



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Medicina

**CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS
PAN-INHIBIDORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO E IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES
BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA MEDIANTE LA
UTILIZACIÓN DE XENOINJERTOS DERIVADOS DE PACIENTES CON
ALTERACIONES EN ESTA VÍA MOLECULAR**

Tesis doctoral para optar al grado de Doctor

Cinta Hierro Carbó

Directores de la tesis:

Jordi Rodón Ahnert

Violeta Serra Elizalde

Tutor de la tesis:

Francesc Bosch Albareda

Barcelona, 2020

“Y una vez que la tormenta termine, no recordarás cómo lo lograste, cómo sobreviviste.

Ni siquiera estarás seguro de si la tormenta ha terminado realmente.

Pero una cosa si es segura.

Cuando salgas de esa tormenta, no serás la misma persona que entró en ella”

Haruki Murakami

A Gara

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Josep Tabernero, por la confianza depositada en mí y por ofrecerme esta gran oportunidad en mi carrera.

Al Dr. Jordi Rodón y la Dra. Violeta Serra, ambos directores de esta tesis. Porque nunca dos mentores tan antagónicos tuvieron un efecto tan sinérgico, a ellos les debo haber sacado lo mejor de mí como investigadora. Echaré de menos nuestras teleconferencias en franjas horarias imposibles, y la fuga de ideas que apuntar en mi libreta.

A Mònica Sánchez-Guixé, por su dedicación en el laboratorio y por compartir conmigo la ilusión de este proyecto. Ha sido un lujo trabajar juntas.

A la Dra. Elena Garralda y todo el equipo humano que vertebra la *UITM*, por el apoyo a todo este proyecto; en especial, gracias a Laura Maynes, la mejor coordinadora que el *FGFR 360° RESISTANCE* podría haber tenido.

A la Dra. Ana Vivancos, el Dr. Paolo Nuciforo, el Dr. Rodrigo Dienstmann y sus respectivos equipos, cuyo trabajo ha hecho posible esta tesis.

Al Prof. José Jiménez, por su inestimable ayuda con la gestión de muestras. Definitivamente, si no existiera tendrían que inventarlo.

A las Dras. Cristina Saura y Mafalda Oliveira, por entender como nadie que para el éxito de los proyectos es imprescindible colaborar. Definitivamente, todas las direcciones siempre me han llevado a la mama, aunque yo me haya resistido.

Al Dr. Ricard Mesía y la Dra. Maica Galán, por enseñarme ese algo más de la Oncología, y por haber creído siempre en mí.

A los pacientes y sus familias, por recordarme a diario porqué elegí esta profesión.

A mi tribu de amigos, mi gran familia elegida, por estar ahí 24/7/365 desde las antípodas o en medio de una pandemia mundial: *#Este gato é una mielta, #Pasajeros confinados, #Sukiyaki friends, #Sinó a Bcn a SF, #AlbaRipoll, #Meprecipitodelavida, #You'll never walk alone, #Gossip girls, #Pirri the ripper is back, #Ebre connection, #Tu pelo tu pelo.*

A mi padres, Tere y Fermín, por su cariño y valores inculcados, pero sobretodo, por su apoyo total a pesar de no siempre entender mis decisiones. A mi hermana Maite y Ismael, luchadores como nadie y cómplices en la vida. A Ismael e Iván, por querer a su tía de forma incondicional. A Juanjo y Susana, por recargarme las pilas siempre que ha hecho falta, y a Marta, por aceptar el reto de compartir conmigo el título de aventurera de la familia. A Pilar, Álvaro y Mariona, por tener la gran suerte de haber encontrado en ellos la otra mitad de mis imprescindibles.

A J. J. Carbó, mi genial abuelo pintor que impregnó mi infancia de pasión cromática. Por enseñarme a ir contracorriente, no conformarme nunca con nada y cuestionarlo todo siempre. Creo que estaría orgulloso.

A Joan, mi perfecto compañero de viaje. Por entender como nadie lo que significa ser médico, e intentar superarse cada día en el empeño de hacerlo mejor. Por ser mi crítico más duro y al mismo tiempo, mi mayor fan durante todo este proyecto. Gracias por no dejarme tirar la toalla nunca.

A mis hijas, por enseñarme el verdadero significado de la resiliencia humana.

Y por último, a la ciudad de Melbourne. Por estar allí cuando más la necesitaba. Sin ella, esta tesis nunca hubiera visto la luz.

LISTADO DE ABREVIACIONES

FGFR: del inglés *Fibroblast Growth Factor Receptor*
FGF: del inglés *Fibroblast Growth Factor*
MTKI: del inglés *Multi-Tyrosin Kinase Inhibitor*
ORR: del inglés *Overall Response Rate*
DCR: del inglés *Disease Control Rate*
ALK: del inglés *Anaplastic Lymphoma Kinase*
NTRK: del inglés *Neurotrophic Tyrosin Receptor Kinase*
MSI-H: del inglés *MisroSatellite Instability High*
dMMR: del inglés *deficient in MisMatch Repair*
PTEN: del inglés *Phosphatase and TENsin homolog*
EGFR: del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*
IGFR: del inglés *Insulin Growth Factor Receptor*
VEGFR: del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*
PDGFR: del inglés *Platelet Derived Growth Factor Receptor*
MAPK: del inglés *Mitogen-Activated Pathway Kinase*
PI3K: del inglés *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-Kinase*
BRAF: del inglés *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*
HER: del inglés *Human Epidermal Receptor*
EMT: del inglés *Epithelial-Mesenchymal Transition*
ADCC: del inglés *Antibody-Dependent Cellular-mediated Cytotoxicity*
IRB: del inglés *Institutional Review Board*
FDA: del inglés *Food and Drug Administration*
NCCN: del inglés *National Comprehensive Cancer Network*
WMA: del inglés *World Medical Association*
RECIST: del inglés *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*
CR: del inglés *Complete Response*
PR: del inglés *Partial Response*
SD: del inglés *Stable Disease*
PD: del inglés *Progressive Disease*
mRNA: Ácido RiboNucleico mensajero

ADN: Ácido DesoxirriboNucleico

CNA: del inglés *Copy Number Alteration*

NGS: del inglés *Next Generation Sequencing*

FACT: del inglés *Functional Annotation for Cancer Treatment*

qRT-PCR: del inglés *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*

WES: del inglés *Whole Exome Sequencing*

RNAseq: del inglés *RiboNucleic Acid sequencing*

EGFP: del inglés *Enhanced Green Fluorescent Protein*

ROC: del inglés *Receiver Operating Characteristics*

TMB: del inglés *Tumor Mutational Burden*

ICI: del inglés *Immune Checkpoint Inhibitors*

PBMCs: del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Identificación de poblaciones de pacientes seleccionados molecularmente y aplicación de protocolos traslacionales.

Figura 2. Esquema de la vía del *FGFR:FGF*.

Figura 3. Potenciales biomarcadores predictivos a los FGFRinh y métodos de detección.

Figura 4. Potenciales mecanismos de resistencia a los FGFRinh.

Figura 5. Protocolo de generación de PDXs y líneas celulares *FGFR*-alteradas y su utilidad como herramienta investigacional.

Figura 6. Bloqueo de la angiogénesis en modelos PDXs *FGFR*-alterados.

Figura 7. Proyecto traslacional *FGFR 360° RESISTANCE*.

Figura 8. Esquema de la generación de PDXs *FGFR:FGF*-amplificados de cáncer de mama seleccionados para experimentos *in vivo* y caracterización molecular.

Figura 9. Porcentaje de cambio en las lesiones diana en casos con FGFRamp/mRNAh según el subtipo tumoral y características moleculares de los pacientes.

Figura 10. Correlación entre ClinBen a FGFRinh y nivel de amplificación génica del *FGFR* en el subgrupo pacientes FGFRamp.

Figura 11. Porcentaje de cambio en las lesiones diana en casos con FGFRmut según el subtipo tumoral y características moleculares de los pacientes.

Figura 12. Predicción *in vitro* de la actividad oncogénica de las mutaciones *FGFR* detectadas en el subgrupo de pacientes FGFRmut.

Figura 13. Predicción *in vitro* de la actividad oncogénica de las co-alteraciones detectadas en el subgrupo de pacientes FGFRmut.

Figura 14. Ejemplo de la predicción de respuesta *in vitro* con un agente diana de la variante génica activadora identificada en un caso del subgrupo FGFRmut.

Figura 15. Historia clínica y caracterización molecular *VHIO* de paciente con cáncer de mama *FGFR2*-amplificada respondedora a FGFRinh.

Figura 16. Historia clínica y caracterización molecular *VHIO* de paciente con

cáncer de mama *FGFR1*-amplificada no-respondedora a FGFRinh.

Figura 17. Porcentaje de cambio en las lesiones diana de los pacientes incluidos en el proyecto *FGFR 360° RESISTANCE* según el subtipo tumoral y sus características moleculares.

Figura 18. Correlación de las biopsias *FGFR*-alteradas recogidas y generación de nuevos PDXs en distintos momentos evolutivos de la enfermedad.

Figura 19. Evaluación de biomarcadores predictivos a FGFRinh en modelos PDXs *FGFR:FGF*-amplificados de cáncer de mama.

Figura 20. Evaluación de biomarcadores predictivos a MTKI en una cohorte de pacientes con cáncer de mama.

Figura 21. Correlación de la eficacia FGFRinh/MTKI y biomarcadores predictivos en modelos PDXs *FGFR:FGF*-amplificados de cáncer de mama.

Figura 22. Análisis del mecanismo de acción de los inhibidores del FGFR en modelos PDXs *FGFR1*-amplificados de cáncer de mama.

Figura 23. Evolución clínica y caracterización genómica del caso 30 *FGFR 360°R*.

Figura 24. Diferencias en las alteraciones somáticas detectadas mediante NGS-panel *versus* WES.

Figura 25. Evolución clínica y caracterización genómica del caso 66 *FGFR 360°R*.

Figura 26. Evolución clínica y caracterización genómica del caso 32 *FGFR 360°R*.

Figura 27. Implementación de la plataforma funcional *FACTTM*.

Figura 28. Diagrama simplificado de las principales vías de señalización intracelular analizadas mediante *FACTTM*.

Figura 29. Análisis *FACTTM* de un tumor portador de una mutación somática en el gen *KRAS*.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Principales alteraciones moleculares de los genes de la vía del *FGFR:FGF* en tumores sólidos y sus implicaciones clínicas.

Tabla 2. Ensayos fase 1 desarrollando FGFRinh en poblaciones de pacientes molecularmente seleccionados.

Tabla 3. Ensayos fase 1 con pacientes en curso de tratamiento con inhibidores del FGFR en *UITM-VHIO* durante el período 2014-2018.

Tabla 4. Colección *VHIO* de PDXs con cáncer de mama *FGFR*-alterados caracterizados genómicamente.

Tabla 5. Ensayos fase 1 con pacientes en curso de tratamiento con FGFRinh en *UITM-VHIO* durante el período 2011-2016.

Tabla 6. Características clínico-patológicas de los casos FGFRalt incluidos en el análisis retrospectivo *VHIO*.

Tabla 7. Evolución de los casos FGFRalt durante el tratamiento con FGFRinh.

Tabla 8. Comparación del valor oncogénico de las mutaciones detectadas en la cohorte de pacientes FGFRmut tratados con FGFRinh.

Tabla 9. Colección de biopsias tumorales con aberraciones del *FGFR:FGF* implantadas *de novo* en modelos murinos en el marco del proyecto *FGFR 360° RESISTANCE*.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
LISTADO DE ABREVIACIONES	3
LISTADO DE FIGURAS	5
LISTADO DE TABLAS	7
1. RESUMEN	13
2. SUMMARY	15
3. INTRODUCCIÓN	17
3.1. Desarrollo clínico precoz de nuevos fármacos y poblaciones de pacientes seleccionados molecularmente.....	17
3.2. Biología molecular de la vía del <i>FGFR:FGF</i>	21
3.3. Alteraciones génicas en la vía del <i>FGFR:FGF</i> y relevancia en la carcinogénesis humana	25
3.4. Desarrollo de fármacos inhibidores del FGFR.....	28
3.5. Potenciales biomarcadores predictivos de respuesta a los FGFRinh	35
3.6. Mecanismos de resistencia a los FGFRinh y papel de la heterogeneidad tumoral.....	41
3.7. Modelos de PDXs con aberraciones del <i>FGFR</i> como modelos preclínicos <i>in vivo</i>	46
4. HIPÓTESIS	51
5. OBJETIVOS.....	53
6. MATERIAL Y MÉTODOS	55
6.1. ESTUDIO RETROSPECTIVO: Análisis exploratorio de biomarcadores predictivos de respuesta en pacientes con cáncer	

avanzado tratados con pan-inhibidores del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFRinh)	55
6.1.1. <i>Diseño del estudio</i>	55
6.1.2. <i>Selección de la muestra: circuito de derivación a la UITM</i>	55
6.1.3. <i>Criterios de inclusión y exclusión</i>	56
6.1.4. <i>VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS RECOGIDAS</i>	57
6.1.5. <i>Herramientas de análisis molecular de los pacientes</i>	58
6.1.6. <i>Evaluación del valor oncogénico de las mutaciones</i>	60
6.1.6.1. <i>Plataforma bioinformática OncoKB</i>	60
6.1.6.2. <i>Tecnología Functional Annotation for Cancer Treatment (FACT™)</i>	61
6.1.7. <i>Análisis estadístico</i>	63
6.2. ESTUDIO PROSPECTIVO: Implementación del proyecto traslacional FGFR 360° RESISTANCE	64
6.2.1. <i>Diseño del estudio</i>	64
6.2.2. <i>Selección de la muestra: criterios de inclusión y exclusión</i>	65
6.2.3. <i>VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS RECOGIDAS</i>	67
6.2.4. <i>Circuitos de obtención de muestras biológicas</i>	68
6.2.5. <i>Experimentos in vivo con modelos PDXs FGFR-amplificados</i>	69
6.2.6. <i>Cohorte de validación de pacientes tratadas con MTKI</i>	73
6.2.7. <i>Herramientas de análisis molecular</i>	73
6.2.7.1. <i>Caracterización molecular de los PDXs</i>	73
6.2.7.2. <i>Análisis de muestras de pacientes seleccionados</i>	75
6.2.8. <i>Análisis estadístico</i>	76
7. RESULTADOS	79
7.1. ESTUDIO RETROSPECTIVO	79
7.1.1. <i>Análisis en el subgrupo de pacientes FGFRamp/mRNAh</i>	81
7.1.2. <i>Análisis en el subgrupo de pacientes FGFRmut</i>	83
7.1.2.1. <i>Análisis in vitro del valor oncogénico de las mutaciones detectadas en el subgrupo de pacientes FGFRmut</i>	87
7.2. ESTUDIO PROSPECTIVO	91

7.2.1. Obtención de muestras de pacientes y generación de una colección de PDXs FGFR-alterados.	94
7.2.2. Identificación de biomarcadores predictivos y evaluación de la actividad anti-proliferativa y anti-angiogénica de los FGFRinh en modelos PDXs FGFR-amplificados.	100
7.2.3. Estudio de la heterogeneidad tumoral y mecanismos de resistencia en pacientes FGFR-alterados respondedores inusuales.	107
7.2.3.1. Caso 30 <i>FGFR 360°R</i> : Mecanismos de resistencia en un tumor mülleriano mixto maligno tubárico-endometrial <i>FGFR2</i> -mutado sin beneficio a FGFRinh.	107
7.2.3.2. Caso 66 <i>FGFR 360°R</i> : Mecanismos de resistencia en un colangiocarcinoma <i>FGFR2</i> -translocado con beneficio clínico a FGFRinh.	116
7.2.3.3. Caso 32 <i>FGFR 360°R</i> : Evolución clonal de un cáncer de colon <i>FGFR1</i> -mutado con estabilidad prolongada en curso de FGFRinh.	123
8. DISCUSIÓN	131
8.1. ESTUDIO RETROSPECTIVO.	131
8.2. ESTUDIO PROSPECTIVO.	138
9. CONCLUSIONES	151
10. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	153
11. BIBLIOGRAFÍA	157
12. ANEXOS	189
12.1. Anexo 1: Relación de ensayos con FGFRinh monoterapia en tumores sólidos.	189
12.2. Anexo 2: VHIO NanoString® fusion panel v.4.0.	193
12.3. Anexo 3: VHIO AmpliconSeq panel v.3.0.	194
12.4. Anexo 4: VHIO NanoString® copy number panel v.2.0.	195
12.5. Anexo 5: Esquema de la tecnología FACT™ (NovellusDx®) ...	196
12.6. Anexo 6: Hoja informativa VHIO de consentimiento informado del Proyecto 360° RESISTANCE.	198

12.7. Anexo 7: Circuito <i>VHIO</i> de obtención de muestras de seroteca Proyecto <i>360° RESISTANCE</i>.....	208
12.8. Anexo 8: Circuito <i>VHIO</i> de obtención de muestras de autopsia Proyecto <i>360° RESISTANCE</i>.....	209
12.9. Anexo 9: Panel de Biomarcadores en Oncología (OBP) <i>HTG EdgeSeq®</i>.	224
12.10. Anexo 10: Esquema de la relación de proyectos de colaboración establecidos en el marco del Proyecto <i>FGFR 360° RESISTANCE</i>....	230
12.11. Anexo 11: Publicaciones del doctorando en el área de trabajo descrita.	231

1. RESUMEN

En cáncer, la desregulación de la vía del *FGFR:FGF* se ha asociado a un crecimiento tumoral descontrolado, una angiogénesis aberrante y una mayor capacidad de metastatización. En este contexto, en la última década se ha realizado un gran esfuerzo en desarrollar fármacos dirigidos contra esta diana terapéutica. Los datos de eficacia incipientes con la primera generación de inhibidores de la vía, fármacos multi-tirosina quinasa (MTKI), han sido más bien limitados, con un significativo porcentaje de efectos secundarios no deseados *–off target–*. Por este motivo, se están desarrollando nuevos inhibidores más selectivos y potentes del FGFR (FGFRinh), pero aún existe controversia sobre cuáles de estas alteraciones podrían ser los mejores biomarcadores de predicción de respuesta al bloqueo con FGFRinh.

Con este proyecto de tesis, pretendemos contribuir a la definición de una estrategia terapéutica óptima para los pacientes con alteraciones de la vía del *FGFR:FGF*, mediante una mejor selección de aquéllos que más pueden beneficiarse de estos FGFRinh. Con tal objetivo, esta memoria para la defensa de tesis consta de dos estudios principales. El primero se trata de un estudio retrospectivo de una cohorte de pacientes con cáncer avanzado, pre-seleccionados por ser portadores de tumores con aberraciones en los genes del *FGFR* y *FGFs* detectadas dentro del programa de *pre-screening VHIO*, e incluidos en ensayos fase 1 dónde se estaba testando un FGFRinh. Se presentan los datos del análisis exploratorio de biomarcadores realizado tras la correlación estadística de los datos clínico-patológicos y de eficacia a los FGFRinh disponibles. La mayoría de estos estudios partían de la hipótesis de que cualquier alteración molecular en la vía del *FGFR:FGF* podía servir como biomarcador predictivo de respuesta a los FGFRinh, independientemente del subtipo tumoral. Sin embargo, con este análisis retrospectivo pretendemos identificar entre los respondedores a un subgrupo de pacientes portadores de una alteración específica común *FGFR:FGF*. Nuestro objetivo es delimitar

con mayor precisión cuáles de estos determinantes moleculares son en realidad biomarcadores fiables y discernir si, en realidad, están al mismo nivel en relación a la predicción de respuesta en los distintos contextos histológicos (p.ej. alteraciones a nivel del ADN –amplificaciones, mutaciones, translocaciones- *versus* nivel mRNA *versus* proteína).

El segundo estudio en cambio, se trata de un estudio prospectivo cuyo objetivo es generar una colección de muestras de pacientes con cáncer avanzado seleccionados molecularmente por sus alteraciones en los genes de la vía *FGFR:FGF*. Se presentan datos sobre el desarrollo del protocolo investigacional *FGFR 360° RESISTANCE*, la plataforma traslacional implementada para obtener muestras seriadas (biopsias tumorales pre-, en curso y post- tratamiento, plasma e incluso autopsias en caliente) en diferentes momentos de la enfermedad de estos pacientes. Este valioso repositorio de muestras ha servido para generar xenoinjertos derivados de pacientes (PDXs), utilizados en nuestro laboratorio para validar *in vivo* algunas de las hipótesis previamente observadas, así como integrar el conocimiento obtenido del análisis molecular de las muestras más relevantes de algunos respondedores inusuales seleccionados.

La presentación de cada uno de estos estudios se acompaña de una discusión de los resultados obtenidos, así como un sumario final de las conclusiones alcanzadas y las futuras líneas de investigación asociadas.

2. SUMMARY

Among cancers, deregulation of the *FGFR:FGF* pathway has been widely associated with uncontrolled tumoral growth, aberrant angiogenesis and increased metastatic dissemination rates. In this context, several efforts have been done during the last decade in order to develop targeted agents against this molecular pathway. However, early efficacy data seen with first-generation FGFR inhibitors, namely multi-tyrosin kinase inhibitors (MTKI), has been limited, with a significant proportion of off-target effects. Hence, more potent and selective second-generation FGFR inhibitors (FGFRinh) are currently under development, although there is a lack of consensus regarding which *FGFR:FGF* molecular alteration could represent a reliable predictive biomarker of response to FGFR blockade.

With this thesis project, we aim to contribute in the definition of an optimal therapeutic strategy for patients whose tumours harbour *FGFR:FGF* pathway alterations, by better selecting those patients more likely to respond to FGFRinh. With this purpose, this thesis encompasses two principal studies. The first study is a retrospective study performed in a cohort of refractory *FGFR:FGF*-aberrant cancer patients, pre-selected within the molecular pre-screening program at *VHIO*, and treated with novel FGFRinh in ongoing phase 1 clinical trials. Here we present the biomarker exploratory analysis, statistically correlating the clinic-pathological characteristics of these patients with the efficacy signals observed. The vast majority of these studies were based on the hypothesis that any molecular alteration in the *FGFR:FGF* pathway could serve as predictive biomarker to FGFRinh, independently of the tumor subtype. However, this retrospective analysis is seeking to identify a subgroup of patients sharing a common molecular alteration of the *FGFR:FGF* pathway among the responders. Our aim is to delineate more precisely which of these molecular determinants are actually reliable biomarkers and to discern if, in fact, they are at the same level in terms of

predicting response in different histological contexts (eg. DNA alterations – amplifications, mutations, translocations- *versus* mRNA *versus* protein).

The second study instead is a prospective study whose objective is to generate a valuable collection of biological samples from advanced cancer patients, molecularly-selected by their *FGFR:FGF* gene alterations. Here we present the results of the development of the investigational protocol *FGFR 360° RESISTANCE*, the traslational platform implemented to obtain serial patient samples (tumoral biopsies pre-/on-/post-treatment, blood samples and warm autopsies, if feasible) at different timepoints of their disease. This valuable repository of samples has served to generate patient-derived xenografts (PDXs), used for validating *in vivo* some of our previous observed hypothesis, as well as to integrate the molecular knowledge acquired from deep-sequencing the most relevant samples from selected unusual responders.

The presentation of each one of these two studies is accompanied by a discussion of the results obtained, together with a final summary of the conclusions reached and the future lines of research associated.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Desarrollo clínico precoz de nuevos fármacos y poblaciones de pacientes seleccionados molecularmente.

A pesar de los avances médicos alcanzados en los últimos años, el cáncer sigue siendo una causa importante de morbimortalidad. Hasta finales de los años noventa, los fármacos quimioterápicos eran prácticamente la única herramienta disponible para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, desde entonces numerosos avances científicos han permitido desentrañar parte de los mecanismos implicados en la carcinogénesis. Hanahan y Weinberg describieron lo que se consideran los diez rasgos distintivos para entender mejor la enfermedad neoplásica: ¹proliferación celular ilimitada, ²eliminación de las señales supresoras del crecimiento, ³evasión del sistema inmunológico, ⁴inmortalidad replicativa, ⁵promoción del microambiente inflamatorio, ⁶activación de la invasión y capacidad de metastatización, ⁷inducción de la angiogénesis, ⁸inestabilidad genómica con acumulación de daños en el ADN, ⁹resistencia a la apoptosis, y ¹⁰alteración de los mecanismos de regulación energéticos de la célula (1, 2).

El reconocimiento de estas características tumorales se ha traducido en un revolucionario enfoque moderno de la biología molecular del cáncer, estableciendo como objetivo el desarrollo de fármacos que sean precisamente capaces de inhibir algunas de estas capacidades adquiridas que diferencian las células tumorales de las células o tejidos normales. En el ámbito del desarrollo precoz de nuevos fármacos, este cambio ha implicado el auge de las nuevas terapias dirigidas molecularmente, drogas que actúan modulando alguno de estos sellos distintivos de las células cancerígenas (3).

