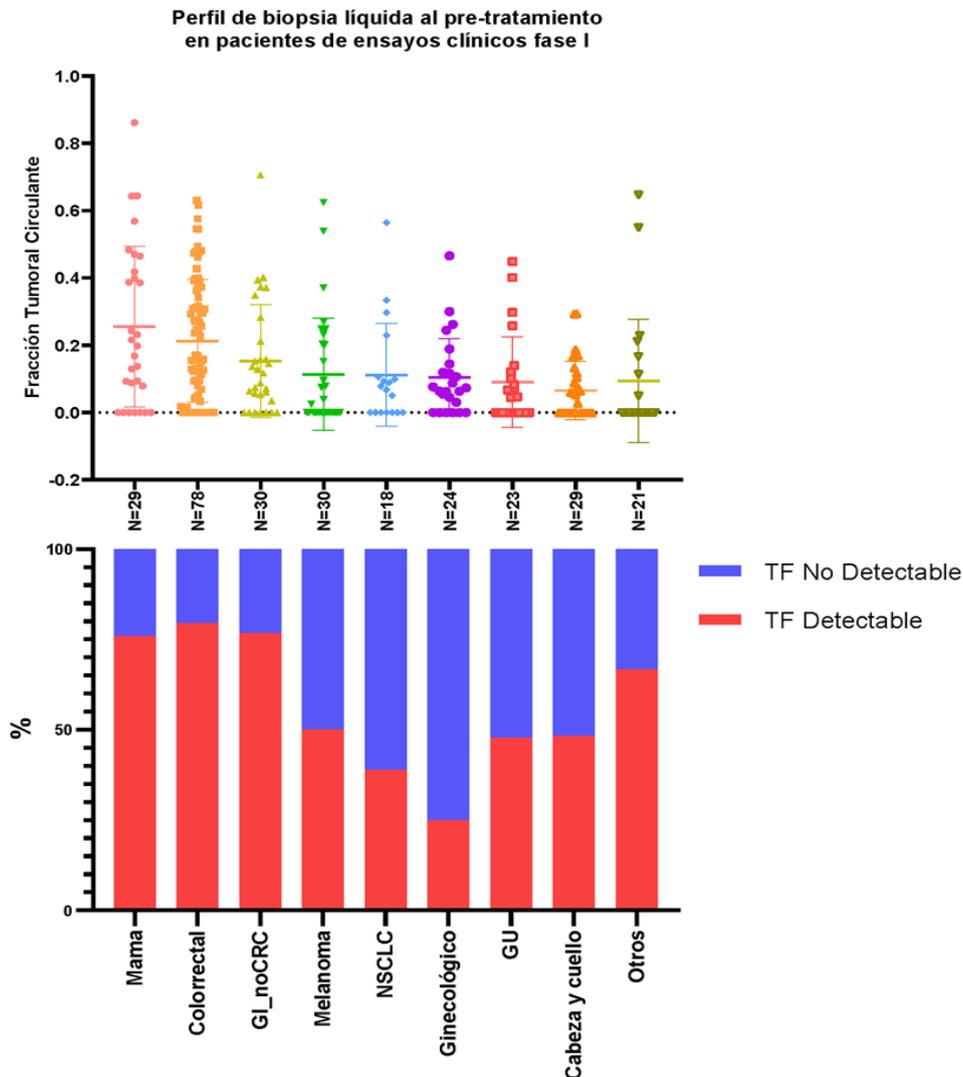


Figura 9. Fracción tumoral circulante en los pacientes agrupados por tipo de tumor (panel superior) o en función de las categorías no detectable (TF = 0) y detectable (TF > 0).

Es importante destacar que en todos los tipos tumorales analizados existían casos en los que el ctDNA era indetectable (TF = 0). El mayor porcentaje de tumores con TF circulante indetectable de ctDNA correspondía al cáncer ginecológico (75%) y el de porcentaje menor al cáncer colorrectal (20,5%) (la categoría de “otros” tumores fue excluida dada la heterogeneidad de los tumores

presentes en este grupo). Los valores específicos de la media, mediana y rango de la fracción tumoral circulante en cada uno de los tipos tumorales se especifican en la Tabla 1. Se puede objetivar la gran variabilidad en todos los tipos tumorales analizados. Cáncer de mama fue el tipo tumoral con mayor variabilidad y cabeza y cuello el de menor variabilidad (Figura 9 y Tabla 1).

Tabla 1. Cuantificación de la fracción tumoral circulante de ctDNA según el tipo de tumor

	Mama	Colorrectal	GI_noCRC	Melanoma	NSCLC	Ginecológico	GU	Cabeza y cuello	Otros
Número de valores	29,00	78,00	30,00	30,00	18,00	24,00	23,00	29,00	21,00
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Percentilo 25%	0,04	0,04	0,03	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
Mediana	0,20	0,16	0,10	0,01	0,07	0,07	0,04	0,03	0,00
Percentilo 75%	0,44	0,35	0,23	0,21	0,14	0,14	0,12	0,11	0,14
Máximo	0,86	0,63	0,71	0,62	0,56	0,47	0,45	0,29	0,65
Rango	0,86	0,63	0,71	0,62	0,56	0,47	0,45	0,29	0,65
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Percentilo 25%	0,04	0,04	0,03	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
Desviación Estándar	0,24	0,18	0,17	0,17	0,15	0,12	0,13	0,09	0,18
Error de media estándar	0,04	0,02	0,03	0,03	0,04	0,02	0,03	0,02	0,04
Fracción tumoral circulante (TF=0), %	24,14	20,51	23,33	50,00	61,11	75,00	52,17	51,72	33,33
Fracción tumoral circulante (TF>0), %	75,86	79,49	76,67	50,00	38,89	25,00	47,83	48,28	66,67

Se analizó específicamente la TF circulante en los tumores con inestabilidad de microsatélites (n = 10) (8 casos de tumores de cáncer colorrectal, 2 casos de cáncer de endometrio), dado que las alteraciones genómicas de estos pacientes están más relacionadas con un perfil mutacional que con el número de copias (176). En este grupo reducido de tumores, 5 de ellos presentaron una TF > 0 y los otros 5, una TF = 0.

A modo de ejemplo, la Figura 10 muestra las gráficas del genoma completo generado mediante la plataforma ichorCNA correspondientes a tres pacientes del estudio con las medidas de las TF correspondientes (TF = 0, TF bajo = 5% y TF alto = 60%).

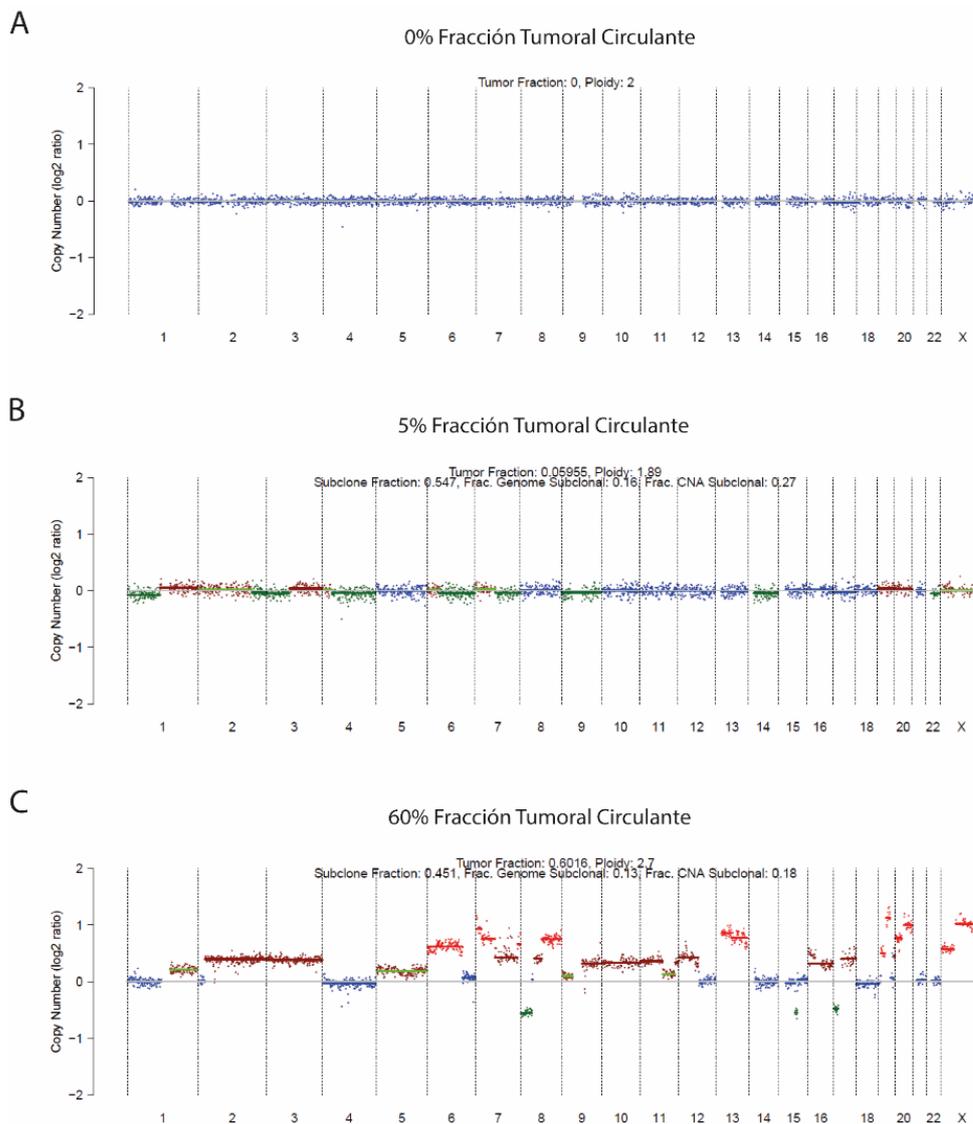


Figura 10. Gráficas del genoma completo generadas mediante el software IchorDNA (cromosomas 1 al 22 y cromosoma X en el eje horizontal, número de copias en escala logarítmica en el eje vertical). A) genoma con TF = 0; B) genoma con TF = 5%; C) genoma con TF = 60% (las regiones coloreadas indican el número de copias; en azul: normal, $n = 2$; en verde: inferior al normal ($n < 2$); en marrón/rojo: superior al normal ($n > 2$)).

5.4. Valor pronóstico de ctDNA antes del tratamiento respecto a las variables clínicas

Para estudiar el valor pronóstico de la cuantificación del ctDNA a nivel basal se analizaron ambos grupos, pacientes con TF detectable ($TF > 0$) y TF no

detectable (T = 0). Las principales características clínicas de ambos grupos se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Diferencias entre los pacientes con TF circulante detectable y no detectable antes del tratamiento con inmunoterapia

Característica	No detectable (n = 97)	Detectable (n = 185)	Total (n = 282)	Valor de la P
Mujeres, n (%)	45 (46,4)	78,00	30,00	21,00
Edad al comienzo de tratamiento UITM, años, mediana (rango)	64 (56-70)	60 (51-69)	61 (52-69)	0,239
Estadio al diagnóstico, n (%)				0,027
I-III	59 (66,3)	88 (49,7)	147 (55,3)	
IV	30 (33,7)	89 (50,3)	119 (44,7)	
Grupo de tumor, n (%)				0,001
Colorrectal	16 (16,5)	62 (33,5)	78 (27,7)	
Melanoma	15 (15,5)	15 (8,1)	30 (10,6)	
Cabeza y cuello	14 (14,4)	15 (8,1)	29 (10,3)	
GU	11 (11,3)	12 (6,5)	23 (8,2)	
GI-no colorrectal	7 (7,2)	23 (12,4)	30 (10,6)	
Mama	7 (7,2)	22 (11,9)	29 (10,3)	
NSCLC	7 (7,2)	11 (5,9)	18 (6,4)	
Ginecológico	6 (6,2)	18 (9,7)	24 (8,5)	
Otros	14 (14,4)	7 (3,8)	21 (7,4)	
ECOG, n (%)				0,523
0	53 (54,6)	110 (59,5)	163 (57,8)	
1	44 (45,4)	75 (40,5)	119 (42,2)	
Leucocitos (10 ⁹ /L), mediana (rango)	7,1 (5,4-8,8)	6,8 (5,6-8,3)	6.9 (5,5-8,4)	0,774

Neutrófilos (10 ⁹ /L), mediana (rango)	4,5 (3,3-6,0)	4,4 (3,4-5,8)	4,4 (3,4-5,8)	0,840
Linfocitos (10 ⁹ /L), mediana (rango)	1,5 (1,1-1,9)	1,4 (1,0-1,7)	1,4 (1,0-1,8)	0,070
Ratio neutrófilos-linfocitos	3,1 (2,1-4,1)	3,4 (2,4-5,2)	3,3 (2,3-4,8)	0,112
LDH (UI/L), mediana (rango)	235 (186-357)	415,5 (254,2-619,8)	335 (218-519,5)	< 0,001
Albúmina (g/dL), mediana (rango)	4,0 (3,9-4,3)	4,0 (3,7-4,2)	4,0 (3,8-4,2)	0,283
Metástasis hepáticas, n (%)	26 (26,8)	107 (57,8)	133 (47,2)	< 0,001
Sumatoria de todas las lesiones diana (mm), mediana (rango)	70 (41,2-107,5)	100,5 (65,8-149,0)	89,0 (56-136)	< 0,001
Líneas previas, mediana (rango)	2 (1-3)	3 (2-4)	3 (2-4)	< 0,001
Exposición previa a ICI, n (%)	44 (45,4)	72 (38,9)	116 (41,1)	0,445
Inmunoterapia, n (%)				0,499
Combinación	80 (82,5)	144 (77,8)	224 (79,4)	
Monoterapia	17 (17,5)	41 (22,2)	58 (20,6)	
Primera diana: PD1/PDL1, n (%)	76 (78,4)	137 (74,1)	213 (75,5)	0,523
Beneficio clínico, n (%)	33 (34,0)	29 (15,7)	62 (22,0)	0,001

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de algunas características basales entre ambos grupos. El grupo con TF detectable incluyó una mayor proporción de tumores colorrectales y cáncer de mama, mientras que el grupo con TF no detectable incluía más pacientes con melanoma y tumores de cabeza y cuello. El estadio IV al diagnóstico de los tumores en el grupo con TF detectable fue del 50% vs 30% en el grupo no detectable. La mediana de la LDH en el grupo detectable fue de 415 UI/L, frente a 235 UI/L en el grupo no detectable ($p < 0,001$). Cabe destacar que en el grupo con TF detectable, el 57,8% de los pacientes presentaban metástasis hepáticas,

frente al 26,8% en el grupo de TF no detectable ($p < 0,001$). Asimismo, el grupo TF detectable, presentaba un sumatorio de lesiones diana mayor que el grupo TF no detectable, ($p < 0,001$). Por otro lado, el grupo con TF detectable estaba más politratado, con una media de líneas previas de 3 vs 2 líneas en el grupo no detectable ($p < 0,001$), aunque la diferencia del porcentaje de pacientes que habían recibido inmunoterapia previa era similar (45,4% vs 38,9% $p = 0,445$). No existieron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a proporción de mujeres o edad antes de iniciar el tratamiento. En cuanto al tratamiento que realizaron en el ensayo clínico tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

En resumen, la presencia de ctDNA detectable (TF > 0) antes del tratamiento con inmunoterapia demostró una relación estadísticamente significativa con un mayor porcentaje de pacientes afectados de tumores gastrointestinales (colorrectal y no colorrectal), con metástasis hepáticas, sumatorio de las lesiones diana mayor, mayores niveles de LDH y líneas previas de tratamiento.

5.5. Valor pronóstico de ctDNA antes del tratamiento respecto a los resultados oncológicos

La detección de ctDNA antes del tratamiento con inmunoterapia mostró un valor pronóstico significativo. La mediana de supervivencia global (SG) en el grupo de TF circulante no detectable fue de 15,5 meses (IC 95% 13,3-21,7) frente a 8,2 meses (IC 95% 6,8-9,2) para el grupo de TF detectable. Las diferencias en SG fueron estadísticamente significativas con un HR de 1,8 (IC 95% 1,4-2,4, $p < 0,0001$) (Figura 11).

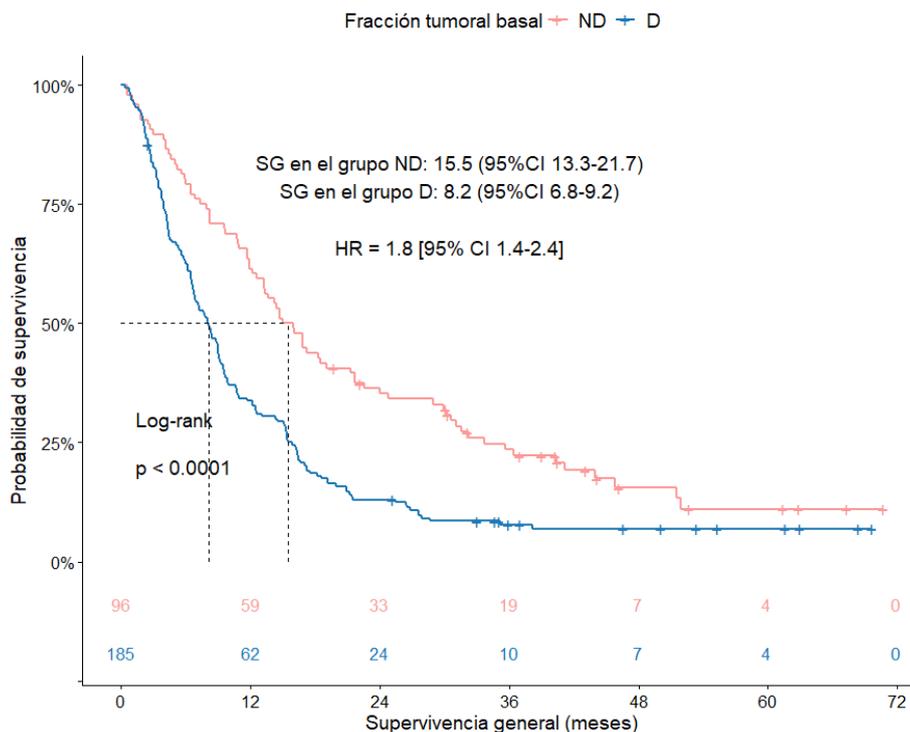


Figura 11. Curvas de supervivencia global (SG) en función de la presencia de ctDNA no detectable (ND) (en rojo) o detectable (D) (en azul).

Los pacientes con una TF no detectable también presentaron una mayor SLP que aquellos pacientes con TF detectable, con una mediana de SLP de 3,8 meses (IC 95% 2,6-5,1) frente a 1,9 meses (IC 95% 1,8-2,1) (Figura 12). Las diferencias eran estadísticamente significativas con un HR= 1,6 (IC95% 1,2-2,1, $p < 0,00023$).

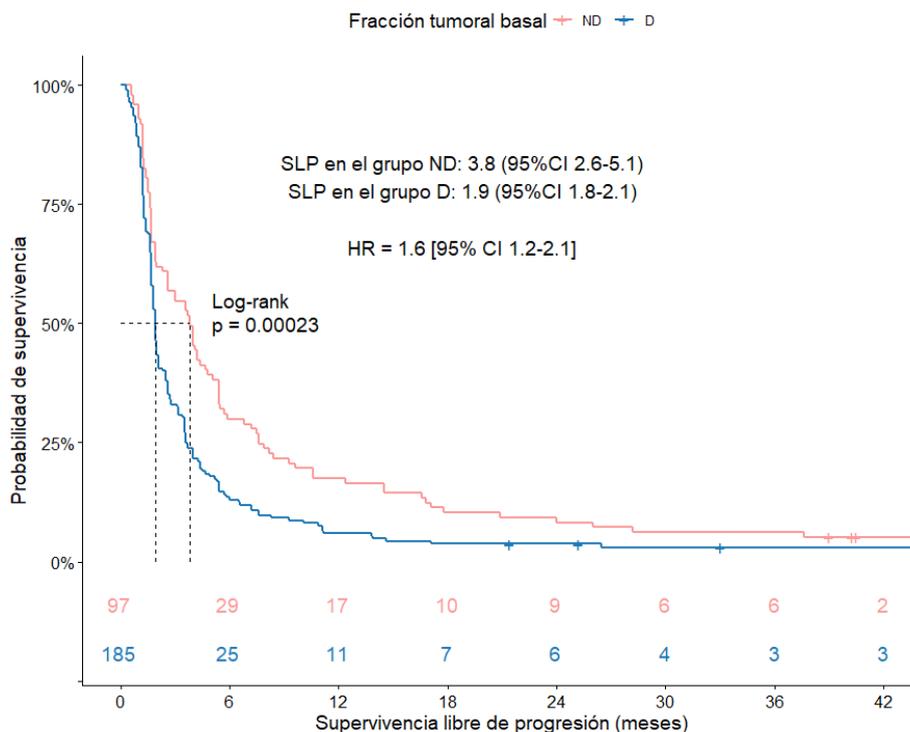


Figura 12. Curvas de supervivencia libre de progresión (SLP) en función de la presencia de ctDNA no detectable (ND) (en rojo) o detectable (D) (en azul).

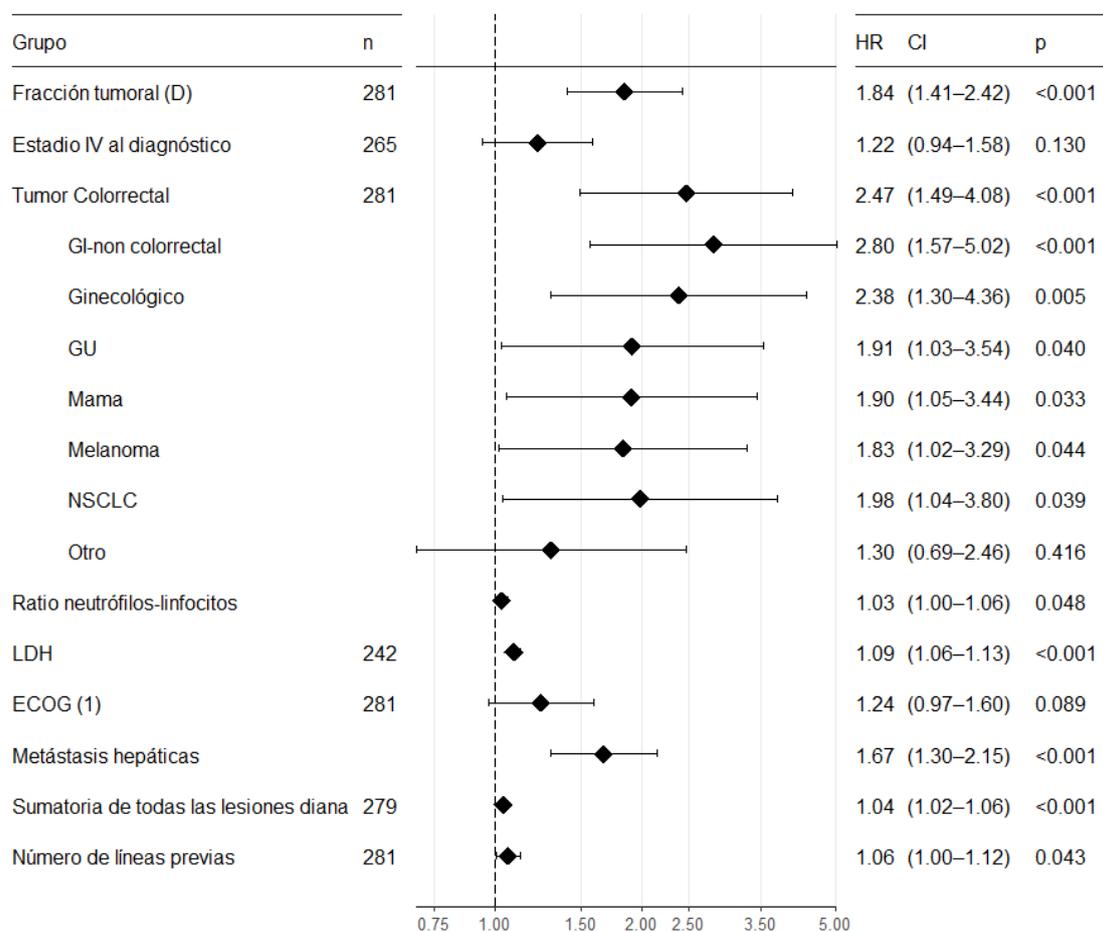
5.6. Análisis multivariante de la detección de ctDNA antes del tratamiento como factor independiente de supervivencia global

Para valorar el papel de la detección de ctDNA en las muestras obtenidas antes del tratamiento como factor predictor independiente en un modelo de regresión logística, se determinó, en primer lugar, la influencia de la detección del ctDNA y de otras variables mediante una regresión de Cox univariante (Tabla 3). Los resultados de este análisis demostraron una asociación significativa ($p < 0,05$) entre la SG y los siguientes factores: metástasis hepáticas, ratio neutrófilo-linfocito, número de líneas previas de tratamiento, sumatorio de las lesiones diana, niveles de LDH, tipo tumoral y ctDNA detectable ($TF > 0$). Respecto al tipo de tumor, se consideraron los tumores de cabeza y cuello como referencia, ya que los pacientes con estos tumores presentaron un riesgo de muerte menor (la

mayoría de los pacientes recibieron el tratamiento en 1-2 línea y no habían recibido inmunoterapia previa).