El imatinib mesilato, una pequeña molécula inhibidora de la actividad tirosina quinasa de *BCR-ABL* y *c-kit*, fue el primer fármaco dirigido que se aprobó

para el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide crónica. En estos pacientes portadores del “cromosoma Filadelfia”, la fusión génica *BCR-ABL* sirve como potente biomarcador predictivo de respuesta al imatinib (4). Posteriormente, los resultados positivos de los ensayos clínicos desarrollando imatinib en tumores del estroma gastrointestinal metastásicos *c-kit*-positivos (5-8), avalaron la hipótesis de que la inhibición de una vía de señalización molecular a la cual el tumor fuera adicto era útil. De hecho, estos estudios sirvieron como prueba de concepto de que ciertos receptores tirosina quinasa podían representar dianas críticas para el tratamiento de algunos tumores sólidos. Cabe destacar que el desarrollo del imatinib marcó un cambio de paradigma en la historia de los fármacos diana, aunque se demoró casi 41 años, tiempo que transcurrió desde el descubrimiento del “cromosoma Filadelfia” hasta su aprobación por parte de las agencias regulatorias (9). Sin embargo, desde entonces el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos se ha acelerado de forma notable (10). Uno de los mejores ejemplos es el del crizotinib, que en sólo tres años, fue aprobado en 2011 para el tratamiento de pacientes afectos con cáncer de pulmón no microcítico portadores de una fusión en el gen *ALK* (11). El caso de los inhibidores de *ALK* es un ejemplo muy ilustrativo que traduce el cambio de tendencia en el proceso de desarrollo clínico de los fármacos (12), pues demuestra que ensayos clínicos bien diseñados desde sus fases tempranas podrían acelerar la puesta a punto de nuevas drogas, especialmente cuando éstas suponen una opción de tratamiento para tumores de mal pronóstico sin otras alternativas terapéuticas (13).

De hecho, el éxito de algunos de los muchos 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 respaldado por la disponibilidad de biomarcadores predictivos apropiados. Los biomarcadores predictivos son características tumorales que pueden determinarse objetivamente y que se consideran indicadores de la respuesta farmacológica que puede presentar el paciente a cierto medicamento (14). Las técnicas de ultra-secuenciación génica modernas han permitido recientemente la identificación de nuevas alteraciones moleculares potencialmente inductoras

de la carcinogénesis en los distintos tipos tumorales, algunas con clara relevancia terapéutica.

En 2017, pembrolizumab, un anticuerpo monoclonal desarrollado como inmunoterapia del cáncer, fue el primer fármaco en la historia de la Oncología en recibir la aprobación por parte de la agencia regulatoria del medicamento en Estados Unidos (*FDA*) de forma agnóstica para la histología. Esta aprobación acelerada incluía el tratamiento de cualquier tipo tumoral independientemente de su órgano de origen, siempre y cuando éste tuviera el biomarcador predictivo validado y definido como alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) o defectos en la reparación de los errores de emparejamiento (dMMR) (15). La aprobación acelerada de pembrolizumab fue respaldada por los datos obtenidos en sólo 149 pacientes MSI-H/dMMR que habían sido incluidos en cinco ensayos clínicos no randomizados, objetivándose una tasa de respuesta objetiva (ORR) del 39.6% en este subgrupo de pacientes (intervalo de confianza (IC) 95%, 31.7-47.9).

Otro ejemplo muy ilustrativo es el caso de las translocaciones en los genes del *NTRK* (16). Aunque las translocaciones de *NTRK* se conocían desde hace más de tres décadas, las nuevas tecnologías han sido las que han revelado su presencia en una amplia gama de tipos tumorales, especialmente en casos pediátricos y entre histologías consideradas raras. En este contexto, durante el desarrollo de algunos de los inhibidores de primera generación de TRK, los pacientes ya fueron pre-seleccionados para participar en los ensayos fase 1/2 mediante un criterio de selección molecular predefinido con alteraciones de los genes *NTRK1/2/3* (17, 18). Mediante esta estrategia de enriquecimiento, el pan-inhibidor selectivo de TRKA/B/C larotrectinib, demostró una ORR del 81% (IC 95%, 72-88) entre los 122 pacientes *NTRK*-translocados tratados (19). Con esta clara evidencia de que las fusiones de *NTRK* son potentes biomarcadores predictivos para los inhibidores de TRK, el 26 de noviembre del 2018, larotrectinib fue aprobado por la *FDA* para el tratamiento de pacientes con cáncer avanzado portadores de alguna fusión de los genes *NTRK*, independientemente de la histología tumoral, de la edad del paciente y del tipo

de fusión/gen *NTRK* asociado. Esta designación ha permitido que puedan tratarse de forma dirigida un subgrupo de pacientes afectados de cáncer avanzado sin alternativas terapéuticas efectivas. Sin este desarrollo precoz guiado por un biomarcador fiable, la comercialización de los inhibidores de TRK hubiera resultado poco probable debido a su escasa demanda, por tratarse de una patología que afecta menos del 5% global de los pacientes oncológicos.

Los casos de pembrolizumab y larotrectinib son dos claros ejemplos de cómo la aplicación de las nuevas tecnologías está permitiendo obtener un perfil molecular único y específico de cada paciente, que guía la óptima selección de un tratamiento personalizado (20). En este contexto, los estudios fase 1 están adquiriendo progresivamente un papel más central en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos, enriqueciendo la población participante de acuerdo con biomarcadores exploratorios pre-especificados para identificar tendencias y señales que puedan ayudar a definir sub-poblaciones de respondedores (21). En un proceso similar, los mecanismos de resistencia a dichas terapias dirigidas han empezado a describirse precozmente como resultado de la investigación traslacional realizada conjuntamente en estos ensayos fase 1 (22). Estamos, por lo tanto, siendo testigos de cómo la investigación clínica y traslacional se han ido acercando, con tal de desarrollar en paralelo los mejores agentes dirigidos y alinearlos con sus biomarcadores predictivos óptimos para que orienten su uso adecuado.

Protocolos investigacionales que permiten la obtención de muestras de estas pequeñas poblaciones de pacientes seleccionados molecularmente (biopsias de tejido tumoral, muestras de sangre o autopsias en caliente), han demostrado ser factibles de implementar en paralelo al curso de ensayos clínicos (23). Tal y como ilustra la **figura 1**, se trata de iniciativas traslacionales diseñadas para intentar generar líneas celulares y xenoinjertos derivados de pacientes (PDXs), además de permitir la obtención de valiosas muestras biológicas cuyo análisis mediante técnicas de ultra-secuenciación resulta crucial para avanzar en el conocimiento de una vía de señalización y sus agentes dirigidos (24).

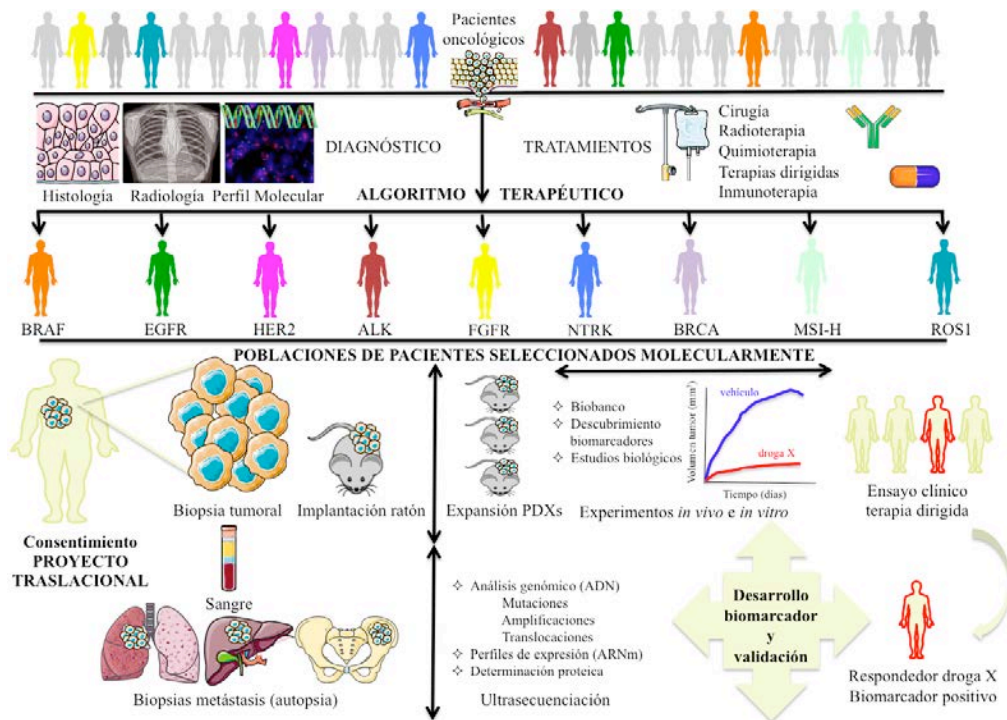


Figura 1. Identificación de poblaciones de pacientes seleccionados molecularmente y aplicación de protocolos traslacionales. La identificación de alteraciones moleculares concretas permite el enriquecimiento de los pacientes candidatos a participar en ensayos clínicos con nuevas terapias dirigidas. La implementación de estrategias traslacionales en paralelo a estos ensayos con la finalidad obtener muestras biológicas de estos pacientes (biopsias tumorales y muestras de sangre en distintos momentos de la enfermedad, autopsias en caliente), es una herramienta muy valiosa para poder disponer de muestras de tejido y generar xenoinjertos derivados de pacientes (PDXs), que permitan realizar estudios preclínicos correlativos para incrementar el conocimiento sobre las distintas dianas moleculares.

3.2. Biología molecular de la vía del *FGFR:FGF*.

El eje del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR) y sus ligandos (FGFs) es una vía de señalización intracelular compleja que está implicada en múltiples procesos de la homeostasis celular normal (25). Filogenéticamente existen hasta 22 tipos distintos de FGFs, polipéptidos que se agrupan en siete subfamilias (26). Aunque gran parte de ellos median sus funciones actuando como ligandos de los FGFR (FGF1-10 y FGF15-23), existen algunos como FGF11-14 que actúan a nivel intracelular independientemente de su unión a un receptor tirosina quinasa (27). A excepción de estos ligandos FGF11-14 de secreción intracrina, la mayoría de los FGFs son secretados por los distintos tejidos del cuerpo de forma paracrina (FGF1-10/16-18/20/22) o endocrina (FGF15/19/21/23), y en el caso de los

FGF1-2, éstos son liberados directamente en contexto de daño celular bajo condiciones de estrés, independientes de la vía estándar de exocitosis (28). En condiciones basales, gran parte de estos ligandos se encuentran secuestrados a nivel de la matriz extracelular, a través del entramado de fuerzas electrostáticas que conforman los glicosaminoglicanos del heparan sulfato (HSPGs) y de las proteínas klotho, proteoglicanos que interactúan específicamente con los FGFs hormonales. Las interacciones que se establecen entre FGFs:HSPGs o klotho contribuyen a crear un reservorio local de los distintos ligandos, de modo que éstos se encuentran protegidos de la degradación en el espacio extracelular pero disponibles según varíen los requerimientos homeostáticos de la célula en determinadas circunstancias. Las proteasas de la matriz extracelular se encargan de degradar selectivamente los proteoglicanos, liberando el subtipo de FGF que la célula precisa en cada momento (29).

Una vez liberados, los FGFs se unen a uno de los cuatro distintos receptores FGFR1-4, induciendo la dimerización del receptor y con ello la fosforilación del dominio tirosina quinasa intracelular. Los FGFR son receptores tirosina quinasa altamente conservados a lo largo de la evolución humana, y como tal, comparten la estructura clásica compuesta por una porción extracelular, una porción intramembranosa y un dominio carboxi-terminal intracelular. De hecho, existe un quinto receptor FGFR5, en realidad conocido como FGFR1, que puede unirse a ligandos pero no tiene actividad tirosina quinasa. Se postula que este FGFR1 actúa como co-receptor transmembrana para la dimerización de otros receptores tirosina quinasa, y como mecanismo de *feedback* negativo a la activación de FGFR1-4 (30).

En la porción extracelular de FGFR1-4 se diferencian tres dominios de características inmunoglobulina (IgI-III), que se encargan de modular la actividad del receptor y de refinar su afinidad por los distintos ligandos: ¹el extremo más distal amino-terminal, contiene una región rica en aminoácidos serina a nivel IgI-II que se conoce como la caja ácida, y que desempeña un papel fundamental en la auto-inhibición del receptor; ²los proteoglicanos de la

matriz extracelular están anclados a nivel de la porción IgII del FGFR, controlando de forma estricta la liberación de FGFs; y ³la región IgII-III contiene el punto crítico de unión de los FGFs para desencadenar el cambio conformacional del receptor y su activación subsecuente.

La unión del ligando con el receptor induce el acoplamiento-fosforilación de otras proteínas adaptadoras, como la proteína sustrato 2 del FGFR (FRS2), desencadenando así la activación sucesiva de múltiples cascadas de señalización intracelular como PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK y JAK/STAT, que finalmente activan la transcripción de genes implicados en aquellos procesos biológicos en los que el eje *FGFR:FGF* desempeña un papel crucial (31). La **figura 2** resume de forma esquemática la complejidad del eje *FGFR:FGF* descrito.

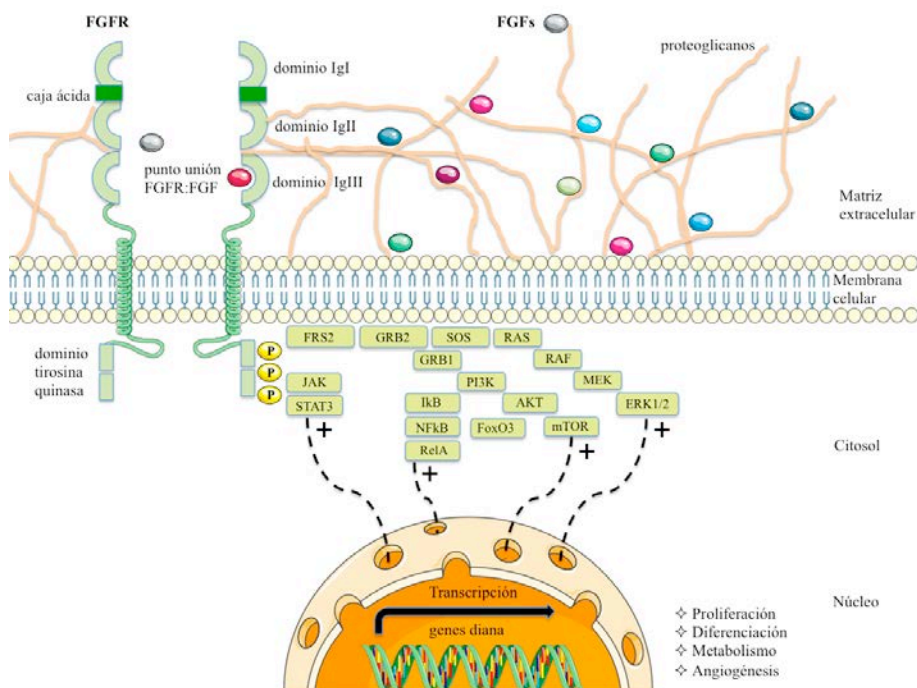


Figura 2. Esquema de la vía del *FGFR:FGF*.

La vía del *FGFR* desempeña un rol fundamental en múltiples procesos biológicos en el individuo sano, que van desde la organogénesis, el metabolismo y la angiogénesis. De hecho, se postula que ya desde etapas muy

tempranas del desarrollo embrionario, se organiza una distribución temporo-espacial muy específica para cada uno de los receptores y sus ligandos, sugiriendo que los perfiles de expresión de los *FGFR* y sus *FGFs* determinan los efectos biológicos de esta vía de señalización en los distintos contextos celulares. De hecho, su papel crucial en la migración celular y diferenciación de los tejidos se conoce desde hace muchos años, pues hay descritos en la literatura múltiples síndromes de displasias esqueléticas asociados a un funcionamiento aberrante de la vía, en la mayoría de casos por mutaciones germinales en los genes del *FGFR* (32).

Por otro lado, los ligandos endocrinos constituyen una subfamilia de *FGFs* que están implicados en la regulación fina de ciertos procesos metabólicos del organismo. *FGF19/21* presentan la particularidad de que requieren del proteoglicano beta-klotho (β klotho) para formar el complejo terciario *FGFR:FGF: β klotho*, y esto condiciona su área de actuación en el organismo. La especificidad por el receptor *FGFR4: β klotho* limita que *FGF19* desempeñe sus funciones sobretodo a nivel hepático, suprimiendo la gluconeogénesis, inhibiendo la síntesis de los ácidos biliares y estimulando la glicogénesis (33). En cambio, *FGF21* puede unirse a otros receptores en distintas zonas del cuerpo, y desempeña acciones antagónicas, estimulando la gluconeogénesis y reprimiendo la lipogénesis (34). *FGF23* se encarga del ajuste de los niveles de calcio-fosfato del cuerpo, mediante la co-regulación con las glicoproteínas de membrana alfa-klotho y el *FGFR1* expresados a nivel de la glándula paratiroidea, el túbulo distal renal y el hueso (35).

Finalmente, numerosos trabajos han descrito el papel de la vía del *FGFR* a nivel de la angiogénesis. *FGFR1-2* se expresan normalmente en la superficie de los vasos sanguíneos, y mediante la unión de los ligandos *FGF1-2* inducen la proliferación de nuevas células endoteliales y de factores que promueven la adhesión celular. Así pues, *FGFR:FGF* estaría implicado fundamentalmente en la formación de neo-vasos en respuesta a cicatrización de heridas, como mecanismo complementario al que desempeñan *VEGFR:VEGF* en la formación de nuevos vasos en condiciones de homeostasis basal (36).

3.3. Alteraciones génicas en la vía del *FGFR:FGF* y relevancia en la carcinogénesis humana.

La aplicación de nuevas técnicas de secuenciación génica ha permitido detectar en los últimos años una gran variedad de alteraciones moleculares en los genes codificantes para los cuatro receptores *FGFR* y sus ligandos entre los diferentes tipos de tumores sólidos. La mayoría de estas alteraciones pueden inducir las distintas etapas de la carcinogénesis en aquellas células cuya transformación neoplásica es dependiente de estos oncogenes, favoreciendo su proliferación incontrolada y angiogénesis aberrante, así como su capacidad de metastatización y la resistencia a fármacos (37). Así pues, la vía del *FGFR:FGF* ha suscitado un renovado interés en el campo de la investigación oncológica, emergiendo como una vía clave para optimizar las opciones terapéuticas de los pacientes con cáncer.

Las distintas isoformas de los *FGFR* y sus ligandos se distribuyen desigualmente por los distintos tejidos del cuerpo, lo que traduce probablemente el papel diferencial que cada uno de ellos tiene en las distintas etapas de la embriogénesis humana. Del mismo modo, esta distribución órgano-específica parece mantenerse durante la carcinogénesis, por lo que ciertas alteraciones moleculares son altamente específicas de ciertos tipos tumorales. Muchas de estas alteraciones moleculares, independientemente del subtipo de receptor afecto o del tipo histológico, conllevan unos rasgos de mayor desdiferenciación tumoral, asociándose a resistencia a las terapias convencionales y a una supervivencia reducida.

Las translocaciones cromosómicas son el desplazamiento de un segmento de un cromosoma a un nuevo lugar del genoma, una reordenación del material genético entre cromosomas, sin que haya pérdida o ganancia de información genética. Este proceso de translocación puede dar lugar a genes de fusión, genes que se originan por la unión de partes procedentes de dos genes distintos, dando lugar a una nueva proteína de fusión. Actualmente, estas translocaciones del *FGFR* y sus genes de fusión generados *de novo* se

encuentran precisamente en el foco de atención del desarrollo de nuevos fármacos, ya que proporcionan objetivos terapéuticos muy atractivos. Pero existen también otras alteraciones moleculares, como mutaciones y amplificaciones del *FGFR:FGF*, que se están estudiando con mayor detalle por su potencial implicación en la carcinogénesis de tumores *FGFR*-alterados.

La **tabla 1** recoge las principales alteraciones moleculares descritas en los genes codificantes de los *FGFR* y de los ligandos *FGF3-4-19 (11q)*, aquellos tipos tumorales en los que es más frecuente detectarlas y algunas de las características fenotípicas que se han asociado con ellas.

Tabla 1. Principales alteraciones moleculares de los genes de la vía del *FGFR:FGF* en tumores sólidos y sus implicaciones clínicas.

Gen	Alteración	Tipo tumoral	Prev	Características	Ref
FGFR1	Amplificación	Carcinoma no microcítico pulmón escamoso	10-20%	Mayor afectación linfática.	(38, 39)
		Carcinoma no microcítico pulmón adenocarcinoma	6%	Resistencia a tratamiento anti-EGFR.	(40, 41)
		Carcinoma microcítico pulmón	6%	Quimio-resistencia	(42, 43)
		Carcinoma escamoso del área cabeza y cuello	10%	Mutuamente exclusivo con infección por HPV y peor pronóstico.	(44, 45)
		Carcinoma escamoso de esófago	9-12%	Peor pronóstico.	(46, 47)
		Carcinoma mama receptores hormonales +	10%	Resistencia endocrina y metastatización precoz.	(48, 49)
		Carcinoma triple negativo mama	4%	Tumores más vascularizados.	(50, 51)
		Carcinoma ovario	4%	Resistencia a platinos.	(52, 53)
		Adenocarcinoma endometrio	4%	No evaluado específicamente.	(54)
		Carcinoma urotelial invasivo	11%	No evaluado específicamente.	(55)
		Adenocarcinoma de próstata	8%	Resistencia a la castración en pacientes hormono-naïve.	(56)
		Osteosarcoma	18%	Quimio-resistencia.	(57)
	Mutación	Melanoma	4%	Variante de significado incierto.	(58)
11q	Amplificación	Carcinoma no microcítico pulmón escamoso	12%	Posible dependencia de la co-amp del FGFR1 para activación de la vía.	(39, 59)
		Carcinoma no microcítico pulmón adenocarcinoma	4%		(41)
		Carcinoma mama receptores hormonales +	15%		(48, 59)
FGFR2	Amplificación	Adenocarcinoma gástrico	7%	Tumores sin HER2/METamp con mayor invasión linfovascular.	(60-62)
		Carcinoma triple negativo mama	4%	No evaluado específicamente.	(63)
	Mutación	Adenocarcinoma endometrio	12%	Mutuamente exclusivo con KRASmut.	(64, 65)
		Melanoma	9%	Variante de significado incierto.	(58)
Translocación	Vías biliares	8-13%	Mutuamente exclusivo con KRAS/BRAFmut.	(66, 67)	
FGFR3	Mutación	Carcinoma escamoso cérvix	25%	No evaluado específicamente.	(68)
		Carcinoma urotelial invasivo	15%	Subtipo luminal-papilar.	(55, 69)
	Translocación	Carcinoma pulmón no microcítico	1%	Tumores más grandes, pobremente diferenciados.	(70)
		Carcinoma urotelial invasivo	6%	Subtipo luminal-papilar.	(55, 69)
Glioblastoma	3-7%	Mutuamente exclusivo con MET/PDGFR/EGFRamp.	(71, 72)		
FGFR4	Amplificación o sobreexpresión	Hepatocarcinoma	15-40%	Niveles elevados de α feto-proteína, pobre diferenciación.	(73, 74)
		Adenocarcinoma colon	4%	Resistencia a tratamiento anti-EGFR.	(75)
	Mutación	Melanoma	4%	Variante de significado incierto.	(58)
		Rabdomiosarcoma	8%	Quimio-resistencia.	(76)

Abreviaciones: Prev (prevalencia); Ref (referencia); amp (amplificación); mut (mutación); HPV (Virus del Papiloma Humano).

3.4. Desarrollo de fármacos inhibidores del FGFR.

Dado que las alteraciones moleculares en la vía del *FGFR:FGF* parecen ser un denominador común en distintos tumores, en los últimos años se ha hecho un esfuerzo en desarrollar estrategias terapéuticas con tal de bloquear su efecto sobre la proliferación celular. Algunos estudios *in vitro* han demostrado que la inhibición de la vía ocasiona la muerte celular en líneas celulares de cáncer de mama *FGFR1*-amplificado, demostrando que estas células dependen de la activación FGFR para su viabilidad (77). Asimismo, estudios de eficacia *in vivo* utilizando modelos de xenoinjerto de ratón con carcinoma endometrial *FGFR2*-mutado han demostrado su sensibilidad a inhibidores tirosina quinasa del FGFR, avalando la dependencia oncogénica de los tumores portadores de estas aberraciones (78).

En segundo lugar, es conocido el papel de la vía del *FGFR1-2* y de sus ligandos en la formación de vasos aberrantes tumorales y como mecanismo de resistencia a la terapia anti-angiogénica. De hecho, se ha demostrado un aumento de FGF a la progresión en pacientes afectados de glioblastoma tratados con cediranib, un inhibidor multi-tirosina quinasa que bloquea VEGF (79). FGF1-2 ejercerían su papel de factores pro-angiogénicos como mecanismo compensatorio para facilitar la formación de nuevos vasos cuando la angiogénesis basal mediada por *VEGFR:VEGF* está bloqueada mediante fármacos anti-VEGF (80). El aumento de los niveles de FGF detectado en pacientes afectados con cáncer de colon tratados previamente con bevacizumab también avala esta hipótesis (81).