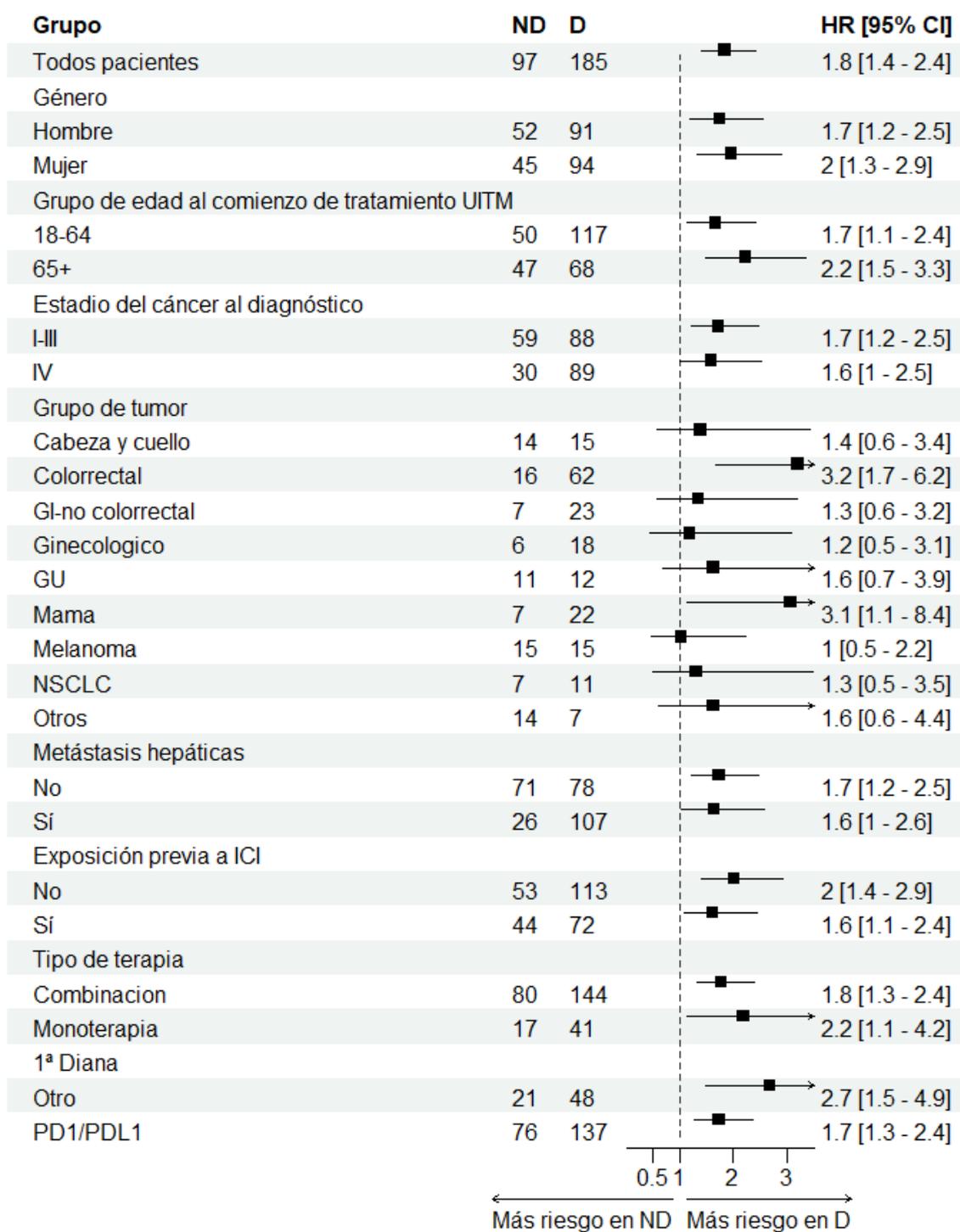
Los resultados obtenidos en una regresión de Cox univariante con estratificación de las variables confirmaron el valor de ctDNA detectable en todos los estratos analizados (Tabla 4).

Tabla 3. Análisis univariante de riesgos Cox para supervivencia global



Los tipos tumorales están referenciados frente a los tumores de cabeza cuello, que se usaron como referencia. Se considero la variable LDH con incrementos de 100 unidades y la sumatoria de lesiones diana en incrementos de 1cm. ECOG: escala de estado general del paciente oncológico. GU: genitourinario. LDH: lactato deshidrogenasa. NSCLC: cáncer de pulmón de células pequeñas. HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza; D: detectable.

Tabla 4. Análisis univariante de riesgos Cox estratificado para supervivencia global

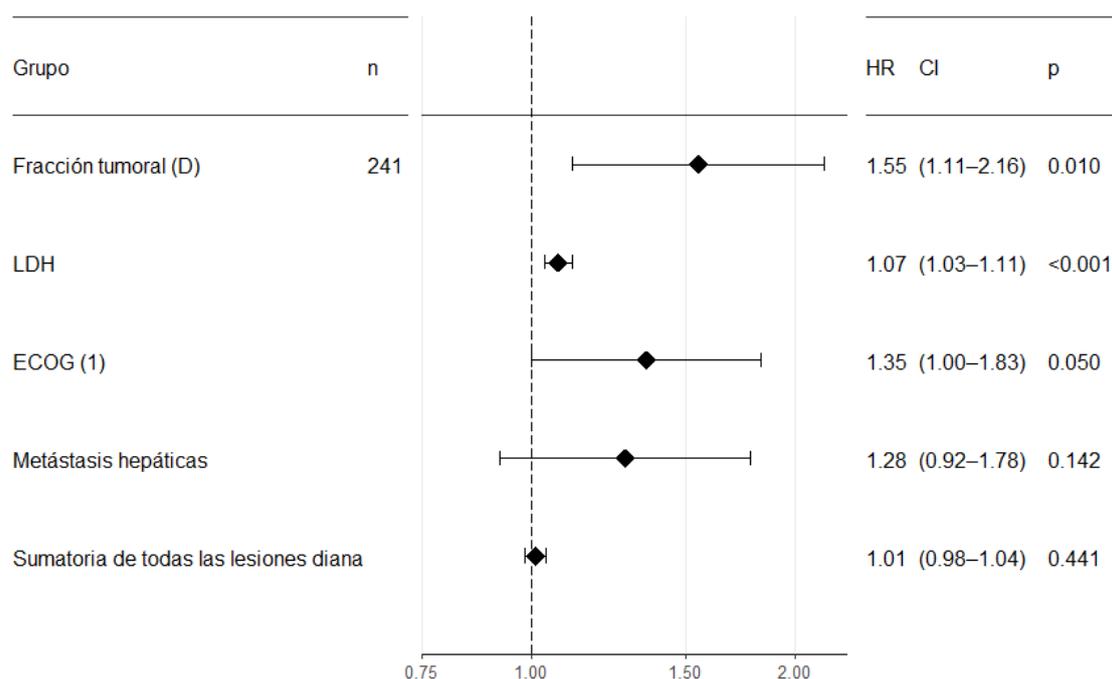


ND: no detectable; D: detectable; HR: hazard ratio; IC: intercalo de confianza; GI: gastrointestinal; GU: genitourinario; NSCLC: cáncer de pulmón de células pequeñas; ICI: Inhibidores de puntos de control inmunitario; PD1/PDL1: receptor/ligando de muerte programada 1.

Para el análisis multivariante de riesgos de Cox, las variables seleccionadas para ser incluidas en el modelo fueron las siguientes: detección de ctDNA (TF circulante > 0), valor de LDH, puntuación del ECOG, metástasis hepáticas y sumatorio de las lesiones diana. El tipo tumoral se utilizó como factor de estratificación a fin de que los resultados obtenidos estuvieran ajustados por la diferencia en el pronóstico entre los diferentes tipos de tumores. Para el análisis multivariante se analizaron los 241 pacientes que disponían todas las variables del modelo. De los 282 pacientes, 39 pacientes no disponían de valor de LDH, y en 2 no había valor para el sumatorio de lesiones diana, al tener no tener enfermedad medible por RECIST v1.1.

En el modelo final (Tabla 5), se observó como la detección de TF se mantenía estadísticamente asociada con la SG después de ajustar por los otros factores pronósticos. La HR ajustada en la comparativa entre pacientes con TF detectable vs TF no detectable fue de 1,5 (IC 95% 1,11-2,16, $p = 0,01$). Los niveles de LDH fueron el otro factor que mantuvo su significación estadística (HR por un incremento de 100-unidades: 1,07 [IC 95% 1,03-1,11], $p < 0,001$). Sin embargo, el sumatorio de las lesiones diana y la presencia de metástasis hepáticas perdieron la significación estadística indicando un menor impacto pronóstico de estos factores. El valor del ECOG se quedó en el borde de la significación estadística ($p=0,05$).

Tabla 5. Análisis multivariante de riesgos Cox para supervivencia global



HR: hazard ratio; IC: intervalos de confianza; ECOG: escala de estado general del paciente oncológico; *Eastern Cooperative Oncology Group*. LDH: lactato deshidrogenasa. Se considero la variable LDH con incrementos de 100 unidades y la sumatoria de lesiones diana en incrementos de 1 cm. El tipo tumoral se utilizó como factor de estratificación.

5.7. Correlación entre la cantidad de ctDNA antes del tratamiento y otras variables clínicas

Se analizó la correlación entre la cantidad de ctDNA medida como TF y otras variables clínicas. Dada la posible correlación entre el ctDNA y el volumen de enfermedad tumoral, se analizó la relación entre el TF y el sumatorio de las lesiones diana de las evaluaciones RECIST antes del tratamiento. La fuerza de la correlación fue leve ($\tau = 0,362$) (Figura 13). Hay que destacar que se identificaron, por ejemplo, dos pacientes con TF indetectable y sumatorios de lesiones muy elevados (> 20 cm) y que también había pacientes con TF elevados (> 10%) y sumatorio de lesiones pequeños (< 5 cm). Al analizar esta correlación

según tipo tumoral, se pudo observar una mayor correlación con ciertos tipos tumorales, como NSCLC ($\tau = 0,88$), cáncer de mama ($\tau = 0,61$) y tumores ginecológicos ($\tau = 0,49$), así como ausencia de correlación en otros, como en los tumores genitourinarios ($\tau = 0,08137$) (Figura 14).

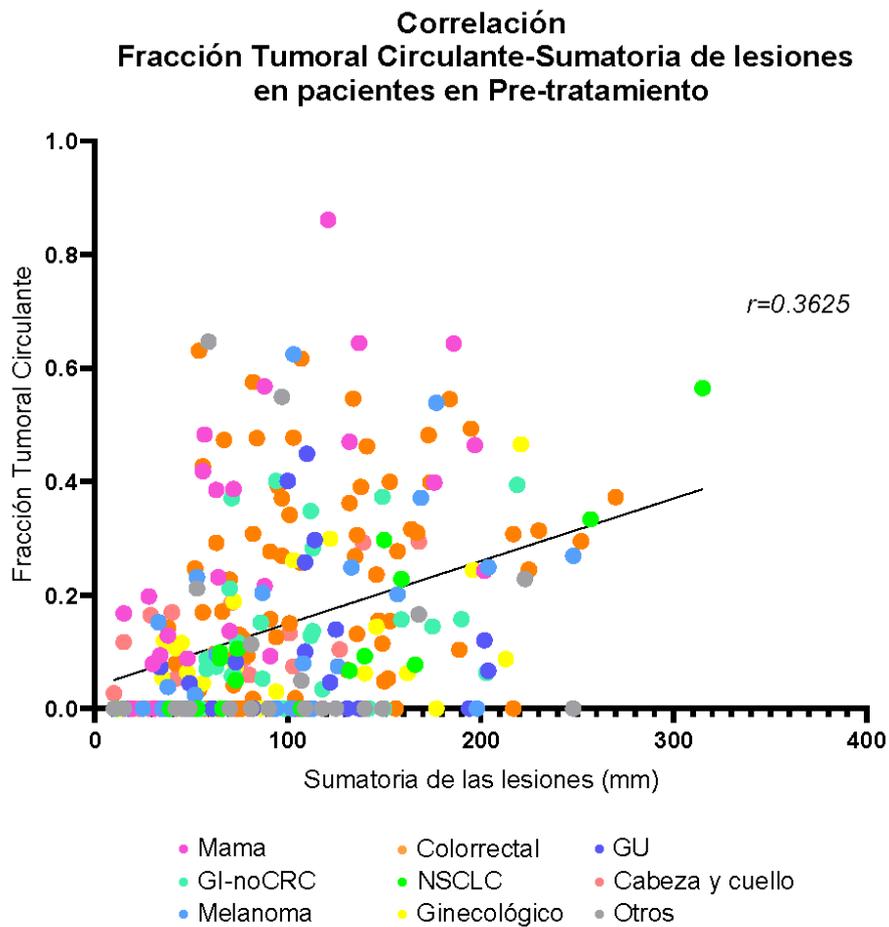


Figura 13. Correlación entre la fracción tumoral (TF) circulante y el sumatorio de lesiones diana en la evaluación por RECIST antes de iniciar el tratamiento (GI: gastrointestinal; CRC: cáncer colorrectal; NSCLC: cáncer de pulmón de célula no pequeña; GU: genitourinario).

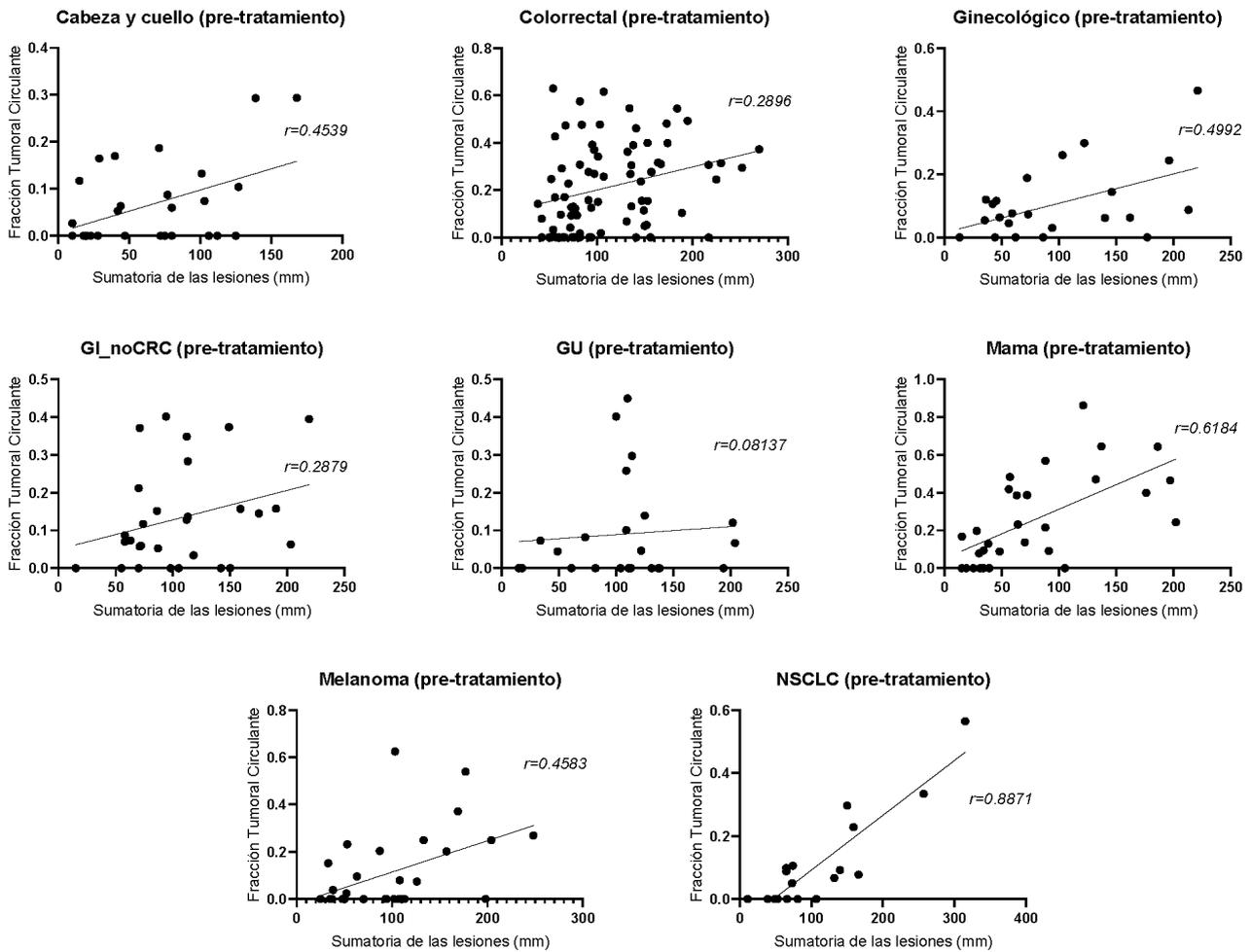


Figura 14. Correlación entre la fracción tumoral circulante (ctDNA) y el sumatorio de lesiones diana en la evaluación por RECIST antes del tratamiento con inmunoterapia para cada tipo de tumor (GI: gastrointestinal; CRC: colorrectal; GU: genitourinario; NSCLC: cáncer de pulmón de célula no pequeña).

Otro marcador pronóstico clásico es el valor de la LDH antes del tratamiento que también demostró significación estadística respecto a la SG en los análisis univariante y multivariante. La correlación entre ctDNA y niveles de LDH era moderada ($\tau = 0,569$), siendo más pronunciada en los casos con LDH $> 1\,500$ UI/L (Figura 15). Sin embargo, la correlación en el estrato de valores

bajos de LDH o de TF fue más débil, con muchos casos con LDH normal y TF > 10% así como pacientes con TF circulante indetectable y valores de LDH por encima del doble del límite de la normalidad.

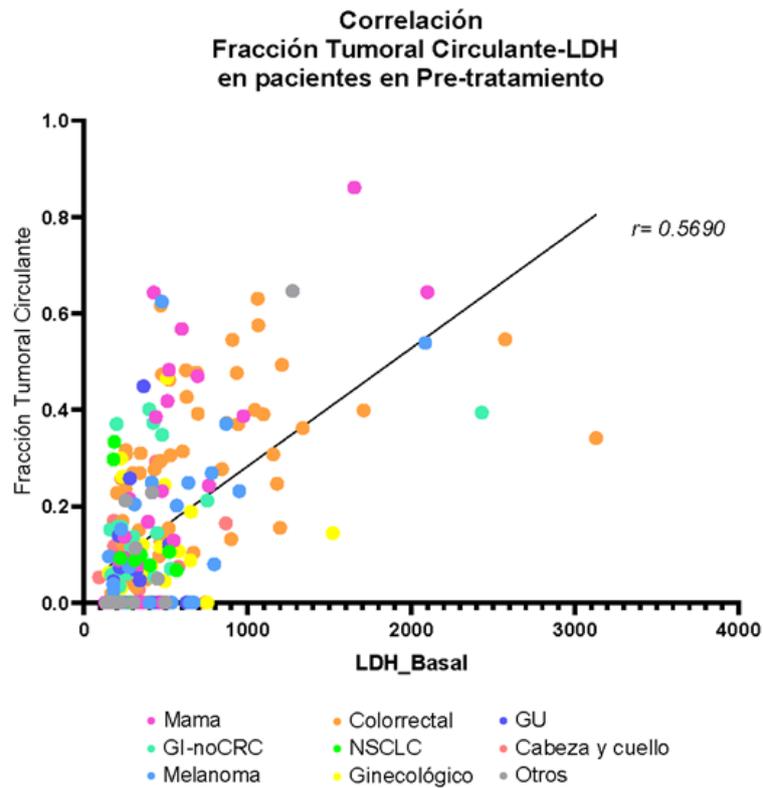


Figura 15. Correlación entre la fracción tumoral circulante (ctDNA) y el valor de LDH plasmático antes del tratamiento con inmunoterapia(GI: gastrointestinal; CRC: colorrectal; NSCLC: cáncer de pulmón de célula no pequeña; GU: genitourinario).

Respecto a la correlación entre ctDNA antes del tratamiento y el estadio tumoral al diagnóstico del paciente, se observó un aumento creciente de la media del valor del TF en función del estadio (menor en estadio I y mayor en estadio IV), pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 16).

Fracción Tumoral Circulante Pre-tratamiento según el estadio al diagnóstico

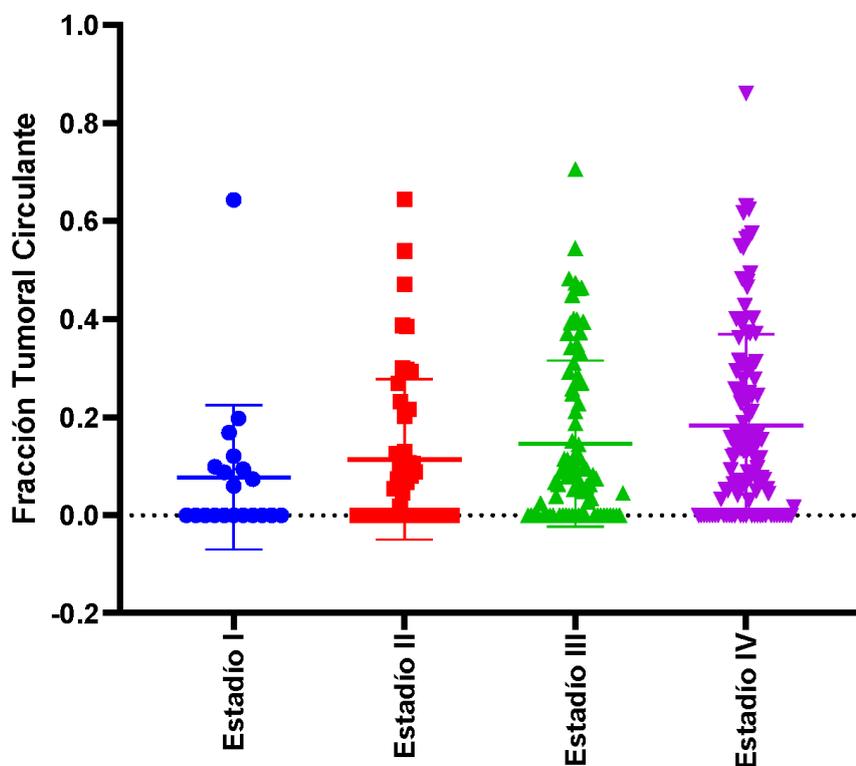


Figura 16. Correlación entre la fracción tumoral circulante (ctDNA) antes del tratamiento y el estadio del tumor al diagnóstico.

La relación entre la cantidad de ctDNA antes del tratamiento con inmunoterapia y otras variables clínicas solo demostró significación estadística ($p < 0,0001$) en el caso de la presencia de metástasis hepáticas (Figura 17). Los pacientes con metástasis hepáticas presentaban una media de TF circulante de 0,20 vs 0,09 en los pacientes sin metástasis hepáticas. Es importante destacar que hubo un grupo de 26 pacientes atípicos con metástasis hepáticas y TF indetectable (TF = 0), sin que existiera ninguna relación entre ctDNA y metástasis hepáticas. La asociación entre el valor de TF circulante y las metástasis

pulmonares no fue significativa, indicando la importancia específica de las metástasis hepáticas en la liberación de ctDNA.