Finalmente, se ha demostrado que la activación de *FGFR1:FGF2* promueve la transformación epitelio-mesénquima (EMT) en líneas celulares de cáncer de pulmón *FGFR1*-amplificadas, mediante la señalización intracelular a través del eje *FGFR1/ERK1-2/SOX2* (82). Este paso de EMT resultaría crucial para la adquisición de capacidad invasiva de estos tumores y su posterior diseminación metastásica. Así pues, mediante la inhibición combinada de tres

de los rasgos más distintivos de las células tumorales, como son la proliferación celular, la angiogénesis y capacidad de metastatización, los nuevos fármacos inhibidores del FGFR han emergido como una opción terapéutica prometedora para el tratamiento del cáncer.

Actualmente, distintos fármacos inhibidores del FGFR se encuentran en proceso de desarrollo. La mayor parte de estos inhibidores del FGFR pueden clasificarse según el grado de selectividad que presentan para inhibir específicamente el receptor FGFR: ¹inhibidores no-selectivos del FGFR de primera generación (MTKI), pequeñas moléculas con biodisponibilidad oral que pueden ocasionar efectos secundarios adicionales por la inhibición paralela de múltiples quinasas; inhibidores selectivos del FGFR (FGFRinh), la mayoría fármacos orales que incluyen los ²pan-inhibidores de segunda generación, con actividad altamente dirigida hacia los FGFR o FGFs ($IC_{50} < 10$ nmol/L) así como los ³inhibidores ultra-selectivos de tercera generación, diseñados para bloquear la activación mediada por un único FGFR específico, Asimismo, se han diseñado algunos anticuerpos endovenosos FGFRinh, potenciando sinérgicamente en algunos casos la citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC) (83). En cualquiera de los tres casos, la mayoría de estos fármacos han demostrado actividad anti-proliferativa y anti-angiogénica en experimentos preclínicos *in vitro* con líneas celulares y en modelos *in vivo* (25). Sin embargo, existen ciertas diferencias notables a nivel mecanístico que explican las diferencias de eficacia y de toxicidad evidenciadas entre los dos grandes grupos de MTKI y FGFRinh.

Los MTKI se conocen como inhibidores multi-tirosina quinasa de amplio espectro, pues no sólo obtenemos los efectos dirigidos contra el receptor tirosina quinasa deseado, en este caso el FGFR, sino que también aparecen los efectos colaterales derivados de la inhibición de otros receptores tirosina quinasa. El motivo de esta inhibición más amplia se debe en parte a que los receptores tirosina quinasa son receptores transmembrana cuya estructura está altamente preservada a lo largo de la evolución humana (84). A pesar de los avances en biotecnología, esta proximidad filogenética del FGFR con otros

receptores tirosina quinasa es tan cercana, que resulta muy complejo obtener inhibidores dirigidos limitados a un único receptor. Aunque a veces, esta peculiaridad biológica se ha aprovechado también como ventaja a la hora de diseñar los MTKI, para que así engloben un abanico de acciones más amplio contra más de uno de los sellos distintivos de las células tumorales.

Muchos de los MTKI han sido desarrollados como fármacos anti-angiogénicos en primera instancia, como es el caso del lenvatinib, un MTKI con actividad inhibitoria de FGFR1-4/VEGFR1-3/PDGFR α /c-KIT/RET (85), cuyo desarrollo se centró en el tratamiento de los tumores tiroideos refractarios al radio-yodo (86). También ocurrió con el nintedanib, fármaco angio-quinasa triple inhibidor de FGFR/VEGFR/PDGFR (87), cuyos resultados en monoterapia fueron limitados y pasó a desarrollarse en múltiples regímenes, aprobándose tras los resultados del ensayo fase 3 *LUME-Lung 1* en combinación con docetaxel para el tratamiento de segunda línea del cáncer de pulmón no microcítico metastásico (88). En otros casos, el MTKI dovitinib, inhibidor de FGFR1-3/VEGFR1-3/PDGFR α - β /c-KIT/FLT3, demostró desde sus etapas precoces actividad *in vivo* e *in vitro* en modelos específicos de tumores de endometrio *FGFR2*-mutado (89) y mama *FGFR1*-amplificado (90), siendo desarrollado entonces dirigidamente en sendos ensayos fase 2 para estas histologías. En el caso del cáncer de endometrio, el estudio fue considerado negativo dado que las diferencias en supervivencia libre de progresión (SLP) no fueron estadísticamente significativas en un primer análisis interino (SLP a las 18 semanas del subgrupo *FGFR2*-mutado 35% versus *FGFR2*-no mutado 25%) (91). Sin embargo, en el caso de las 81 pacientes con cáncer de mama metastásico reclutadas en el ensayo fase 2 multi-cohorte, se objetivó una respuesta parcial no confirmada o estabilización de la enfermedad en el 25% de pacientes del subgrupo *FGFR1*-amplificado (90). El hecho de que sólo 1 paciente sin dicha alteración molecular presentara beneficio sugirió que en realidad el fármaco tenía actividad sólo en las pacientes con tumores dependientes de la vía FGFR.

Con estos datos, posteriores MTKI se desarrollaron ya enfocados en algunas poblaciones de pacientes seleccionados molecularmente según sus alteraciones en los genes del *FGFR:FGF*. Soria JC. *et al* (92) reportaron en 2014 datos muy esperanzadores en el subgrupo de 12 pacientes con cáncer de mama *FGFR1*-amplificado tratadas en el ensayo fase 1 con lucitanib, MTKI anti-FGFR1-3/VEGFR1-3/PDGFR α - β /c-KIT/CSF-1R. Se objetivó una tasa global de respuesta parcial según criterios RECIST del 50% entre estas pacientes *FGFR*-alteradas (6 de 12 pacientes), con respuestas precoces en la primera valoración de respuesta y duraciones de más de 1 año en algunos de los casos. Desafortunadamente, aún a día de hoy no se han reportado datos adicionales del análisis de biomarcadores predictivos en dicho subgrupo de pacientes respondedoras. El análisis exploratorio dentro del posterior ensayo fase 2 *FINESSE*, sugirió que el beneficio al lucitanib era mayor entre aquellas pacientes con cáncer de mama *FGFR1*-amplificado con alta expresión de la proteína FGFR1, evaluada mediante técnicas inmunohistoquímica (IHC, H-score >50) (93).

ODM-203 con actividad anti-FGFR1-4/VEGFR1-3/PDGFR α /RET/SIK2, ha demostrado ser activo también en pacientes pre-seleccionados, objetivándose una respuesta en un tumor mioepitelial *FGFR2*-mutado y estabilizaciones radiológicas en un colangiocarcinoma *FGFR2*-translocado, un cáncer de mama *FGFR1*-amplificado y un carcinoma tiroideo *FGFR2*-deleccionado (94). Derazantinib, MTKI con actividad pan-FGFR1-4/VEGFR1-3/PDGFR α - β /RET/KIT, ha demostrado actividad entre los 18 pacientes con alteraciones de la vía del FGFR incluidos en su ensayo fase 1, destacando dos respuestas parciales en dos colangiocarcinomas intrahepáticos *FGFR2*-translocados y en un carcinoma urotelial con co-amplificación del *FGFR2/FGF19* (95).

Sin embargo, cabe destacar que estos MTKI han presentado un significativo porcentaje de efectos secundarios no deseados, derivados precisamente de su potente acción anti-VEGFR (p.ej. proteinúria, hipertensión, diarreas, astenia). Este perfil dominado por la toxicidad VEGFR-mediada podría haber limitado

la posibilidad de mantener una adecuada intensidad de dosis para bloquear la vía del *FGFR* por parte de estos fármacos, minimizando así su potencial terapéutico en los pacientes con alteraciones de la vía del *FGFR*.

En los últimos años se han desarrollado los FGFRinh selectivos, con el objetivo de bloquear más selectivamente la quinasa dependiente de activación del receptor FGFR pero disminuyendo los efectos secundarios derivados del bloqueo de otras quinasas. En general, la mayoría de estos FGFRinh han sido desarrollados en múltiples tipos tumorales, pero pre-seleccionando ya desde fases muy tempranas a aquéllos individuos con mayores posibilidades de beneficiarse tras detectárseles una alteración molecular en alguno de los genes del *FGFR:FGF*. Los FGFRinh pueden sub-clasificarse además según el tipo de unión que tengan con el sitio catalítico del FGFR. Los inhibidores reversibles se unen al dominio tirosina quinasa de forma transitoria, mientras que los inhibidores irreversibles reaccionan de forma covalente con el receptor, impidiendo su actividad enzimática de forma permanente (96). Esto se traduce en que los FGFRinh irreversibles mantienen un efecto inhibitorio más potente y que perdura más allá de su anclaje con el receptor, de hecho hasta que el complejo FGFR:FGFRinh es transportado en una vesícula de endocitosis para su degradación hacia los lisosomas de la célula.

La **tabla 2** recoge algunos de los FGFRinh desarrollados en poblaciones molecularmente seleccionadas y su mecanismo de acción, así como las señales incipientes de eficacia objetivadas durante los ensayos fase 1 y las toxicidades que han ayudado a redefinir su dosis óptima para los subsecuentes ensayos fase 2.

Tabla 2. Ensayos fase 1 desarrollando FGFRinh en poblaciones de pacientes molecularmente seleccionados.

FGFRinh	Diana	RP2D	DLTs	Signos iniciales eficacia	Ref
Pan-FGFRinh selectivos 2ª generación					
Pan-FGFRinh reversibles					
AZD4547	FGFR1-3	80 mg vo. BD continuo	Fallo renal Mucositis Alteración fx hepática Hiperfosfatemia	- Escalada: 1 PR FGFR1amp escNSCLC, 4 SD (2 FGFR3mut vejiga, 1 FGFR1amp mama, 1 FGFR1amp escNSCLC). - Expansión FGFR1amp escNSCLC: 1 PR, 4 SD. - Expansión FGFR2amp gástrico: 1 PR, 4 SD.	(97-100)
Infigratinib (BGJ398)	FGFR1-3	125 mg vo. OD intermitente (3sem/1)	Transaminitis Hiperfosfatemia Toxicidad corneal	7 PR (4 FGFR1amp escNSCLC, 3 FGFR3mut vejiga), otras SD (FGFR1/2amp-FGFR3mut mama, FGFR2trans/mut vías biliares). - Cohorte FGFR1amp escNSCLC: 4 PR, 14 SD. - Cohorte FGFR3mut vejiga: 3 PR, 3 SD.	(101)
Debio1347	FGFR1-3	80 mg vo. OD continuo	Sequedad mucosas Estomatitis Hiperamilasemia Hipercalcemia Hiperfosfatemia Hiperbilirrubinemia	6 PR (2 FGFR3trans ca. urotelial, 1 FGFR2amp endometrio, 1 FGFR2trans CCA, 1 FGFR2amp/mut cérvix, 1 FGFR1amp/FGFR2trans mCRC), 16 SD.	(102)
Rogaratinib (BAY1163877)	FGFR1-4	800 mg vo. BD continuo	No alcanzadas	- Escalada: 1 PR FGFR3 mRNAh escORL, 1 FGFR1 mRNAh ACC lengua, 1 FGFR1 mRNAh escNSCLC, 5 SD (1 FGFR3 mRNAh gástrico, 1 escNSCLC, 1 adeNSCLC; 1 FGFR2 mRNAh mama; 1 FGFR1 mRNAh hemangioendotelioma). - Expansión FGFRalt ca.urotelial: 12 CR o PR.	(103-105)
LY2874455	FGFR1-4	16 mg vo. BD continuo	Hiperfostatemia Transaminitis Fatiga	- Escalada: 1 PR gástrico, 14 SD. - Expansión NSCLC: 11 SD. - Expansión gástrico: 1 PR, 12 SD.	(106)
Erdafitinib (JNJ42756493)	FGFR1-4	10 mg vo. OD intermitente (1sem/1)	Transaminitis	- Escalada: 5 PR (3 FGFR2/3trans ca. urotelial, 1 FGFR3trans glioblastoma, 1 FGFR2trans endometrio). - Cohorte FGFRalt ca. urotelial: 12 CR/PR. - Cohorte FGFRalt CCA: 3 CR/PR.	(107-110)
FP-1039	FGF trap	20 mg/kg ev. intermitente (4sem/2)	Urticaria Perforación GI Neutropenia Debilidad muscular	No clara eficacia en pacientes no FGFRalt seleccionados. SD (41% de pacientes, 1 mCPRC -20% reducción tumoral durante >7 meses y descenso de captación FDG-PET).	(111)

Pan-FGFRinh irreversibles					
Futibatinib (TAS120)	FGFR1-4	20 mg vo. OD continuo	Transaminitis Hiperbilirrubinemia Elevación CPKs	- Escalada: 4 PR (3 FGFR2trans CCA, 1 FGFR1mut ODG). - Cohorte FGFRalt CCA: 10 PR (7 FGFR2trans, 2 FGFR2rear, 1 co-rear/amp), 15 SD FGFR2trans.	(112, 113)
PRN1371	FGFR1-4	Pendiente	No alcanzadas	1 SD (FGFR1mut mama).	(114)
FGFRinh ultra-selectivos de 3ª generación					
Bemarituzumab (FPA144)	FGFR2b (isoform2b)	15 mg/kg ev. q2w	No alcanzadas	Cohorte FGFR2b-over gástrico: 5 PR -4 confirmadas-	(83)
MGFR1877S	FGFR3	30 mg/kg ev. q28d	Trombocitopenia	9 SD (5 ca. urotelial, 2 ACC, 2 carcinoides).	(115)
Roblitinib (FGF401)	FGFR4-βklotho	120 mg vo. OD (posología en ayunas)	Transaminitis Hiperbilirrubinemia	Cohorte HCC: tasa global de respuesta 8%	(116)
Fisogatinib (BLU554)	FGFR4	600 mg vo. OD continuo	Dolor abdominal Fatiga	Cohorte HCC FGF19 IHC+: 1 CR, 4 PR, 6 SD.	(117)

Abreviaciones: RP2D (Dosis Recomendada para el Ph2); DLTs (Toxicidad Limitante de Dosis); Ref (referencia); vo (vía oral); ev (vía endovenosa); BD (dos veces al día); OD (una vez al día); q2w (dosificación cada 2 semanas); q4w (dosificación cada 28 días); PR (Respuesta Parcial); SD (estabilización); amp (amplificado); mut (mutado); trans (translocado); rear (re-ordenamientos génicos); over: sobreexpresión; mRNAh (niveles altos de expresión ARN mensajero); FGFRalt (alteraciones del FGFR); escNSCLC (carcinoma de pulmón no microcítico histología escamosa); adeNSCLC (carcinoma de pulmón no microcítico histología adenocarcinoma); ca. urotelial (carcinoma urotelial); CCA (colangiocarcinoma); mCRC (cáncer colorrectal metastásico); escORL (carcinoma escamoso del área de cabeza y cuello); ACC (Carcinoma Adenoide quístico); perforación GI (perforación GastroIntestinal); mCPRC (Cáncer de Próstata Resistente a la Castración metastásico); CPKs (enzimas creatinina quinasa); ODG (OligoDendroGlioma); HCC (HepatoCarcinoma); FGF19 IHC+ (ImmunoHistoquímica positiva para la expresión del ligando FGF19).

De hecho, algunos de los FGFRinh ya están en fases avanzadas del desarrollo: por ejemplo, erdafitinib, ha sido el primer inhibidor selectivo aprobado por la *FDA* como fármaco anti-canceroso para el tratamiento para el carcinoma urotelial refractario con mutaciones o translocaciones del *FGFR2/3*, a la progresión durante o tras primera línea de quimioterapia con platinos (118). Además, recientemente la *FDA* también ha dado su aprobación acelerada a otro FGFR1-3inh reversible, pemigatinib, para colangiocarcinomas con translocaciones o fusiones del *FGFR2*, en base a los resultados del ensayo fase 2 *FIGHT-202* (119).

En la actualidad, aún queda por discernir si el efecto anti-tumoral observado con los MTKI en comparación con los FGFRinh se debe o no a su inhibición simultánea del VEGFR y/o sobre otras quinasas, y si los efectos secundarios indeseados de estos MTKI podrían ahorrarse optimizando los FGFRinh en poblaciones de pacientes molecularmente seleccionados. Lo que parece claro es que el éxito de los ensayos desarrollando FGFRinh dependerá de que seamos capaces comprender mejor su mecanismo de acción y de identificar con mayor precisión biomarcadores predictivos de respuesta que nos permitan seleccionar de forma aquellos pacientes que pueden obtener un mayor beneficio de estos fármacos. El [anexo 1](#) resume la relación actual de algunos de los ensayos desarrollando FGFRinh en monoterapia en tumores sólidos.

3.5. Potenciales biomarcadores predictivos de respuesta a los FGFRinh.

A medida que los distintos FGFRinh van avanzando en las distintas etapas de su desarrollo, resulta fundamental analizar algunos de los datos de eficacia obtenidos hasta la fecha para intentar identificar los posibles determinantes moleculares de respuesta a estos fármacos (ver [tabla 2](#)). En global, las alteraciones moleculares de la vía *FGFR:FGF* son raras, y de hecho, se detectaron en sólo un 7.1% de los pacientes (66% amplificaciones, 26%

mutaciones, 8% translocaciones) de una cohorte de más de 4.853 muestras tumorales, incluyendo 47 subtipos histológicos distintos (120).

Por lo general, las translocaciones del gen *FGFR* resultan en una activación constitutiva del receptor, debido a la fusión del dominio quinasa intracelular del *FGFR* con la porción N-terminal de otro gen que contiene algún dominio que promueve la dimerización continua del receptor resultante, con su consecuente fosforilación intracelular y activación oncogénica de la vía (71). Precisamente han sido los pacientes con translocaciones del *FGFR* aquellos que han presentado una mayor eficacia en los ensayos fase 1 iniciales evaluando estos FGFRinh. Los 3 pacientes con colangiocarcinoma *FGFR2*-alterado (2 translocados y 1 mutado) tratados en el ensayo fase 1 con BGJ398 presentaron una reducción del tamaño tumoral (101), y estos datos impulsaron el posterior desarrollo del ensayo fase 2 específico en esta población seleccionada (121). La DCR reportada en el ensayo fase 2 fue del 83.6% (IC 95%, 72.5-91.5) en el subgrupo de 71 pacientes *FGFR2*-translocados (122). Asimismo, entre los 28 pacientes afectados de colangiocarcinoma *FGFR2*-translocado tratados con TAS-120, se objetivaron 7 respuestas parciales confirmadas (113). Cabe destacar que 3 de estas respuestas ocurrieron en pacientes previamente tratados con un FGFRinh reversible, avalando así los estudios preclínicos *in vitro* que demuestran que los FGFRinh covalentes podrían ser efectivos en aquellos casos en los que la resistencia a un FGFRinh previo es mediada por mutaciones en el residuo catalítico del FGFR (123).

No sólo las fusiones en *FGFR2* serían eventos oncogénicos en los colangiocarcinomas, sino que se han descrito respuestas en relación con otras translocaciones en distintas histologías: cuatro carcinomas uroteliales *FGFR3-TACC3* y uno *FGFR2-BICC1/FGFR2-CASP7*, un cáncer de colon *FGFR2-INA*, un glioblastoma *FGFR3-TACC3* y un carcinoma endometrial *FGFR2-BICC1/FGFR2-OFD1*, entre otras (107, 124). Las implicaciones de estos resultados suponen un nuevo reto en el ámbito de la medicina de precisión, dado que será necesario un esfuerzo adicional para mejorar las técnicas de secuenciación para ser capaces de detectar estas raras translocaciones y

entender las consecuencias funcionales de los nuevos genes de fusión resultantes (125).

En segundo lugar, las mutaciones del *FGFR3* en carcinomas uroteliales son el ejemplo más frecuente de mutaciones *FGFR* entre los tumores sólidos, y los datos disponibles confirman la actividad de los FGFRinh en este subgrupo de pacientes (97, 98, 101, 107). La eficacia objetivada en forma de 11 respuestas parciales en la cohorte de carcinoma urotelial *FGFR*-alterado del estudio fase 1 con erdafinitib, fue validada en el ensayo fase 2 posterior, con una DCR de hasta 80% -incluyendo pacientes con translocaciones y mutaciones de los genes *FGFR2/3*- (126, 127).

A diferencia de las mutaciones activadoras del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), la mayoría de las mutaciones del *FGFR* ocurren fuera del dominio tirosina quinasa. Estos cambios de aminoácidos en la porción extracelular o transmembrana del receptor favorecen su dimerización, generalmente mediada por un incremento de la afinidad al ligando o mediante la formación de puentes disulfuro. Sin embargo, no todas las mutaciones se traducen en una activación constitutiva de la vía del *FGFR*, y serán necesarios futuros estudios funcionales para discernir mejor cuáles de estas mutaciones son en realidad activadoras y sensibles de responder a un FGFRinh (128).

Además, y a pesar de ser la alteración molecular *FGFR* más frecuente en los tumores sólidos, aún queda por determinar el impacto que la amplificación de genes del *FGFR* y/o *FGFs* puede tener en la eficacia de los FGFRinh. La amplificación del gen *FGFR1* está asociada con la respuesta tumoral a FGFRinh en células de carcinoma escamoso de pulmón (129), pero hay datos que indican que no todos los casos con amplificación del *FGFR1* presentan sobreexpresión del ARN mensajero (mRNA) (130), sugiriendo que los niveles de mRNA *FGFR1* podrían servir como un mejor biomarcador predictivo en cáncer de pulmón (131). En esta línea, también se ha observado un mayor beneficio clínico de los FGFRinh en pacientes con cáncer de mama que

presentan mayores niveles de amplificación del *FGFR1* (97), precisamente dónde la ganancia en el número de copias del gen parece correlacionarse estrechamente con altos niveles de expresión del mRNA que se traducirían en mayores niveles de proteína (48). Estudios recientes señalan que los FGFRinh sólo deberían utilizarse en pacientes que presenten ambas alteraciones, la amplificación génica del *FGFR1* con su correspondiente elevada expresión proteica (132). Sin embargo, hay que tener en cuenta que a veces existe una pobre correlación entre los resultados genómicos y los niveles de expresión proteica de los receptores tirosina quinasa (133), y se deberían implementar métodos de análisis proteómico (o transcriptómico) más precisos para evaluar adecuadamente los niveles de proteínas FGFR.

Adicionalmente, en el caso de algunos tumores como ocurre en el cáncer gástrico, no sólo sería un requisito tener un alto nivel de amplificación del *FGFR2* con su correspondiente sobreexpresión de mRNA y/o proteína, sino que incluso el grado de homogeneidad con que exista la amplificación clonal del gen *FGFR2* y la isoforma *FGFR2* C3 que se exprese, serían factores necesarios para predecir la sensibilidad al bloqueo del FGFRinh (134). Además, la co-amplificación de los genes que codifican para los ligandos *FGF3/4/19* ha demostrado aumentar la sensibilidad a los FGFRinh en líneas celulares con amplificación del *FGFR* (59). La caracterización genómica del locus del gen *FGFR1* a nivel del amplicon 8p12 en tumores *FGFR1*-amplificados ha demostrado un frecuente incremento de la expresión de genes colindantes (*BAG4*, *LSMI*, *WHSC1L1*), por lo que los análisis de expresión génica podrían ser cruciales para entender mejor los mecanismos de sensibilidad a los FGFRinh en estos casos de co-dependencia (135).

En medio de este entramado de complejidad, los niveles de expresión del mRNA *FGFR* han emergido como un posible biomarcador predictivo más fiable que las alteraciones genómicas utilizadas hasta ahora, véase translocaciones, mutaciones o amplificaciones. En un ensayo *in vivo* con PDXs de múltiples tipos tumorales, debio1347 fue capaz de inducir regresiones tumorales en el 33% de los modelos que presentaban alguna

alteración en el número de copias de los genes del *FGFR* o alguna fusión-mutación, pero llamativamente, también se objetivaron respuestas en el 29% de modelos sin alteraciones genómicas conocidas. Análisis dirigidos demostraron que precisamente todos los PDXs con beneficio presentaban niveles elevados de expresión del mRNA (mRNAh) de al menos uno de los *FGFR* (136). A raíz de esta creciente evidencia, algunos ensayos fase 1 ya han empezado a implementar metodologías de pre-selección de los pacientes candidatos basadas en la secuenciación del ARN (RNAseq), identificando pacientes sensibles a FGFRinh entre histologías en las que tradicionalmente no se consideraba una carcinogénesis *FGFR*-mediada (p.ej. carcinoma adenoide quístico de lengua *FGFR1* mRNAh y carcinoma escamoso del área de cabeza y cuello *FGFR3* mRNAh) (104). Una de las grandes incógnitas que acompaña estos hallazgos será el de cómo establecer un punto de corte para definir qué tumores se consideran FGFR-dependientes en función de sus niveles de expresión del *FGFR* mRNA, sobretodo teniendo en cuenta que la vía del *FGFR* desempeña un papel clave en muchos procesos biológicos de la célula sana, y que cada tejido presenta una dependencia selectiva por alguno de los receptores (137). Además, se ha objetivado que no siempre existe buena correlación entre las alteraciones del ADN con el mRNA y/o proteína asociada, por lo que es controvertido establecer cuál sería la mejor estrategia de selección de candidatos: los métodos basados en ADN podrían estar excluyendo pacientes que, aún sin alteración genómica sobreexpresan mRNA-proteína. Asimismo, los métodos de transcriptómica o proteómica podrían perder la detección de aquellos pacientes con alteraciones del ADN activadoras sin sobreexpresión (p.ej. mutaciones del *FGFR* sin sobreexpresión mRNA ni proteína FGFR).