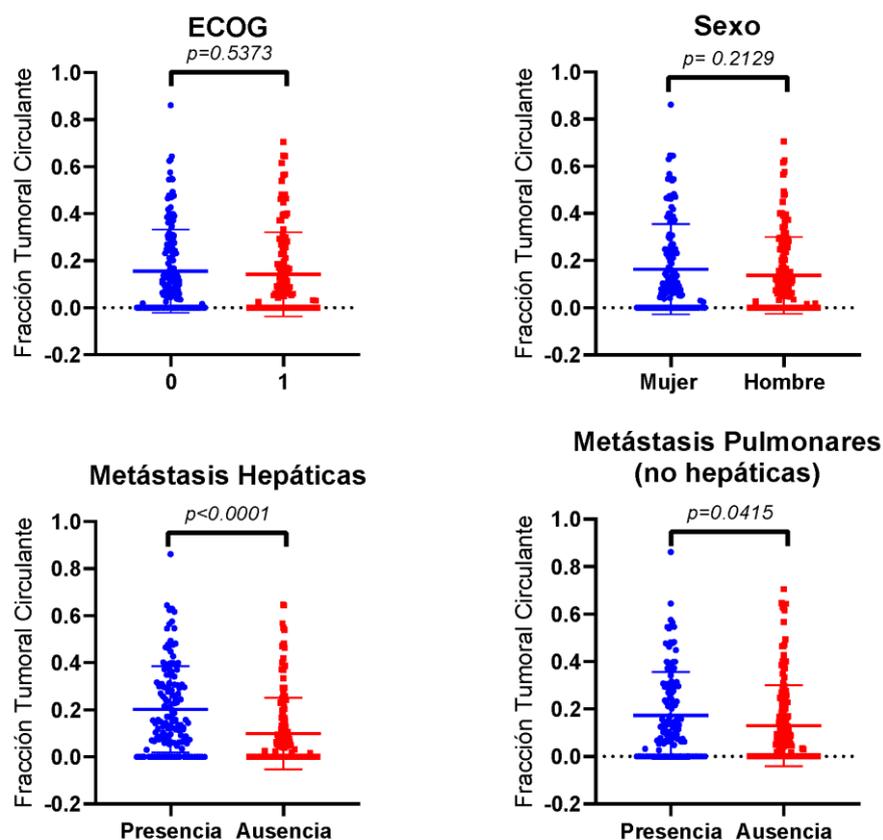


Figura 17. Fracción tumoral circulante según el sexo de los pacientes, el ECOG, la presencia de metástasis hepática, y presencia de metástasis pulmonares (excluyendo a aquellos pacientes que presentan también metástasis hepáticas).

5.8. Correlación entre ctDNA detectable antes del tratamiento y mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1

En el análisis de las diferencias entre la mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 y los pacientes con ctDNA detectable y no detectable antes de iniciar el tratamiento, cabe destacar que aquellos pacientes con TF detectable en el 57% de los casos presentaba progresión de la enfermedad como

mejor respuesta, frente a solo el 37% de los pacientes con TF no detectable (Figura 18 y tabla 6).

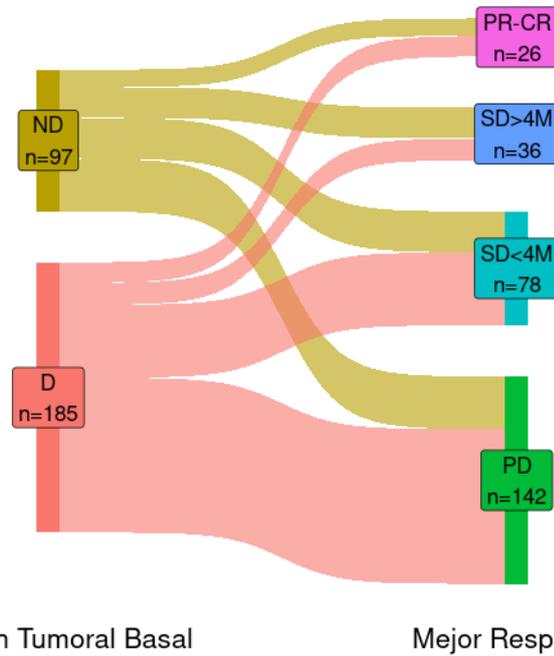


Figura 18. Sankey plot mostrando la relación entre la detección de ctDNA antes de iniciar el tratamiento con inmunoterapia y la mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 (D: detectable; ND: no detectable; CR: respuesta completa; PD: progresión de la enfermedad; PR: respuesta parcial; SD: estabilización de la enfermedad;).

Al analizar la relación entre la detección de ctDNA a nivel basal y el beneficio clínico (pacientes con CR, PR y SD > 4 meses), se demostró una relación estadísticamente significativa ($p = 0,012$) (Tabla 6).

Tabla 6. Correlación entre la detección de ctDNA a nivel basal antes de iniciar el tratamiento con inmunoterapia y la mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 (A) y el beneficio clínico de los pacientes (B)

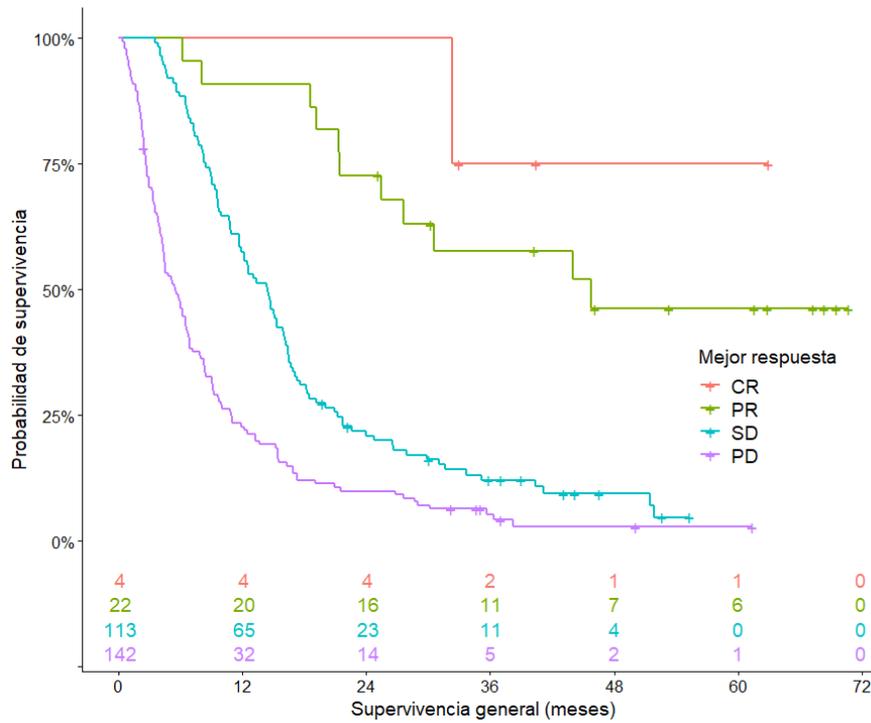
A)				
TF antes del tratamiento	CR-PR n (%)	SD > 4 meses n (%)	SD < 4 meses n (%)	PD n (%)
TF = 0, n = 97	12 (12,4)	21 (21,6)	28 (28,9)	36 (37,1)
TF > 0, n = 185	14 (7,6)	15 (8,1)	50 (27,1)	106 (57,3)
Pearson chi-square test p-value = 0.0012				
B)				
TF antes del tratamiento N=282	Sin beneficio	Beneficio clínico		
TF =0	64	33		
TF>0	156	29		
RR = 2,17 [IC 95% 1,4-3,35]				

CR: respuesta completa; **PR:** respuesta parcial; **SD:** estabilización de la enfermedad; **PD:** progresión de la enfermedad.

En el grupo de pacientes con ctDNA no detectable (TF = 0) antes del tratamiento, un 34% (33/97) presentaron beneficio clínico en comparación con un 15,7% (29/185) en el grupo de pacientes con ctDNA detectable (TF > 0). Es decir, el riesgo relativo (RR) de beneficio clínico fue 2,17 veces superior en los pacientes con ctDNA indetectable (RR = 2,17, IC 95% 1,4-3,35; $p < 0.001$).

5.9. Relación entre los cambios de ctDNA tras el inicio del tratamiento y la supervivencia global

Antes de analizar si los cambios en la cuantificación del ctDNA reflejaban un cambio en la SG de los pacientes, se analizó la SG de las diferentes categorías de respuesta según RECIST v1.1. Los resultados confirmaron una relación estadísticamente significativa entre una mejor SG de los pacientes y una mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 (Figura 19).



Grupo	Muerte/N	Mediana (meses)	% de supervivencia de 1 año
CR	1/4	NA (32,3-NE)	75% (43 - 100)
PR	11/22	45,8 (27,6-NE)	86% (73 - 100)
SD	102/113	14,4 (11,7-16,1)	56% (47 - 66)
PD	135/142	5,5 (4,3-6,8)	22% (16 - 30)

Supervivencia general en los grupos de mejor respuesta, HR (p valor)

		Referencia			
		CR	PR	SD	PD
Comparador	CR	-			
	PR	Ns	-		
	SD	7,8 (p = 0,04)	3,5 (p < 9*10⁻⁵)	-	
	PD	16,3 (p = 0,005)	7,3 (p < 5*10⁻⁵)	2,1 (p < 3*10⁻⁸)	-

Figura 19. Curvas de Kaplan Meier mostrando las diferencias de supervivencia global entre los pacientes con las diferentes categorías de respuesta según RECIST v1.1. (CR: respuesta completa; PR: respuesta parcial; SD: enfermedad estable; PD: progresión de la enfermedad). NE: No evaluable por insuficiente número de casos con el evento

Posteriormente se analizaron si los cambios en la cuantificación del ctDNA reflejaban una diferencia en la supervivencia de los pacientes. En un primer análisis cualitativo, los cambios de ctDNA se dividieron en aquellos pacientes que no tenían TF detectable a nivel basal, y luego cambiaban a un TF detectable (ND/D); aquellos pacientes que teniendo un TF detectable a nivel basal presentan posteriormente una eliminación del TF (D/ND), y los pacientes que no presentan cambios cualitativos: TF no detectable en ambos puntos (ND/ND), o TF detectable en ambos puntos (D/D). Estas cuatro categorías cualitativas se muestran en la Figura 20.

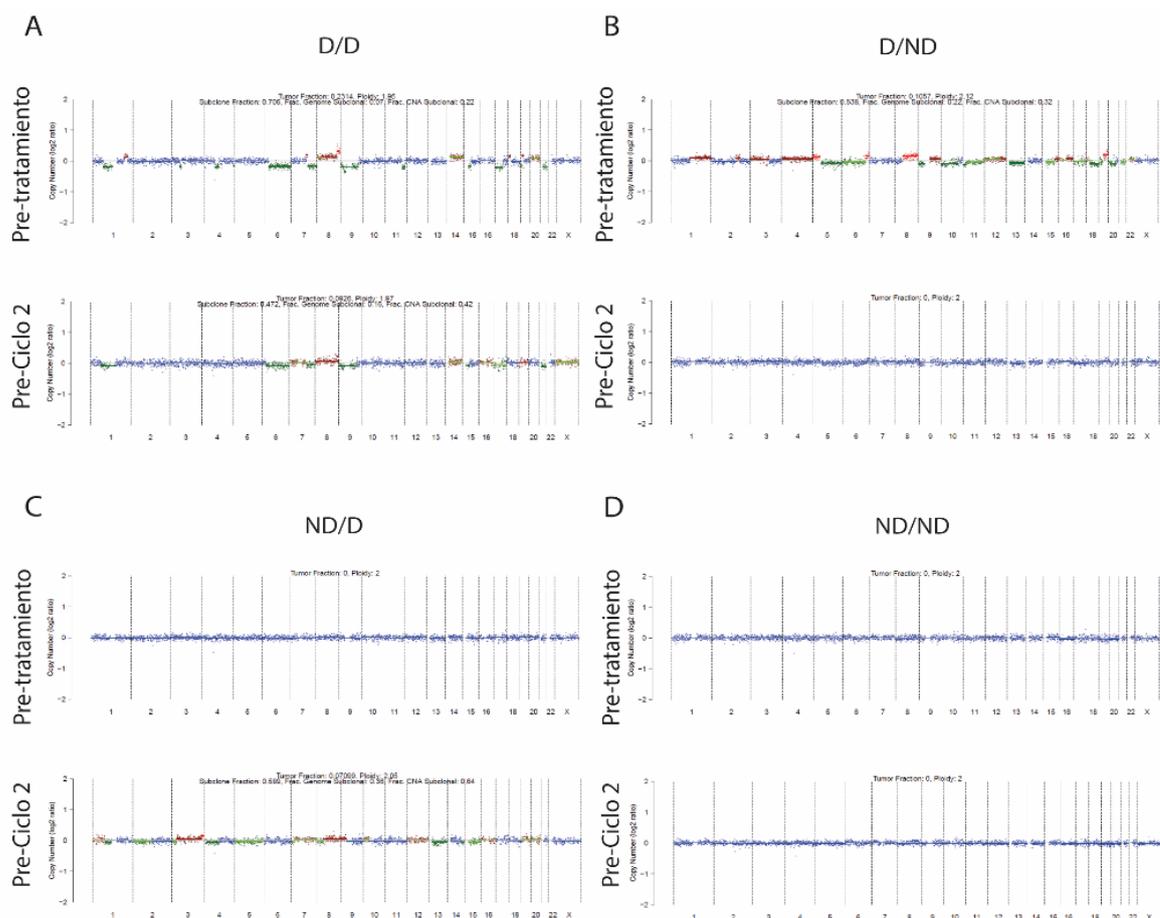


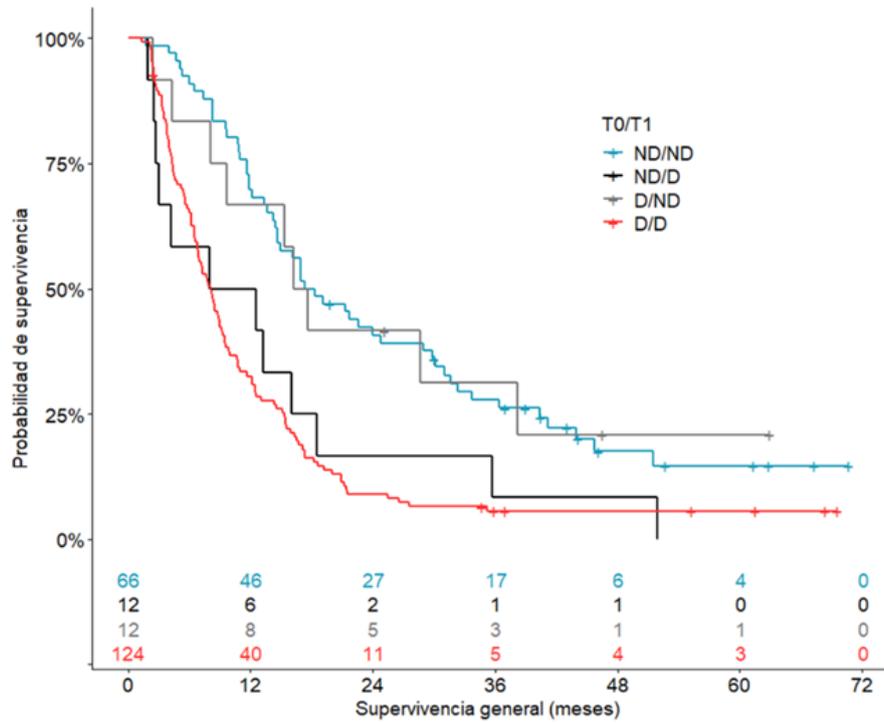
Figura 20. Genoma completo antes del tratamiento y antes de iniciar el ciclo 2. A) Paciente que presentó una fracción tumoral (TF) circulante detectable antes de iniciar el tratamiento con inmunoterapia y antes del ciclo 2 de tratamiento. B) Paciente con TF circulante detectable en antes de iniciar el tratamiento con inmunoterapia, pero no detectable antes de iniciar el ciclo 2 de tratamiento. C) Paciente con TF circulante no detectable antes del tratamiento, pero detectable antes de iniciar el ciclo 2 de tratamiento. D) Paciente con TF circulante no detectable en ningún momento (D: detectable; ND: no detectable).

Para la valoración de la relación entre los cambios cuantitativos de ctDNA y la SG, se utilizó la clasificación previamente descrita por el grupo *Friends of Cancer Research* (152, 161), en la que los pacientes se dividen en aquellos con aumento (incremento del 20% en el TF), descenso (descenso del 50% del TF),

intermedio (cambios cuantitativos del TF entre ambas categorías) y aquellos pacientes con TF no detectable en ambos momentos. Asimismo, se analizaron los cambios en dos momentos diferentes, antes de iniciar el ciclo 2 (2, 3 o 4 semanas desde el inicio de tratamiento), y la muestra más cercana a la realización del primer TAC de estadiaje tumoral (normalmente 6-8 semanas desde el inicio de tratamiento) para observar si existen diferencias entre ambos momentos, y si los cambios en la supervivencia se pudieran detectar en un momento temprano.

5.9.1. Cambios precoces antes del segundo ciclo de tratamiento

Se estudió si los cambios en la cuantificación de ctDNA previos al inicio del tratamiento y antes del segundo de tratamiento con inmunoterapia (preC2) tenían un impacto en la SG. En el análisis cualitativo (Figura 21), se objetivó que los pacientes con TF no detectable en ambos momentos (ND/ND) tuvieron una mayor SG con una mediana de 17,8 meses (IC 95% 14,7-29,9) y una probabilidad de supervivencia al año del 68% frente a aquellos pacientes que en ambos momentos tenían un TF detectable (D/D), que presentaron mediana de SG de 8,1 meses (IC 95% 6,8-9,5), y una probabilidad de supervivencia al año del 31%.



T0/T1	Progresión/N	Mediana (meses)	% de supervivencia de 1 año
ND/ND	53/66	17,8 (14,7-29,9)	68% (58 - 80)
ND/D	12/12	10,3 (3-NE)	42% (21 - 81)
D/ND	9/12	16,9 (9,7-NE)	58% (36 - 94)
D/D	116/124	8,1 (6,8-9,5)	31% (24 - 40)

Supervivencia Global (HR p valor)

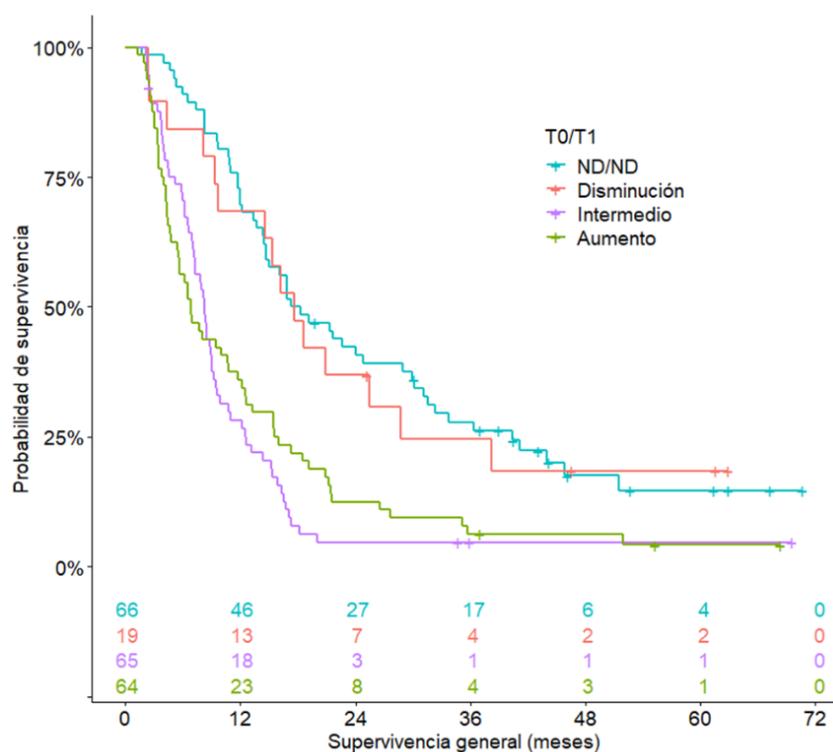
		Referencia			
		ND/ND	ND/D	D/ND	D/D
Comparador	ND/ND	-			
	ND/D	2,14 (p=0,02)	-		
	D/ND	ns	ns	-	
	D/D	2,46 (p < 1x10 ⁻⁶)	ns	2,45 (p = 0,01)	-

Figura 21. Curvas de Kaplan Meier mostrando las diferencias de supervivencia global entre los pacientes con cambios cualitativos del ctDNA antes del tratamiento con inmunoterapia (T0) y antes del inicio del segundo ciclo (T1). Las categorías incluyen fracción tumoral (TF) detectable – detectable (D/D) en rojo, no detectable-no detectable (ND/ND) en azul, detectable-no detectable (D/ND) en gris, no detectable – detectable (ND/D) en negro. NE: No evaluable por insuficiente número de casos con el evento

Pocos pacientes presentaron un cambio cualitativo del TF en un momento precoz (solo 12 pacientes en cada categoría). Sin embargo, de manera muy interesante, aquellos pacientes que teniendo un TF no detectable antes de iniciar tratamiento, tenían un TF detectable preC2 (ND/D), mostraron una supervivencia global similar a aquellos pacientes con TF D/D, con una mediana de 10,3 meses (IC 95% 3-NA) y una probabilidad de supervivencia al año del 42%. Asimismo, los pacientes que presentaron un cambio cualitativo inverso (D/ND), presentaron una supervivencia global similar a aquellos pacientes que eran ND/ND con una mediana de 16,9 meses (IC 95% 9,7-NA) y una probabilidad de supervivencia al año del 58%.

Seguidamente se analizaron los cambios cuantitativos con resultados similares (Figura 22). Los pacientes con una disminución del TF > 50% presentaron una supervivencia global similar a los pacientes con un TF indetectable en ambos momentos, con una mediana de SG de 17,6 meses (IC 95% 14,6-38,2) en el primer caso y del 17,8 (IC 95% 14,7-29,9) en el segundo. Estos valores fueron claramente superiores a la mediana de SG de las otras dos categorías (aumento e intermedio). Los pacientes que presentaron un aumento del TF, o un cambio considerado intermedio tuvieron una SG más baja y similar entre ambas categorías, con una mediana de 6,8 meses (IC 95% 5,5-11,7) en el

grupo con aumento de TF y una mediana de 8,3 meses (IC 95% 7,2-9,2) en el grupo con un cambio intermedio.



T0/T1	Muerte/N	Mediana (meses)	% de supervivencia de 1 año
ND/ND	53/66	17,8 (14,7-29,9)	68% (58 - 80)
Disminución	15/19	17,6 (14,6-38,2)	63% (45 - 89)
Intermedio	61/65	8,3 (7,2-9,2)	27% (18 - 40)
Aumento	61/64	6,8 (5,5-11,7)	34% (25 - 48)

Supervivencia Global (HR p valor)

		Referencia			
		ND/ND	Disminución	Intermedio	Aumento
Comparador	ND/ND	-			
	Disminución	ns	-		
	Intermedio	2,9 ($p = 7 \times 10^{-8}$)	2,7 ($p = 8 \times 10^{-4}$)	-	
	Aumento	2,4 ($p = 6 \times 10^{-6}$)	2,2 ($p = 0,006$)	ns	-

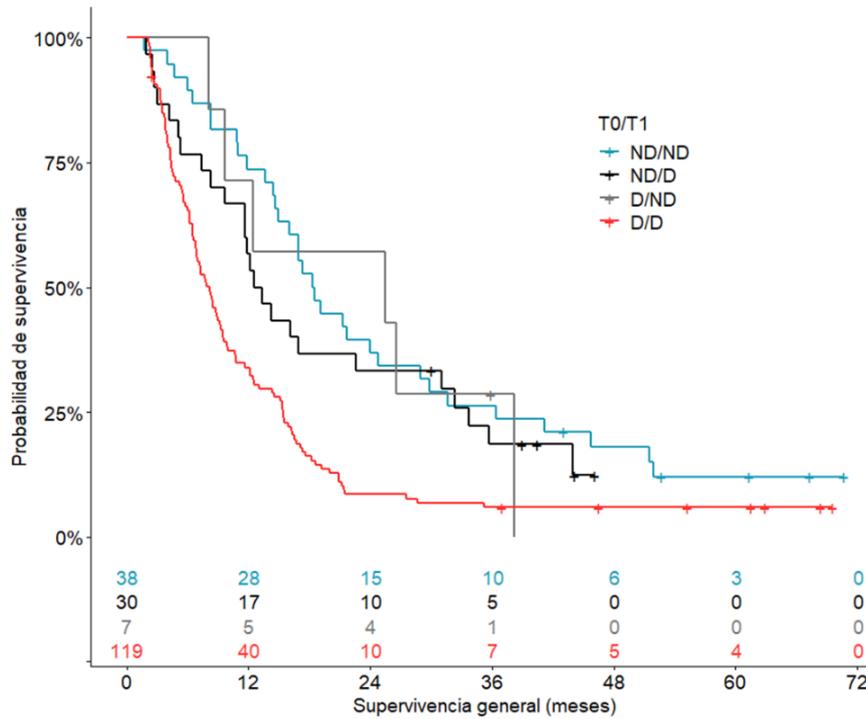
Figura 22. Curvas de Kaplan Meier mostrando las diferencias de supervivencia global entre los pacientes con cambios cuantitativos del ctDNA de manera basal (T0) y previo al inicio del segundo ciclo de tratamiento (T1). Disminución de ctDNA en rojo: Disminución del ctDNA del > 50% desde T0 a T1 (y aquellos pacientes con ctDNA detectable en T0 y ND en T1). Aumento de ctDNA en verde: Aumento del ctDNA del > 20% desde T0 a T1 (y aquellos pacientes con ctDNA no detectable en T0 y detectable en T1). Intermedio en morado: Cambios de ctDNA entre el 20% de aumento y 50% de disminución entre T0 y T1. ND/ND en azul: En aquellos pacientes donde el TF no era detectable en T0 y T1.