La **figura 3** ilustra algunos de los potenciales biomarcadores predictivos identificados, así como las principales técnicas de detección empleadas como métodos de pre-selección molecular que han permitido enriquecer las poblaciones de pacientes en los ensayos fase 1 testando FGFRinh.

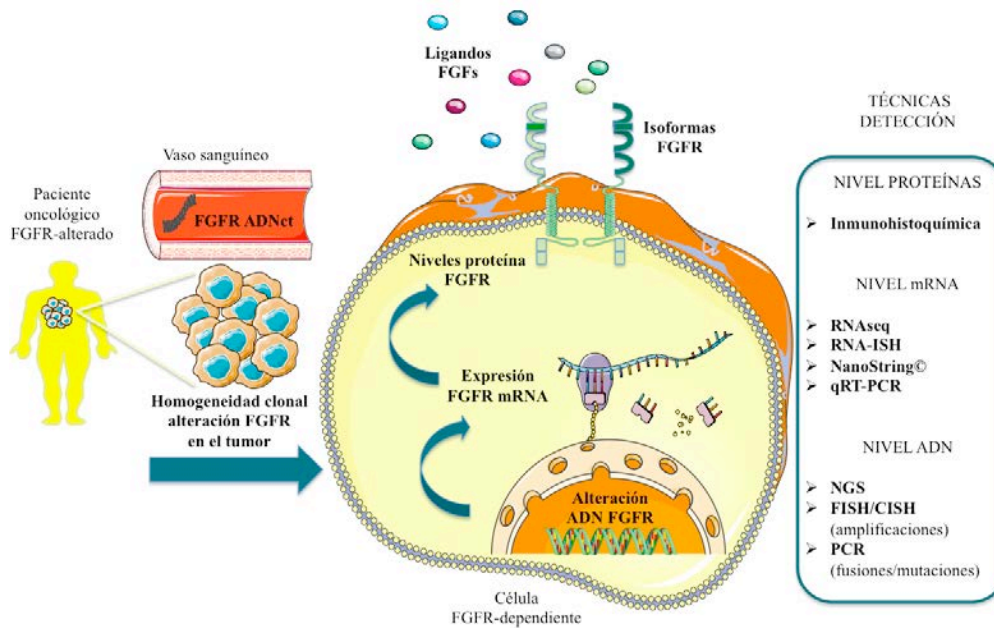


Figura 3. Potenciales biomarcadores predictivos a los FGFRinh y métodos de detección. Hasta la fecha, las técnicas de detección de alteraciones a nivel genómico (ADN) han sido de las más utilizadas para el cribado molecular de pacientes con tumores *FGFR*-alterados (técnicas de ultra-secuenciación genómica (NGS), hibridación in-situ fluorescente (FISH), hibridación in-situ cromogénica (CISH) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)). Sin embargo, hay datos que sugieren que los niveles de expresión del *FGFR* mRNA podrían ser un mejor biomarcador predictivo al bloqueo FGFR (técnicas de secuenciación del mRNA (RNAseq; *Nanostring*®), hibridación in-situ RNA (RNA-ISH) y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (qRT-PCR)), o incluso los niveles de proteínas FGFR detectados mediante inmunohistoquímica. Sin embargo, todavía queda por discernir el rol que desempeñan la sobreexpresión de los ligandos FGFs, el subtipo de isoforma FGFR y la homogeneidad clonal con se que expresen estas alteraciones, y por lo tanto, cuál será también la mejor forma de evaluarlos en la práctica clínica. Mientrastanto, la detección de las distintas alteraciones del *FGFR* en ADN tumoral circulante (ADNct) está emergiendo como una estrategia prometedora para mejorar la selección de los pacientes candidatos a recibir terapia con FGFRinh.

Es importante reflexionar detenidamente que los estudios preclínicos disponibles al inicio del desarrollo precoz de estos FGFRinh no fueron suficientes para predecir las alteraciones génicas que resultarían mejores biomarcadores predictivos. Sin embargo, la capacidad de adaptación y desarrollo de nuevas estrategias en el ámbito del desarrollo precoz de nuevos fármacos, como la implementación de ensayos de tipología cesta o “basket” que incluyen pacientes con múltiples tipos tumorales pre-seleccionados según su alteración *FGFR*, han sido capaces de aportar información muy valiosa para guiar el posterior desarrollo de un FGFRinh en subgrupos concretos de pacientes respondedores (138). De hecho, las agencias regulatorias ya se han dado cuenta de la importancia de estos ensayos fase 1/2 bien diseñados, y han

empezado a adaptar la tradicional vía de aprobación de nuevos fármacos en poblaciones pequeñas de pacientes con alteraciones moleculares infrecuentes.

En resumen, existen resultados prometedores que avalan el desarrollo de FGFRinh en ciertos subtipos histológicos y genómicos, incluyendo ¹los carcinomas uroteliales *FGFR3*-mutado/translocados, los ²colangiocarcinomas *FGFR2*-translocados y ³cualquier tipo tumoral con una fusión en los genes *FGFR1-3*, inclusive para el tratamiento de tumores del sistema nervioso central con FGFRinh que cruzan la barrera hematoencefálica (107). Sin embargo hasta ahora, las amplificaciones del *FGFR* y el *11q* han sido poco fiables como biomarcadores predictivos para esta clase de agentes dirigidos (139) y todavía hay una limitada evidencia sobre el papel que pueden desempeñar los niveles de mRNA-proteína del FGFR:FGF, la expresión de isoformas específicas o la detección de estas alteraciones en ADN tumoral circulante (ADNct) en plasma. Por ello, resulta crucial continuar refinando nuestra comprensión sobre las alteraciones que conducen a la adición de esta vía y desarrollar métodos más fiables para medir todas estas aberraciones moleculares con mayor precisión (140).

3.6. Mecanismos de resistencia a los FGFRinh y papel de la heterogeneidad tumoral.

A pesar del esfuerzo por determinar aquellos biomarcadores predictivos que nos permitan identificar a los pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse de un FGFRinh, la realidad es que no todos los pacientes cuyos tumores sean portadores de dicha alteración molecular van a responder al tratamiento. Se calcula que entre el 40-50% de los pacientes seleccionados para una alteración oncogénica no responderá nunca a dicha terapia dirigida ya de entrada (resistencia primaria o intrínseca). Otros en cambio, pueden presentar un alto índice de respuesta, seguido del desarrollo de resistencia al agente diana y posterior recidiva del tumor (resistencia secundaria o adquirida).

Tradicionalmente, se han utilizado modelos preclínicos para identificar los mecanismos de resistencia a algunas de las primeras terapias dirigidas, como ocurrió con los inhibidores de BRAF en melanoma (141). Sin embargo, las altas tasas de eficacia objetivadas con el bloqueo de la vía en los melanomas *BRAF* V600E-mutado no fueron extrapolables en el caso de los cánceres de colon con la misma alteración molecular, y es que en este caso, los modelos preclínicos no fueron capaces de replicar todos los factores de la enfermedad en humanos (142). Por esto, en los últimos años, se han ido implementando estudios correlativos en el marco de ensayos clínicos, con el objetivo de evaluar los mecanismos de resistencia primaria y secundaria en muestras obtenidas de los propios pacientes (22).

Una de las principales dificultades en la caracterización molecular de los tumores es precisamente la heterogeneidad tumoral. Los tumores humanos no son entidades homogéneas sino que están compuestos por distintas clonas de células tumorales, cada una de las cuáles tiene sus características diferentes (143). Esta variabilidad no se limita a los eventos genéticos, sino prácticamente a todas las características fenotípicas (144). Las nuevas tecnologías, como la ultra-secuenciación genómica (145) o los perfiles de expresión génica (146) han ayudado a demostrar la evolución clonal de los tumores en humanos, dejando entrever claramente que la heterogeneidad genética no sólo existe entre las diferentes células que componen un tumor (heterogeneidad espacial), sino que también existe entre el tumor primario y sus metástasis a distancia (heterogeneidad temporal). Esta heterogeneidad tumoral supone todo un desafío para el desarrollo de terapias dirigidas en poblaciones de pacientes molecularmente seleccionados. En algunos casos, como en el carcinoma de pulmón no microcítico *EGFR*-mutado, algunos subclones del tumor primario ya son intrínsecamente resistentes a la terapia dirigida con fármacos anti-EGFR antes de iniciar el tratamiento por albergar mutaciones en el gen *KRAS* (147), y en cambio, en otros casos todas las células son inicialmente sensibles, aunque algunos de los subclones desarrollan resistencia al estar bajo presión terapéutica, adquiriendo la mutación *EGFR* T790 *de novo* (148).

En 2012, Gerlinger M. *et al* fueron pioneros en ilustrar esta heterogeneidad tumoral, calculando que sólo aproximadamente el 30% de las mutaciones presentes en todas las muestras de un paciente podrían identificarse con una única biopsia de la lesión tumoral (149). Así pues, la implementación de múltiples biopsias tumorales, espacial (dentro del propio tumor primario) y temporalmente separadas (previo inicio terapia dirigida, en el momento de máxima respuesta, a la progresión de las distintas metástasis y en el momento del fallecimiento (autopsia en caliente)), la recogida de líquidos biológicos (líquido ascítico o pleural) y plasma (estudio de ADNct), han demostrado ser una herramienta extremadamente útil para el estudio de dicha heterogeneidad tumoral (150). La aplicación de estas estrategias traslacionales en paralelo a las fases precoces del desarrollo de los fármacos ha permitido que en la actualidad ya estemos identificando mecanismos de resistencia adquirida a terapias dirigidas entre los pacientes tratados en los ensayos fase I (151, 152). La valiosa información obtenida con la secuenciación de estas muestras ha guiado el posterior desarrollo racional de inhibidores de segunda generación diseñados para revertir estas resistencias, como es el caso del inhibidor de TRK Loxo-195, que ha llegado incluso a ser validado en la misma cohorte de pacientes donde se han descubierto estas resistencias (153).

Mientras que la resistencia a los inhibidores tirosina quinasa es un hecho en la práctica clínica actual, todavía no se ha estudiado en profundidad la resistencia a los inhibidores del FGFR. Gran parte de la información de la que disponemos se basa en estudios preclínicos. Igual que ocurre con otros inhibidores tirosina quinasa, en ocasiones la resistencia puede causar la selección de poblaciones clonales que presentan mutaciones puntuales en aminoácidos del dominio tirosina quinasa, conocidas como *gatekeeper*, cuya alteración implica probablemente un reposicionamiento de algunos residuos críticos que rodean el sitio de unión al ATP del receptor, desestabilizando así las interacciones con sus inhibidores competitivos (154). De ahí que los inhibidores irreversibles hayan demostrado eficacia en pacientes previamente tratados con inhibidores reversibles (155). Estas mutaciones *gatekeeper* han

sido ya descritas en tres de los receptores *FGFR1-3*, como son la *FGFR1-V651M* (156), *FGFR2-N550K/H* (157) o *FGFR3-V555M* (158), por ejemplo. La activación de la vía de *PI3K/AKT* (159), en ocasiones como consecuencia de la pérdida o inactivación del gen *PTEN* (160), o la transición de epitelio a mesénquima (161), también han sido descritos como potenciales mecanismos de insensibilidad a los inhibidores del FGFR. Asimismo, la activación sinérgica de otros receptores tirosina quinasa podría atenuar la respuesta al bloqueo FGFR, incluyendo los de la familia de EGFR (162), MET (163), IGFR (164) o PDGFR α (165), entre otros. Esta activación alternativa de receptores de membrana explicaría la baja tasa de respuestas objetivada en el subgrupo *FGFR1*-amplificado (166) y avalaría la necesidad de combinar distintos agentes diana para conseguir un bloqueo completo de las señales inductoras de supervivencia (167). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la doble inhibición con otro agente dirigido podría no ser suficiente en algunos casos, si existiera además una reactivación redundante de la vía MAPK subyacente (168), asociada en algunos casos a la mutación de *KRAS* o amplificación de *NRAS* (169).

Algunos grupos ya han identificado los primeros mecanismos genéticos de resistencia clínicamente relevantes entre pacientes tratados con inhibidores del FGFR. Goyal L. *et al* demostraron la aparición de mutaciones policlonales secundarias en el gen *FGFR2* como mecanismo de resistencia adquirido en tres pacientes con colangiocarcinoma *FGFR2*-translocado respondedores a infgratinib (170). El análisis molecular integral del ADNct recogido en distintos puntos de la enfermedad, así como de las muestras de los tumores primarios y de las metástasis a la progresión, dejó entrever un sorprendente grado de heterogeneidad intra- e inter-lesional, con el hallazgo de diferentes mutaciones puntuales *FGFR2* entre las distintas metástasis de un mismo paciente: N549H, N549K, V564F, E565A, K659M, L617V y K641R. Estos datos confirman la heterogeneidad tumoral y la aparición de mutaciones *gatekeeper* en el dominio tirosina quinasa del FGFR como dos de los principales mecanismos de resistencia a los FGFRinh, así como la señalización AKT-mediada a través de mutaciones activadoras en *PI3KCA* o

inactivadoras en *PTEN*, como un posible mecanismo adicional de resistencia FGFR-independiente (171).

En el caso de los pacientes *FGFR2*-amplificados, se ha descrito la aparición de una translocación *FGFR2-ACSL5* como mecanismo de resistencia en un paciente con cáncer gástrico que presentó una dramática y prolongada respuesta al bloqueo con LY2874455 (172). Además, en un modelo PDX con carcinoma gástrico difuso, se ha demostrado que los tumores *FGFR2*-amplificados cuya supervivencia es altamente *FGFR2*-dependiente desarrollan rápidamente resistencia a AZD4547, a través de la inhibición de GSK3 β mediante su fosforilación por la proteína quinasa C (PKC) (173). La **figura 4** ilustra algunos de los potenciales mecanismos de resistencia a los inhibidores del FGFR aquí descritos.

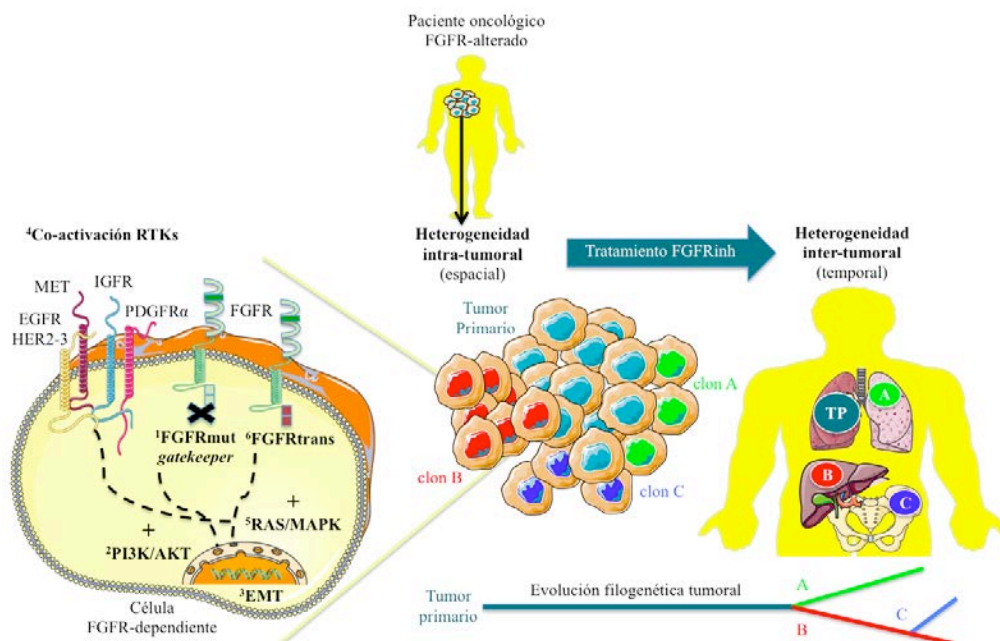


Figura 4. Potenciales mecanismos de resistencia a los FGFRinh. La heterogeneidad intra-tumoral, o existencia de distintos clones (A, B, C) dentro de un mismo tumor primario (TP), y la heterogeneidad inter-tumoral, o distribución metastásica diferencial de los distintos clones de un tumor a lo largo de su evolución, son conocidos mecanismos de resistencia a las terapias dirigidas. Además, a nivel celular, se han descrito distintos mecanismos de resistencia a los FGFRinh: ¹las mutaciones puntuales *gatekeeper* en el dominio tirosina quinasa intracelular de los receptores (FGFRmut); ²la activación de la vía de PI3K/AKT; ³la transición de epitelio a mesénquima (EMT); ⁴la activación sinérgica de otros receptores tirosina quinasa (RTKs); ⁵la reactivación redundante de la vía RAS/MAPK o ⁶la adquisición de nuevas translocaciones del *FGFR* (FGFRtrans).

3.7. Modelos de PDXs con aberraciones del *FGFR* como modelos preclínicos *in vivo*.

Se ha postulado que una de las principales causas de la falta de éxito de algunos de los nuevos fármacos desarrollados en el campo de la Oncología es la falta de modelos preclínicos precisos, que sean capaces precisamente de recapitular las características de heterogeneidad intrínseca de los tumores humanos. En el caso de las líneas celulares expandidas *in vivo*, parece obvio presuponer que estas células cancerosas hayan adaptado sus características a las condiciones de crecimiento fuera del microambiente tumoral. Además, la divergencia genética entre el tumor original y la línea celular derivada de éste puede exacerbar todavía más dichas diferencias (174).

Por esto, en los últimos años se ha hecho un esfuerzo por establecer protocolos para el desarrollo de xenoinjertos derivados de pacientes (PDXs) a partir de muestras de biopsias de tumores de pacientes, modelos que son histológica e inmuno-histoquímicamente indistinguibles del tumor de origen, muestran respuestas a tratamientos similares y son bastante estables tras la transferencia a sucesivas generaciones (175). En el campo del desarrollo precoz de fármacos, estos PDXs han evolucionado como uno de los mejores modelos para ensayos co-clínicos de eficacia a realizar en paralelo al tratamiento de pacientes -modelos *avatar*- con nuevos agentes diana (176). Además, la obtención de cultivos primarios tridimensionales derivados de estas mismas muestras tumorales, ha permitido la perpetuación de las muestras para ampliar las herramientas disponibles para desarrollar investigación traslacional (177).

Una de las principales limitaciones a la hora de establecer estos PDXs ha sido la dificultad para obtener muestras tumorales de óptima calidad: en algunos casos, algunas de las biopsias tumorales apenas alcanzan la celularidad requerida para el diagnóstico histológico del cáncer, siendo insuficientes para su implantación en un modelo de ratón; en otras circunstancias, la localización del propio tumor o las condiciones basales del paciente contraindican la realización de una maniobra invasiva, por el riesgo vital que conllevaría dicha

punción. Pero los investigadores han sabido adaptarse a las adversidades, adaptando nuevos protocolos para la generación de PDXs a partir incluso de líquidos biológicos, como la implantación de células provenientes del ultra-centrifugado de líquido ascítico (173, 178) o a partir de células tumorales circulantes (CTCs) de muestras sanguíneas (23). La **figura 5** resume un posible protocolo de generación de PDXs y líneas celulares a partir de muestras de pacientes *FGFR*-alterados y su utilidad como herramienta investigacional.

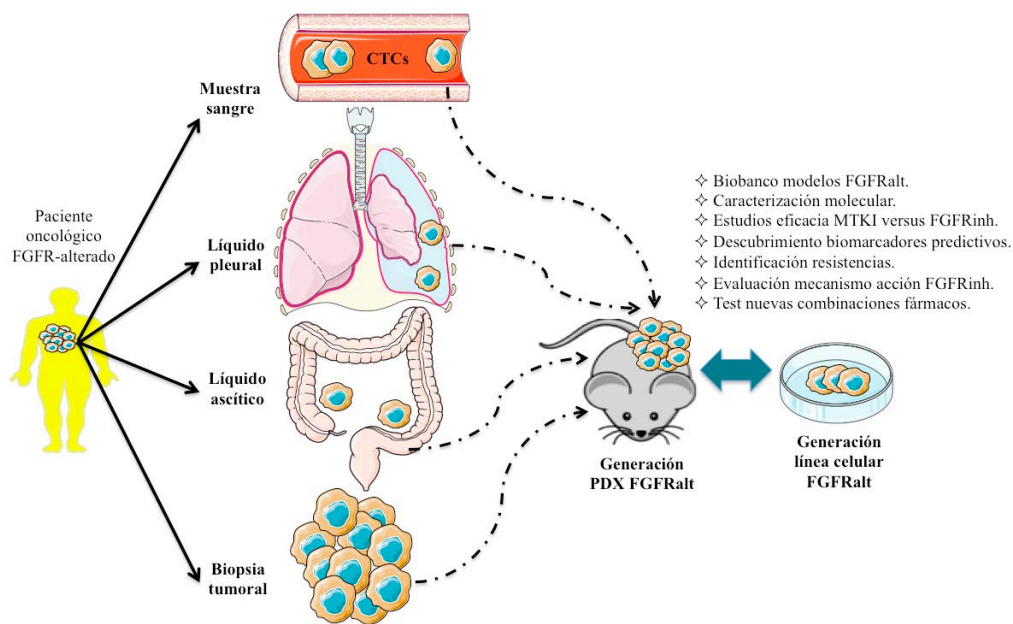


Figura 5. Protocolo de generación de PDXs y líneas celulares *FGFR*-alteradas y su utilidad como herramienta investigacional. Los xenoinjertos derivados de pacientes (PDXs) suelen generarse mediante la implantación de muestras de tejido procedentes de biopsias tumorales de pacientes *FGFR*-alterados (*FGFR*Ralt). Además, también se han obtenido PDXs generados tras la implantación del remanente celular obtenido del ultra-centrifugado de líquido ascítico o pleural, y aunque en fase todavía experimental, del aislamiento de células tumorales circulantes (CTCs) de la sangre de pacientes. La generación de PDXs y líneas celulares *FGFR*Ralt es una valiosa herramienta para realizar estudios preclínicos en el marco de proyectos traslacionales en poblaciones de pacientes seleccionados molecularmente.

La caracterización genómica de PDXs ha permitido profundizar en la biología molecular de la vía del *FGFR:FGF*, la heterogeneidad de los tumores que albergan sus alteraciones asociadas y sus incipientes mecanismos de resistencia a los FGFRinh, como los modelos PDXs *FGFR2*-amplificados de cáncer gástrico (172, 173) o *FGFR2*-translocados de colangiocarcinoma (179).

Sin embargo, todavía hacen falta nuevos modelos PDXs *FGFR*-alterados que nos permitan ampliar el horizonte del conocimiento sobre la carcinogénesis diferencial *FGFR*-mediada en los distintos subtipos histológicos (p.ej. mama versus vías biliares versus vejiga), las diferencias subyacentes entre las distintas alteraciones moleculares (p.ej. amplificaciones versus translocaciones versus mutaciones) que afectan los genes de los diferentes receptores *FGFR* (p.ej. *FGFR1* versus *FGFR2* versus *FGFR3*), la capacidad de predecir respuestas de los potenciales biomarcadores (p.ej. ADN versus mRNA versus proteína) y la validación de mecanismos de resistencia ya identificados o aún nuevos por descubrir.

Adicionalmente, estos PDXs podrían resultar extremadamente útiles para el estudio del mecanismo de acción de los distintos inhibidores del *FGFR*, detallando exactamente su papel en el bloqueo de la angiogénesis, uno de los puntos clave para el crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis. El incremento de la regulación del *VEGFR:VEGF* se ha observado en distintos tipos tumorales, siendo *VEGFR2* el principal mediador de la angiogénesis inducida por *VEGF* en modelos preclínicos (37). Bevacizumab (BVZ), es un anticuerpo monoclonal humanizado con alta afinidad por el *VEGF-A* humano (h*VEGF-A*), que bloquea la activación de *VEGFR1-2*. Sin embargo, la aplicabilidad de BVZ en modelos preclínicos está limitada, pues BVZ presenta menor afinidad por el *VEGF-A* murino (m*VEGF-A*) debido a diferencias estructurales inter-especies del *VEGF* (180). DC101, un anticuerpo específico anti-*VEGFR2* murino (m*VEGFR2*), ha demostrado la inhibición eficaz de la angiogénesis *in vivo* (181). El bloqueo anti-angiogénico con DC101 permitiría estudiar con más precisión el papel de la angiogénesis en modelos PDXs *FGFR*-alterados. La **figura 6** ilustra las posibles estrategias disponibles para inhibir la angiogénesis en modelos preclínicos *in vivo*.