5.9.2. Cambios más tardíos coincidentes con el primer estadiaje tumoral radiológico

Posteriormente se estudió si los cambios en la cuantificación de ctDNA en un momento más tardío, correspondiente al momento del primer estadiaje tumoral radiológico, mantenían un impacto en la SG de los pacientes. Se analizaron los cambios entre el TF antes del tratamiento con inmunoterapia y la muestra obtenida en el momento más próximo a realización del TAC (generalmente a las 6-8 semanas del inicio del tratamiento), que en la mayoría de los pacientes correspondía a la muestra previa al ciclo 3.

En el análisis cualitativo (Figura 23), pocos pacientes hicieron un cambio cualitativo (solamente 7 pacientes fueron D/ND). Los pacientes con ND/ND presentaron una mediana de SG de 18,4 meses (IC 95% 15-29,9) y una probabilidad de supervivencia al año del 71% frente a los pacientes D/D que presentaron una mediana de 8,2 meses (IC 95% de 6,8-9,5) y una probabilidad de supervivencia al año del 32%. A diferencia de los cambios detectados de manera precoz los pacientes que cambian de ND/D en el momento de realizar el TAC tuvieron una supervivencia global mayor que aquellos pacientes con D/D,

con una mediana de 13 meses (IC 95% de 11,7-32,3) y una probabilidad de supervivencia al año del 53%.



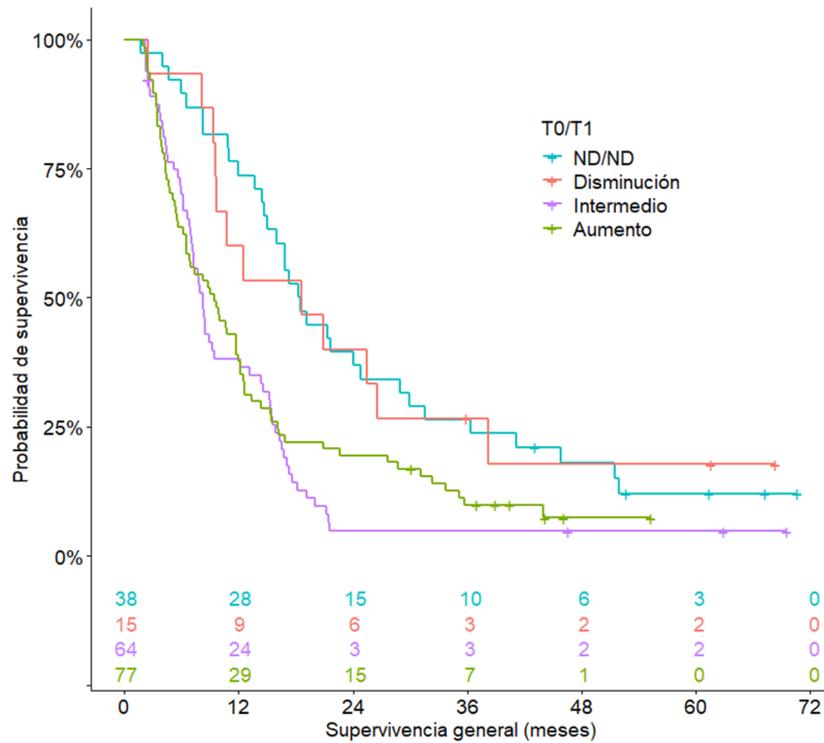
T0/T1	Progresión/N	Mediana (meses)	% de supervivencia de 1 año
ND/ND	33/38	18,4 (15-29,9)	71% (58 - 87)
ND/D	25/30	13 (11,7-32,3)	53% (38 - 75)
D/ND	6/7	25,5 (9,7-NE)	57% (30 - 100)
D/D	111/119	8,2 (6,8-9,5)	32% (25 - 42)

Supervivencia Global (HR p valor)

		Referencia			
		ND/ND	ND/D	D/ND	D/D
Comparador	ND/ND	-			
	ND/D	ns	-		
	D/ND	ns	ns	-	
	D/D	2,24 (p <0,0001)	1,84 (p = 0,006)	ns	-

Figura 23. Curvas de Kaplan Meier mostrando las diferencias de supervivencia global entre los pacientes con cambios cualitativos del ctDNA de manera basal (T0) y en el momento de la realización del primer estadiaje radiológico (T1). Las categorías son fracción tumoral (TF) detectable – detectable (D/D) en rojo, no detectable-no detectable (ND/ND) en azul, detectable-no detectable (D/ND) en gris, no detectable – detectable (ND/D) en negro. NE: No evaluable por insuficiente número de casos con el evento

En el análisis cuantitativo (Figura 24), aquellos pacientes con una disminución del TF (descenso de TF > 50%), mostraron una SG similar a aquellos pacientes con un TF ND en ambos momentos, con una mediana de 18,6 meses (IC 95% 9,7-NA) y una probabilidad de supervivencia al año del 53%. Las curvas de supervivencia de estas 2 categorías estaban significativamente separadas de los pacientes con un aumento (incremento de FT > 20%) o de los que presentaron un cambio considerado intermedio. No existieron diferencias significativas entre estos subgrupos con una mediana de 9,5 meses (IC 95% de 6,5-12,2) y una probabilidad de supervivencia al año del 35% en el primer grupo frente a una mediana de 8,2 meses (IC 95% 7-13,1) y una probabilidad de supervivencia al año del 37% en el segundo.



T0/T1	Muerte/N	Mediana (meses)	% de supervivencia de 1 año
ND/ND	33/38	18,4 (15-29,9)	71% (58 - 87)
Disminución	12/15	18,6 (9,7-NE)	53% (33 - 86)
Intermedio	60/64	8,2 (7-13,1)	37% (26 - 51)
Aumento	70/77	9,5 (6,5-12,2)	35% (26 - 48)

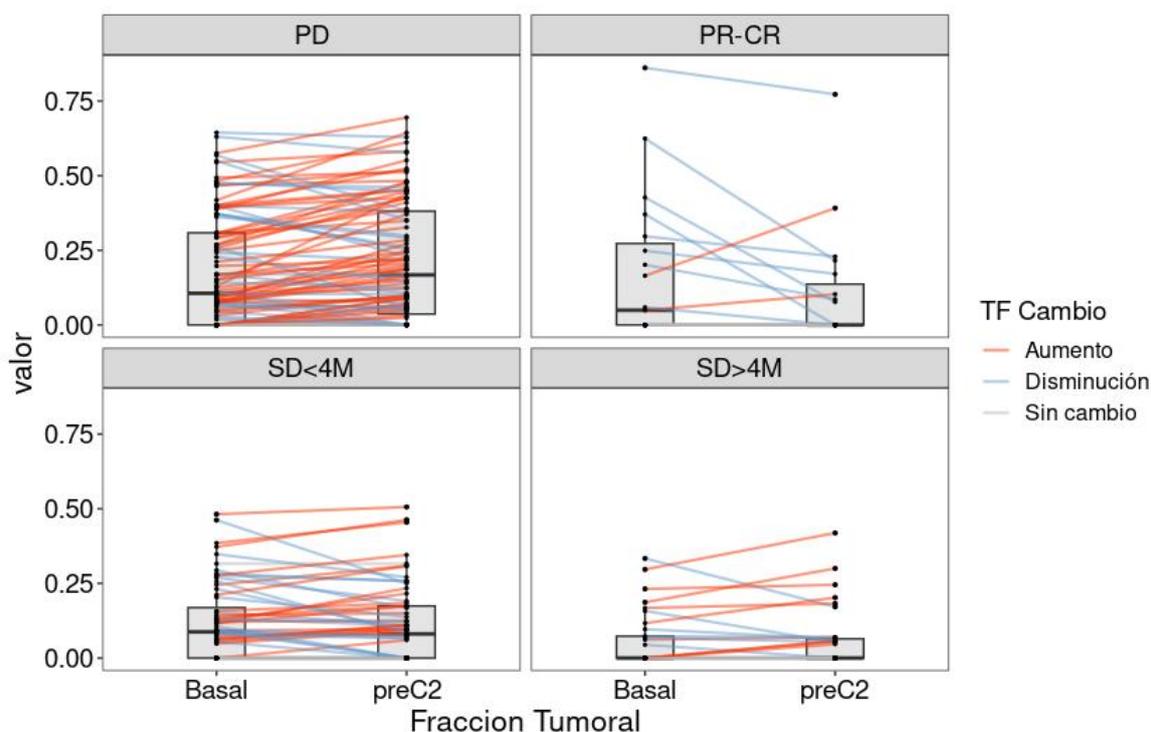
		Referencia			
		ND/ND	Disminución	Intermedio	Aumento
Comparador	ND/ND	-			
	Disminución	ns	-		
	Intermedio	2,2 ($p = 0,0002$)	2,3 ($p = 0,01$)	-	
	Aumento	1,9 ($p = 0,003$)	1,9 ($p = 0,04$)	ns	-

Figura 24. Curvas de Kaplan Meier mostrando las diferencias de supervivencia global entre los pacientes con cambios cuantitativos del ctDNA de manera basal (T0) y en el momento de la realización del primer estadiaje radiológico (T1). Disminución de ctDNA en rojo: Disminución del ctDNA del > 50% desde T0 a T1 (y aquellos pacientes con ctDNA detectable en T0 y ND en T1). Aumento de ctDNA en verde: Aumento del ctDNA del > 20% desde T0 a T1 (y aquellos pacientes con ctDNA no detectable en T0 y detectable en T1). Intermedio en morado: Cambios de ctDNA entre el 20% de aumento y 50% de disminución entre T0 y T1. ND/ND en azul: En aquellos pacientes donde el TF no era detectable en T0 y T1.). NE: No evaluable por insuficiente número de casos.

5.10. Cambios en la cuantificación de ctDNA y mejor respuesta tumoral radiológica medida por RECIST v1.1

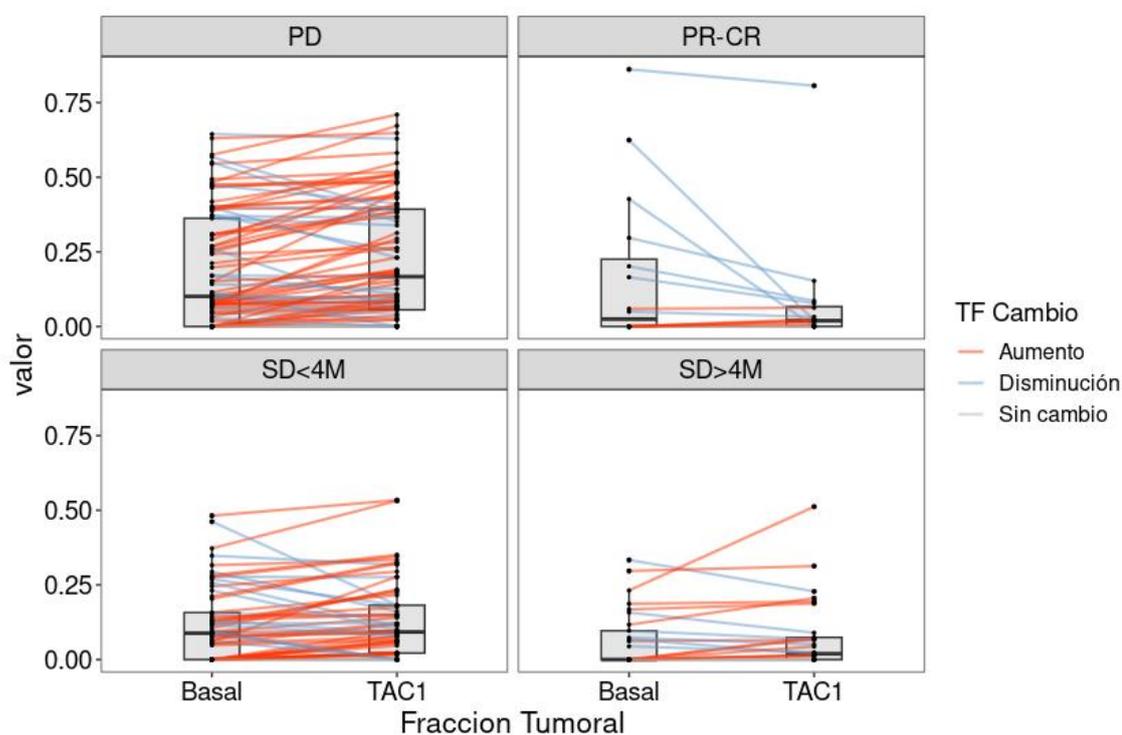
Para este análisis, se analizaron los cambios de ctDNA antes de recibir el segundo ciclo de tratamiento (preC2) y en el momento de la realización del primer control radiológico, considerando cualquier incremento o disminución, y se categorizaron según un criterio binario de “aumento” o “descenso”. La relación de estos con la mejor respuesta tumoral radiológica medida por RECIST v1.1 se muestra en la Figura 25 y Figura 26. Los resultados mostrados en los diagramas de caja muestran una tendencia de los pacientes con PR/CR a presentar una disminución del ctDNA frente a los pacientes con PD, que tienen una mayor tendencia a presentar un aumento del ctDNA (las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas con una $p = 0,0002$). Solamente en 2 pacientes con PR/CR se objetivó un aumento del ctDNA preC2 (10%) y en 5 pacientes en el momento del TAC (30%). Al observar el valor del TF en estos casos, la mayoría presentaron valores inferiores al 3% del TF, por lo que pueden representar falsos positivos de la técnica. En los pacientes con PD como mejor respuesta, se objetivó un aumento del ctDNA en un 53% de los casos en el

momento de realizar el TAC. Esta tendencia ya se observaba de manera precoz, ya que en los pacientes con PD como mejor respuesta en un 53% de los casos también se demostró un aumento del ctDNA antes del C2. En el momento de realizar el TAC un 40% de pacientes con una estabilización de más de 4 meses presentó un aumento del TF, frente al 60% con una estabilización menor de 4 meses que presento un aumento. Esta tendencia no se objetivo de manera temprana, ya que previo al C2 un 33% de los pacientes con SD menor de 4 meses presentaba un aumento y el 27% de los pacientes con SD mayor de 4 meses presentaba un aumento.



.Respuesta	Disminución n (%)	Aumento n (%)	Sin cambio n (%)
PD, n = 99	29 (29,3)	52 (52,5)	18 (18,2)
SD < 4 meses, n = 54	20 (37,0)	21 (38,9)	23 (42,6)
SD > 4 meses, n = 33	6 (18,2)	9 (27,3)	18 (54,5)
PR-CR, n = 19	8 (42,1)	2 (10,5)	9 (47,4)

Figura 25. Diagramas de caja de la relación entre los cambios de cuantificación de ctDNA y la mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 antes del segundo ciclo de tratamiento con inmunoterapia (preC2). En este análisis cualquier incremento del ctDNA fue considerado “aumento” en rojo, y cualquier descenso de ctDNA como “disminución” en azul. Los pacientes sin cambios (principalmente TF no detectable- no detectable) corresponden al color gris.



Respuesta	Disminución n (%)	Aumento n (%)	Sin cambio n (%)
PD, n = 89	21 (23,6)	53 (59,6)	15 (16,8)
SD < 4 meses, n = 61	16 (26,2)	37 (60,7)	8 (13,1)
SD > 4 meses, n = 29	6 (20,7)	12 (41,4)	11 (37,9)
PR-CR, n = 16	7 (43,7)	5 (31,2)	4 (25,0)

Figura 26. Diagramas de caja de la relación entre los cambios de cuantificación de ctDNA y la mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 previa al primer control radiológico (TAC) para valorar la respuesta al tratamiento. En este análisis cualquier incremento del ctDNA fue considerado “aumento” en rojo, y cualquier descenso de ctDNA como “disminución” en azul. Los pacientes sin cambios (principalmente TF no detectable- no detectable) corresponden al color gris.

De los 84 pacientes que presentaron un aumento del ctDNA preC2, únicamente un 13,1% presentó un beneficio clínico. El porcentaje de beneficio clínico fue más alto en los pacientes con disminución del ctDNA preC2 (22,2%) y en aquellos sin cambios en los niveles de ctDNA (39,7%) ($p < 0,001$). De los 107 pacientes que presentaron un aumento, el 84% no presentó beneficio clínico vs el 16% que presentó beneficio clínico. Sin embargo, si consideramos los pacientes con disminución del ctDNA preC2 (considerando cualquier disminución del ctDNA), el 22% de los pacientes presentaron beneficio clínico (Tabla 7).

Tabla 7. Beneficio clínico de los cambios de ctDNA antes del tratamiento y previo al segundo ciclo (preC2) y antes de la realización del TAC

Cambios ctDNA	Beneficio clínico n (%)	No beneficio clínico n (%)
Pre-tratamiento-preC2		
Aumento, n = 84	11 (13,1%)	73 (86,9%)
Disminución, n = 63	14 (22,2%)	49 (77,8%)
Sin cambios, n = 68	27 (39,7%)	41 (60,3%)
Pre-tratamiento-TAC		
Aumento, n = 107	17 (15,9%)	90 (84,1%)
Disminución, n = 50	13 (26,0%)	37 (74,0%)
Sin cambios, n = 38	15 (39,5%)	23 (60,5%)

6. Discusión

El desarrollo de la inmunoterapia ha supuesto una revolución en el tratamiento del cáncer y, actualmente, existen múltiples fármacos aprobados (principalmente fármacos contra los inhibidores del punto de control inmunitario PD1/PDL1) que se han incorporado como tratamiento estándar en diferentes tipos de tumores (23-26, 28). Sin embargo, no todos los pacientes responden al tratamiento con inmunoterapia y algunos de ellos presentan toxicidades a largo plazo que pueden ser clínicamente muy relevantes y duraderas, por lo que los trabajos de investigación en este campo continúan siendo decisivos (29). En este sentido, el número de fármacos frente a nuevas dianas terapéuticas que están siendo investigados no ha parado de aumentar y ello se refleja en el protagonismo creciente de los ensayos clínicos fase 1 de inmunoterapia (31).

Durante la última década el papel de los ensayos clínicos fase 1 en el proceso del desarrollo clínico de un fármaco ha cambiado radicalmente. Inicialmente estos ensayos eran pequeños estudios, donde prácticamente el único objetivo era evaluar la toxicidad del fármaco y establecer una dosis recomendada para continuar el desarrollo del medicamento (44). Sin embargo, la irrupción de los biomarcadores, las terapias dirigidas y la inmunoterapia han supuesto un cambio de paradigma (177). De esta forma, aunque determinar el perfil de toxicidad y la dosis recomendada (o el rango de dosis óptima) sigue siendo la razón de ser de estos ensayos, la evaluación de respuesta y la determinación de biomarcadores se han integrado como otros aspectos fundamentales (45). Esta transformación de los ensayos fase 1 también les otorga un papel más protagonista en el desarrollo clínico de un fármaco y hace que el número de pacientes que reciben tratamiento en el contexto de dichos ensayos vaya en aumento y que las posibilidades de que un paciente tenga

beneficio de un tratamiento en investigación clínica en fase I sea muy superior. Cabe destacar que en el periodo comprendido entre 2018 y 2022, un total de 2.812 pacientes recibieron tratamiento en un ensayo fase 1 en la UITM en el Hospital Vall d'Hebron, una cifra elevada que refleja el importante papel de estos ensayos en el contexto de la investigación clínica.

La selección de pacientes incluidos en ensayos clínicos fase 1 es un elemento crítico para optimizar el desarrollo clínico de un fármaco (178, 179). Una mejor selección de pacientes permite, no solo identificar a aquellos pacientes que podrían obtener el mayor beneficio del tratamiento, sino también minimizar el potencial riesgo de toxicidad. El estudio inicial del perfil de toxicidad de un fármaco en una población frágil y de mal pronóstico podría determinar una atribución inadecuada de efectos tóxicos al fármaco, por efectos adversos que en realidad podrían estar relacionados con la propia enfermedad. Por otra parte, el hecho de que el tratamiento se tuviera que suspender de forma temprana por progresión de la enfermedad haría que el tiempo de exposición al fármaco fuera relativamente corto, lo que a su vez podría penalizar la evaluación correcta del perfil de toxicidad. Este hecho es especialmente relevante en los ensayos con inmunoterapia en los que las toxicidades tienen un perfil de aparición más tardío (176-178). Por tanto, establecer correctamente los criterios de selección de los pacientes es un requisito primordial en los ensayos precoces a fin de obtener datos robustos de seguridad y eficacia de los fármacos en investigación, que permitan una toma de decisiones adecuada y fundamentada sobre los fármacos en los que se debe priorizar su desarrollo y en los que éste se debe interrumpir. Este hecho es muy relevante en los ensayos de inmunoterapia, tanto por el perfil particular de toxicidades de los fármacos, como por la limitación de

biomarcadores de respuesta al tratamiento aplicables en la mayoría de los pacientes, de modo que en muchos ensayos clínicos siguen participando pacientes cuya inclusión no está basada en datos de ningún biomarcador (177).

En este sentido, uno de los criterios de inclusión más comúnmente utilizado en todos los ensayos fase 1 sigue siendo una estimación de la probabilidad de supervivencia del paciente superior a 3 meses. Sin embargo, la estimación de la supervivencia de los pacientes también continúa siendo un reto, y aunque existen múltiples parámetros pronósticos clínicos bien conocidos, su aplicación en la práctica clínica y su incorporación como criterio de inclusión objetivable en los ensayos presenta una alta variabilidad (68). En la mayoría de las ocasiones, el criterio de inclusión de la probabilidad de supervivencia del paciente superior a 3 meses se basa sencillamente en la opinión del oncólogo que está evaluando al paciente, aunque los estudios publicados demuestran que del 10% al 20% de pacientes no sobreviven 3 meses desde el inicio del ensayo fase 1, a pesar de que a priori se han cumplido los criterios de inclusión (67, 180, 181). Estas realidades justifican la importancia de evaluar nuevos factores pronósticos que puedan ser objetivos y cuantificables. Esto es evidente también en nuestra población de estudio, en la que la gran mayoría de pacientes fueron incluidos sin ningún biomarcador de predicción de respuesta al tratamiento y la tasa de respuesta global fue solamente del 9,2%, con una mediana de SLP de 2 meses y un 14% de los pacientes no sobrevivió 3 meses desde su inclusión en el ensayo. Estos datos son desalentadores y recalcan, aún más, la importancia de poder disponer de nuevos marcadores pronósticos y predictivos de respuesta en los tratamientos de inmunoterapia.

Por otro lado, dado que una proporción alta de pacientes no responden a los tratamientos y el potencial de toxicidad de estos, la evaluación temprana sobre la eficacia de estos fármacos también es de gran trascendencia. Actualmente, la evaluación de la respuesta tumoral se realiza mediante la evaluación clínica y radiológica siguiendo los criterios RECIST v1.1 (69), generalmente a las 6 o 8 semanas desde el inicio del tratamiento en los ensayos en fase temprana. Sin embargo, la evaluación de respuesta clínica y radiológica tiene limitaciones, por tener una parte subjetiva (tanto al definir progresión clínica, como en la selección de las lesiones dianas para ser evaluadas por RECIST v1.1), no ser capaz de predecir de manera temprana la progresión y tampoco poder capturar el fenómeno de pseudoprogresión descrito con la inmunoterapia (75). También hay que considerar que los pacientes con lesiones inferiores a 1 cm o con enfermedad no medible determinada por RECIST v1.1 (p.ej., lesiones óseas, ascitis, derrame pleural) son excluidos de muchos ensayos fase 1 dado que no existe posibilidad de objetivar la respuesta al tratamiento mediante RECIST v1.1. Estudiar otros factores predictivos de la respuesta a inmunoterapia que sean objetivos y se puedan determinar de manera temprana es por tanto una prioridad en el contexto actual de la investigación en los ensayos fase 1.

La relevancia de encontrar métodos que evalúen la respuesta al tratamiento de inmunoterapia de manera precoz queda reflejada también en nuestra experiencia. La mitad de los pacientes presentaron progresión de la enfermedad como mejor respuesta (progresión radiológica medida por RECIST v1.1 en 131 pacientes y progresión clínica en 11), lo que si se hubiera podido identificar precozmente, hubiera evitado que los pacientes continuaran con un

tratamiento que no estaba siendo efectivo. La identificación temprana de la falta de beneficio no solo evitaría una potencial toxicidad del fármaco y el coste que supone administrar un tratamiento ineficaz, sino también abre la posibilidad a cambiar el tratamiento por otra alternativa que pudiera ser eficaz. Esto es especialmente relevante en la población que suele participar en los ensayos clínicos fase 1 de tratamientos no dirigidos, dado el estadio avanzado de la enfermedad y la fragilidad del paciente, lo que se ha reflejado en la mediana de SG de 9,6 meses (inferior a un año).

La secuenciación del DNA tumoral circulante (ctDNA) en muestras de plasma mediante técnicas de secuenciación de alto rendimiento, se ha establecido recientemente como una técnica menos invasiva y altamente específica para detectar mutaciones del tumor que predicen respuesta a tratamientos dirigidos, así como para determinar mutaciones de resistencia (92, 99, 110). Los avances tecnológicos y científicos están permitiendo evaluar otras posibles aplicaciones de la cuantificación del ctDNA en la clínica. En este contexto estudiar el valor pronóstico y predictivo de respuesta del ctDNA al tratamiento con inmunoterapia en ensayos clínicos fase 1 es altamente atractivo y ha constituido el objetivo principal de la presente Tesis.

En la actualidad, existen diferentes técnicas para la determinación del ctDNA en plasma, siendo las más aplicadas y validadas en la práctica clínica aquellas basadas en la determinación de mutaciones ya conocidas en el tumor, o en la secuenciación de un panel de genes concreto ya preestablecido de amplia cobertura (182, 183). Estas tecnologías de biopsia líquida basadas en el conocimiento previo de los resultados de secuenciación del tumor son sensibles y específicas, pero precisan disponer de una muestra tumoral previa y

generalmente tienen un coste bastante elevado. Como contrapunto, existen procedimientos que permiten analizar directamente la muestra de plasma. Una de estas técnicas es la secuenciación a baja cobertura del genoma completo del DNA libre circulante en plasma (en inglés *shallow whole-genome sequencing*, shWGS), lo que permite identificar alteraciones en el número de copias de todo el genoma (171, 184). Estas técnicas ofrecen la ventaja potencial de que no se requiere el conocimiento previo de las alteraciones que presenta el tumor, por lo cual su aplicabilidad puede ser mayor. Por otra parte, pueden suponer técnicas más costo-eficientes, ya que se puede cuantificar el ctDNA del paciente a un coste menor y de forma más rápida (185, 186).

En este estudio hemos analizado el valor pronóstico y predictivo de la cuantificación del ctDNA en pacientes que recibían inmunoterapia en ensayos clínicos fase 1 en la UITM del Hospital Universitari Vall'Hebron de Barcelona. Hemos cuantificado el ctDNA mediante el cálculo de la fracción tumoral circulante a partir de la secuenciación del genoma completo a baja cobertura en plasma (shWGS) y analizado el patrón de número de copias del DNA circulante mediante el software IchorCNA. La TF circulante corresponde a la fracción de ctDNA respecto al total del DNA circulante libre (cfDNA). En la población de estudio, el 61,7% de los pacientes presentó un TF detectable según esta tecnología, y la media y rango del TF era diferente según el tipo de tumor analizado, existiendo una gran variabilidad del valor del TF (rango del 0% al 86%). Los pacientes con melanoma, el tumor en el que clásicamente se ha confirmado un mayor beneficio del tratamiento de inmunoterapia, son los pacientes que presentaron los valores de ctDNA más bajos. Como contrapartida, las pacientes con cáncer de mama presentaron la media más alta de ctDNA, lo

que coincide con otros datos publicados de valores más elevados de ctDNA en el cáncer de mama triple negativo en comparación con otros subtipos (187) (la mayoría de las pacientes con cáncer de mama en nuestro estudio eran pacientes con TNBC). El siguiente tumor con valores de ctDNA más altos fue el cáncer colorrectal, que no solo fue el tipo tumoral con un menor porcentaje de ctDNA indetectable, sino el tipo tumoral más frecuente en nuestra población.

Para analizar el valor pronóstico de la detección del TF en plasma en pacientes que recibieron tratamiento con inmunoterapia en los ensayos clínicos fase 1, establecimos dos grupos en base a la ausencia de ctDNA en plasma (TF no detectable o TF = 0) o presencia de ctDNA en plasma (TF detectable o TF > 0). Nuestro estudio objetivó que la detección de ctDNA a nivel basal tiene un claro valor pronóstico para determinar la SG de los pacientes con diferencias muy significativas en las medianas de supervivencia global, de 8,2 meses en los pacientes con TF detectable a 15,5 meses en aquellos casos con TF no detectable. De manera similar, los pacientes con TF no detectable tuvieron una mediana de SLP correspondiente al doble de aquellos con TF detectable (mediana de 3,8 meses vs 1,9 meses).

Un valor detectable de ctDNA estuvo asociado a otras variables clínicas de mal pronóstico, tales como la presencia de metástasis hepáticas, un valor más elevado de la LDH, un mayor sumatorio de lesiones diana y más líneas de tratamiento previo. Estos resultados coinciden con datos preliminares que sugieren que el TF podría reflejar una naturaleza más agresiva del tumor (188). Estos factores pronósticos fueron evaluados en análisis univariantes y multivariantes para la SG. Cabe destacar que la detección de TF (TF > 0) fue una variable estadísticamente significativa en ambos procedimientos de análisis.

Los pacientes con TF detectable en el análisis univariante, presentaban un riesgo de muerte 1,8 veces mayor que los pacientes con TF no detectable, disminuyendo a 1,5 veces tras el ajuste del modelo con otras variables. Es importante destacar, por tanto, que el TF mantuvo la significación estadística como marcador pronóstico independiente a otras variables pronósticas clásicas que reflejan la agresividad del tumor (cuantificados por la LDH, la presencia de metástasis hepáticas y el sumatorio de las lesiones diana) o el estado inmunológico del paciente (cuantificado en la ratio neutrófilo-linfocito).

El valor pronóstico del TF ya ha sido descrito en otros trabajos, principalmente en cáncer de mama, colorrectal y NSCLC (133). Los resultados del presente estudio concuerdan con la evidencia publicada hasta la fecha, pero tiene la particularidad que ha evaluado el valor pronóstico del TF en los pacientes que participan en ensayos clínicos fase 1 de inmunoterapia, de manera agnóstica de tumor. En 2023, la unidad de ensayos clínicos fase 1 del *Institut Gustave Roussy* de París, presentaba datos en una población similar a la de nuestro estudio (189), aunque para la determinación de ctDNA en su trabajo utilizaban el TF estimado mediante el panel de secuenciación de FoundationOne® Liquid CDx (190), con un punto de corte de 10%. En la población francesa, aquellos pacientes con un TF inferior a 10 presentaban una mediana de supervivencia global de 14,4 meses frente a aquellos pacientes con un TF superior o igual a 10% en los que la mediana de supervivencia global fue de 6,2 meses (HR = 2,49 (IC 95% 2,11-2,95 $p < 0,001$)). Nuestro estudio confirma que la detección de TF usando una técnica más costo-eficiente, como la secuenciación a baja cobertura del genoma completo, mantiene la significación estadística del ctDNA como variable pronóstica. Como consecuencia, el uso de esta técnica podría permitir

una mayor implementación de la cuantificación del TF en las unidades de fase 1 en la práctica clínica.

Al analizar la relación entre el valor de TF con otras variables clínicas se pudo observar que aquellos pacientes con metástasis hepáticas presentaron valores más altos de TF de manera significativa, esto no ocurría con otra localización de las metástasis (en concreto las metástasis pulmonares), por lo que la presencia de metástasis hepáticas podría estar contribuyendo a la liberación de ctDNA al plasma de una manera característica y distintiva. Por otro lado, los niveles de TF antes del inicio del tratamiento con inmunoterapia no correlacionaron de manera franca con el sumatorio de las lesiones dianas según RECIST v1.1, sugiriendo que la cuantificación de ctDNA a nivel basal podría proporcionar información adicional sobre la biología del tumor, más allá de carga tumoral del paciente. El valor del sumatorio de las lesiones diana en cualquier caso no incluía la medición de las lesiones no diana, y por la propia definición de RECIST v1.1 (69) incluía como máximo 3 lesiones diana por órgano afectado y un máximo de 5 lesiones totales; por lo que este análisis tiene sus limitaciones, sin embargo, los resultados orientan en esa dirección. A pesar de que existe una evidencia clara de que la concentración de ctDNA en plasma aumenta desde estadios más localizados del tumor a estadios más avanzados (118), nuestro estudio concuerda con otros estudios que apuntan que la cuantificación de ctDNA no está relacionada exclusivamente con la carga tumoral del paciente y que existe una gran heterogeneidad de factores que influyen en la liberación de ctDNA al plasma en pacientes con tumores metastásicos (191), siendo muchos de ellos hoy por hoy desconocidos.

Existen pocos estudios publicados sobre el valor del TF antes del inicio del tratamiento como valor predictivo de respuesta a la inmunoterapia. En nuestro trabajo demostramos que los pacientes con un TF no detectable tenían una probabilidad 2 veces mayor de presentar beneficio clínico al tratamiento (incluyendo pacientes con respuesta completa, respuesta parcial o una estabilización de la enfermedad > 4 meses) frente a aquellos pacientes con TF detectable. Esto también está reflejado en la mayor SLP al tratamiento con inmunoterapia en los pacientes con TF no detectable en los cuales solamente el 37% presentó progresión de la enfermedad como mejor respuesta, frente al 57% en los pacientes con TF detectable. Nuestro estudio es por tanto uno de los primeros trabajos en demostrar en una población con múltiples tipos tumorales, que la determinación de TF antes de iniciar el tratamiento se correlaciona con la mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1 y con la probabilidad de beneficio de la inmunoterapia en ensayos clínicos en fase temprana, pudiendo ser, por lo tanto, un marcador predictivo de resistencia a los tratamientos.

Los mecanismos subyacentes que pudieran explicar esta asociación son poco conocidos, aunque podría existir una relación con una mayor agresividad biológica de los tumores que más liberan ctDNA al plasma. En ese sentido un estudio reciente demostraba que existían diferencias entre el perfil transcriptómico de tumores de vejiga con liberación de ctDNA y aquellos sin liberación de ctDNA, sugiriendo una mayor agresividad biológica de los primeros (188). En nuestro trabajo también observamos una tendencia de los pacientes con un diagnóstico inicial del tumor en estadios más tempranos a presentar un valor menor de TF en el momento del inicio del ensayo clínico (y, por tanto, presentar ya enfermedad metastásica en el momento de la toma de la muestra),

lo cual podría indicar también una menor agresividad de estos tumores (aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas). Por otro lado, existen evidencias de que la elevación de la LDH y la presencia de metástasis hepáticas, se asocian a una peor respuesta al tratamiento con inmunoterapia (192). En nuestra población, los pacientes con TF detectable también presentaron valores de LDH más altos y mayor presencia de metástasis hepáticas.

En la última parte de nuestro estudio, analizamos otra potencial aplicación de la biopsia líquida en la clínica y cómo la cuantificación de los cambios del ctDNA pueden servir para monitorizar la respuesta al tratamiento. Existen datos preliminares de que los cambios del DNA tumoral circulante en el curso de tratamiento se podrían correlacionar con la respuesta al tratamiento, lo que permitiría una valoración más objetiva y temprana de la respuesta obtenida, lo que potencialmente podría tener una influencia positiva en el enfoque terapéutico de los pacientes (138-140). Se han publicado varios estudios que sugieren una correlación entre las disminuciones de ctDNA y las medidas de respuesta como la SG, SLP y la tasa de respuesta (143-146). Sin embargo, existe incertidumbre en cuanto a la aplicabilidad y posibilidad de generalizar esos resultados, ya que los estudios presentan notables diferencias en la determinación de ctDNA (principalmente utilizando técnicas con una alta cobertura dirigidas en base a los resultados de la secuenciación tumoral del tejido del paciente), momento de recogida de las muestras, tipos tumorales y tratamientos. Nuestro estudio estudia el valor de los cambios de ctDNA mediante el análisis de los cambios de TF utilizando la secuenciación a baja cobertura del genoma completo (shWGS), la cual, como ya he mencionado, no requiere información previa del tumor y es una tecnología más costo-eficiente, lo que podría suponer una ventaja para su

implementación en la clínica, dada la necesidad de estudiar múltiples muestras de manera secuencial en el tiempo para monitorizar la respuesta al tratamiento.

Puesto que a diferencia de lo que ocurre con la respuesta radiológica y los criterios RECIST v1.1, no existe un consenso en la definición de lo que corresponde a una respuesta molecular por ctDNA, siguiendo las recomendaciones publicadas por el grupo *Friends for Cancer Research*, analizamos los cambios de ctDNA cuantitativa y cualitativamente (152, 161). Se utilizaron estos criterios justamente dado que han sido elaborados tras el análisis conjunto de varias cohortes de pacientes que incluían diferentes tecnologías, tipos tumorales y tipos de tratamiento. Con ello se quiso evitar sesgos en el análisis de los datos, así como el potencial sobreajuste de los datos para establecer diferentes puntos de cohorte en las distintas categorías, lo que podría dificultar la generalización de los datos y comprometer la validez externa del estudio.

Este trabajo ha demostrado que los cambios cualitativos precoces en el ctDNA (2-4 semanas desde el inicio del tratamiento), identifican claramente pacientes con diferente SG. De esta forma, los pocos pacientes que consiguieron eliminar la detección de ctDNA en plasma después de recibir un solo ciclo de tratamiento (D/ND), tuvieron una supervivencia notablemente superior que aquellos pacientes en los que el ctDNA siguió siendo detectable en plasma (D/D). Hay que destacar que la mediana de SG de 16,9 meses de los pacientes D/ND era similar a la media de SG de 17,8 meses correspondiente a los pacientes en los que ctDNA no fue detectable en ningún momento (ND/ND) (ni antes del tratamiento con inmunoterapia ni durante el tratamiento). De forma contraria, los pacientes que teniendo un ctDNA no detectable antes del tratamiento mostraron

un cambio cualitativo, detectándose ctDNA en el plasma tras recibir 1 ciclo de tratamiento (ND/D), presentaron una SG notablemente inferior (mediana 10,3 meses) a la de los pacientes en los que el ctDNA siguió siendo no detectable (ND/ND) (mediana 17,8 meses). La SG de estos pacientes con un cambio cualitativo de ctDNA era similar a la de los pacientes con ctDNA detectable antes del tratamiento (mediana 8,1 meses). Estos resultados son novedosos y ponen de manifiesto el valor de la cuantificación temprana de los cambios de ctDNA como factor para determinar el beneficio a la inmunoterapia.

También analizamos el impacto de los cambios cualitativos de ctDNA en el momento de realizar la primera reevaluación radiológica del tumor (6-8 semanas desde el inicio del tratamiento). Muy pocos pacientes consiguieron eliminar el ctDNA del plasma en este momento, y aunque en ellos la supervivencia global sí que se equiparaba a aquellos pacientes en los que no se detectaba ctDNA antes del tratamiento, el número de pacientes es tan pequeño que es difícil establecer conclusiones sólidas al respecto. Otros grupos de investigación han publicado como la eliminación de ctDNA en plasma tiene un impacto positivo en la supervivencia independientemente del momento en el que ello acontece (143). Nuestros resultados se orientarían en esa línea, aunque no sean concluyentes dado el bajo número de pacientes. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurría de manera precoz, los pacientes que no teniendo ctDNA detectable antes del tratamiento presentaron un cambio a ctDNA detectable en el momento cercano a la realización del TAC, no mostraron claramente una peor supervivencia que aquellos pacientes en los que el ctDNA seguía siendo no detectable.

Aunque estos resultados podrían indicar que los cambios más tardíos en el ctDNA tienen un menor impacto en la SG que los cambios más tempranos, existen muchas limitaciones que obligan a interpretar con cautela estos resultados. La sensibilidad de la técnica shWGS implica que pacientes con TF circulante muy baja o cercana al 3% puedan ser interpretados erróneamente como indetectables y viceversa. Será importante evaluar si las técnicas con mayor sensibilidad podrían tener un mayor valor en la clínica para determinar el impacto de los cambios cualitativos en la monitorización de respuesta. En este sentido, otros estudios ya han demostrado como en muestras con valores bajos de ctDNA (por debajo del 1-5% del total del cfDNA), obtener resultados que sean precisos constituye un reto todavía mayor (193). Otro aspecto a comentar es la limitación relacionada con el momento de la extracción de la muestra más cercana al TAC, ya que nuestro protocolo traslacional permitía obtener las muestras antes del inicio de cada ciclo, y no exactamente al mismo tiempo que el TAC, por lo que hay que considerar esta variabilidad. La importancia del momento de la extracción de la muestra es todavía uno de los factores a definir antes de la implementación de la biopsia líquida en la monitorización de respuesta al tratamiento. En cualquier caso, el interés clínico principal reside en poder identificar los cambios en la supervivencia de la manera más precoz posible, para poder actuar en la clínica con la máxima celeridad (indicando un cambio de tratamiento o actitud).

Dada las características de la cuantificación del TF utilizando la secuenciación a baja cobertura del genoma completo (shWGS) y el estado tan avanzado de la enfermedad de los pacientes de nuestra cohorte, el análisis de los cambios cuantitativos podría tener un interés todavía mayor que los cambios

cualitativos, al establecer diferentes puntos de cohorte para las diferentes categorías, que marcaran cambios más evidentes en la cuantificación del TF. En este sentido los pacientes que presentaron una disminución $> 50\%$ en el TF tuvieron una SG claramente más favorable que aquellos pacientes con disminuciones $\leq 50\%$ o un incremento del TF. Es importante destacar que estos resultados fueron similares tanto en el análisis de los cambios de manera precoz, como en el momento de la realización del TAC. Por lo tanto, en base a nuestros resultados, una disminución del TF mediante el análisis de CNV tras la secuenciación a baja cobertura de más del 50% identifica claramente a los pacientes con una mayor supervivencia independientemente del momento en el que ello ocurra. Sin embargo, los pacientes con un aumento del TF $> 20\%$ y con cambios intermedios (variaciones del TF entre una disminución de $< 50\%$ y un aumento $< 20\%$), no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos en cuanto a la SG, ni al evaluarlo de manera temprana, ni al estudiarlo en el momento de la realización del TAC, lo que indica que es preciso realizar nuevos estudios que definan de manera óptima los puntos de cohorte de las diferentes categorías. En esta línea estudios más recientes sugieren puntos de corte diferentes que tienen que ser validados antes de implementarse en la clínica (140, 157).

En línea con lo publicado hasta la fecha, nuestro estudio también mostró como la cuantificación de ctDNA se asoció de manera moderada a la mejor respuesta radiológica medida por RECIST v1.1. Esta asociación fue mayor en los pacientes con PR/CR donde pocos pacientes presentaron un aumento significativo de ctDNA. Asimismo, la proporción de pacientes con un aumento de ctDNA que no presentaron beneficio clínico fue mayor que los pacientes que

presentaron beneficio clínico. En este sentido, en nuestra cohorte en el momento de realizar el primer TAC existía un aumento del TF en un 60% de los pacientes que presentarían una SD < 4 meses, frente al 40% de aquellos pacientes con una SD > 4 meses. Hacen falta, sin embargo, otros estudios para poder valorar si la cuantificación del ctDNA podría ayudar a diferenciar aquellas estabilizaciones de la enfermedad que son fruto de una biología más indolente del tumor o de una respuesta real al tratamiento.

Los presentes resultados pueden tener importantes implicaciones clínicas. En primer lugar, demuestran el valor del TF antes del inicio del tratamiento con inmunoterapia como un factor pronóstico de SG, independiente de otros factores pronósticos clásicos, por lo que en un futuro podría plantearse su uso dentro de la investigación clínica para una mejor selección de pacientes que participan en los ensayos clínicos fase 1 de inmunoterapia. En segundo lugar, destacan la necesidad de disponer de datos de más estudios para valorar el papel del TF previo al tratamiento con inmunoterapia como marcador predictivo de resistencia al mismo.

Asimismo, nuestro trabajo sugiere que los cambios en la cuantificación de TF podrían ayudar a monitorizar la respuesta al tratamiento, identificando principalmente al grupo de pacientes con un descenso del 50% del TF mediante secuenciación a baja cobertura del genoma completo como un grupo de pacientes con una SG distintiva. A la hora de poder implementar en la clínica el TF como marcador pronóstico y predictivo de respuesta para la inmunoterapia en ensayos clínicos fase 1, otros aspectos clave serían poder aclarar las diferencias existentes entre las diferentes técnicas para la cuantificación del ctDNA, así como establecer el punto de corte preciso para considerar positiva la

prueba, y si dicho umbral variara en función de las diferentes técnicas. En cuanto a la aplicación del ctDNA para la monitorización de respuesta, los retos son todavía mayores y se necesitan más estudios que lo validen para poder implementarlo en la clínica.

Nuestro estudio tiene importantes limitaciones, principalmente debido a que es un estudio retrospectivo realizado en una única institución, aunque los datos clínicos han sido recogidos de forma prospectiva dentro de los ensayos clínicos y para el estudio *Immunomics* se analizó de manera secuencial la muestra de plasma de los primeros 282 pacientes incluidos en el proyecto 360RIO del que se disponía de una muestra de plasma a nivel basal. La población de estudio incluye múltiples tipos tumorales y diferentes regímenes de tratamiento, esta heterogeneidad podría haber influido en los resultados. Sin embargo, esta diversidad tanto en el tipo tumoral como en el tipo de tratamiento respalda la evidencia real de nuestros datos como reflejo de las características de los pacientes que reciben tratamiento en ensayos clínicos fase 1. Otra limitación es el hecho de que el TF se analizó de manera retrospectiva mediante una prueba solo para fines de investigación (y no validada para su aplicación en el manejo clínico de los pacientes), en un laboratorio de investigación traslacional y que no disponía de certificación ISO. Finalmente, y en relación con la valoración del TF como marcador predictivo de resistencia al tratamiento, la principal limitación es que se trata de un estudio retrospectivo y no existe un brazo control. Para determinar definitivamente el valor predictivo del TF sería necesario realizar un ensayo clínico aleatorizado seleccionando en base al biomarcador y evaluar las diferencias en los resultados del tratamiento según la presencia o ausencia de dicho biomarcador.

En resumen, la implementación de este proyecto traslacional 360 RIO nos ha permitido obtener un valioso repertorio de muestras biológicas procedentes de pacientes que recibían tratamiento de inmunoterapia en ensayos clínicos en fase temprana. Los resultados de este trabajo demuestran que la cuantificación del ctDNA tiene un importante valor pronóstico y su aplicación en la clínica tendría una trascendencia indiscutible en la selección de pacientes que participan en los ensayos clínicos de inmunoterapia en fase temprana. Asimismo, sugiere un papel del TF como marcador predictivo de respuesta a la inmunoterapia (tanto antes de iniciar el tratamiento, como la cuantificación de los cambios del TF en el curso del tratamiento), lo que debería ser validado en futuros estudios. No obstante, la aportación de evidencia clínica real es un aspecto singular y una fortaleza del presente trabajo.

7. Conclusiones

1. La detección de ctDNA es un marcador pronóstico de supervivencia global y supervivencia libre de progresión en pacientes en ensayos clínicos fase 1 que reciben inmunoterapia.
2. La detección de ctDNA antes de iniciar el tratamiento se comporta como un factor predictivo independiente en un modelo pronóstico de regresión logística para supervivencia global.
3. Existen diferencias clínicas entre los pacientes según la identificación y cuantificación del ctDNA. Las principales diferencias fueron la presencia de metástasis hepáticas y el tipo tumoral. Existió una correlación leve entre el sumatorio de lesiones diana a nivel basal del RECIST v1.1 y la cuantificación de ctDNA, indicando que probablemente existan otros factores además de la carga tumoral que impacten en la liberación de ctDNA.
4. Los pacientes con ctDNA detectable antes de iniciar el tratamiento con inmunoterapia en ensayos clínicos fase 1 presentaron una mayor tasa de progresión de la enfermedad y menor beneficio clínico que aquellos pacientes con ctDNA no detectable.
5. Los cambios en la cuantificación de ctDNA antes de recibir el segundo ciclo de tratamiento (2-4 semanas del inicio de la inmunoterapia) o en el momento de la realización del primer control radiológico de la enfermedad (6-8 semanas del inicio de la inmunoterapia) se relacionaron con cambios en la supervivencia global de los pacientes.
6. Los cambios en la cuantificación de ctDNA antes de recibir el segundo ciclo de tratamiento (2-4 semanas del inicio de la inmunoterapia) o en el

momento de la realización del primer control radiológico de la enfermedad (6-8 semanas del inicio de la inmunoterapia) se relacionaron con la mejor respuesta tumoral radiológica medida por RECIST v1.1 y el beneficio clínico obtenido por los pacientes.

8. Líneas futuras de investigación

La relevancia del ctDNA en los ensayos clínicos en fase temprana será cada vez más importante en los próximos años y nuestro interés es seguir analizando su valor pronóstico y predictivo de respuesta a los distintos tipos de tratamiento que están siendo evaluados en la unidad. En este sentido tenemos previsto la colaboración con otros grupos de investigación para poder validar nuestros hallazgos. Principalmente, esta colaboración se llevará a cabo con centros europeos afiliados a *Cancer Core Europe* (CCE) (163), en el marco del proyecto europeo DART (la doctoranda es la investigadora principal del proyecto (166)).