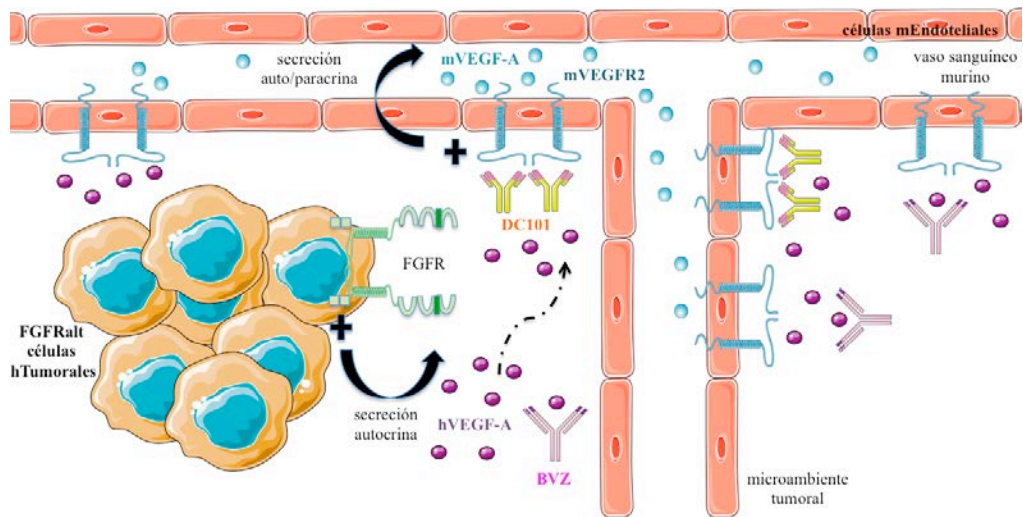


Figura 6. Bloqueo de la angiogénesis en modelos PDXs *FGFR*-alterados. Con la implantación de la muestra tumoral (FGFRalt células hTumorales), se generan neovasos de origen murino (células mEndoteliales) que expresan el receptor murino del VEGFR2 (mVEGFR2). La activación (+) de la angiogénesis induce una secreción auto/paracrina de VEGF-A por parte de las propias células endoteliales murinas (mVEGF-A), que es la que mayoritariamente activa los mVEGFR2. En paralelo, la activación de la vía del FGFR en las células tumorales, induce la secreción autocrina de VEGF-A humano (hVEGF-A), para perpetuar la activación de la angiogénesis mediante la activación del mVEGFR2. Bevacizumab (BVZ - anti-hVEGF-A-) y DC101 (anti-mVEGFR2), permiten el estudio *in vivo* del papel de la angiogénesis en PDXs, bloqueando la activación del mVEGFR2, tanto si es por el mVEGF-A como por el hVEGF-A.

4. HIPÓTESIS

4.1. Los modelos PDXs caracterizados genómicamente permiten identificar biomarcadores predictivos de respuesta a los FGFRinh.

4.2. El análisis de la muestra tumoral de los pacientes con las herramientas de análisis apropiadas, permite identificar aquellos pacientes que se pueden beneficiar más del tratamiento con FGFRinh.

4.3. El mecanismo de acción de los FGFRinh se puede caracterizar mediante estudios de eficacia en PDXs.

4.4. La heterogeneidad tumoral es un factor asociado a la resistencia a los FGFRinh.

5. OBJETIVOS

Objetivo principal

5.1. Correlacionar la actividad anti-tumoral de los FGFRinh en PDXs, con tal de identificar potenciales determinantes moleculares de sensibilidad al bloqueo de la vía.

Objetivos secundarios

5.2. Mejorar las herramientas genómicas disponibles para detectar alteraciones moleculares del *FGFR:FGF*.

5.3. Caracterizar la actividad anti-proliferativa y anti-angiogénica de los FGFRinh en PDXs con alteraciones moleculares del *FGFR*.

5.4. Estudiar mecanismos de resistencia (primaria y secundaria) en pacientes tratados con FGFRinh basados en la heterogeneidad tumoral.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. ESTUDIO RETROSPECTIVO: Análisis exploratorio de biomarcadores predictivos de respuesta en pacientes con cáncer avanzado tratados con pan-inhibidores del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFRinh).

6.1.1. Diseño del estudio.

Estudio retrospectivo de una cohorte de pacientes con cáncer avanzado tratados con FGFRinh en el contexto de ensayos clínicos fase 1, durante el período 2011-2016, dentro de la Unidad de Investigación y Terapia Molecular (UITM)-La Caixa del VHIO, en el Hospital Universitario Vall d'Hebrón (HUVH) de Barcelona. El objetivo era identificar a un subgrupo de pacientes portadores de una alteración específica en la vía del *FGFR:FGF* entre aquellos pacientes respondedores a la terapia con FGFRinh (182).

Este estudio se ha realizado de acuerdo a la normativa del Comité Institucional de Revisión de Protocolos (IRB) HUVH, y no ha sido preciso un consentimiento informado específico dado su carácter retrospectivo.

6.1.2. Selección de la muestra: circuito de derivación a la UITM.

La UITM-VHIO es una Unidad de ensayos fase 1 focalizada actualmente en el desarrollo clínico precoz de nuevos fármacos dirigidos. Los pacientes con tumores sólidos avanzados, refractarios y en progresión, para los que no exista una terapia convencional disponible, son derivados a la UITM para valorar su posible inclusión en un ensayo fase 1.

Con esta finalidad, se le explica al paciente candidato la posibilidad de realizar un estudio de cribado molecular, con el objetivo de identificar ciertas alteraciones genéticas en el tejido sobrante tumoral de su diagnóstico o biopsia, pues el conocimiento de estas alteraciones moleculares puede ser importante para intentar predecir el comportamiento del tumor y determinar el tratamiento óptimo. De acceder, el paciente firma de forma voluntaria el consentimiento informado del proyecto de investigación *VHIO “Perfil genético de tumores de pacientes candidatos a recibir tratamiento en el VHIO: muestras recogidas durante el pre-screening y al momento de la progresión (PR(AG)147-2009)”*, aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del HUVH (última versión marzo 2018).

Los resultados del perfil molecular obtenido de cada paciente son evaluados de forma multidisciplinar en un Comité de Fase 1, una reunión semanal en la que los investigadores clínicos discuten el valor predictivo de las distintas alteraciones detectadas y la idoneidad de recibir un agente dirigido. Según la disponibilidad de ensayos en la Unidad, el médico responsable decide, junto con el paciente, la posibilidad de inclusión en un ensayo fase 1 con una terapia dirigida (183).

6.1.3. Criterios de inclusión y exclusión.

A partir de los pacientes con análisis molecular disponible dentro del programa de *pre-screening VHIO*, se han seleccionado aquéllos con tumores portadores de aberraciones en los genes del *FGFR:FGF* e incluidos en ensayos fase 1 dónde se estaba testando un *FGFRinh*.

Se trata de pacientes mayores de 18 años, con múltiples tipos tumorales, refractarios a sus respectivos tratamientos convencionales según cada subtipo histológico. Los pacientes fueron incluidos en diferentes protocolos investigacionales, dependiendo de la disponibilidad de los ensayos en el

momento de su valoración en la *UITM*, y por lo tanto, firmaron el consentimiento informado respectivo de cada uno de dichos estudios. Todos los pacientes tenían evidencia de progresión confirmada de su enfermedad antes de su inclusión, cumplían con todos los criterios de elegibilidad requeridos por cada estudio y recibieron al menos una dosis del FGFRinh.

Todos los pacientes disponían de datos epidemiológicos y clínico-patológicos en curso de ensayo accesibles a través de las bases de datos digitales del hospital (SAP).

6.1.4. Variables clínico-patológicas recogidas.

Los siguientes datos han sido recogidos en una base de datos *excel* para su posterior correlación estadística:

- Datos epidemiológicos: fecha de nacimiento, sexo.
- Datos de patología molecular: tipo tumoral y subtipo histológico, herramienta de análisis molecular utilizada, el nivel de amplificación – ratio y nº de copias totales del gen *FGFR* en el caso del FISH-, alteración molecular del *FGFR:FGF* y otras co-alteraciones detectadas en el *pre-screening* molecular.
- Datos clínicos: número de líneas previas para el tratamiento de la enfermedad metastásica, tipo de FGFRinh recibido dentro de ensayo fase 1, mejor respuesta radiológica alcanzada y porcentaje de cambio en las lesiones diana, status en el ensayo en el momento de la revisión, fecha de la progresión confirmada, fecha del último control y/o del fallecimiento, en caso de aplicar.

La eficacia a los FGFRinh se ha analizado siguiendo los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST v.1.1.) (184).

El beneficio clínico (ClinBen) se ha definido como cualquier reducción del tamaño tumoral más el control de la enfermedad durante al menos ≥ 4 meses. El tiempo a la progresión tumoral (TTP) se ha definido como el tiempo entre el inicio de FGFRinh y la finalización por cualquier motivo.

6.1.5. Herramientas de análisis molecular de los pacientes.

El análisis molecular se ha realizado en muestras de archivo parafinadas procedentes del tumor primario o de lesiones metastásicas, según disponibilidad en el momento de valoración del paciente. Aún así, se ha intentado priorizar la utilización de la muestra obtenida más reciente, y a poder ser, de la lesión metastásica en progresión al último tratamiento específico recibido.

- Translocaciones del *FGFR*: El análisis de translocaciones del *FGFR* se ha realizado utilizando la tecnología *nCounter® (NanoString®)* (185), mediante el panel optimizado *VHIO fusion v.4.0.* para el *pre-screening* local, que actualmente permite la detección de hasta 81 nuevos genes de fusión (ver [anexo 2](#)). Este panel incluye algunas de las translocaciones del *FGFR* más frecuentemente reportadas en la literatura como oncogénicas, incluyendo 3 del *FGFR1*, 19 del *FGFR2* y 10 del *FGFR3*.
- Mutaciones del *FGFR* y otros genes: La detección de mutaciones se ha realizado utilizando técnicas de ultra-secuenciación génica (NGS) (186): mediante la plataforma *AmpliconSeq (MiSeq/HiSeq 2000 Illumina®)*, utilizando la *VHIO OncoCarta* optimizada para su programa de *pre-screening* local, o bien mediante el test de *Foundation One® (Foundation Medicine®)*, en el caso del *pre-screening* central realizado en el marco de un ensayo clínico. Actualmente, con la última versión de esta *VHIO OncoCarta*

AmpliconSeq panel v.3.0 es posible analizar mutaciones puntuales establecidas –conocidas como *hotspots*- entre 59 oncogenes, con una cobertura máxima en la secuenciación de los 4 genes del *FGFR1-4* (ver [anexo 3](#)).

- Amplificaciones del *FGFR* y *FGF3-4-19*: Las amplificaciones de los genes del *FGFR1-2* y de los genes de los ligandos *FGF3-4-19* han sido analizadas mediante técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). La sonda utilizada para la determinación de la amplificación del gen del *FGFR1* ha sido la *ZytoLight® SPEC FGFR1/CEN 8 Dual Color Probe* con referencia Z-2072-200 y para la determinación de la amplificación del gen del *FGFR2* se ha utilizado la sonda *ZytoLight® SPEC FGFR2/CEN 10 Dual Color Probe* con referencia Z-2122-200. Sin embargo, en el caso de la amplificación de los ligandos *FGF3-4-19*, no se disponía de una sonda FISH específica; dado que los genes de estos ligandos co-localizan con el gen de la *ciclina D1* a nivel del cromosoma 11q, se ha inferido el resultado obtenido mediante la sonda FISH del gen *ciclina D1*, la *ZytoLight® SPEC CCND1/CEN 11 Dual Color Probe* con referencia Z-2071-200. Todas las sondas utilizadas son de *Zytovision®*. En los tres casos, el criterio para definir que un paciente se consideraba *FGFR1-2* o *11q*-amplificado era un ratio gen/centrómero ≥ 2.2 , o si el número total de copias del gen era ≥ 6 , según la evidencia científica disponible actualmente (92).

Algunos de los pacientes habían sido pre-identificados como amplificados con la tecnología *nCounter® (NanoString®)*, en este caso mediante el panel optimizado *VHIO copy number v.2.0*. para la detección de variaciones en el número de copias de hasta 59 genes implicados en la carcinogénesis humana (ver [anexo 4](#)). Entre ellos, se podían detectar alteraciones en el número de copias de los genes *FGFR1-4* y de los tres principales ligandos *FGF3-4-19*, aunque su amplificación debía confirmarse vía FISH, bajo los criterios antes

mencionados.

- Niveles mRNA del *FGFR* y *11q*: El análisis de los niveles de expresión del mRNA de los genes de los receptores *FGFR* y sus ligandos *FGF3-4-19* se ha realizado también mediante la tecnología *nCounter® (NanoString®)*. En este caso, se ha utilizado el panel optimizado *VHIO fusion v.4.0.* de expresión génica, que actualmente permite la detección de los niveles de expresión del mRNA de 26 genes (ver [anexo 2](#)), incluyendo *FGFR1-4* y los ligandos *FGF3-4-19*.

Asimismo, en algunos casos, los niveles de expresión del mRNA *FGFR* se han evaluado mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (qRT-PCR) (187).

6.1.6. Evaluación del valor oncogénico de las mutaciones.

6.1.6.1. Plataforma bioinformática *OncoKB*.

Mediante la plataforma bioinformática *OncoKB* se ha realizado un análisis de predicción del valor oncogénico de las mutaciones detectadas en nuestra cohorte de pacientes *FGFR*-mutados tratados con *FGFRinh* (188). *OncoKB* dispone de una extensa base de datos que, en la actualidad, recoge la información disponible en relación a >3000 mutaciones somáticas y otras alteraciones moleculares, como amplificaciones y fusiones, asociadas a más de 671 genes descritos hasta en 48 tipos distintos de cáncer. Con el objetivo de actualizar toda la evidencia disponible de forma periódica, *OncoKB* recopila la información procedente de las nuevas aprobaciones de la *FDA*, de las recomendaciones incorporadas en las guías de la *NCCN*, de las recomendaciones de grupos de expertos, así como de los resultados presentados en congresos recientes y en la literatura científica.

Esta herramienta bioinformática pretende facilitar la interpretación de la accionabilidad de los hallazgos genómicos obtenidos en muestras de pacientes, y es accesible públicamente a través del enlace <http://oncokb.org>.

6.1.6.2. Tecnología *Functional Annotation for Cancer Treatment (FACTTM)*.

En paralelo a la revisión en *OncoKB*, la funcionalidad de las mismas variantes detectadas en los 6 pacientes *FGFR*-mutados tratados con *FGFRinh* se ha evaluado mediante la tecnología *FACTTM* (*NovellusDx*©), utilizando el perfil molecular obtenido mediante el análisis NGS de sus muestras (ver esquema *FACTTM* en [anexo 5](#)). Las distintas variantes génicas de los pacientes han sido caracterizadas mediante ensayos celulares funcionales *in vitro*, basados en la predicción de activación de las vías de señalización y la inhibición posterior con agentes dirigidos (189):

- Ensayo celular *in vitro*: Las distintas mutaciones de los pacientes han sido clonadas en un vector de expresión *wild-type* (WT) y asociadas a un marcador específico de la vía intracelular correspondiente. En este caso, el marcador se trataba de una proteína marcada con fluorescencia, proteínas que forman parte de la vía y cuya translocación del citoplasma al núcleo celular suele ocurrir tras la activación la señalización. Seguidamente, las variantes han sido transfectados a células vivas (células epiteliales HeLa), con el objetivo de inducir la expresión génica de dichas mutaciones.

La síntesis de las variantes se ha realizado utilizando el kit de mutagénesis Q5 (New England Biolabs, Cat.# E0554S), verificado mediante la secuenciación de Sanger. Se han sembrado las células HeLa en placas transparentes recubiertas de poli-L-lisina. A las 24h posteriores de la siembra, se han transfectado las células con una

mezcla de plásmidos WT, con mutaciones de los genes a estudio y los distintos marcadores etiquetados con EGFP (reactivo FuGENE HD Promega, Cat. # E2312). Después de la transfección, las células se han incubado durante 24h más para permitir una expresión adecuada de los genes. Posteriormente, se han fijado las placas con paraformaldehído, y se ha realizado una tinción nuclear (DAPI). Las placas han sido fotografiadas utilizando un microscopio NIKON Ti Eclipse, y las imágenes han sido procesadas por un sistema de software NIS-Elements de análisis de imagen. Este software de alto rendimiento ha permitido delinear diferencialmente los bordes celulares y los bordes nucleares, con tal de cuantificar la intensidad del marcador fluorescente en cada uno de estos compartimentos.

- Predicción de la actividad oncogénica: Una vez establecido el ensayo celular, se ha escaneado con un microscopio para localizar el marcador y correlacionarlo con la activación de la vía de señalización asociada, mediante un algoritmo de cuantificación nuclear de la fluorescencia (ver [figura 2](#)). En el caso de activación, se ha objetivado un incremento de la fluorescencia nuclear de *RelA* en la vía NFκB (190), *STAT3* en la vía JAK/STAT (191) y *ERK2* en la vía de las MAPK/ERK (192). Sólo en el caso de *FoxO3*, la activación de la vía PI3K/AKT ha favorecido la localización de este factor a nivel citosólico, disminuyendo así la presencia del marcador fluorescente en el núcleo celular (193). La activación de la vía se ha representado con las medianas normalizadas del ratio núcleo-citoplasma (NCR) en cada caso, comparando cada variante génica con la forma no mutada del gen o WT y con una mutación oncogénica conocida (rango de valores entre 0%-100%, correspondientes a la actividad de la forma WT y de la mutación conocida, respectivamente). Sólo aquellas variantes con un incremento del $NCR \geq 20\%$ respecto a la forma WT se han considerado activas. Todos los experimentos han sido repetidos al menos tres veces.

- Predicción de la respuesta a terapia dirigida: Para medir la respuesta de una de las variantes a un inhibidor específico, se han testado curvas dosis-respuesta de 6 puntos con un FGFRinh (debio1347 2.5-2500 nmol). La droga se ha incubado 6h después de la transfección en cada una de las dosis correspondientes. Todos los experimentos han sido repetidos al menos tres veces. La inhibición de la respuesta ha sido evaluada siguiendo el mismo criterio descrito previamente, considerando como inhibición de la vía un descenso de la actividad oncogénica $\geq 20\%$ en cualquier dosis respecto a la actividad observada en condiciones de no tratamiento.

6.1.7. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se ha realizado mediante el programa de *software* R versión 3.2.4.

Se ha realizado un análisis descriptivo de las distintas variables clínico-patológicas y moleculares de los pacientes de la cohorte a estudio. Las variables categóricas se han descrito con números y/o porcentajes, mientras que las variables continuas se han descrito con la mediana y el rango.

La correlación entre el nivel de amplificación del *FGFR* y el ClinBen alcanzado a los FGFRinh se ha evaluado mediante un test de *Wilcoxon*, considerándose los valores de $p \leq 0.05$ estadísticamente significativos para todos los análisis.

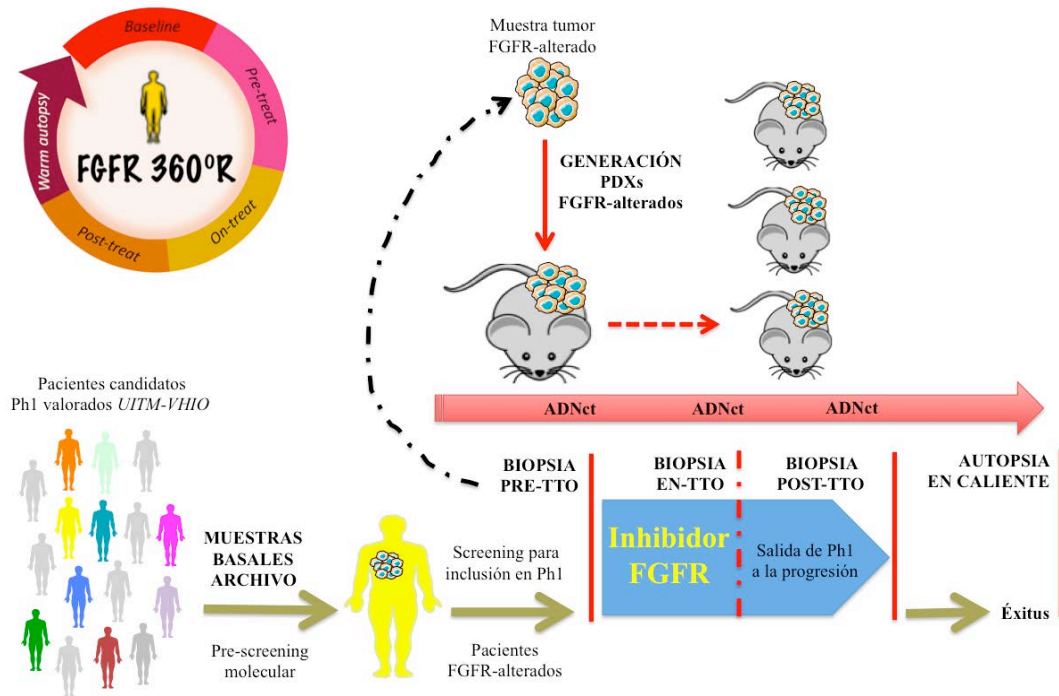
La actividad oncogénica de las distintas variantes génicas del estudio funcional *FACTTM* se ha analizado mediante un test *ANOVA* unidireccional, para determinar que el incremento $\geq 20\%$ del NCR es estadísticamente significativo.

6.2. ESTUDIO PROSPECTIVO: Implementación del proyecto traslacional *FGFR 360° RESISTANCE*.

6.2.1. Diseño del estudio.

Estudio prospectivo con el objetivo de generar una colección de muestras de pacientes con cáncer avanzado seleccionados molecularmente por sus alteraciones en los genes del *FGFR:FGF*, y evaluados para ser tratados con distintos inhibidores del FGFR dentro de ensayos fase 1 desarrollados en la *UITM-VHIO* durante el período 2014-2018. Con esta finalidad, se ha desarrollado el protocolo investigacional llamado *FGFR 360° RESISTANCE* (**figura 7**), una plataforma traslacional para obtener muestras seriadas (biopsias tumorales pre-, en curso y post- tratamiento, plasma e incluso autopsias en caliente) en diferentes momentos de la enfermedad de estos pacientes, con tal de generar PDXs *FGFR*-alterados para validar potenciales biomarcadores predictivos, definir mejor los mecanismos de acción de los inhibidores del FGFR e identificar mecanismos de resistencia (194).

Este estudio se ha realizado de acuerdo a la normativa del *IRB HUVH*, implementando el consentimiento informado específico del proyecto “*360° RESISTANCE: Aplicación de un modelo traslacional para estudiar la eficacia, los mecanismos de resistencia y la heterogeneidad tumoral en pacientes tratados con fármacos dirigidos a dianas moleculares (PR(AG)293/2014)*”, aprobado por el *CEIC HUVH* (última versión 5.0 noviembre 2017) ([anexo 6](#)).



Abreviaciones: Ph1 (ensayos clínicos fase 1); PDXs (xenoinjertos derivados de pacientes); ADNct (ADN circulante tumoral); TTO (tratamiento).

Figura 7. Proyecto traslacional *FGFR 360° RESISTANCE*.

6.2.2. Selección de la muestra: criterios de inclusión y exclusión.

Los candidatos han sido seleccionados entre todos aquellos pacientes que han participado en el programa de *pre-screening* molecular del circuito *UITM-VHIO* (ver [6.1.2](#)).

Se trata de pacientes con múltiples tipos tumorales, refractarios y en progresión confirmada a su última línea, cuyos tumores han sido identificados como portadores de aberraciones en la vía del *FGFR:FGF* y valorados para su inclusión en algún ensayo clínico fase 1 testando un inhibidor del FGFR (tabla 3).

Tabla 3. Ensayos fase 1 con pacientes en curso de tratamiento con inhibidores del FGFR en *UITM-VHIO* durante el periodo 2014-2018.

CÓDIGO Ph1	DROGA	DIANA	IC50 (nM/L)	MoA	clinicaltrial.gov	Ref
E-3810-I-01	lucitanib	FGFR1-3 VEGFR1-3 PDGFR α/β c-KIT CSF-1R	17.5-82.5 7-25 175-525 456 5	MTKI	NCT01283945	(92, 195)
KIDES-203	ODM-203	FGFR1-4 VEGFR1-3	11-35 5-26	MTKI	NCT01283945	(94, 196)
CBGJ398X2101	infigratinib	FGFR1-3	0.9-1.4	FGFRinh rev	NCT01004224	(101, 197)
CBGJ398X2102	infigratinib + alpelisib	FGFR1-3 PI3K α	0.9-1.4 4.6	FGFRinh rev + PI3K(α)inh	NCT01928459	(198, 199)
Debio1347-101	debio1347	FGFR1-3	9.3-22	FGFRinh rev	NCT01948297	(102, 200)
42756493EDI1001	erdafitinib	FGFR1-4	1.2-5.7	FGFRinh rev	NCT01703481	(107, 201)
TPU-TAS-120-101	futibatinib	FGFR1-4	3.9-8.3	FGFRinh irr	NCT02052778	(155, 202)
PRN1371-001	PRN1371	FGFR1-4	0.6-19.3	FGFRinh irr	NCT02608125	(96, 203)
CFGF401X2101	roblitinib	FGFR4	1.1	FGFRinh rev	NCT02325739	(204)

Abreviaciones: Ph1 (ensayo fase 1); IC50 (Concentración Inhibitoria del 50%); nM/L (nanoMolar/Litro); MoA (Mecanismo de Acción); Ref (Referencia); MTKI (Inhibidores Multi-Tirosina Kinasa); FGFRinh (inhibidores selectivos del FGFR); PI3K(α)inh (inhibidor alfa-selectivo del PI3K); rev (reversible); irr (irreversible).