Además, la doctoranda continuará su trabajo como miembro del grupo RECIST para establecer los pasos necesarios para la integración de ctDNA en las guías de respuesta RECIST v1.1 e iRECIST (90).

Por otro lado, continuaremos trabajando en el análisis de la cohorte de este proyecto para poder profundizar en los resultados de la Tesis doctoral. En la colaboración con el grupo de “Biomarcadores y Dinámica Clonal” del VHIO, elegimos utilizar la técnica shWGS para la cuantificación del ctDNA por varias razones, entre ellas: la posibilidad de realizar el análisis de ctDNA sin la necesidad de secuenciar previamente la muestra tumoral; la posibilidad de implementar el proyecto en un laboratorio académico sin la necesidad de depender de una plataforma comercial; y la posibilidad de realizar un análisis bioinformático establecido y ampliamente aceptado por la comunidad científica (171). Sin embargo, como ya hemos comentado, esta tecnología también tiene sus limitaciones. Por tanto, los siguientes pasos en nuestra investigación, estarán focalizados en intentar incrementar la sensibilidad de detección de la señal del ctDNA en el shWGS y, con ello, poder mantener las ventajas del

análisis a bajo coste del shWGS pero con una mayor sensibilidad. Para ello estamos implementando nuevos análisis bioinformáticos que nos permitirán evaluar los mismos datos ya generados por shWGS para este proyecto, pero con una mayor sensibilidad.

En un primer paso, queremos integrar los datos de “fragmentomics” a nuestro análisis. Esta técnica consiste en el análisis de los patrones de tamaño de los fragmentos de cfDNA; (las moléculas de cfDNA provenientes del tumor son en general más cortas que las moléculas de cfDNA provenientes de células no tumorales) (194). Esto es particularmente relevante en los casos con un TF no detectable o valores muy bajos de TF, donde el perfil de fragmentos podría ayudar a detectar una señal de ctDNA no detectada previamente.

Asimismo, queremos integrar datos de los perfiles de metilación de cfDNA a partir de shWGS. El DNA tumoral tiene un perfil de metilación diferente del tejido no tumoral y existe un gran interés en la comunidad científica en considerar la metilación de cfDNA en los diferentes análisis de biopsia líquida (195).

Otro análisis que realizaremos en el futuro será la evaluación del patrón de nucleosomas en la población de estudio. El DNA se encuentra altamente empaquetado y condensado en histonas dentro del núcleo formando los cromosomas. La estructura de DNA empaquetado y condensado en un octámero de histonas se llama nucleosoma, y tiene 146 pares de bases, que corresponde casi exactamente con el tamaño del cfDNA circulante en la sangre. Mediante un análisis bioinformático, se puede mapear las regiones genómicas en las que el DNA se encuentra más empaquetado, e inferir patrones de nucleosomas y, consecuentemente, patrones de expresión génica y finalmente, el tipo de tejido al que pertenecen (196). Por último, queremos incorporar un nuevo análisis

sobre la caracterización del tipo celular que fue desarrollado recientemente por el grupo de “Biomarcadores y Dinámica Clonal” del VHIO (197).

La incorporación de estas técnicas y análisis bioinformáticos nos permitirá obtener más datos de las muestras obtenidas para este proyecto, lo cual en un análisis final mediante herramientas de inteligencia artificial (IA) puede aportar nuevas perspectivas sobre el valor de la detección y cuantificación de ctDNA mediante shWGS como marcador pronóstico y predictivo de respuesta al tratamiento con inmunoterapia en los pacientes con cáncer.

9. Bibliografía

En esta Tesis se ha utilizado el sistema Vancouver (numeración correlativa) para el orden de las referencias bibliográficas. En cada una de ellas se han incluido los nombres de los seis primeros firmantes, añadiendo “et al” (y cols) si el número era superior a siete autores. Las revistas se han abreviado según el patrón de PubMed y se ha añadido el identificador de objeto digital (doi) en los artículos publicados en revistas de acceso libre (*open access*).

1. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013;132(5):1133-45.
2. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). *Las Cifras del cáncer en España 2023*. ISBN: 978-84-09-48173-6.
3. REDECAN. Red Española de Registros de Cáncer 2020 [Available from: <https://redecana.org/es>].
4. Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones según la causa de la muerte [Available from: <https://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?t=6609>].
5. Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones según la causa de la muerte 2021 y provisionales semestre [Available from: https://www.ine.es/dynqs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=125473617680&menu=ultiDatos&idp=1254735573175].
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
7. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
8. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46.
9. Rodon J. An (only) partially established paradigm of drug development of targeted therapies. *Eur J Cancer*. 2014;50(12):2037-9.
10. Saez-Ibanez AR, Upadhaya S, Campbell J. Immuno-oncology clinical trials take a turn beyond PD1/PDL1 inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2023;22(6):442-3.

11. Druker BJ, Lydon NB. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest.* 2000;105(1):3-7.
12. Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med.* 2001;344(14):1052-6.
13. Blanke CD, Rankin C, Demetri GD, Ryan CW, von Mehren M, Benjamin RS, et al. Phase III randomized, intergroup trial assessing imatinib mesylate at two dose levels in patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing the kit receptor tyrosine kinase: S0033. *J Clin Oncol.* 2008;26(4):626-32.
14. Ali MA. Chronic Myeloid Leukemia in the Era of Tyrosine Kinase Inhibitors: An Evolving Paradigm of Molecularly Targeted Therapy. *Mol Diagn Ther.* 2016;20(4):315-33.
15. Chin L, Gray JW. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature.* 2008;452(7187):553-63.
16. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(18):1693-703.
17. Shaw AT, Kim DW, Mehra R, Tan DS, Felip E, Chow LQ, et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2014;370(13):1189-97.
18. Chabner BA. Approval after phase I: ceritinib runs the three-minute mile. *Oncologist.* 2014;19(6):577-8.
19. Mateo J, Steuten L, Aftimos P, André F, Davies M, Garralda E, et al. Delivering precision oncology to patients with cancer. *Nat Med.* 2022;28(4):658-65.

20. Hierro C, Matos I, Martin-Liberal J, Ochoa de Olza M, Garralda E. Agnostic-Histology Approval of New Drugs in Oncology: Are We Already There? *Clin Cancer Res.* 2019;25(11):3210-9.
21. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54(4):307-14.
22. Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(5):739-45.
23. Bagchi S. Pembrolizumab for treatment of refractory melanoma. *Lancet Oncol.* 2014;15(10):e419.
24. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2521-32.
25. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(2):123-35.
26. Seiwert TY, Burtness B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(7):956-65.
27. Motzer RJ, Escudier B, George S, Hammers HJ, Srinivas S, Tykodi SS, et al. Nivolumab versus everolimus in patients with advanced renal cell carcinoma: Updated results with long-term follow-up of the randomized, open-label, phase 3 CheckMate 025 trial. *Cancer.* 2020;126(18):4156-67.

28. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2015;373(19):1803-13.
29. Mishima S, Taniguchi H, Akagi K, Baba E, Fujiwara Y, Hirasawa A, et al. Japan Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion for the diagnosis and use of immunotherapy in patients with deficient DNA mismatch repair tumors, cooperated by Japanese Society of Medical Oncology, First Edition. *Int J Clin Oncol*. 2020;25(2):217-39.
30. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541(7637):321-30.
31. Saez-Ibañez AR, Sommers E, Upadhaya S, Campbell J. PD1/PDL1 clinical trials adapt to a growing landscape of patients resistant to PDx. *Nat Rev Drug Discov*. 2023;22(12):944-5.
32. Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin Cancer Res*. 2016;22(8):1865-74.
33. Gandini S, Massi D, Mandalà M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;100:88-98.
34. McGranahan N, Rosenthal R, Hiley CT, Rowan AJ, Watkins TBK, Wilson GA, et al. Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell*. 2017;171(6):1259-71.e11.
35. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348(6230):124-8.

36. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*. 2015;350(6257):207-11.
37. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med*. 2016;375(9):819-29.
38. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*. 2017;168(4):707-23.
39. Shin DS, Zaretsky JM, Escuin-Ordinas H, Garcia-Diaz A, Hu-Lieskovan S, Kalbasi A, et al. Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations. *Cancer Discov*. 2017;7(2):188-201.
40. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019;25(13):3753-8.
41. Marcus L, Fashoyin-Aje LA, Donoghue M, Yuan M, Rodriguez L, Gallagher PS, et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Tumor Mutational Burden-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2021;27(17):4685-9.
42. Spreafico A, Hansen AR, Abdul Razak AR, Bedard PL, Siu LL. The Future of Clinical Trial Design in Oncology. *Cancer Discov*. 2021;11(4):822-37.
43. Cook N, Hansen AR, Siu LL, Abdul Razak AR. Early phase clinical trials to identify optimal dosing and safety. *Mol Oncol*. 2015;9(5):997-1007.
44. Eisenhauer EA, O'Dwyer PJ, Christian M, Humphrey JS. Phase I clinical trial design in cancer drug development. *J Clin Oncol*. 2000;18(3):684-92.
45. Araujo D, Greystoke A, Bates S, Bayle A, Calvo E, Castelo-Branco L, et al. Oncology phase I trial design and conduct: time for a change - MDICT Guidelines 2022. *Ann Oncol*. 2023;34(1):48-60.

46. Chakiba C, Grellety T, Bellera C, Italiano A. Encouraging Trends in Modern Phase 1 Oncology Trials. *N Engl J Med*. 2018;378(23):2242-3.
47. Dienstmann R, Garralda E, Aguilar S, Sala G, Viaplana C, Ruiz-Pace F, et al. Evolving Landscape of Molecular Prescreening Strategies for Oncology Early Clinical Trials. *JCO Precis Oncol*. 2020;4.
48. Adashek JJ, LoRusso PM, Hong DS, Kurzrock R. Phase I trials as valid therapeutic options for patients with cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(12):773-8.
49. Garralda E, Dienstmann R, Piris-Giménez A, Braña I, Rodon J, Tabernero J. New clinical trial designs in the era of precision medicine. *Mol Oncol*. 2019;13(3):549-57.
50. Hierro C, Azaro A, Argilés G, Elez E, Gómez P, Carles J, et al. Unveiling changes in the landscape of patient populations in cancer early drug development. *Oncotarget*. 2017;8(8):14158-72.
51. Subbiah V, Gainor JF, Rahal R, Brubaker JD, Kim JL, Maynard M, et al. Precision Targeted Therapy with BLU-667 for RET-Driven Cancers. *Cancer Discov*. 2018;8(7):836-49.
52. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*. 2009;361(2):123-34.
53. Juric D, Castel P, Griffith M, Griffith OL, Won HH, Ellis H, et al. Convergent loss of PTEN leads to clinical resistance to a PI(3)K α inhibitor. *Nature*. 2015;518(7538):240-4.
54. Awad MM, Liu S, Rybkin II, Arbour KC, Dilly J, Zhu VW, et al. Acquired Resistance to KRAS(G12C) Inhibition in Cancer. *N Engl J Med*. 2021;384(25):2382-93.

55. Hernando-Calvo A, Garralda E. Patient-Centric Approaches for Phase I Combination Trials Come on Stage. *Cancer Discov.* 2023;13(8):1762-4.
56. Girotti MR, Gremel G, Lee R, Galvani E, Rothwell D, Viros A, et al. Application of Sequencing, Liquid Biopsies, and Patient-Derived Xenografts for Personalized Medicine in Melanoma. *Cancer Discov.* 2016;6(3):286-99.
57. Borad MJ, Champion MD, Egan JB, Liang WS, Fonseca R, Bryce AH, et al. Integrated genomic characterization reveals novel, therapeutically relevant drug targets in FGFR and EGFR pathways in sporadic intrahepatic cholangiocarcinoma. *PLoS Genet.* 2014;10(2):e1004135.
58. Tao DL, Kartika T, Tran A, Prasad V. Phase I trials and therapeutic intent in the age of precision oncology: What is a patient's chance of response? *Eur J Cancer.* 2020;139:20-6.
59. Fukuda YK, Huang E, Finnigan S, Ivy SP, Rubinstein L, Takebe N. Risks and benefits of phase 1 oncology trials, 2001 through 2012. *Journal of Clinical Oncology.* 2014;32(15_suppl):2552-.
60. Roberts TG, Jr., Goulart BH, Squitieri L, Stallings SC, Halpern EF, Chabner BA, et al. Trends in the risks and benefits to patients with cancer participating in phase 1 clinical trials. *Jama.* 2004;292(17):2130-40.
61. Olmos D, A'Hern R P, Marsoni S, Morales R, Gomez-Roca C, Verweij J, et al. Patient selection for oncology phase I trials: a multi-institutional study of prognostic factors. *J Clin Oncol.* 2012;30(9):996-1004.
62. Penel N, Vanseymortier M, Bonneterre ME, Clisant S, Dansin E, Vendel Y, et al. Prognostic factors among cancer patients with good performance status screened for phase I trials. *Invest New Drugs.* 2008;26(1):53-8.
63. Arkenau HT, Barriuso J, Olmos D, Ang JE, de Bono J, Judson I, et al. Prospective validation of a prognostic score to improve patient selection for oncology phase I trials. *J Clin Oncol.* 2009;27(16):2692-6.

64. Wheler J, Tsimberidou AM, Hong D, Naing A, Falchook G, Piha-Paul S, et al. Survival of 1,181 patients in a phase I clinic: the MD Anderson Clinical Center for targeted therapy experience. *Clin Cancer Res.* 2012;18(10):2922-9.
65. Bigot F, Castanon E, Baldini C, Hollebecque A, Carmona A, Postel-Vinay S, et al. Prospective validation of a prognostic score for patients in immunotherapy phase I trials: The Gustave Roussy Immune Score (GRIm-Score). *Eur J Cancer.* 2017;84:212-8.
66. Sen S, Hess K, Hong DS, Naing A, Piha-Paul S, Janku F, et al. Development of a prognostic scoring system for patients with advanced cancer enrolled in immune checkpoint inhibitor phase 1 clinical trials. *Br J Cancer.* 2018;118(6):763-9.
67. Day D, Guo C, Kanjanapan Y, Tran B, Spreafico A, Joshua AM, et al. Survival in Early Phase Immuno-Oncology Trials: Development and Validation of a Prognostic Index. *JNCI Cancer Spectr.* 2019;3(4):pkz071.
68. Matos I, Villacampa G, Hierro C, Martin-Liberal J, Berché R, Pedrola A, et al. Phase I prognostic online (PIPO): A web tool to improve patient selection for oncology early phase clinical trials. *Eur J Cancer.* 2021;155:168-78.
69. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-47.
70. Schwartz LH, Seymour L, Litière S, Ford R, Gwyther S, Mandrekar S, et al. RECIST 1.1 - Standardisation and disease-specific adaptations: Perspectives from the RECIST Working Group. *Eur J Cancer.* 2016;62:138-45.
71. Chen EY, Raghunathan V, Prasad V. An Overview of Cancer Drugs Approved by the US Food and Drug Administration Based on the Surrogate End Point of Response Rate. *JAMA Intern Med.* 2019;179(7):915-21.

72. Haslam A, Hey SP, Gill J, Prasad V. A systematic review of trial-level meta-analyses measuring the strength of association between surrogate end-points and overall survival in oncology. *Eur J Cancer*. 2019;106:196-211.
73. Litière S, Isaac G, De Vries EGE, Bogaerts J, Chen A, Dancey J, et al. RECIST 1.1 for Response Evaluation Apply Not Only to Chemotherapy-Treated Patients But Also to Targeted Cancer Agents: A Pooled Database Analysis. *J Clin Oncol*. 2019;37(13):1102-10.
74. Borcoman E, Kanjanapan Y, Champiat S, Kato S, Servois V, Kurzrock R, et al. Novel patterns of response under immunotherapy. *Ann Oncol*. 2019;30(3):385-96.
75. Di Giacomo AM, Danielli R, Guidoboni M, Calabrò L, Carlucci D, Miracco C, et al. Therapeutic efficacy of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with metastatic melanoma unresponsive to prior systemic treatments: clinical and immunological evidence from three patient cases. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(8):1297-306.
76. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711-23.
77. Long GV, Weber JS, Larkin J, Atkinson V, Grob JJ, Schadendorf D, et al. Nivolumab for Patients With Advanced Melanoma Treated Beyond Progression: Analysis of 2 Phase 3 Clinical Trials. *JAMA Oncol*. 2017;3(11):1511-9.
78. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-39.
79. Rizvi NA, Mazières J, Planchard D, Stinchcombe TE, Dy GK, Antonia SJ, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(3):257-65.

80. Gandara DR, von Pawel J, Mazieres J, Sullivan R, Helland Å, Han JY, et al. Atezolizumab Treatment Beyond Progression in Advanced NSCLC: Results From the Randomized, Phase III OAK Study. *J Thorac Oncol.* 2018;13(12):1906-18.
81. George S, Motzer RJ, Hammers HJ, Redman BG, Kuzel TM, Tykodi SS, et al. Safety and Efficacy of Nivolumab in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated Beyond Progression: A Subgroup Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2016;2(9):1179-86.
82. Escudier B, Motzer RJ, Sharma P, Wagstaff J, Plimack ER, Hammers HJ, et al. Treatment Beyond Progression in Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma Treated with Nivolumab in CheckMate 025. *Eur Urol.* 2017;72(3):368-76.
83. Haddad R, Concha-Benavente F, Blumenschein G, Jr., Fayette J, Guigay J, Colevas AD, et al. Nivolumab treatment beyond RECIST-defined progression in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck in CheckMate 141: A subgroup analysis of a randomized phase 3 clinical trial. *Cancer.* 2019;125(18):3208-18.
84. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res.* 2009;15(23):7412-20.
85. Hodi FS, Ballinger M, Lyons B, Soria JC, Nishino M, Tabernero J, et al. Immune-Modified Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (imRECIST): Refining Guidelines to Assess the Clinical Benefit of Cancer Immunotherapy. *J Clin Oncol.* 2018;36(9):850-8.
86. Nishino M, Giobbie-Hurder A, Gargano M, Suda M, Ramaiya NH, Hodi FS. Developing a common language for tumor response to immunotherapy: immune-related response criteria using unidimensional measurements. *Clin Cancer Res.* 2013;19(14):3936-43.

87. Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, Ford R, Schwartz LH, Mandrekar S, et al. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol.* 2017;18(3):e143-e52.
88. Kuhl CK, Alparslan Y, Schmoee J, Sequeira B, Keulers A, Brümmendorf TH, et al. Validity of RECIST Version 1.1 for Response Assessment in Metastatic Cancer: A Prospective, Multireader Study. *Radiology.* 2019;290(2):349-56.
89. Nakajima EC, Simpson A, Bogaerts J, de Vries EGE, Do R, Garalda E, et al. Tumor Size Is Not Everything: Advancing Radiomics as a Precision Medicine Biomarker in Oncology Drug Development and Clinical Care. A Report of a Multidisciplinary Workshop Coordinated by the RECIST Working Group. *JCO Precis Oncol.* 2024;8:e2300687.
90. Garralda E, Laurie SA, Seymour L, de Vries EGE. Towards evidence-based response criteria for cancer immunotherapy. *Nat Commun.* 2023;14(1):3001.
91. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(6):426-37.
92. Pantel K, Alix-Panabières C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res.* 2013;73(21):6384-8.
93. Overman MJ, Modak J, Kopetz S, Murthy R, Yao JC, Hicks ME, et al. Use of research biopsies in clinical trials: are risks and benefits adequately discussed? *J Clin Oncol.* 2013;31(1):17-22.
94. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366(10):883-92.
95. De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, Won HH, Ng CKY, Nuciforo P, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling

of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann Oncol.* 2018;29(11):2268.

96. McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell.* 2015;27(1):15-26.

97. Murtaza M, Dawson SJ, Pogrebniak K, Rueda OM, Provenzano E, Grant J, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. *Nat Commun.* 2015;6:8760.

98. Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S, Oliver J, Schuster T, Blanché H, et al. Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002. *Clin Cancer Res.* 2014;20(17):4613-24.

99. Siravegna G, Mussolin B, Venesio T, Marsoni S, Seoane J, Dive C, et al. How liquid biopsies can change clinical practice in oncology. *Ann Oncol.* 2019;30(10):1580-90.

100. Mandel P, Metais P. [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142(3-4):241-3.

101. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-a survey. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1775(1):181-232.

102. Mattox AK, Douville C, Wang Y, Popoli M, Ptak J, Silliman N, et al. The Origin of Highly Elevated Cell-Free DNA in Healthy Individuals and Patients with Pancreatic, Colorectal, Lung, or Ovarian Cancer. *Cancer Discov.* 2023;13(10):2166-79.

103. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977;37(3):646-50.

104. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994;3(1):67-71.
105. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1994;86(4):774-9.
106. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology.* 1989;46(5):318-22.
107. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta.* 2001;313(1-2):139-42.
108. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001;61(4):1659-65.
109. Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res.* 1975;35(9):2375-82.
110. Thress KS, Brant R, Carr TH, Dearden S, Jenkins S, Brown H, et al. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. *Lung Cancer.* 2015;90(3):509-15.
111. Uchida J, Kato K, Kukita Y, Kumagai T, Nishino K, Daga H, et al. Diagnostic Accuracy of Noninvasive Genotyping of EGFR in Lung Cancer Patients by Deep Sequencing of Plasma Cell-Free DNA. *Clin Chem.* 2015;61(9):1191-6.

112. Paweletz CP, Sacher AG, Raymond CK, Alden RS, O'Connell A, Mach SL, et al. Bias-Corrected Targeted Next-Generation Sequencing for Rapid, Multiplexed Detection of Actionable Alterations in Cell-Free DNA from Advanced Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2016;22(4):915-22.
113. Pascual J, Attard G, Bidard FC, Curigliano G, De Mattos-Arruda L, Diehn M, et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 2022;33(8):750-68.
114. Chi KN, Barnicle A, Sibilla C, Lai Z, Corcoran C, Barrett JC, et al. Detection of BRCA1, BRCA2, and ATM Alterations in Matched Tumor Tissue and Circulating Tumor DNA in Patients with Prostate Cancer Screened in PROfound. *Clin Cancer Res.* 2023;29(1):81-91.
115. Reckamp KL, Melnikova VO, Karlovich C, Sequist LV, Camidge DR, Wakelee H, et al. A Highly Sensitive and Quantitative Test Platform for Detection of NSCLC EGFR Mutations in Urine and Plasma. *J Thorac Oncol.* 2016;11(10):1690-700.
116. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med.* 2015;21(7):795-801.
117. Fernandez-Cuesta L, Perdomo S, Avogbe PH, Leblay N, Delhomme TM, Gaborieau V, et al. Identification of Circulating Tumor DNA for the Early Detection of Small-cell Lung Cancer. *EBioMedicine.* 2016;10:117-23.
118. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6(224):224ra24.
119. Tsuboi M, Herbst RS, John T, Kato T, Majem M, Grohé C, et al. Overall Survival with Osimertinib in Resected EGFR-Mutated NSCLC. *N Engl J Med.* 2023;389(2):137-47.

120. Luo J, Shen L, Zheng D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2014;4:6269.
121. Cristiano S, Leal A, Phallen J, Fiksel J, Adleff V, Bruhm DC, et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature.* 2019;570(7761):385-9.
122. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov.* 2021;11(4):858-73.
123. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science.* 2018;359(6378):926-30.
124. Jamshidi A, Liu MC, Klein EA, Venn O, Hubbell E, Beausang JF, et al. Evaluation of cell-free DNA approaches for multi-cancer early detection. *Cancer Cell.* 2022;40(12):1537-49.e12.
125. Kulasingam V, Diamandis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008;5(10):588-99.
126. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477-87.
127. Chan HT, Nagayama S, Chin YM, Otaki M, Hayashi R, Kiyotani K, et al. Clinical significance of clonal hematopoiesis in the interpretation of blood liquid biopsy. *Mol Oncol.* 2020;14(8):1719-30.
128. Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, Swanton C, Seiden MV. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Ann Oncol.* 2020;31(6):745-59.