Las distintas alteraciones del *FGFR:FGF* de los pacientes candidatos a participar en este proyecto *FGFR 360° RESISTANCE* han sido identificadas con las herramientas de análisis molecular descritas previamente en el apartado [6.1.5](#).

La inclusión en uno u otro ensayo dependía de su disponibilidad en el momento de la valoración del paciente en *UITM-VHIO*, y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado respectivo de cada uno de dichos ensayos, en paralelo con la firma voluntaria del consentimiento específico del proyecto *FGFR 360° RESISTANCE*. Sin embargo, a pesar de cumplir con todos los criterios de elegibilidad, algunos nunca llegaron a recibir una dosis del inhibidor del FGFR por ser finalmente fallo de *screening* del ensayo. Todos los pacientes disponían de datos epidemiológicos y clínico-patológicos en curso de estudio accesibles a través las bases de datos digitales del hospital (SAP).

6.2.3. Variables clínico-patológicas recogidas.

Los siguientes datos han sido recogidos en una base de datos *excel* para su posterior análisis:

- Datos epidemiológicos: fecha de nacimiento, sexo.
- Datos de patología molecular: tipo tumoral y subtipo histológico, localización del tumor primario, herramienta de análisis molecular utilizada, el nivel de amplificación *-ratio* y nº de copias totales del gen *FGFR*-, origen de la muestra utilizada para el cribado molecular y disponibilidad como material de archivo, alteración molecular del *FGFR:FGF* y otras co-alteraciones detectadas en el *pre-screening*.
- Datos clínicos: número de líneas previas para el tratamiento de la enfermedad metastásica, fecha de firma del consentimiento informado del ensayo fase 1 específico, tipo de inhibidor *FGFR* recibido y fecha su primera dosis, mejor respuesta radiológica alcanzada y porcentaje de cambio en las lesiones diana, evolución de los marcadores tumorales, niveles de fosfato en cada evaluación de respuesta, status en el ensayo en el momento de la revisión, fecha de la progresión confirmada, fecha del último control y/o del fallecimiento, en caso de aplicar.
- Datos traslacionales: fecha de la firma del consentimiento informado específico del proyecto *360° RESISTANCE*, fecha de obtención de las muestras de plasma, autorización de necropsia y su fecha en caso afirmativo, fechas de realización de las biopsias *pre-/en-/post-tratamiento*, con su correspondiente localización tumoral y técnica de biopsia, así como los datos de generación del *PDX* asociado (laboratorio *VHIO*/nomenclatura del *PDX*/status del modelo). Para todas las muestras biológicas obtenidas en los distintos momentos de la enfermedad, se ha recogido su referencia de codificación para facilitar su trazabilidad posterior.

La eficacia a los inhibidores del FGFR se ha analizado siguiendo los criterios de RECIST v.1.1. El ClinBen se ha definido como cualquier reducción del tamaño tumoral más el control de la enfermedad durante al menos ≥ 4 meses.

6.2.4. Circuitos de obtención de muestras biológicas.

Para llevar a cabo este proyecto se han desarrollado tres circuitos específicos para obtener muestras de los pacientes incluidos:

- Circuito *VHIO* de generación de PDXs *FGFR 360° RESISTANCE*: En colaboración con el laboratorio de patología molecular y los investigadores de los diferentes laboratorios traslacionales *VHIO*, se ha establecido un circuito para facilitar el desarrollo de nuevos modelos PDXs, a partir de las biopsias de los pacientes *FGFR*-alterados. La doctoranda ha sido la encargada de identificar a los pacientes candidatos a participar en este proyecto traslacional, solicitar la prueba radiológica adecuada en cada caso para obtener la biopsia de la lesión tumoral más fácilmente accesible, y coordinar al equipo de patología molecular con los distintos laboratorios traslacionales *VHIO* el día de la realización del procedimiento biopsico, para la recogida e implantación de las biopsias tumorales.
- Circuito *VHIO* de obtención de muestras de seroteca *FGFR 360° RESISTANCE*: En colaboración con enfermería de la *UITM-VHIO*, se ha establecido un circuito protocolizado para recoger muestras de plasma para el análisis de ADNct de los pacientes. De este modo, se ha generado un documento fuente con tal de especificar la cantidad de muestra a extraer, su procesamiento y codificación, para su posterior conservación apropiada (ver [anexo 7](#)).

- Circuito *VHIO* de autopsias de investigación *FGFR 360° RESISTANCE*: En colaboración con el departamento de Anatomía Patológica *HUVH*, se ha establecido un circuito protocolizado para solicitar autopsias calientes de aquellos pacientes del proyecto que fallezcan en el ámbito hospitalario. De este modo, se ha generado un documento fuente con tal de recoger la información relevante del caso a estudio y detallar los trámites legales necesarios para llevar a cabo la autopsia, estableciendo una referencia de codificación de las lesiones a biopsiar, así como un circuito de recogida y conservación del material, durante los días laborables y festivos. Finalmente, se ha generado un circuito de traslado de pacientes desde un centro externo (ver [anexo 8](#)).

6.2.5. Experimentos *in vivo* con modelos PDXs *FGFR*-amplificados.

Todos los procedimientos realizados para la generación de nuevos PDXs *FGFR*-amplificados de cáncer de mama, desde la implantación de la biopsia tumoral y la monitorización de su crecimiento, su caracterización molecular y los distintos experimentos *in vivo* aquí descritos, han sido efectuados por Mònica Sánchez-Guixé en el laboratorio del Grupo de Terapias Experimentales *VHIO* (Investigadora Principal Dra. Violeta Serra).

Los modelos *FGFR*-amplificados utilizados para correlacionar *in vivo* la eficacia anti-tumoral de los inhibidores de *FGFR* con potenciales determinantes moleculares de sensibilidad han sido seleccionados entre la colección *VHIO* de PDXs con cáncer de mama de la que ya disponíamos de datos moleculares (**tabla 4**). De todos los modelos seleccionados, 11 PDXs formaban parte de una colección de modelos existente (n=15), cuya generación se había llevado a cabo a partir de biopsias de pacientes con cáncer de mama, identificadas mayoritariamente en la Unidad de Cáncer de Mama *HUVH*. Además, se han seleccionado algunos modelos PDXs *FGFR*-amplificados adicionales entre la nueva colección generada a partir de biopsias

implantadas en el proyecto *FGFR 360° RESISTANCE*, cuya finalidad era precisamente expandir la colección de modelos preclínicos, pero con muestras de pacientes de distintas histologías *FGFR:FGF*-alterados.

Tabla 4. Colección VHIO de PDXs con cáncer de mama *FGFR*-alterados caracterizados genómicamente.

PDX	SUBTIPO TUMORAL	ALTERACIÓN <i>FGFR:FGF</i>	CO-ALTERACIONES DEL PDX
VS-PDX153	HER2+	FGFR1amp	ERBB2-RPTOR-MYCamp; PI3KCAmut
VS-PDX291	Triple negativo	FGFR1amp	AKT3-MYCamp; TP3fs; ERBB3mut
VS-PDX302	Triple negativo	FGFR1amp	gBRCA2mut splice site; TP52fs, CCND3amp
VS-PDX342	Luminal B	FGFR1amp	
JAL-PDX173	HER2+	FGFR1amp	
VS-PDX156	Triple negativo	FGFR1amp 11q-amp	EGFR-RICTOR-CCND1-MYCamp; TP53mut
VS-PDX191	ER+/Luminal B	FGFR1amp 11q-amp	CCND1-GNAS-MYCamp
VS-PDX131	Luminal B	11q-amp	MYCamp; PTENmut
VS-PDX293	Triple negativo	11q-amp	FGFR3del; TP53 fs; PIK3CA mut
VS-PDX251	Luminal B	FGF3/4amp	PIK3CDdel; PIK3CA-TP53mut
VS-PDX225	Luminal B	FGFR4amp	MYCamp; AKT1-TP53mut
VS-PDX039	ER+/luminal B	FGFR4amp	RPTORamp; AKTdel; TP53mut
VS-PDX222	HER2+	FGFR4amp	ERBB2-EGFR-RET-MYC-ARamp
VS-PDX4	ER+/HER2-	FGFR3mut (I285V)	PTPRTamp; IRS1-AKTdel; MTORMut
VS-PDX179	Triple negativo	FGF7mut (I100L)	gBRCAfs; PTEN-PIK3R1del, MAP3K13-TP53mut

Abreviaciones: amp (amplificado); mut (mutado); fs (del inglés *frameshift*); del (delección); g (germinal).

El modelo animal utilizado en este proyecto está basado en la implantación subcutánea de los fragmentos tumorales procedentes de las biopsias en fresco de pacientes en ratones atímicos *HsdCpb:NMRI-FoxItm* (*Harlan Laboratories*) o ratones NOD.Cg-Prkdc scid Il2rg tm1Wjl/Szj (*Charles River*). Todos los experimentos se han llevado a cabo siguiendo los principios éticos de la WMA de la Declaración de Helsinki, según la directiva de cuidado animal de la Unión Europea (2010/63/EU), y aprobados debidamente por el Comité Ético de Experimentación Animal del Instituto de Recerca de Vall d'Hebrón (VHIR).

Para el ensayo de eficacia tumoral y evaluación de biomarcadores, 2-5 ratones han sido implantados con muestras tumorales de 3x3 mm del mismo modelo PDX. A los animales se les ha administrado un suplemento hormonal de 1µM 17β-estradiol en el agua, permitiendo que los tumores crecieran hasta alcanzar

el tamaño recomendado (100-300 mm³), antes ser randomizados aleatoriamente a recibir uno de los brazos de tratamiento:

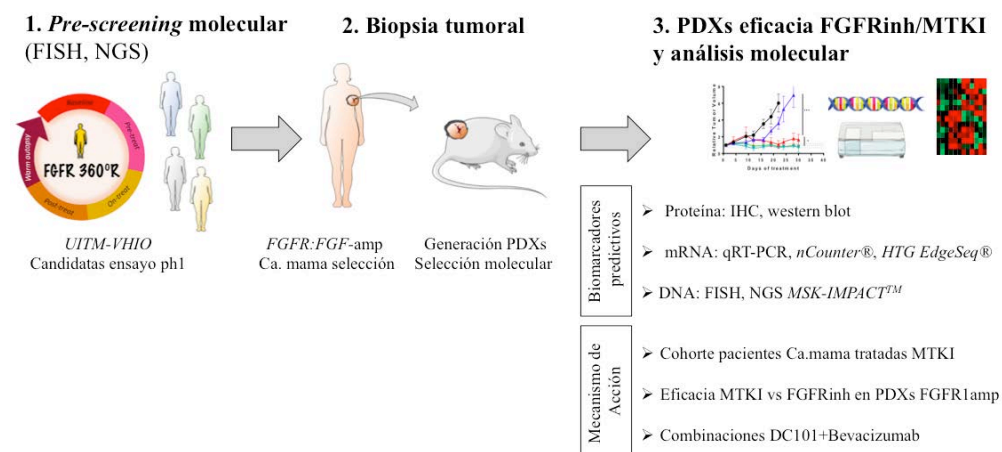
- Rogaratinib: FGFRinh reversible con actividad inhibitoria FGFR1, 2, 3,4, con IC50 de 1.8, <1, 9.2 y 1.2 nM, respectivamente (205). La dosis administrada por sonda oral ha sido de 108 mg/kg/día dos veces al día 6 veces a la semana.
- Lucitanib, MTKI con actividad inhibitoria FGFR1-2-3, VEGFR1-2-3, PDGFR α - β , c-KIT, CSF-1R, con IC50 de 17.5/82.5/237.5, 7/25/10, 175/525, 456 y 5 nM, respectivamente (195). La dosis administrada por sonda oral ha sido de 20 mg/kg/día 6 veces a la semana.
- Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal endovenoso anti-VEGF-A humano, con una afinidad K_D 58 pM (206). La dosis admnistrada ha sido de 0.125 mg/ratón dos veces a la semana (mar-vie).
- DC101, un anticuerpo monoclonal endovenoso anti-VEGFR2 murino, con una afinidad K_D 110 pM (207). La dosis administrada ha sido de 0.8 mg/ratón dos veces a la semana (lun-jue).

El crecimiento tumoral se ha monitorizado dos veces por semana mediante palpación (medición del calibre de los implantes tumorales), desde el primer día de administración del inhibidor. Los ratones han sido sacrificados cuando los tumores alcanzaban 1500 mm³ o bien en caso de pérdida de peso severa, de acuerdo a las guías institucionales. La actividad antitumoral se ha determinado comparando el porcentaje de cambio en el volumen tumoral [% cambio Volumen = (Volumen_{21 días} - Volumen_{inicial}) / Volumen_{inicial} x 100. Para clasificar la respuesta de los PDXs se han utilizado los criterios RECIST v.1.1. modificados, en base al porcentaje de cambio en el volumen tumoral: Respuesta Completa (CR), si mejor respuesta \leq 95%; Respuesta Parcial (PR), si 95% < mejor respuesta \leq -30%; Enfermedad Estable (SD) , si -30% < mejor respuesta \leq +20% (mantenida al menos durante 35 días); Progresión de Enfermedad (PD), si la mejor respuesta > + 20%.

Muestras congeladas y en parafina de los implantes tumorales han sido recogidas 2h después de dosificar cada ratón en todos los brazos de tratamiento. Los posibles biomarcadores predictivos de respuesta al FGFRinh han sido evaluados en cada modelo PDX *FGFR:FGF*-amplificado, mediante las herramientas de análisis molecular descritas en el apartado 6.2.7.

Para caracterizar el mecanismo de acción diferencial de los FGFRinh *versus* MTKI, 7 modelos seleccionados por su distinta sensibilidad al FGFRinh han sido tratados durante 15 días con rogaratinib o lucitanib, y se ha evaluado la expresión diferencial de mRNA de sus potenciales dianas terapéuticas (*FGFR1-4/FGFs*, *VEGFR1-2-3/VEGFA-B-C*, *PDGFR α - β /PDGFA-B-C*, entre otras). Además, se han realizado estudios comparativos de la eficacia de FGFRinh con combinaciones de fármacos anti-angiogénicos (Bevacizumab y DC101) *versus* MTKI.

La **figura 8** resume el protocolo de selección de los modelos PDXs de cáncer de mama *FGFR:FGF*-amplificados utilizados para llevar a cabo los distintos experimentos *in vivo* planificados en este proyecto:



Abreviaciones: FISH (Hibridación *In-Situ* IFluorescente); NGS (técnicas de ultra-secuenciación genómica); p11 (fase 1); amp (amplificados); FGFRinh (inhibidor selectivo del FGFR); MTKI (Inhibidor Multi-Tirosina quinasa); IHC (immunohistoquímica); qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa).

Figura 8. Esquema de la generación de PDXs *FGFR:FGF*-amplificados de cáncer de mama seleccionados para experimentos *in vivo* y caracterización molecular.

6.2.6. Cohorte de validación de pacientes tratadas con MTKI.

Las muestras de una cohorte de 9 pacientes afectas de cáncer de mama han sido utilizadas para validar los hallazgos de potenciales biomarcadores predictivos de respuesta a los FGFRinh. Todas las pacientes habían sido tratadas con MTKI dentro de ensayos fase 1 previa a la implementación del proyecto *FGFR 360° RESISTANCE*, y de todas ellas disponíamos de datos epidemiológicos y clínico-patológicos en curso de ensayo accesibles a través de las bases de datos digitales del hospital (SAP).

Estas pacientes habían sido seleccionadas mediante el circuito de derivación a la *UITM-VHIO*, y por consiguiente, habían firmado el consentimiento informado que autorizaba el análisis de sus muestras dentro del programa de *pre-screening* molecular *VHIO* (ver [6.1.2](#)). No ha sido preciso un consentimiento informado específico para utilizar dichas muestras como cohorte de validación dado su carácter retrospectivo.

6.2.7. Herramientas de análisis molecular.

6.2.7.1. Caracterización molecular de los PDXs.

Cada uno de los PDXs *FGFR:FGF*-amplificados utilizados en los experimentos *in vivo* ha sido caracterizado por Mònica Sánchez-Guixé en el laboratorio del Grupo de Terapias Experimentales *VHIO* (Investigadora Principal Dra. Violeta Serra):

- Nivel ADN: la detección de la variación en el número de copias (CNA) de los genes *FGFR:FGF* se ha realizado utilizando técnicas de NGS, mediante el panel *MSK-IMPACT™* del *Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC)* (208), que incluye los genes del *FGFR1-4* y

del *FGF3/4/19* en su panel de 410 genes. Los PDXs se consideraron amplificados si el número absoluto de copias del gen era ≥ 4 , según el punto de corte establecido en el *IMPACTTM*.

Además, las amplificaciones del *FGFR1-2/4/11q* que se han detectado por el panel han sido corroboradas mediante sus respectivos FISH. La sonda utilizada para la determinación de la amplificación del gen del *FGFR1* ha sido la *ZytoLight[®] SPEC FGFR1/CEN 8 Dual Color Probe* con referencia Z-2072-200, para el gen del *FGFR2* se ha utilizado la sonda *ZytoLight[®] SPEC FGFR2/CEN 10 Dual Color Probe* con referencia Z-2122-200 y para gen del *11q*, que co-localiza con el gen de la ciclina D1, ha sido la *ZytoLight[®] SPEC CCND1/CEN 11 Dual Color Probe* con referencia Z-2071-200, todas de *Zytovision[®]*. Para la determinación de la amplificación del gen del *FGFR4* se ha utilizado la sonda *SureFiSH[®] FGFR4 (NSD1)* con referencia cat #G101226R-8, de *Agilent Technologies[®]*. En los cuatro casos, el criterio FISH para definir que un paciente se consideraba *FGFR1-2/4* o *11q*-amplificado era un *ratio* gen/centrómero ≥ 2.2 , o si el número total de copias del gen era ≥ 6 , según la evidencia científica disponible actualmente (92). No se ha detectado ninguna amplificación del *FGFR3* mediante NGS, por lo que no ha sido necesario validar la técnica FISH del *FGFR3*.

- Nivel mRNA: la detección de los niveles de mRNA *FGFR1-4* y *FGF3-4-19* se ha realizado mediante la tecnología *nCounter[®] (NanoString[®])* con el panel local *VHIO fusion-expresión génica v.4.0* (ver [anexo 2](#)).

La qRT-PCR se ha utilizado para validar los hallazgos de expresión de cada uno de los receptores *FGFR1-4*, utilizando ensayos prediseñados de *TaqManTM*: *primers* y sondas FAM-MGB Hs00915142_m1 para el *FGFR1*, Hs01552918_m1 para el *FGFR2*, Hs0019829_m1 para el *FGFR3* y Hs01106908_m1 para el *FGFR4*.

No ha sido técnicamente posible realizar qRT-PCR de los diferentes FGFs, por lo que adicionalmente, se ha utilizado un análisis transcriptómico con la herramienta *HTG EdgeSeq®* (*HTG Molecular Diagnostics*©) (209). Mediante el panel de biomarcadores en oncología (OBP) de *HTG EdgeSeq®*, se han podido evaluar los niveles de mRNA de hasta 2545 genes, permitiendo la evaluación de la expresión génica de los distintos componentes de la vía del *FGFR:FGF* (*FGFR1-4/FGFRL1*, y los ligandos *FGF1-2/4-14/16-23*), pero también al mismo tiempo, la de genes implicados en la vías de las MAPKs (*KRAS, BRAF*), PI3K (*PI3KCA, AKT*) o de la angiogénesis (*VEGFR1-2-3/VEGFA-B-C, PDGFR α - β /PDGFA-B-C*), entre otras (ver [anexo 9](#)).

- Nivel proteína: la detección de los niveles de proteína FGFR2 se ha realizado cualitativamente mediante inmunohistoquímica (IHC), utilizando el anticuerpo FGFR2 Cat#NB200-642 de *Novus Biologicals*©. Además, se ha realizado un valoración cuantitativa mediante western blot de FGFR1 y FGFR3, utilizando los anticuerpos FGFR1 (D8E4) Cat#9740, y *FGFR3 (C51F2)* Cat#4574, ambos de *Cell Signaling Technologies*©.

No ha sido posible realizar las determinaciones del FGFR4 ni de los FGFs con ninguna de ambas técnicas, por no estar optimizadas en los laboratorios *VHIO*.

6.2.7.2. Análisis de muestras de pacientes seleccionados.

Las muestras de pacientes de especial interés han sido analizadas con tecnologías NGS de última generación, mediante secuenciación completa del

exoma (*WES*) (210) y secuenciación del RNA (*RNAseq*) (211) en el *MD Anderson Cancer Center (MDACC)*, y el panel OBP de *HTG EdgeSeq®* (209). La prevalencia celular (PC) de las clonas detectadas mediante *WES* indica el número estimado de células tumorales portadoras de una mutación concreta en la muestra secuenciada. El valor de dicha PC se ha estimado a partir del contenido de células tumorales en la muestra, el número de copias y la fracción alélica de cada mutación. Los valores de PC se han reportado en un rango del uno al cero (1-0), asumiendo como eventos clonales aquellos más próximos al uno.

El valor oncogénico de las distintas alteraciones génicas detectadas se ha evaluado mediante la información disponible en la literatura, realizando una revisión a través de las plataformas bioinformáticas *OncoKB* (<http://oncokb.org>) y *cBioportal* (<https://www.cbioportal.org>), así como las bases de datos *GeneCards®* (<https://www.genecards.org>) y *PubMed* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

6.2.8. Análisis estadístico.

Se ha realizado un análisis descriptivo de las distintas variables clínico-patológicas, moleculares y traslacionales de los pacientes incluidos en el proyecto *FGFR 360° RESISTANCE*. Las variables categóricas se han descrito con números y/o porcentajes, mientras que las variables continuas se han descrito con la mediana y el rango. La representación gráfica de los pacientes, mejor porcentaje de respuesta y tipos tumorales se ha realizado mediante el programa de *software R* versión 3.2.4.

Los test estadísticos han sido realizados con el programa *GraphPad Prism* versión 6.01. Las diferencias entre grupos de tratamiento se han analizado mediante un *t-test* o un test *ANOVA*.

La evaluación de biomarcadores predictivos de respuesta se ha realizado mediante curvas ROC (Característica Operativa del Receptor), comparando la sensibilidad (verdaderos positivos en relación con verdaderos positivos y falsos negativos) y la especificidad (verdaderos negativos en relación con verdaderos negativos y falsos positivos) (212). Se ha considerado que la curva ROC asociada a un potencial biomarcador predictivo fiable sería aquella que se situaría en un punto de la esquina superior izquierda, o coordenada (0,1) del espacio ROC, representando un 100% de sensibilidad (ningún falso negativo) y un 100% también de especificidad (ningún falso positivo); es el punto (0,1) que se conoce como una *clasificación perfecta*. En el caso de FGFR1-4 mRNAh, las diferencias estadísticas entre respondedores *versus* no-respondedores se han analizado mediante un test U Mann-Whitney, debido a una distribución no-Gaussiana de los datos.

Los valores de p estadísticamente significativos para los análisis representados en las leyendas de las figuras son los siguientes: * ($0.01 \leq p < 0.05$); ** ($0.001 \leq p < 0.01$); *** ($0.0001 \leq p < 0.001$); **** ($p < 0.0001$).

7. RESULTADOS

7.1. ESTUDIO RETROSPECTIVO: Análisis exploratorio de biomarcadores predictivos de respuesta en pacientes con cáncer avanzado tratados con pan-inhibidores del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFRinh).

Desde 2011 hasta 2016, 36 pacientes con tumores *FGFR:FGF*-amplificados (FGFRamp; n=25), altos niveles de expresión del *FGFR* mRNA (mRNAh; n=5) o *FGFR*-mutados (FGFRmut; n=6) recibieron tratamiento dentro de ensayos clínicos fase 1 con FGFRinh en curso en *UITM-VHIO*. La **tabla 5** recoge las principales características de los FGFRinh con los que fueron tratados estos pacientes:

Tabla 5. Ensayos fase 1 con pacientes en curso de tratamiento con FGFRinh en *UITM-VHIO* durante el período 2011-2016.

CÓDIGO Ph1	FGFRinh	DIANA	IC50 (nM/L)	MoA	clinicaltrial.gov	Ref
CBGJ398X2101	infigratinib	FGFR1-3	0.9-1.4	rev	NCT01004224	(101, 197)
CBGJ398X2102	infigratinib + alpelisib	FGFR1-3 PI3K α	0.9-1.4 4.6	rev	NCT01928459	(198, 199)
Debio1347-101	debio1347	FGFR1-3	9.3-22	rev	NCT01948297	(102, 200)
42756493EDI1001	erdafitinib	FGFR1-4	1.2-5.7	rev	NCT01703481	(107, 201)
TPU-TAS-120-101	futibatinib	FGFR1-4	3.9-8.3	irr	NCT02052778	(155, 202)
PRN1371-001	PRN1371	FGFR1-4	0.6-19.3	irr	NCT02608125	(96, 203)
CFGF401X2101	roblitinib	FGFR4	1.1	rev	NCT02325739	(204)

Abreviaciones: FGFRinh (inhibidores selectivos del *FGFR*); Ph1 (ensayo fase 1); IC50 (Concentración Inhibitoria del 50%); nM/L (nanoMolar/Litro); MoA (Mecanismo de Acción); Ref (Referencia); rev (reversible); irr (irreversible).

La mediana de edad de todos los pacientes incluidos fue de 55 años, y habían recibido una mediana de 3 líneas previas con intención paliativa. Los tipos tumorales incluidos en el análisis fueron mama (n=17), colon (n=3), esófago (n=3), hígado (n=3), pulmón (n=3), endometrio/anejos (n=2), vejiga (n=2), cabeza y cuello (n=2) y estómago (n=1). En total, se incluyeron 30 pacientes en el subgrupo FGFRamp/mRNAh (25/5), algunos de los cuales presentaban

más de una aberración molecular en *FGFR:FGF*, y 6 pacientes en el subgrupo FGFRmut.

El global de casos tratados con FGFRinh fue de 38 casos, dado que 2 de los pacientes FGFRmut fueron incluidos sucesivamente en 2 ensayos diferentes, recibiendo un FGFRinh irreversible a la progresión tras recibir un FGFRinh reversible. En total, 23 casos recibieron un FGFRinh reversible, 11 casos un FGFRinh irreversible, 3 casos un FGFRinh ultra-específico del *FGFR4* y 1 caso recibió tratamiento con una combinación FGFRinh más un inhibidor de PI3K(α)-selectivo. La **tabla 6** detalla la características clínico-patológicas de los casos:

Tabla 6. Características clínico-patológicas de los casos FGFRalt incluidos en el análisis retrospectivo VHIO.

	Pacientes FGFRamp/mRNAh (%)	Pacientes FGFRmut (%)
n casos	25 (83)/ 5 (17)	8 (100)
Sexo	♂ 12 (40)/ ♀ 18 (60)	♂ 3 (37)/ ♀ 5 (63)
Mediana edad (rango)	56 (34-76)	57 (49-76)
Metastásicos al diagnóstico	14 (47)	2 (25)
Mediana tratamientos previos (rango)	3 (0-8)	3 (2-4)
INHIBIDOR FGFR ESPECÍFICO		
Pan-FGFRinh reversible	21 (70)	2 (25)
Pan-FGFRinh irreversible	6 (20)	5 (63)
FGFR4inh ultra-selectivo	3 (10)	0 (0)
Combinación FGFRinh+PI3KCAinh	0 (0)	1 (12)

Abreviaciones: FGFRalt (*FGFR*-alterados); FGFRinh (inhibidor selectivo *FGFR*); PI3KCAinh (inhibidor PI3K); FGFRamp (*FGFR*-amplificado); FGFR mRNAh (altos niveles de expresión *FGFR* mRNA); FGFRmut (*FGFR*-mutado).

La mediana de TTP en los 38 casos analizados fue de 1.67 meses (IC 95%; 1.40-2.87). En cuanto a la evolución de los casos en curso de terapia con FGFRinh, casi la mitad de la cohorte global, un 52.6% de los casos (15 casos FGFRamp/mRNAh y 5 casos FGFRmut), presentaron progresión como mejor respuesta alcanzada. Cabe destacar que tan sólo se objetivó una única respuesta parcial en un paciente del subgrupo FGFRamp/mRNAh, sin ninguna respuesta completa reportada. En el momento del análisis, sólo once pacientes seguían vivos, todos pertenecientes al subgrupo FGFRamp/mRNAh. La mayoría de los casos habían finalizado la terapia con FGFRinh a causa de

progresión confirmada de la enfermedad (n=31), aunque tres casos habían interrumpido definitivamente el tratamiento por culpa de la toxicidad inaceptable presentada al fármaco, y uno de ellos había decidido retirar el consentimiento del ensayo en el que participaba de forma voluntaria. Sólo tres casos FGFRamp/mRNAh continuaban en curso de ensayo con FGFRinh. La **tabla 7** recoge los datos de la evolución de todos los casos durante el tratamiento con FGFRinh:

Tabla 7. Evolución de los casos FGFRalt durante el tratamiento con FGFRinh.		
	Pacientes FGFRamp/mRNAh (%)	Pacientes FGFRmut (%)
MEJOR RESPUESTA ALCANZADA		
Progresión	15 (50)	5 (62)
Estabilización	13 (44)	3 (38)
Respuesta parcial	1 (3)	0 (0)
Respuesta completa	0 (0)	0 (0)
Desconocida	1 (3)	0 (0)
CAUSA FINALIZACIÓN TRATAMIENTO		
Progresión confirmada	23 (77)	8 (100)
Toxicidad inaceptable	3 (10)	0 (0)
Retirada del consentimiento	1 (3)	0 (0)
En curso de tratamiento	3 (10)	0 (0)

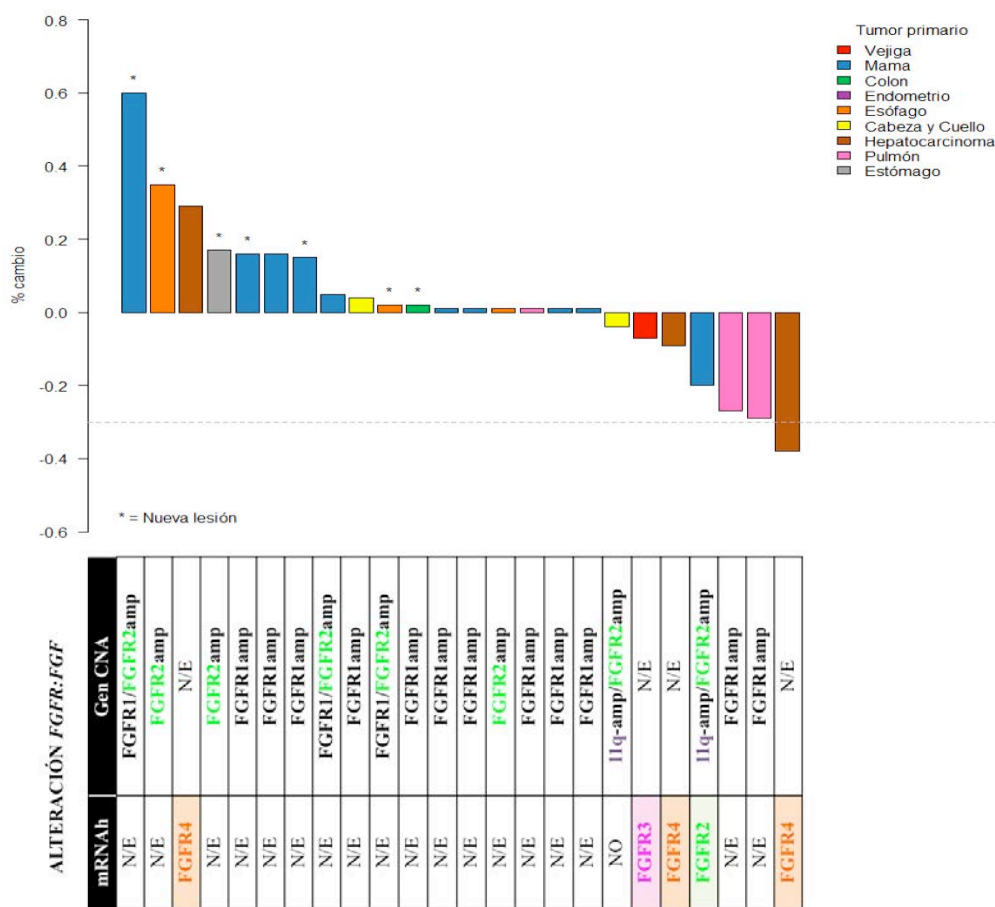
Abreviaciones: FGFRalt (*FGFR*-alterados); FGFRinh (inhibidor selectivo *FGFR*); PI3KCAinh (inhibidor PI3K); FGFRamp (*FGFR*-amplificado); FGFR mRNAh (altos niveles de expresión *FGFR* mRNA); FGFRmut (*FGFR*-mutado).

7.1.1. Análisis en el subgrupo de pacientes FGFRamp/mRNAh.

En el subgrupo FGFRamp/mRNAh (n=30 casos), 7 casos alcanzaron ClinBen (23%): 2 casos con cáncer de pulmón, 2 casos con hepatocarcinoma, 1 caso con cáncer de mama, 1 caso con cáncer de vejiga y 1 caso con cáncer de cabeza y cuello (carcinoma indiferenciado de cavum). La **figura 9** detalla el porcentaje de cambio en las lesiones diana de los casos FGFRamp/mRNAh según el subtipo tumoral y sus características moleculares.

De estos 7 casos con ClinBen, destaca que 4 casos presentaban FGFR mRNAh: 2 casos con hepatocarcinomas FGFR4 mRNAh, 1 caso con cáncer de mama FGFR2amp con FGFR2 mRNAh y 1 caso con cáncer de vejiga FGFR3 mRNAh. No fue posible determinar los niveles de FGFR mRNA de

los 2 casos con cáncer de pulmón FGFR1amp con ClinBen, dada la ausencia de material de archivo. Asimismo, no fue posible evaluar la presencia de amplificaciones/mutaciones/translocaciones génicas en los casos con hepatocarcinomas y cáncer de vejiga debido al mismo motivo. El caso con cáncer de cabeza y cuello FGFR2amp no presentaba mRNAh de ninguno de los FGFR. Dos de los casos con ClinBen presentaban co-amplificación del 11q: 1 caso con cáncer de mama FGFR2amp y un caso con cáncer de cabeza y cuello FGFR2amp.



Abreviaciones: CNA (Alteración Número de Copias); amp (amplificado); mRNAh (altos niveles expresión mRNA); N/E (No Evaluado).

Figura 9. Porcentaje de cambio en las lesiones diana en casos con FGFRamp/mRNAh según el subtipo tumoral y características moleculares de los pacientes. En el gráfico se objetiva como 7 casos de distintos tipos tumorales alcanzan ClinBen: 2 pulmones FGFR1amp, 2 hepatocarcinomas FGFR4 mRNAh, 1 vejiga FGFR3 mRNAh, 1 mama y 1 tumor de cabeza y cuello, ambos con co-amplificación FGFR2 y del 11q. En el caso de la paciente con cáncer de mama, además presentaba FGFR2 mRNAh.

Finalmente, evaluamos la posible correlación entre el ClinBen observado y el nivel de amplificación del gen *FGFR* (ratio amplificación gen:centrómero),

siendo ésta estadísticamente no significativa en la población general de 25 pacientes FGFRamp ($p=0.449$) como se observa en la **figura 10**. Debido a que el subgrupo de pacientes mama FGFRamp era el mayoritario (casos $n=16$), se evaluó por separado la correlación entre ClinBen y el ratio de FGFRamp en este subgrupo, resultando igualmente no estadísticamente significativa ($p=0.29$).

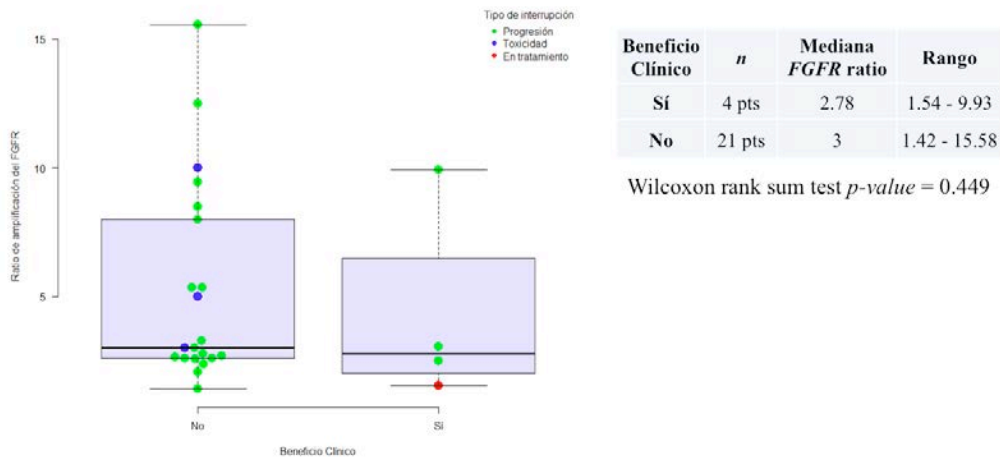


Figura 10. Correlación entre ClinBen a FGFRinh y nivel de amplificación génica del *FGFR* en el subgrupo pacientes FGFRamp. En la gráfica están representados el subgrupo de pacientes FGFRamp ($n=25$). No puede establecerse un ratio de amplificación del *FGFR* que se asocie a ClinBen (pacientes con FISH ratio ≥ 2.2 considerados positivos en la mayoría de ensayos para su inclusión, pueden o no beneficiarse).

7.1.2. Análisis en el subgrupo de pacientes *FGFRmut*.

El subgrupo de seis pacientes *FGFRmut* incluye 4 tipos tumorales distintos, incluyendo endometrio (*FGFR3mut* T689M) y *FGFR2mut* (N549D)), colon (*FGFR1mut* (I529M) y *FGFR2mut* (G238R)), mama (*FGFR1mut* (N546K)) y vejiga (*FGFR3mut* (S249C)). Para el objetivo de este análisis retrospectivo se consideraron 8 casos, dado que 2 pacientes recibieron un *FGFRinh* irreversible a la progresión tras su tratamiento con un *FGFRinh* reversible.

Ante la controversia sobre la relevancia terapéutica que tienen las mutaciones del *FGFR* como posibles biomarcadores predictivos, revisamos la evidencia científica disponible mediante la plataforma bioinformática *OncoKB*. Cabe

destacar que inicialmente, cuando se obtuvieron los resultados del cribado molecular de estos pacientes FGFRmut, se consideró la idoneidad de que éstos recibieran un FGFRinh precisamente en base a los datos disponibles en la literatura, predicciones de respuesta *in silico* en la mayoría de los casos.

En nuestra cohorte, sólo en el paciente afecto de cáncer de vejiga FGFR3mut (S249C) existía evidencia clínica que apoyaba dicha mutación como predictiva de respuesta al bloqueo FGFR en esta histología concreta, aunque ni el biomarcador ni la droga se consideraban tratamiento estándar en el momento de la decisión terapéutica (213). En cambio, en los pacientes con cáncer de mama FGFR1mut (N546K) y cáncer de endometrio-tubárico FGFR2mut (N549D), sólo existía evidencia biológica que respaldara estas mutaciones del *FGFR* como posibles biomarcadores predictivos a los FGFRinh (157, 214).

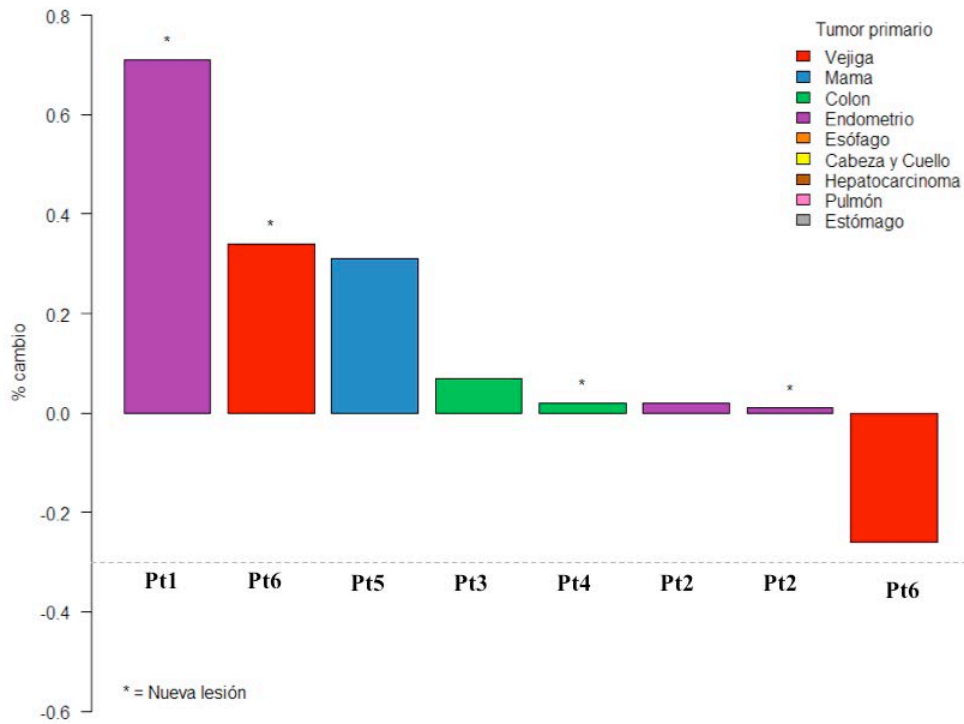
En el resto de pacientes, los dos pacientes afectados de cáncer de colon, FGFR1mut (I529) y FGFR2mut (G238R), y una de las pacientes con cáncer de endometrio FGFR3mut (T689M), se detectaron variantes de significado incierto, mutaciones cuya relevancia oncogénica aún no estaba definida. A pesar de esta limitada evidencia, se discutió con los pacientes la posibilidad de administrar terapia experimental dirigida dentro de ensayos clínicos con FGFRinh, dado que se trataba de casos refractarios a sus respectivos tratamientos oncológicos estándar.

En segundo lugar, revisamos los datos de clonalidad de los pacientes FGFRmut, objetivándose que sólo en la mitad de los pacientes, las mutaciones del *FGFR* eran eventos clonales, ambos pacientes con cáncer de endometrio FGFR3mut (T689M) y FGFR2mut (N549D), y el paciente afecto de cáncer de vejiga FGFR3mut (S249C). Además, también evaluamos la presencia de otras mutaciones concomitantes detectadas mediante los paneles de NGS utilizados en el cribado molecular de estos 6 pacientes. Destacaba que en 5 de los pacientes se detectaron otras co-alteraciones afectando algunos de los genes de las vías MAPKs y PI3K, dos de las principales vías de señalización

intracelular: mutaciones en los genes *PI3KCA* (n=3), *PTEN* (n=2), *KRAS* (n=1) y *BRAF* (n=1).

Al establecer la correlación de eficacia con las características moleculares del subgrupo FGFRmut, únicamente el caso del paciente afecto de cáncer de vejiga con una mutación clonal en *FGFR3* (S249C), descrita como oncogénica activadora, y sin ninguna otra co-alteración molecular, obtuvo ClinBen, tal y como se objetiva en la **figura 11**. En este caso concreto, el paciente obtuvo ClinBen en curso de su terapia inicial con un FGFRinh reversible, pero sin embargo, progresó rápidamente cuando a la progresión de este primer inhibidor recibió tratamiento con un FGFRinh irreversible. El resto de los casos FGFRmut que no se beneficiaron del bloqueo FGFR presentaban eventos subclonales, con co-existencia de otras mutaciones en las otras vías de señalización de las MAPKs o PI3K, con algunas de las mutaciones del *FGFR* descritas como variantes de significado incierto.

Ante estos hallazgos, decidimos analizar más detalladamente el valor oncogénico *in vitro* de cada una de estas mutaciones del *FGFR*, con tal de revisar su predicción de respuesta al bloqueo FGFR en el contexto biológico concreto de cada uno de estos pacientes FGFRmut, especialmente en aquéllos en que se trataba de variantes de significado incierto del *FGFR* y/o coexistían con otras co-alteraciones moleculares.



PACIENTE	Pt1	Pt2	Pt3	Pt4	Pt5	Pt6
MUTACIÓN	FGFR3mut	FGFR2mut	FGFR1mut	FGFR2mut	FGFR1mut	FGFR3mut
VARIANTE	T689M	N549D	I529M	G238R	N546K	S249C
OncoKB	VSI	Oncogénica	VSI	VSI	Oncogénica	Oncogénica
CLONALIDAD	SÍ	SÍ	NO	NO	NO	SÍ
CO-ALTERACIÓN	PI3KCAmut (R88Q)	PTENmut (R130Q) PTENmut (R173C) PI3KCAmut (E81K)	KRASmut (G12C)	BRAFmut (D594G)	PI3KCAmut (H1047R)	NO

Abreviaciones: mut (mutado); VSI (Variante de Significado Incierto).

Figura 11. Porcentaje de cambio en las lesiones diana en casos con FGFRmut según el subtipo tumoral y características moleculares de los pacientes. En el gráfico se objetiva como sólo el caso de un paciente afecto de una neoplasia de vejiga (Pt6) alcanza ClinBen. El Pt6 se benefició de recibir un FGFRinh reversible, pero progresó rápidamente después cuando recibió un FGFRinh irreversible, tras el fracaso del primer agente dirigido. Precisamente, el Pt6 era el único que presentaba una mutación clonal *FGFR3* (S249C) oncogénica, sin ninguna otra co-alteración molecular.

7.1.2.1. Análisis *in vitro* del valor oncogénico de las mutaciones detectadas en el subgrupo de pacientes FGFRmut.

Para realizar el análisis de predicción mediante la herramienta *FACTTM*, se consideraron variantes de significado incierto aquellas variantes para las que no existían análisis *in silico* y sin evidencia disponible en la literatura.

En primer lugar, se evaluó *in vitro* el potencial oncogénico de las mutaciones del *FGFR* (**figura 12**). El análisis demostró que dos de las variantes de significado incierto detectadas, *FGFR1* (I529M) y *FGFR2* (G238R), no eran variantes oncogénicas, tras confirmarse su falta de activación respectiva de la vía del *FGFR:FGF*. En cambio, en el caso de la tercera variante de significado incierto, *FGFR3* (T689M), el análisis funcional detectó que se trataba en efecto de una variante activadora de la vía. Las 3 mutaciones del *FGFR* ya descritas en *OncoKB* como oncogénicas, *FGFR2* (N549D), *FGFR1* (N546K) y *FGFR3* (S249C), fueron confirmadas como activadoras, y por lo tanto, posibles predictores de respuesta a los FGFRinh.

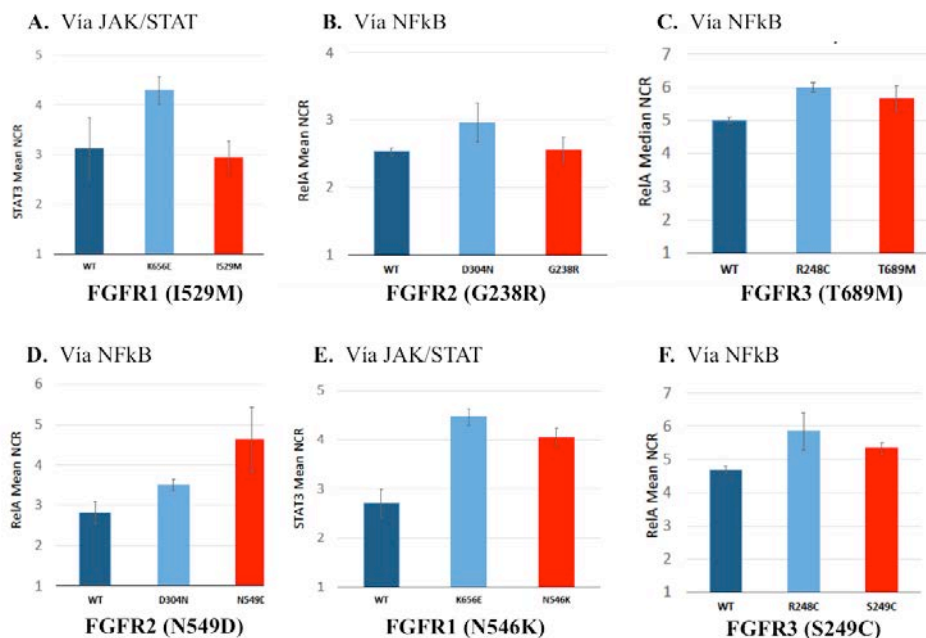


Figura 12. Predicción *in vitro* de la actividad oncogénica de las mutaciones *FGFR* detectadas en el subgrupo de pacientes FGFRmut. La activación de la señalización intracelular asociada a las variantes del *FGFR* ha sido evaluada mediante la cuantificación nuclear de proteínas marcadas con fluorescencia para la vía NFκB (*RelA*) y JAK/STAT (*STAT3*). La actividad oncogénica de las variantes a estudio (rojo), representada por la mediana normalizada del ratio núcleo-citoplasma (NCR), se ha comparado

con la actividad del gen no mutado o *wild-type* (WT) (**azul oscuro**) y con una mutación oncogénica conocida (**azul claro**). Las VSI *FGFR1* (I529M) y *FGFR2* (G238R), se han considerado inactivas debido a que existía < 20% de incremento del NCR respecto a la forma WT (**paneles A-B**). La variante de significado incierto (VSI) *FGFR3* (T689M), presentaba un incremento $\geq 20\%$ del NCR respecto a la forma WT, confirmándose como una variante oncogénica (**panel C**), así como las mutaciones *FGFR2* (N549D), *FGFR1* (N546K) y *FGFR3* (S249C), ya descritas previamente como activadoras (**paneles D-F**).