129. Lennon AM, Buchanan AH, Kinde I, Warren A, Honushefsky A, Cohain AT, et al. Feasibility of blood testing combined with PET-CT to screen for cancer and guide intervention. *Science*. 2020;369(6499).
130. Lamb YN, Dhillon S. Epi proColon(®) 2.0 CE: A Blood-Based Screening Test for Colorectal Cancer. *Mol Diagn Ther*. 2017;21(2):225-32.
131. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14(9):985-90.
132. Mittal A, Molto Valiente C, Tamimi F, Di Iorio M, Al-Showbaki L, Cescon DW, et al. Utility of ctDNA in predicting relapse in solid tumors after curative therapy: a meta-analysis. *JNCI Cancer Spectr*. 2023;7(4).
133. Reichert ZR, Morgan TM, Li G, Castellanos E, Snow T, Dall'Olio FG, et al. Prognostic value of plasma circulating tumor DNA fraction across four common cancer types: a real-world outcomes study. *Ann Oncol*. 2023;34(1):111-20.
134. Annala M, Vandekerkhove G, Khalaf D, Taavitsainen S, Beja K, Warner EW, et al. Circulating Tumor DNA Genomics Correlate with Resistance to Abiraterone and Enzalutamide in Prostate Cancer. *Cancer Discov*. 2018;8(4):444-57.
135. Geertsen L, Koldby KM, Thomassen M, Kruse T, Lund L. Circulating Tumor DNA in Patients with Renal Cell Carcinoma. A Systematic Review of the Literature. *Eur Urol Open Sci*. 2022;37:27-35.
136. Madsen AT, Hojbjerg JA, Sorensen BS, Winther-Larsen A. Day-to-day and within-day biological variation of cell-free DNA. *EBioMedicine*. 2019;49:284-90.
137. Henriksen TV, Reinert T, Christensen E, Sethi H, Birkenkamp-Demtröder K, Gögenur M, et al. The effect of surgical trauma on circulating free DNA levels in cancer patients-implications for studies of circulating tumor DNA. *Mol Oncol*. 2020;14(8):1670-9.

138. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(13):1199-209.
139. Jakobsen AKM, Spindler KG. ctDNA-Response evaluation criteria in solid tumors - a new measure in medical oncology. *Eur J Cancer.* 2023;180:180-3.
140. Thompson JC, Scholes DG, Carpenter EL, Aggarwal C. Molecular response assessment using circulating tumor DNA (ctDNA) in advanced solid tumors. *Br J Cancer.* 2023;129(12):1893-902.
141. Sanz-Garcia E, Zhao E, Bratman SV, Siu LL. Monitoring and adapting cancer treatment using circulating tumor DNA kinetics: Current research, opportunities, and challenges. *Sci Adv.* 2022;8(4):eabi8618.
142. Stadler JC, Belloum Y, Deitert B, Sementsov M, Heidrich I, Gebhardt C, et al. Current and Future Clinical Applications of ctDNA in Immuno-Oncology. *Cancer Res.* 2022;82(3):349-58.
143. Bratman SV, Yang SYC, Iafolla MAJ, Liu Z, Hansen AR, Bedard PL, et al. Personalized circulating tumor DNA analysis as a predictive biomarker in solid tumor patients treated with pembrolizumab. *Nat Cancer.* 2020;1(9):873-81.
144. Assaf ZJF, Zou W, Fine AD, Socinski MA, Young A, Lipson D, et al. A longitudinal circulating tumor DNA-based model associated with survival in metastatic non-small-cell lung cancer. *Nat Med.* 2023;29(4):859-68.
145. Váraljai R, Wistuba-Hamprecht K, Seremet T, Diaz JMS, Nsengimana J, Sucker A, et al. Application of Circulating Cell-Free Tumor DNA Profiles for Therapeutic Monitoring and Outcome Prediction in Genetically Heterogeneous Metastatic Melanoma. *JCO Precis Oncol.* 2020;3.
146. Jakobsen A, Andersen RF, Hansen TF, Jensen LH, Faaborg L, Steffensen KD, et al. Early ctDNA response to chemotherapy. A potential surrogate marker for overall survival. *Eur J Cancer.* 2021;149:128-33.

147. Shohdy KS, Villamar DM, Cao Y, Trieu J, Price KS, Nagy R, et al. Serial ctDNA analysis predicts clinical progression in patients with advanced urothelial carcinoma. *Br J Cancer*. 2022;126(3):430-9.
148. Raja R, Kuziora M, Brohawn PZ, Higgs BW, Gupta A, Dennis PA, et al. Early Reduction in ctDNA Predicts Survival in Patients with Lung and Bladder Cancer Treated with Durvalumab. *Clin Cancer Res*. 2018;24(24):6212-22.
149. Tolmeijer S, Boerrigter E, Sumiyoshi T, Ng S, Kwan E, Annala M, et al. On-treatment plasma ctDNA fraction and treatment outcomes in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40:5051-
.
150. Jayaram A, Wingate A, Wetterskog D, Wheeler G, Sternberg CN, Jones R, et al. Plasma tumor gene conversions after one cycle abiraterone acetate for metastatic castration-resistant prostate cancer: a biomarker analysis of a multicenter international trial. *Ann Oncol*. 2021;32(6):726-35.
151. Kok PS, Lee K, Lord S, John T, Marschner I, Wu YL, et al. Incorporating circulating tumor DNA detection to radiographic assessment for treatment response in advanced EGFR-mutant lung cancer. *Lung Cancer*. 2022;163:14-8.
152. Vega DM, Nishimura KK, Zariffa N, Thompson JC, Hoering A, Cilento V, et al. Changes in Circulating Tumor DNA Reflect Clinical Benefit Across Multiple Studies of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Immune Checkpoint Inhibitors. *JCO Precis Oncol*. 2022;6:e2100372.
153. Goldberg SB, Narayan A, Kole AJ, Decker RH, Teysir J, Carriero NJ, et al. Early Assessment of Lung Cancer Immunotherapy Response via Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res*. 2018;24(8):1872-80.
154. Anagnostou V, Forde PM, White JR, Niknafs N, Hruban C, Naidoo J, et al. Dynamics of Tumor and Immune Responses during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*. 2019;79(6):1214-25.

155. Anagnostou V, Ho C, Nicholas G, Juergens RA, Sacher A, Fung AS, et al. ctDNA response after pembrolizumab in non-small cell lung cancer: phase 2 adaptive trial results. *Nat Med.* 2023;29(10):2559-69.
156. Lee JH, Long GV, Menzies AM, Lo S, Guminski A, Whitbourne K, et al. Association Between Circulating Tumor DNA and Pseudoprogression in Patients With Metastatic Melanoma Treated With Anti-Programmed Cell Death 1 Antibodies. *JAMA Oncol.* 2018;4(5):717-21.
157. Gouda MA, Janku F, Wahida A, Buschhorn L, Schneeweiss A, Abdel Karim N, et al. Liquid Biopsy Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (LB-RECIST). *Ann Oncol.* 2024;35(3):267-75.
158. Weber S, Spiegl B, Perakis SO, Ulz CM, Abuja PM, Kashofer K, et al. Technical Evaluation of Commercial Mutation Analysis Platforms and Reference Materials for Liquid Biopsy Profiling. *Cancers (Basel).* 2020;12(6).
159. Connors D, Allen J, Alvarez JD, Boyle J, Cristofanilli M, Hiller C, et al. International liquid biopsy standardization alliance white paper. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020;156:103112.
160. Lampignano R, Neumann MHD, Weber S, Klotten V, Herdean A, Voss T, et al. Multicenter Evaluation of Circulating Cell-Free DNA Extraction and Downstream Analyses for the Development of Standardized (Pre)analytical Work Flows. *Clin Chem.* 2020;66(1):149-60.
161. Stires H, Zariffa N, Eisele M, Goren E, Espenschied CR, Guha M, et al. Changes in ctDNA levels as an early indicator of outcomes in advanced NSCLC treated with TKI: Initial findings from a retrospective aggregate analysis of 8 clinical trials. *Journal of Clinical Oncology.* 2023;41(16_suppl):3030-.
162. O'Dwyer PJ, Gray RJ, Flaherty KT, Chen AP, Li S, Wang V, et al. The NCI-MATCH trial: lessons for precision oncology. *Nat Med.* 2023;29(6):1349-57.

163. Eggermont AMM, Apolone G, Baumann M, Caldas C, Celis JE, de Lorenzo F, et al. Cancer Core Europe: A translational research infrastructure for a European mission on cancer. *Mol Oncol*. 2019;13(3):521-7.
164. Tamborero D, Dienstmann R, Rachid MH, Boekel J, Lopez-Fernandez A, Jonsson M, et al. The Molecular Tumor Board Portal supports clinical decisions and automated reporting for precision oncology. *Nat Cancer*. 2022;3(2):251-61.
165. Brana I, Massard C, Baird R, Opdam F, Schlenk R, Petris L, et al. Basket of baskets (BoB): A modular, open label, phase II, multicenter study to evaluate targeted agents in molecularly selected populations with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37:TPS3151-TPS.
166. Baumann M, Celis J, Ringborg U, Heitor M, Berns A, Albrecht T, et al. Engaging European society at the forefront of cancer research and care: How discussions at the 5(th) Gago Conference on European Science policy led to the Heidelberg Manifesto. *Mol Oncol*. 2023;17(6):925-45.
167. Huebner A, Black JRM, Sarno F, Pazo R, Juez I, Medina L, et al. ACT-Discover: identifying karyotype heterogeneity in pancreatic cancer evolution using ctDNA. *Genome Med*. 2023;15(1):27.
168. Elez E, Ros J, Fernández J, Villacampa G, Moreno-Cárdenas AB, Arenillas C, et al. RNF43 mutations predict response to anti-BRAF/EGFR combinatory therapies in BRAF(V600E) metastatic colorectal cancer. *Nat Med*. 2022;28(10):2162-70.
169. Earl J, Calabuig-Fariñas S, Sarasquete ME, Muínelo Romay L, Lopez-Tarruella S, Bellosillo Paricio B, et al. A Standardized Liquid Biopsy Preanalytical Protocol for Downstream Circulating-Free DNA Applications. *J Vis Exp*. 2022(187).
170. Hastings RK, Openshaw MR, Vazquez M, Moreno-Cardenas AB, Fernandez-Garcia D, Martinson L, et al. Longitudinal whole-exome sequencing

of cell-free DNA for tracking the co-evolutionary tumor and immune evasion dynamics: longitudinal data from a single patient. *Ann Oncol.* 2021;32(5):681-4.

171. Adalsteinsson VA, Ha G, Freeman SS, Choudhury AD, Stover DG, Parsons HA, et al. Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors. *Nat Commun.* 2017;8(1):1324.

172. BITTENCOURT. SA, Andrews S, Bittencourt A. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. *Babraham Bioinformatics.* 2010.

173. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. 2011. 2011;17(1):3.

174. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-60.

175. Toolkit P. GitHub Repository: Broad Institute; 2019 [Available from: <https://cyan4973.github.io/xxHash/>].

176. Xie T, G DA, Lamb JR, Martin E, Wang K, Tejpar S, et al. A comprehensive characterization of genome-wide copy number aberrations in colorectal cancer reveals novel oncogenes and patterns of alterations. *PLoS One.* 2012;7(7):e42001.

177. Postel-Vinay S, Aspeslagh S, Lanoy E, Robert C, Soria JC, Marabelle A. Challenges of phase 1 clinical trials evaluating immune checkpoint-targeted antibodies. *Ann Oncol.* 2016;27(2):214-24.

178. Jardim DL, Hess KR, Lorusso P, Kurzrock R, Hong DS. Predictive value of phase I trials for safety in later trials and final approved dose: analysis of 61 approved cancer drugs. *Clin Cancer Res.* 2014;20(2):281-8.

179. Zhang SX, Fergusson D, Kimmelman J. Proportion of Patients in Phase I Oncology Trials Receiving Treatments That Are Ultimately Approved. *J Natl Cancer Inst.* 2020;112(9):886-92.

180. Chau NG, Florescu A, Chan KK, Wang L, Chen EX, Bedard P, et al. Early mortality and overall survival in oncology phase I trial participants: can we improve patient selection? *BMC Cancer*. 2011;11:426.
181. Loh J, Wu J, Chieng J, Chan A, Yong WP, Sundar R, et al. Clinical outcome and prognostic factors for Asian patients in Phase I clinical trials. *Br J Cancer*. 2023;128(8):1514-20.
182. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, Diehn M, Hurley P, Lazar AJ, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol*. 2018;36(16):1631-41.
183. Godsey JH, Silvestro A, Barrett JC, Bramlett K, Chudova D, Deras I, et al. Generic Protocols for the Analytical Validation of Next-Generation Sequencing-Based ctDNA Assays: A Joint Consensus Recommendation of the BloodPAC's Analytical Variables Working Group. *Clin Chem*. 2020;66(9):1156-66.
184. Heitzer E, Ulz P, Belic J, Gutsch S, Quehenberger F, Fischereeder K, et al. Tumor-associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. *Genome Med*. 2013;5(4):30.
185. Allsopp RC, Page K, Ambasager B, Wadsley MK, Acheampong E, Ntereke TP, et al. A Rapid, Shallow Whole Genome Sequencing Workflow Applicable to Limiting Amounts of Cell-Free DNA. *Clin Chem*. 2023;69(5):510-8.
186. Hallermayr A, Wohlfrom T, Steinke-Lange V, Benet-Pagès A, Scharf F, Heitzer E, et al. Somatic copy number alteration and fragmentation analysis in circulating tumor DNA for cancer screening and treatment monitoring in colorectal cancer patients. *J Hematol Oncol*. 2022;15(1):125.
187. Magbanua MJM, Swigart LB, Wu HT, Hirst GL, Yau C, Wolf DM, et al. Circulating tumor DNA in neoadjuvant-treated breast cancer reflects response and survival. *Ann Oncol*. 2021;32(2):229-39.

188. Powles T, Assaf ZJ, Davarpanah N, Banchereau R, Szabados BE, Yuen KC, et al. ctDNA guiding adjuvant immunotherapy in urothelial carcinoma. *Nature*. 2021;595(7867):432-7.
189. Cousin S, Belcaid L, Trin K, Bayle A, Alame M, Rouleau E, et al. Tumor fraction to improve patient selection for oncology early phase clinical trials: Analysis of two precision medicine studies. *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41:3005-.
190. Woodhouse R, Li M, Hughes J, Delfosse D, Skoletsy J, Ma P, et al. Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-Gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin. *PLoS One*. 2020;15(9):e0237802.
191. Lam VK, Zhang J, Wu CC, Tran HT, Li L, Diao L, et al. Genotype-Specific Differences in Circulating Tumor DNA Levels in Advanced NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2021;16(4):601-9.
192. Dercle L, Ammari S, Roblin E, Bigorgne A, Champiat S, Taihi L, et al. High serum LDH and liver metastases are the dominant predictors of primary cancer resistance to anti-PD(L)1 immunotherapy. *Eur J Cancer*. 2022;177:80-93.
193. Herberts C, Wyatt AW. Technical and biological constraints on ctDNA-based genotyping. *Trends Cancer*. 2021;7(11):995-1009.
194. Esfahani MS, Hamilton EG, Mehrmohamadi M, Nabet BY, Alig SK, King DA, et al. Inferring gene expression from cell-free DNA fragmentation profiles. *Nat Biotechnol*. 2022;40(4):585-97.
195. Doebley AL, Ko M, Liao H, Cruikshank AE, Santos K, Kikawa C, et al. A framework for clinical cancer subtyping from nucleosome profiling of cell-free DNA. *Nat Commun*. 2022;13(1):7475.

196. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*. 2016;164(1-2):57-68.

197. Stanley KE, Jatsenko T, Tuveri S, Sudhakaran D, Lannoo L, Van Calsteren K, et al. Cell type signatures in cell-free DNA fragmentation profiles reveal disease biology. *Nat Commun*. 2024;15(1):2220.

10. Anexos

10.1. Anexo 1. Aprobación de CEIm HUVH del proyecto 360 RIO



INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS Y COMISIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON

Sra. Mireia Navarro Sebastián, Secretaria 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 606 el pasado 19/01/2024 y evaluó la enmienda relevante 7, del proyecto de investigación PR(AG)252/2016, titulado "360º RESISTANCE INMUNO-ONCOLOGIA: Aplicación de un modelo de investigación traslacional para estudiar predictores de respuesta/toxicidad, y mecanismos de resistencia en pacientes tratados con inmunoterapia" que tiene como investigador principal a la Dra. ELENA GARRALDA CABANAS del Servicio de Oncología de nuestro Centro.

Versión de documentos:

HIP/CI	versión 4.1 del 05.01.2024
--------	----------------------------

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

10.2. Anexo 1. Hoja actual del consentimiento informado del proyecto

360 RIO

HOJA INFORMATIVA PARA EL ESTUDIO

"360° RESISTANCE: Aplicación de un modelo de investigación traslacional para estudiar predictores de respuesta/toxicidad, y mecanismos de resistencia en pacientes tratados con inmunoterapia"

Proyecto de investigación titulado: " Aplicación de un modelo de investigación traslacional para estudiar predictores de respuesta/toxicidad, y mecanismos de resistencia en pacientes tratados con inmunoterapia "

Investigador principal: Elena Garralda

Sub-investigadores: Guzmán Alonso, Irene Braña, Vladimir Galvao, Alberto Hernando, Julia Lostes, Arjun Oberoi, Katerine Rojas, Omar Saavedra, Marta Sanz, María Vieito, Oriol Mirallas y Belen Ortega.

(ACTUALIZACION DEL EQUIPO)

Sub-investigador de contacto: Marta Sanz (msanz@vhio.net) **(ENFERMERA DE PROYECTOS DE INVESTIGACION Y PERSONA DE CONTACTO EN CASO DE NECESIDAD)**

Servicio: Oncología Médica.

Objetivos:

Le solicitamos su participación en este proyecto cuya finalidad es la investigación de las alteraciones del cáncer y de su sistema inmune, con el objetivo de estudiar su impacto en la respuesta/resistencia a diferentes tratamientos oncológicos y para profundizar en los diferentes tipos de efectos secundarios que se ven con estos tratamientos.

Justificación:

Usted va a ser tratado con un fármaco que actúa modulando directa o indirectamente su sistema inmune, con el objetivo de que sean sus propias defensas las que ataquen al tumor. Su médico cree que este tratamiento puede ser adecuado para usted porque usted tiene un cáncer avanzado con posibilidades de beneficiarse de dicho tratamiento.

Le planteamos la posibilidad de participar en este estudio porque aunque consideramos que usted se puede beneficiar del tratamiento seleccionado, no todos los pacientes con su tumor responden al tratamiento. Mediante este proyecto quisiéramos estudiar los mecanismos preexistentes de resistencia al tratamiento (resistencia primaria) o su aparición durante el tratamiento (resistencia secundaria). Así mismo, su médico le habrá explicado los posibles efectos secundarios del tratamiento. Con este estudio, queremos entender por qué algunos pacientes tienen efectos secundarios, y otros no los tienen, además de intentar profundizar en los mecanismos que subyacen a estos efectos secundarios. Otro objetivo de este estudio es averiguar la influencia de la heterogeneidad del tumor en el funcionamiento del tratamiento que usted va a recibir.

Los investigadores de Vall d'Hebrón consideran que este estudio que se le propone es de gran importancia para avanzar en el campo de la inmunoterapia. Históricamente, la investigación en pacientes individuales o de muy pequeños grupos ha ayudado a iluminar la ciencia y los avances en la medicina clínica. Algunos ejemplos de investigaciones realizadas en pacientes individuales incluyen la vacuna contra la viruela, el Proyecto Humano Visible y el Proyecto del Genoma Humano.

En este proyecto proponemos desarrollar un programa en el que se estudiaría lo anteriormente mencionado usando biopsias de su tumor, xenoinjertos derivados de la muestra tumoral o muestras de sangre para el análisis de células y diferentes marcadores (como por ejemplo marcadores de la inflamación) así como el ADN tumoral presente en sangre. Tanto del ADN tumoral extraído de la sangre como de tejidos tumorales (incluyendo, si disponibles, muestras de autopsia), se realizarán técnicas de secuenciación del ADN de última generación, capaces de analizar un gran número de genes. Por este motivo, le pedimos su consentimiento para que se pueda recoger muestras de tumor, sangre, otros fluidos

biológicos o imágenes radiológicas durante el tratamiento con inmunoterapia, y si en el caso de una eventual defunción, que a la vez que se hace el estudio autopsico rutinario, se pueda tomar una muestra de las lesiones tumorales para su posterior estudio.

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, así como la predicción de toxicidad, podría beneficiar en la selección de un tratamiento entre varios disponibles y 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:

Se realizarán biopsias en aquellos pacientes en que no hay riesgo significativo y en que los parámetros clínicos y de laboratorio del paciente han sido evaluados por el médico de referencia. Además, dicha biopsia debe ser aprobada por el servicio de Radiología (cuando se realiza guiada por tomografías o ecografías) o Cirugía. Una biopsia consiste en la recogida de células tumorales utilizando un equipo similar a una aguja con una vía o canal. Se realiza con anestesia local.

- 1) Se realizará una biopsia de una lesión metastásica accesible antes de empezar el tratamiento con inmunoterapia y/o de posteriores metástasis en aquellos pacientes tratados en la Unidad de Investigación y Terapia molecular (UITM) del Vall Hebrón Institut d'Oncologia (VHIO).
- 2) Se recogerá una muestra de sangre extra (volumen máximo de 50ml) y/o otros fluidos biológicos para analizar las células del sistema inmune, las células tumorales, diferentes marcadores de la inflamación, así como ADN tumoral presente en sangre. Estas muestras se tomarán antes de iniciar el tratamiento y a lo largo de la recepción del mismo.
- 3) Se realizará una biopsia tumoral en el momento de la progresión en aquellos pacientes tratados con inmunoterapia; de este modo se podrá estudiar la resistencia a fármacos.
- 4) Se realizará una biopsia tumoral durante el tratamiento, en casos particulares, con el objetivo de caracterizar el tumor y el sistema inmune a su alrededor en el momento de la respuesta.
- 5) En el caso de presentar toxicidad al tratamiento que se le esté dando, se le realizará una biopsia del órgano afecto, si procede, con el objetivo de estudiar mejor estas toxicidades y prevenirlas.
- 6) En el eventual caso de defunción, se realizará una autopsia en la que se obtendrá una muestra representativa de diferentes lesiones tumorales. Su médico recomendará al patólogo cuales fueron las lesiones tumorales que son más representativas en su caso.

Uso de las muestras:

Parte de la muestra se usará para estudios genéticos del ADN del tumor. Para interpretar las mutaciones del tumor, a veces se precisa un control interno del/de la paciente para complementar el análisis. Por ello, puede que le solicitemos una muestra de tejido normal como la sangre o la saliva. En ella se realizará la misma técnica de secuenciación en profundidad. Ello conlleva la adquisición de información que puede tener implicaciones relevantes para su salud y la de su familia (ver capítulo Implicaciones de la información obtenida en el estudio). El resto de la muestra obtenida será implantada en ratones (xenoinjertos), cultivadas con el objetivo de obtener suficiente tumor para realización de estudios posteriores, o archivadas en parafina.

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 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.

Molestias y posibles riesgos:

La realización de la biopsia podrá causarle molestias en la zona de la punción. Este dolor puede ser aliviado con medicamentos específicos (analgésicos). 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. Las muestras de sangre pueden causarle hematomas, dolor o infección en la zona de la extracción. Algunos pacientes pueden presentar mareos mientras le extraen la sangre, pero no es frecuente.

Lugar de realización del análisis:

Las muestras de tumor y de sangre serán conservadas en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron, y en los laboratorios del VHIO y del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR). El análisis genómico se realizará en el laboratorio de Genómica del Cáncer (VHIO), así como en laboratorios externos colaboradores de VHIO, como por ejemplo Foundation Medicine, Novartis Next Generations Diagnostics (NGDx) lab, Cambridge, EEUU).

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 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 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.

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. **JUSTIFICACION PARA LA MODIFICACION:** *En el apartado de protección de datos de carácter personal se añade información al paciente de las actividades de tratamiento de datos previstas en el proyecto así como de las medidas organizativas y técnicas que aplicarán los responsables de tratamiento de acuerdo con la legislación vigente. Adicionalmente se incorporan cuadros de selección específicos para que el paciente pueda expresar fehacientemente su consentimiento expreso al tratamiento de datos personales recogidos en la hoja de consentimiento informado.*

Implicaciones de la información obtenida en el estudio:

Usted no percibirá ninguna recompensa económica o de otro tipo por las muestras y datos proporcionados y éstas no tendrán valor comercial.

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, y es decisión personal suya informar a sus familiares, en cuyo caso podrían acudir a una consulta especializada en cáncer familiar para asesoramiento; En caso de que prefiera no ser informado, su decisión se respetará.

Ha de tener en cuenta que el análisis que se realizará será sobre la muestra tumoral, que suele tener alteraciones genéticas no heredables. Por tanto, las posibilidades de que el análisis de sus muestras biológicas se obtenga información relevante para su familia son muy bajas.

Uso futuro de las muestras:

Además le pedimos su consentimiento para que autorice al investigador a almacenar su muestra para realizar otros estudios relacionados con el cáncer y su sistema inmune. Estas muestras se almacenarán hasta 15 años. 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.

Hoja informativa para el estudio: "Aplicación de un modelo de investigación traslacional para estudiar predictores de respuesta/toxicidad, y mecanismos de resistencia en pacientes tratados con inmunoterapia."

La conservación de estas muestras se realizará como una colección individualizada con nº de registro C0003435 a nombre del Dr. Josep Tabernero Caturla. Sus muestras sólo se utilizarán en proyectos de investigación aprobados por el Comité de Ética de la Investigación del Hospital. En este caso, también aplicarían lo referido en el apartado "Implicaciones de la información obtenida en el estudio" respecto a su derecho a ser informado de los datos genéticos que se obtengan en el curso del estudio.

En el caso de que usted lo solicite, se le podrá facilitar información acerca de los estudios de investigación en los que hayan utilizado las muestras.

Si cambia de opinión después de dar las muestras biológicas para el estudio de investigación biomédica, puede pedir que se destruyan las muestras; para ello puede contactar con la responsable del estudio (Dra. Elena Garralda. Teléfono: 93.274.60.00, extensión 4916).

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 la Dra. Elena Garralda. (93.274.60.00, extensión 4916)

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL USO DE MUESTRAS DE TEJIDO EN EL ESTUDIO:
"Aplicación de un modelo de investigación traslacional para estudiar predictores de
respuesta/toxicidad, y mecanismos de resistencia en pacientes tratados con inmunoterapia "**

Yo, _____, he leído la hoja de información que se me ha entregado y he entendido los objetivos del estudio del tumor y de mi sistema inmune, 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 que pueda realizarse el estudio sobre posibles alteraciones moleculares y de mi sistema inmune en relación con el cáncer, en muestras de tejido y de sangre.

DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que se puedan aprovechar para el presente estudio las biopsias que se realizan durante los procedimientos asistenciales o que se realizarán en el contexto de un ensayo clínico.

JUSTIFICACION PARA LA MODIFICACION: *Las biopsias en curso de tratamiento dentro del proyecto 360^o RESISTANCE se podrán plantear tanto en situaciones en las que exista una confirmación radiológica de respuesta al tratamiento de inmunoterapia como si la enfermedad se mantiene estable o con progresión. Actualmente, se desconoce el momento óptimo para evaluar los cambios farmacodinámicos en el tumor como consecuencia de los efectos de la inmunoterapia. La cuantificación de los mismos y su comparación dependiendo de la respuesta oncológica, permitira establecer su asociación con el pronóstico del cáncer y evaluar su significado predictivo.*

DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda realizarse una biopsia - en el caso de presentar toxicidad a tratamientos con inmunoterapia – sobre el órgano afecto, si procede.

DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que mi muestra tumoral se almacene para utilizarla en otros estudios sobre alteraciones moleculares o del sistema inmune en relación con el cáncer. Mi tejido y el ADN de la muestra tumoral se identificarán con un número codificado 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 que no se encuentren en el en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que mi muestra tumoral se almacene para utilizarla en otros estudios de investigación sobre alteraciones moleculares 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.

JUSTIFICACION PARA LA MODIFICACION : ACTUALIZACION POR LOPD

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.

JUSTIFICACION PARA LA MODIFICACION : ACTUALIZACION POR LOPD

DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que en el eventual caso de defunción, se realizará una autopsia en la que se pueda obtener una muestra representativa de diferentes lesiones tumorales.

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.

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 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.

DOY NO DOY mi consentimiento a **TODAS LAS OPCIONES** expuestas anteriormente

Número de contacto:

Firmas

Paciente

Fecha

Familiar o representante legal o Testigo

Fecha

Investigador

Fecha

10.3. Anexo 2. Aprobación del CEIm HUVH del proyecto Immunomics



Pg. Vall d'Hebron, 119-129
08035 Barcelona
Tel. 93 489 38 91
Fax 93 489 41 80
ceic@vhir.org

ID-RTF065

INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS Y COMISIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON

Dra. Inmaculada Fuentes Camps, Secretaria en funciones del COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS del Hospital Universitari Vall d'Hebron,

CERTIFICA

Que el Comité Ético 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 349 el pasado 27/07/2018 y evaluó el proyecto de investigación PR(AG)321/2018, presentado con fecha 01/07/2018, titulado "*Inmunomics: desarrollo de una plataforma genómica para la predicción de respuesta a inmunoterapia en pacientes con Cáncer*" que tiene como investigador principal a la Dra. Elena Garralda Cabanas del Servicio de Oncología de nuestro Centro.

Versión de documentos:

- Memoria v.1 09/julio/2018
- Resumen del Proyecto v.1 09/julio/2018
- Solicitud informe CEIC v.1 09/julio/2018

El resultado de la evaluación fue el siguiente:

DICTAMEN FAVORABLE

**10.4. Anexo 3. Circuito de obtención de muestras de plasma del
proyecto 360 RIO**

Circuito VHIO de obtención de muestras para el PROYECTO 360RIO RESISTANCE en pacientes tratados con inmunoterapia.

Introducción

En el proyecto 360RIO se incluyen pacientes que reciben tratamientos con inmunoterapia y se recogen muestras de sangre para 2 subproyectos:

- **TILS**
- **IMMUNOMICS**

Todos los pacientes que se traten con inmunoterapia comparten el mismo ID para los dos subproyectos. Asignaremos ID consecutivo por fecha de inclusión.

- **Muestras TILS: Se extrae sangre pre inicio de tratamiento, como muestra basal y hasta el ciclo 10. Después,(SIEMPRE PreTratamiento), a partir del décimo ciclo, sólo se extraerá muestra en los días de tratamiento, que coincida con TAC, hasta EOT.**
Se sacan 3 tubos ACD-A de 8.5ml (tapón amarillo).
- **Muestras INM: 2 tubos streck 10 ml, se obtiene cada vez que el paciente venga a iniciar ciclo de tratamiento (cada 2, 3 o 4 semanas), muestra basal y EOT.**

Circuito y Procedimientos

- Tras explicar de manera verbal y escrita, se firma la Hoja informativa para el estudio “360RIO: Aplicación de un modelo de investigación traslacional para estudiar predictores de respuesta/toxicidad y mecanismos de resistencia en pacientes tratados con inmunoterapia”

- En el Hospital de Día (HD) *UITM*, se extraerá una muestra extra de sangre coincidiendo con una venopunción programada del/la paciente de 35.5 ml máximo (1-2tubos streck con 10ml y 3 Pbmcs de 8.5ml cada uno).
- Codificar cada una de las alícuotas con información identificativa (información recogida en registro excel muestras de serotecas guardadas en *UITM*, responsable Alicia López), con los datos:
 - **Nº identificativo del paciente previamente asignado.**
 - **Nº ensayos clínicos en UITM, siendo a el primero, b el segundo, c el tercero...**
 - **Timepoint de la extracción.**
 - **Fecha de extracción de la muestra.**
 - **Iniciales del paciente**
- La enfermera responsable de los proyectos de investigación deberá avisar a los laboratorios colaboradores para que a diario se recojan las muestras, que mientras tanto, permanecerán refrigeradas a 4 grados.
- Las alícuotas se procesarán y quedarán almacenadas en los laboratorios:

Tubo streck. - laboratorio de IMMUNOMICS
(Rodrigo Toledo)

Tubos Pbmcs. - Laboratorio TILS (Alena Gros)



Codificación y etiquetado

PROYECTO	INSTRUCCIONES 360RIO	TUBOS
TILS	<ul style="list-style-type: none"> • 3 tubos amarillos <u>PBMC's</u> 8.5ml. • Etiqueta: ID paciente + número de líneas (<u>a,b,c...</u>)+ PreCicloXD1 + Fecha + Iniciales • Ejemplo etiqueta: <div data-bbox="707 602 995 752" style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center; margin: 10px 0;"> 826b PreC10D1 JMMcL 10/04/2024 </div> 	
Inmunomics	<ul style="list-style-type: none"> • 1 o 2 tubos <u>streck</u> • Etiqueta: SE IDENTIFICARÁ CON DOS ETIQUETAS: <ol style="list-style-type: none"> 1.- ID paciente + número de líneas (<u>a,b,c...</u>)+ PreCicloXD1 + +Fecha + Iniciales 2.- P+ ID paciente+ número <u>de</u> <u>líneas</u>+ POST <u>nº</u>ciclo previo • Ejemplo etiqueta: <div data-bbox="783 880 1015 1120" style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center; margin: 10px 0;"> 826b PreC10D1 JMMcL 10/04/2024 <hr/> P826b POST 9 </div> 	

10.5. Anexo 4. Listado de ensayos clínicos fase 1 de inmunoterapia de los pacientes participantes del proyecto *Immunomics*

Código del ensayo	EudraCT	Título del ensayo	Número de pacientes
GCT1046-01	2018-003402-63	First-in-human, Open-label, Dose-escalation Trial With Expansion Cohorts to Evaluate Safety of GEN1046 in Subjects With Malignant Solid Tumors	28
204691	2016-000148-32	A Phase I Open Label Study of GSK3359609 Administered Alone and in Combination With Anticancer Agents in Subjects With Selected Advanced Solid Tumors	23
CN1R178X2201	2017-000241-49	A Phase 2, Multi-center, Open Label Study of N1R178 in Patients With Selected Advanced Solid Tumors and Non-Hodgkin Lymphoma	20
VH1017002	2017-005108-89	Basket of Baskets: A Modular, Open-label, Phase II, Multicentre Study To Evaluate Targeted Agents in Molecularly Selected Populations With Advanced Solid Tumours	14
VH10-PBF-999-01	2017-000601-21	Phase I/Ib Trial of Single Agent PBF-999 in Solid Tumour Advanced Cancer	13
20140318	2014-005386-67	A Phase 1b/2, Multicenter, Open-label, Basket Trial to Evaluate the Safety of Talimogene Laherparepvec Injected Into Liver Tumors Alone and in Combination With Systemic Pembrolizumab in Phase 1b and to Evaluate the Efficacy and Safety of Intratumoral Talimogene Laherparepvec in Combination With Systemic Pembrolizumab to Treat Subjects With Advanced Solid Tumors in Phase 2 (MASTERKEY-318)	11
INCB-01158-101	2017-002903-82	Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Escalating Oral Doses of the Arginase Inhibitor INCB001158 (Formerly Known as CB1158) as a Single Agent and in Combination With Immune Checkpoint Therapy in Patients With Advanced/Metastatic Solid Tumors	11
4280-001	2017-001464-38	A Phase 1 Trial of MK-4280 as Monotherapy and in Combination With Pembrolizumab With or Without Chemotherapy or Lenvatinib (E7080/MK-7902) in Subjects With Advanced Solid Tumors	11
BP41628	2019-004022-25	An Open-Label, Multicenter, Randomized, Dose-Escalation and Extension, Phase I/II Study to Evaluate Safety and Anti-Tumor Activity of RO7284755, A PD-1 Targeted IL-2 Variant (IL-2V) Immunocytokine, Alone or in Combination With Atezolizumab in Participants With Advanced and/or Metastatic Solid Tumors	10
SC103	2018-004334-15	A Multicenter Open-label Phase 1/1b Study to Evaluate the Safety and Preliminary Efficacy of SO-C101 as Monotherapy and in Combination With Pembrolizumab in Patients With Selected Advanced/Metastatic Solid Tumors	9
CPDR001X2102	2016-000654-35	Phase Ib, Open-label, Multi-center Study to Characterize the Safety, Tolerability and Pharmacodynamics (PD) of PDR001 in Combination With LCL161, Everolimus (RAD001) or Panobinostat (LBH589)	8
CTNO155B12101	2018-004771-12	A Phase Ib, Open-label, Multi-center Study to Characterize the Safety, Tolerability, and Preliminary Efficacy of TNO155 in Combination With Spartalizumab or Ribociclib in Selected Malignancies	8
CA224-020	2014-002605-38	A Phase I/2a Dose Escalation and Cohort Expansion Study of the Safety, Tolerability, and Efficacy of Anti-LAG-3 Monoclonal Antibody (BMS-986016) Administered Alone and in Combination With Anti-PD-1 Monoclonal Antibody (Nivolumab, BMS-936558) in Advanced Solid Tumors	7
204686	2017-003545-23	A Phase I, Open-Label Study of GSK1795091 Administered in Combination With Immunotherapies in Participants With Advanced Solid Tumors	7
NP41300	2019-000779-18	An Open Label, Multicenter, Dose Escalation, Phase 1 Study to Evaluate Safety/Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Preliminary Anti Tumor Activity of RO7247669, a PD1-LAG3 Bispecific Antibody, in Patients With Advanced and/or Metastatic Solid Tumors	7
AFM24-101	2019-003296-19	A Phase 1/2a Open Label, Multicenter Study to Assess the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Preliminary Efficacy of AFM24 in Patients With Advanced Solid Tumors	7
CA022-001	2017-000597-11	Phase 1/2a First-In-Human Study of BMS-986218 Monoclonal Antibody Alone and in Combination With Nivolumab in Advanced Solid Tumors	6
TCD14678	2018-001113-32	A Phase 1/1b First-in-human Dose Escalation and Expansion Study for the Evaluation of Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Anti-tumor Activity of SAR439459 Administered Intravenously as Monotherapy and in Combination With Cemiplimab in Adult Patients With Advanced Solid Tumors	5
CA209-358	2015-000230-29	Non-Comparative, Open-Label, Multiple Cohort, Phase 1/2 Study of Nivolumab Monotherapy and Nivolumab Combination Therapy in Subjects With Virus-Positive and Virus-Negative Solid Tumors	5

GO30103	2016-000944-33	A Phase Ia/Ib Open-Label, Dose-Escalation Study of the Safety and Pharmacokinetics of Tiragolumab as a Single Agent and in Combination With Atezolizumab and/or Other Anti-Cancer Therapies in Patients With Locally Advanced or Metastatic Tumors	4
WP41188	2019-002830-35	An Open-Label, Multicenter Phase 1 Study to Evaluate Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of RO7296682, A CD25-Targeting, T-Regulatory Cell Depleting Antibody in Participants With Advanced and/or Metastatic Solid Tumor	4
BP40087	2017-003961-83	Dose-Escalation Study of FAP-Targeted 4-1BBL Alone or in Combination With Atezolizumab in Patients With Advanced and/or Metastatic Solid Tumors Including Tumor-Specific Expansion Cohorts	4
SL01-DEL-101	2019-000446-36	Phase 1 Dose Escalation and Dose Expansion Study of an Agonist Redirected Checkpoint Fusion Protein, SL-279252 (PD1-Fc-OX40L), in Subjects With Advanced Solid Tumors or Lymphomas	4
CV-8102-008	2016-003429-41	Phase I Study of Intratumoral CV8102 in Patients With Advanced Melanoma, Squamous Cell Carcinoma of the Skin, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, or Adenoid Cystic Carcinoma	4
CLAG525X2101C	2015-000449-21	A Phase I/II, Open Label, Multicenter Study of the Safety and Efficacy of LAG525 Single Agent and in Combination With PDR001 Administered to Patients With Advanced Malignancies	4
CLHC165X2101	2017-001968-37	A Phase I/Ib, Open-label, Multi-center Dose-escalation and Dose-expansion Study of the Safety and Tolerability of Intra-tumorally Administered LHC165 Single Agent and in Combination With PDR001 in Patients With Advanced Malignancies	4
1426-0001	2019-001082-32	Phase I, First in Human Trial Evaluating BI 1387446 Alone and in Combination With Ezabemlimab (BI 754091) in Solid Tumors	3
GO39733	2017-001475-23	A Phase 1a/1b Open-Label, Dose-Escalation Study of the Safety and Pharmacokinetics of RO7198457 as a Single Agent and in Combination With Atezolizumab in Patients With Locally Advanced or Metastatic Tumors	3
BP41054	2018-003872-11	An Open-Label, Multicenter, Phase Ib Study To Evaluate Safety And Therapeutic Activity Of RO6874281, An Immunocytokine, Consisting Of Interleukin-2 Variant (IL-2v) Targeting Fibroblast Activation Protein-A (FAP), In Combination With Pembrolizumab (Anti-PD-1), In Participants With Advanced Or Metastatic Melanoma	3
V937-013	2020-001908-42	A Phase 1b/2 Clinical Study of Intratumoral Administration of V937 in Combination With Pembrolizumab (MK-3475) in Participants With Advanced/Metastatic Solid Tumors	3
1336-0011	2017-001378-41	An Open Label Phase Ib Dose Finding Study of BI 836880 in Combination With Ezabemlimab to Characterize Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Efficacy in Patients With Locally Advanced or Metastatic Non-squamous Non-Small Cell Lung Cancer and in Other Solid Tumors	2
CNIZ985B12101	2019-004069-42	A Phase I/Ib Study of Subcutaneous Recombinant Human NIZ985 ((hetIL-15) (IL-15/sIL-15Ra)) in Combination With Spartalizumab in Patients With Check Point Inhibitor (CPI) Relapsed Advanced Solid Tumors and Lymphoma	2
AM0010-301	2016-003858-33	Randomized Study of AM0010 in Combination With FOLFOX Compared to FOLFOX Alone as Second-line Tx in Pts With Metastatic Pancreatic Cancer That Has Progressed During or Following a First-Line Gemcitabine Containing Regimen	2
CADPT01A12101C	2018-002244-82	A Phase Ib, Multicenter, Open-label Dose Escalation and Expansion Platform Study of Select Immunotherapy Combinations in Adult Patients With Triple-negative Breast Cancer	2
BP29889	2015-003480-11	An Open-Label, Multicenter, Dose Escalation Phase Ib Study With Expansion Cohorts to Evaluate the Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Therapeutic Activity of RO7009789 (CD40 Agonistic Monoclonal Antibody) in Combination With Vanucizumab (Anti-Ang2 and Anti-VEGF Bi-Specific Monoclonal Antibody, Part I) or Bevacizumab (Anti-VEGF Monoclonal Antibody, Part II) in Patients With Metastatic Solid Tumors	2
ACT15377	2018-000390-67	A Phase 1/2 Open-label, Multi-center, Safety, Preliminary Efficacy and Pharmacokinetic (PK) Study of Isatuximab (SAR650984) in Combination With Atezolizumab or Isatuximab Alone in Patients With Advanced Malignancies	2
CLXH254X2101	2015-003421-33	A Phase I Dose Finding Study of Oral LXH254 in Adult Patients With Advanced Solid Tumors Harboring MAPK Pathway Alterations	2
ICO-VCN-H&N-2018	2018-001095-38	A Phase I Study to Evaluate the Safety, Tolerability, and Efficacy of VCN-01 in Combination With Durvalumab (MED14736) in Subjects With Recurrent/Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck	2

DEBIO 1143-106	2018-003546-16	A Dose-optimization, Exploratory Phase Ib/II Study to Assess Safety and Efficacy of the Second Mitochondrial-derived Activator of Caspases (SMAC) Mimetic Debio 1143, When Given in Combination With the Anti-PD-1 Antibody Nivolumab in Patients With Specific Solid Tumors Who Have Progressed During or Immediately After Anti-PD-1/PD-L1 Treatment	2
1463-0001	2021-000234-34	An Open Label, Phase I Dose-finding Study of BI 765179 as Monotherapy and in Combination With Pembrolizumab (BI 754091) in Patients With Advanced Solid Cancers	2
BP40092	2017-003834-10	A First-in-Human, Open-Label, Multicenter, Dose-Escalation Phase I Clinical Study of Single-Agent RO7172508 in Patients With Locally Advanced and/or Metastatic CEA-Positive Solid Tumors	1
8374-CL-0101	2018-001146-34	A Phase 1b Study of ASP8374, an Immune Checkpoint Inhibitor, as a Single Agent and in Combination With Pembrolizumab in Subjects With Advanced Solid Tumors	1
BP42595	2020-003164-82	An Open-Label, Multicenter, Phase Ib Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Preliminary Anti-Tumor Activity of RO7296682 in Combination With Atezolizumab in Participants With Advanced and/or Metastatic Solid Tumors	1
B9991040	2019-001358-24	A Phase 1b/2 Study to Evaluate Safety and Clinical Activity of Avelumab in Combination With Bempegaldesleukin(NKTR-214) With or Without Talazoparib or Enzalutamide in Participants With Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors	1
CGWN323X2101	2015-004206-42	A Phase I/Ib Open-label, Multi-center, Dose Escalation Study of GWN323 (Anti-GITR) as a Single Agent and in Combination With PDR001 (Anti-PD-1) in Patients With Advanced Solid Tumors and Lymphomas	1
D8510C00001	2020-005784-31	A Phase 1, Open-label, Dose-escalation and Expansion Study of MEDI1191 Administered Intratumorally as Monotherapy and in Combination With Durvalumab in Subjects With Advanced Solid Tumors	1
78306358STM1001	2021-001646-35	A Phase 1 Study of JNJ-78306358, a T Cell Redirecting Bispecific Antibody Targeting HLA-G for Advanced Stage Solid Tumors	1
D9950C00001	2019-004539-22	A Phase I First-in-Human Study to Evaluate the Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Efficacy of AZD8701 Administered Intravenously as Monotherapy and in Combination With Durvalumab (MEDI4736) in Participants With Advanced Solid Tumours.	1
CTL-002-001	2020-002103-19	A Phase 1/2, FIH, Two-part, Open-label Clinical Trial of Intravenous (IV) Administration of CTL-002 Given as Monotherapy and/or in Combination With an Anti-PD-1 Checkpoint Inhibitor in Subjects With Advanced-stage, Relapsed/Refractory Solid Tumors (The "GDFATHER"-Trial: GDF-15 Antibody-mediated Human Effector Cell Relocation).	1
CA209-848	2016-002898-35	A Randomized, Open-Label, Phase 2 Study of Nivolumab in Combination With Ipilimumab or Nivolumab Monotherapy in Participants With Advanced or Metastatic Solid Tumors of High Tumor Mutational Burden (TMB-H)	1
ICT01-101	2019-003847-31	A First-in-human, Two-part Clinical Study to Assess the Safety, Tolerability and Activity of IV Doses of ICT01 as Monotherapy and in Combination With a Checkpoint Inhibitor, in Patients With Advanced-stage, Relapsed/Refractory Cancer	1
CA209-9X8	2017-003662-27	An Open-Label Exploratory Phase 2/3 Study of Nivolumab With Standard of Care Therapy vs Standard of Care Therapy for First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer	1
20190136	2020-003937-40	A Phase 1, Multicenter, Open-label, Dose Exploration and Dose Expansion Study Evaluating the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Efficacy of AMG 994 Monotherapy and Combination of AMG 994 and AMG 404 in Subjects With Advanced Solid Tumors	1
FS222-19101	2020-003021-28	A Phase 1, Open-Label, First-in-Human Study to Evaluate the Safety and Anti-tumour Activity of FS222, a CD137/PD-L1 Bispecific Antibody, in Subjects With Advanced Malignancies	1
4010-01-001	2016-000320-26	A Phase 1 Dose Escalation and Cohort Expansion Study of TSR-042, an Anti-PD-1 Monoclonal Antibody, in Patients With Advanced Solid Tumors	1
GCT1044-01	2019-003998-26	First-in-human, Open-label, Dose-escalation Trial With Expansion Cohorts to Evaluate Safety of GEN1044 in Subjects With Malignant Solid Tumors	1
BP42169	2020-000793-18	An Open-Label, Multicenter, Phase 1 Study to Evaluate Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of RO7293583, A TYRP1-Targeting CD3 T-Cell Engager, in Participants With Metastatic Melanoma	1
BGB-A317/BGB-290	2017-003580-35	A Phase 1/1b, Open Label, Multiple Dose, Dose Escalation and Expansion Study to Investigate the Safety, Pharmacokinetics and Antitumor Activity of the Anti-PD-1 Monoclonal Antibody BGB-A317 in Combination With the PARP Inhibitor BGB-290 in Subjects With Advanced Solid Tumors	1

CP-MGD013-01	2018-003153-21	A Phase 1, First-in-Human, Open-Label, Dose Escalation Study of MGD013, A Bispecific DART® Protein Binding PD-1 and LAG-3 in Patients With Unresectable or Metastatic Neoplasms	1
BNT411-01	2019-003593-17	Phase 1/2a, First-in-human, Open-label, Dose-escalation Trial With Expansion Cohorts to Evaluate Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Preliminary Efficacy of BNT411 as a Monotherapy in Patients With Solid Tumors and in Combination With Atezolizumab, Carboplatin and Etoposide in Patients With Chemotherapy-naïve Extensive-stage Small Cell Lung Cancer (ES-SCLC)	1
ANV419-001	2020-004569-37	ANV419 First in Human Study Phase 1: Open-label, Dose Escalation Study of ANV419 as Single Agent and in Combination With Ipilimumab in Patients With Relapsed/Refractory Advanced Solid Tumors	1
BP29392	2014-002835-32	An Open-Label, Multicenter, Dose-Escalation Phase IB Study to Investigate the Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Therapeutic Activity of Selicrelumab (CD40 Agonist) in Combination With Atezolizumab (Anti PD-L1) in Patients With Locally Advanced and/or Metastatic Solid Tumors	1
CFAZ053X2101	2016-001470-15	A Phase I, Open-label, Multi-center Dose Escalation Study of FAZ053 as Single Agent and in Combination With PDR001 in Adult Patients With Advanced Malignancies	1