Posteriormente, se decidió confirmar *in vitro* el potencial oncogénico del resto de mutaciones detectadas en este subgrupo de pacientes mediante los análisis NGS (**figura 13**). El análisis demostró que 4 de las variantes descritas en la literatura como probablemente oncogénicas, *PI3KCA* (R88Q; E81K) (215, 216) y *PTEN* (R130Q; R173C) (217), eran efectivamente activadoras de sus respectivas vías intracelulares. En el caso de las mutaciones *KRAS* (G12C) (218) y *PI3KCA* (H1047R) (219), el análisis confirmó su potencial oncogénico ya conocido, aunque en el caso de la variante *BRAF* (D594G) (220) sólo se objetivó un funcionalismo intermedio.

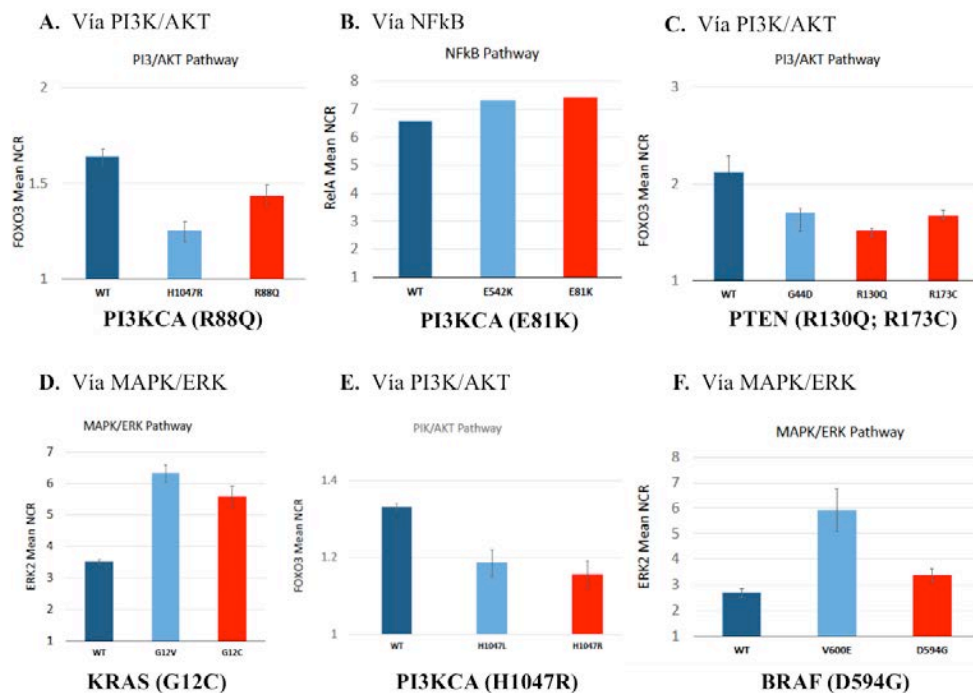


Figura 13. Predicción *in vitro* de la actividad oncogénica de las co-alteraciones detectadas en el subgrupo de pacientes *FGFRmut*. La activación de la señalización intracelular asociada a las variantes de los genes *PI3KCA*, *PTEN*, *KRAS* y *BRAF* ha sido evaluada mediante la cuantificación nuclear de proteínas marcadas con fluorescencia para la vía PI3K/AKT (*FoxO3*), NFkB (*RelA*) y MAPK/ERK (*ERK2*). La actividad oncogénica de las variantes a estudio (**rojo**), representada por la mediana normalizada del ratio núcleo-citoplasma (NCR), se ha comparado con la actividad del gen no mutado o *wild-type* (WT) (**azul oscuro**) y con una mutación oncogénica conocida (**azul claro**). Mediante los ensayos celulares *in vitro* se ha confirmado que las cuatro mutaciones descritas en la literatura como probablemente oncogénicas, son efectivamente activadoras (**paneles A-C**): en el caso de la mutación

PI3KCA (E81K) se ha objetivado un incremento $\geq 20\%$ del NCR RelA respecto a la forma WT, mientras que en el caso de las mutaciones *PI3KCA* (R88Q) y *PTEN* (R130Q; R173C) se ha objetivado un descenso $\geq 20\%$ del NCR respecto a la forma WT, teniendo en cuenta que los niveles nucleares de FoxO3 disminuyen con la activación de la vía PI3K/AKT. Se ha confirmado el funcionalismo de las mutaciones *KRAS* (G12C) y *PI3KCA* (H1047R), descritas previamente como activadoras (**paneles D y E**). En el caso de la mutación *BRAF* (D594G) descrita como oncogénica, el análisis *in vitro* sólo ha demostrado una activación intermedia de la vía MAPK/ERK (**panel F**).

Al comparar todos los datos de funcionalismo de las mutaciones detectadas (**tabla 8**), objetivamos que al menos dos de las variantes de significado incierto detectadas en los dos pacientes afectados de cáncer de colon, *FGFR1* (I529M) y *FGFR2* (G238R), carecían de actividad oncogénica *in vitro*. En cambio, el análisis *FACTTM* demostró que la variante de significado incierto *FGFR3* (T689M), era activadora de la vía del *FGFR:FGF*. En los otros 3 pacientes con variantes *FGFR* confirmadas como activadoras pero sin ClinBen a los FGFRinh, *FGFR3* (T689M), *FGFR2* (N549D) y *FGFR1* (N546K), el análisis funcional confirmó que las mutaciones detectadas simultáneamente en *PI3KCA*, *PTEN*, *KRAS* y *BRAF*, eran asimismo activadoras de sus respectivas vías de señalización.

Tabla 8. Comparación del valor oncogénico de las mutaciones detectadas en la cohorte de pacientes FGFRmut tratados con FGFRinh.

Paciente	Tumor	Mutación	Variante	Potencial oncogénico		Droga recibida	Clin Ben
				<i>OncoKB</i>	<i>FACTTM</i>		
Pt1	Endometrio	<i>FGFR3</i>	T689M	VSI	Activa	FGFRinh rev	NO
		<i>PI3KCA</i>	R88Q	Probable	Activa		
Pt2	Endometrio-tubárico	<i>FGFR2</i>	N549D	Oncogénica	Activa	FGFRinh rev + <i>PI3KCA</i> inh	NO
		<i>PTEN</i>	R130Q	Probable	Activa		
		<i>PTEN</i>	R173C	Probable	Activa		
Pt3	Colon	<i>PI3KCA</i>	E81K	Probable	Activa	FGFRinh irr	NO
		<i>FGFR1</i>	I529M	VSI	Inactiva		
		<i>KRAS</i>	G12C	Oncogénica	Activa		
Pt4	Colon	<i>FGFR2</i>	G238R	VSI	Inactiva	FGFRinh irr	NO
		<i>BRAF</i>	D594G	Oncogénica	Activa media		
Pt5	Mama	<i>FGFR1</i>	N546K	Oncogénica	Activa	FGFRinh irr	NO
		<i>PI3KCA</i>	H1047R	Oncogénica	Activa		
Pt6	Vejiga	<i>FGFR3</i>	S249C	Oncogénica	Activa	FGFRinh rev	SÍ
						FGFRinh irr	NO

Abreviaciones: FGFRmut (*FGFR*-mutado); FGFRinh (inhibidor selectivo *FGFR*); ClinBen (Beneficio Clínico); VSI (Variante de Significado Incierto); *PI3KCA* (inhibidor *PI3KCA*); rev (reversible); irr (irreversible).

En el caso de la paciente afecta de cáncer de endometrio-tubárico *FGFR2* (N549D), *PI3KCA* (E81K) y *PTEN* (R130Q; R173C), todas las mutaciones

demonstraron valor oncogénico, confirmado *in vitro* individualmente. Además, con el análisis conjunto *FACTTM* de las mutaciones *FGFR2* (N549D) y *PI3KCA* (E81K), se objetivó que ambas mutaciones potenciaban la activación de la vía de señalización (**figura 14A**). Cabe destacar que el análisis de predicción de respuesta *in vitro* a la terapia dirigida con FGFRinh fue positivo, objetivándose inhibición de la vía *FGFR:FGF* mediante un FGFRinh reversible en un modelo celular *FGFR2*mut (N549D) (**figura 14B**).

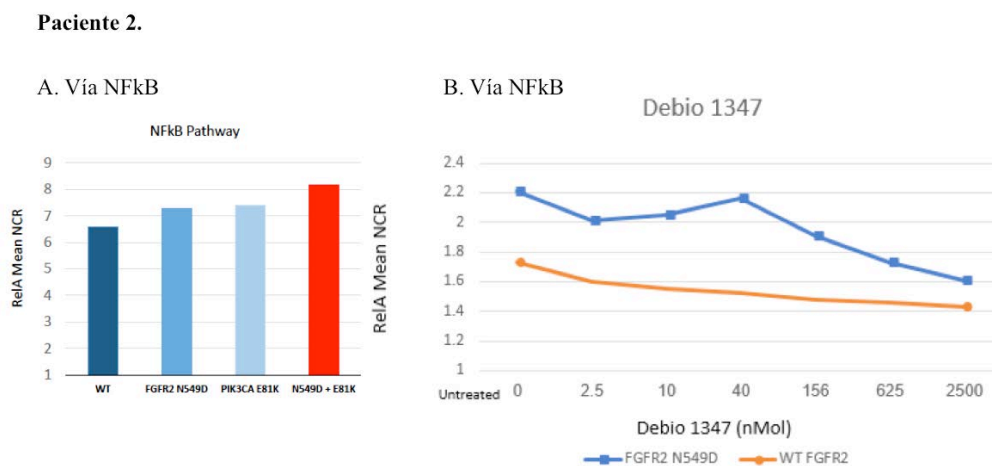
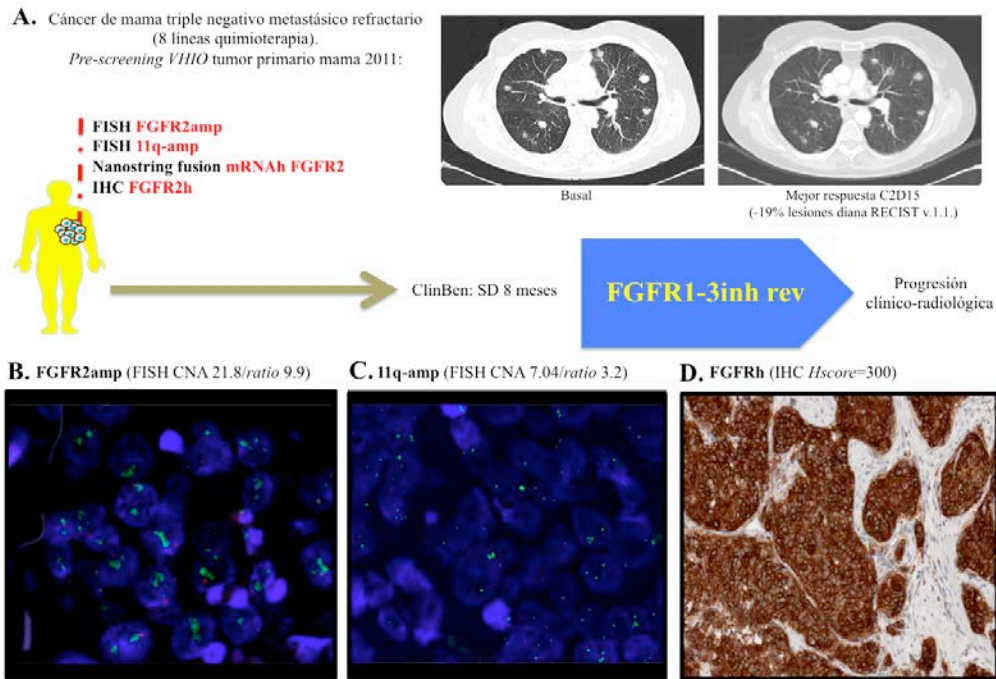


Figura 14. Ejemplo de la predicción de respuesta *in vitro* con un agente diana de la variante génica activadora identificada en un caso del subgrupo FGFRmut. A. En este caso, la co-existencia de ambas mutaciones activadoras *FGFR2* (N549D) y *PI3KCA* (E81K) (**azules claro**), aumenta la señalización de la vía NFkB de forma sinérgica (**roja**), confirmándose un incremento del ratio núcleo-citoplasma (NCR) RelA $\geq 20\%$ respecto a la actividad de los genes no mutados o wild-type (WT) (**azul oscuro**). **B.** La forma *FGFR2* WT es insensible al FGFRinh reversible debio1347, por lo que no se observan cambios en la mediana NCR RelA (**naranja**). En cambio, la mutación oncogénica *FGFR2* (N549D) induce activación de la vía NFkB, que se traduce en un incremento de RelA nuclear: debio1347 es capaz de inhibir la actividad de la variante *FGFR2* (N549D), objetivándose un descenso de la mediana NCR RelA $\geq 20\%$ (**azul**) respecto a la actividad observada en condiciones de no tratamiento.

7.2. ESTUDIO PROSPECTIVO: Implementación del proyecto traslacional *FGFR 360° RESISTANCE*.

El análisis retrospectivo conducido por nuestro grupo en 36 pacientes *FGFR*-alterados que recibieron tratamiento dentro de ensayos fase 1 con FGFRinh, sugiere que el beneficio clínico (ClinBen) en el subgrupo de pacientes *FGFR*-amplificados (FGFRamp) está enriquecido en parte con pacientes que presentan altos niveles de expresión de *FGFR* mRNA (mRNAh) (182). De hecho, una observación muy interesante surge de dos casos concretos de pacientes afectas de cáncer de mama incluidas en dicha serie retrospectiva, ambas tratadas con el mismo FGFRinh reversible.

La paciente cuyo tumor era 11q/*FGFR2*amp presentó una estabilidad radiológica mantenida durante 8 meses, con cierta disminución de tamaño de sus lesiones diana (-19%) según criterios RECIST v.1.1. El análisis molecular disponible de esta paciente con ClinBen reveló que, no sólo se trataba de un tumor con alta amplificación del *FGFR2* (FISH CNA total 21.8/*ratio* gen:centrómero 9.9), sino que ésta se traducía en *FGFR2* mRNAh con su correspondiente alta expresión de la proteína *FGFR2*, de forma homogénea y clonal en el tejido tumoral (ver **figura 15**).



Abreviaciones: amp (amplificada); CNA (Alteración Número de Copias); mRNAh (alta expresión de mRNA); IHC *FGFR2h* (alta expresión proteína por inmunohistoquímica); ClinBen (Beneficio Clínico); SD (Estabilidad); *FGFRinh* (inhibidor selectivo del *FGFR*); rev (reversible).

Figura 15. Historia clínica y caracterización molecular *VHIO* de paciente con cáncer de mama *FGFR2*-amplificada respondedora a *FGFRinh*. A. La paciente afecta de un cáncer de mama triple negativo politratada, recibió un *FGFRinh* reversible alcanzando como mejor respuesta estabilidad radiológica con disminución de las lesiones diana pulmonares (-19%), aunque progresó tras 8 meses de tratamiento y decidió proseguir tratamiento estándar en su centro; B. Imagen FISH *FGFR2* amplificado (promedio nº copias gen *FGFR2* CEN-8 = 2.2); C. Imagen FISH *11q* amplificado (promedio nº copias gen *CCND1/11q* CEN-8=2.2); D. Imagen de alta expresión de la proteína *FGFR2* clonal y homogénea.

En cambio, la paciente con el tumor *FGFR1amp* progresó rápidamente a la terapia con *FGFRinh*. Curiosamente, la caracterización molecular disponible demostró que se trataba de un tumor polisómico (FISH total CNA 27.2/ratio gen:centrómero 2.6). Cabe destacar que esta misma paciente sí obtuvo beneficio clínico al recibir una línea posterior con un MTKI, con estabilidad radiológica durante 3 meses y respuesta serológica por marcador tumoral Ca 15.3 (ver **figura 16**).

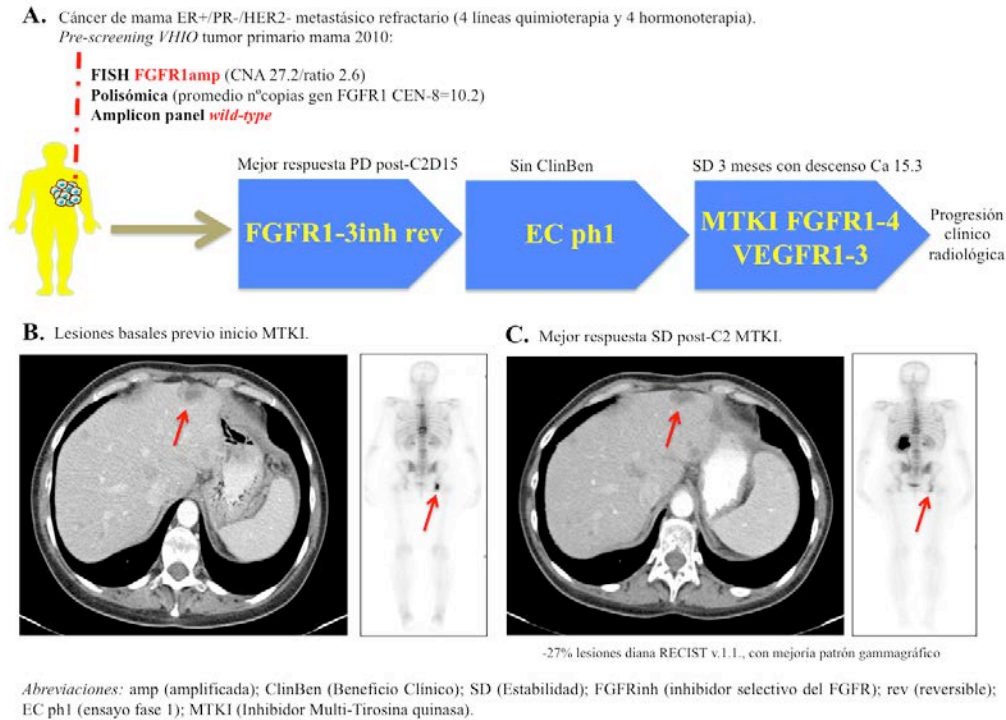


Figura 16. Historia clínica y caracterización molecular *VHIO* de paciente con cáncer de mama *FGFR1*-amplificada no-respondedora a FGFRinh. **A.** La paciente afecta de un cáncer de mama ER+/PR-/HER2- metastásica y politratada, recibió un FGFRinh reversible, con progresión inmediata en la primera evaluación. Posteriormente no obtuvo beneficio clínico con otro fármaco en desarrollo precoz, y sí que presentó cierta eficacia durante 3 meses con un MTKI, objetivándose respuesta serológica (-18% del marcador tumoral Ca 15.3); **B.** Imágenes basales del TC abdominal con metástasis hepáticas y gammagrafía ósea con infiltración a nivel pélvico; **C.** Mejor respuesta alcanzada estabilidad radiológica global, con disminución de las lesiones diana hepáticas (-27%) y reducción de la captación de radiotrazador de las metástasis no-diana óseas.

¿Por qué no se beneficiaron por igual al recibir el mismo FGFRinh si ambos tumores eran *FGFR*-amplificados? Quizás la alta amplificación *FGFR2* homogénea y clonal del primero –ratio 9.9- podría justificar el beneficio que presentó al FGFRinh, a diferencia del segundo tumor, cuya polisomía se traducía en realidad en una baja amplificación *FGFR1* –ratio 2.6- (134). ¿Por qué la paciente con el tumor *FGFR1*amp sin ClinBen al FGFRinh sí presentó eficacia incipiente al posterior MTKI? En el momento de realizar el estudio prospectivo no disponíamos de información molecular adicional que nos ayudara a despejar estas incógnitas.

Estos datos refuerzan la idea de que la amplificación del *FGFR* por sí misma no es un biomarcador fiable para indicar el tratamiento con FGFRinh, pues no todas las pacientes *FGFR*-amplificadas responden. Esto nos ha llevado a

plantear la necesidad de validar con más precisión qué papel predictivo tienen las diferentes alteraciones *FGFR:FGF* en este subgrupo de pacientes, tanto a nivel molecular (p.ej. ADN *versus* mRNA *versus* proteína), con sus puntos de corte respectivos, como a nivel del gen implicado (p.ej. *FGFR1/2/3/4*). Además, la respuesta diferencial a favor del MTKI respecto al FGFRinh en esta segunda paciente invita a reflexionar sobre el mecanismo de acción de ambos tipos de inhibidores del FGFR, pues el análisis detallado de sus propiedades anti-proliferativas y/o anti-angiogénicas podría esclarecer qué pacientes no respondedoras al FGFRinh sí se benefician de recibir un MTKI o cómo optimizar la eficacia de los FGFRinh en combinaciones.

Precisamente a raíz de estas observaciones del estudio retrospectivo, surge la iniciativa de desarrollar e implementar el estudio prospectivo *FGFR 360° RESISTANCE* aquí descrito, con el objetivo de generar modelos preclínicos fiables que nos permitan validar en el laboratorio algunas hipótesis *in vivo*, así como integrar el conocimiento obtenido del análisis molecular de las muestras más relevantes de respondedores inusuales.

7.2.1. Obtención de muestras de pacientes y generación de una colección de PDXs FGFR-alterados.

Desde 2014 hasta 2018, 46 pacientes con tumores *FGFR*-alterados fueron incluidos en el proyecto traslacional *FGFR 360° RESISTANCE*, tras ser valorados en la *UITM-VHIO* para recibir tratamiento dentro de alguno de los ensayos clínicos fase 1 testando inhibidores del FGFR.

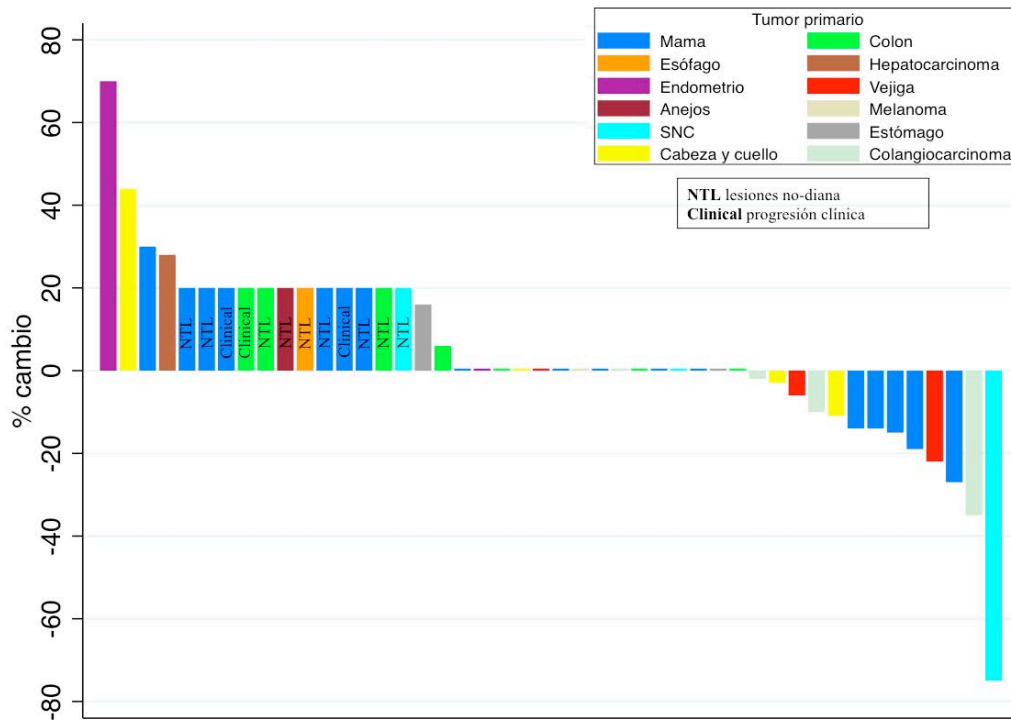
La mediana de edad de todos los pacientes al momento de la inclusión en el proyecto fue de 57 años (rango 26-77), y habían recibido una mediana de 4 líneas previas (rango 0-14) con intención paliativa. Los tipos tumorales incluidos en el análisis fueron mama (n=17), colon (n=7), vías biliares (n=4), cabeza y cuello (n=4), vías urinarias (n=3), sistema nervioso central (n=3),

gástrico (n=2), endometrio (n=2), anejos (n=1), esófago (n=1), hígado (n=1) y melanoma (n=1).

Las distintas alteraciones de la vía *FGFR:FGF* detectadas mediante el *pre-screening* molecular fueron amplificaciones de los receptores (FGFRamp; n=20) o los ligandos (11q-amp, n=1), mutaciones (FGFRmut; n=20), altos niveles de expresión del mRNA (mRNAh; n=11) y translocaciones (FGFRtrans; n=3), con alguno de los pacientes presentando más de una de estas alteraciones.

En global, 31 casos fueron tratados con un inhibidor del FGFR. Recibieron un FGFRinh irreversible 15 casos, un FGFRinh reversible 9 casos, un MTKI 6 casos y, un único caso recibió tratamiento con una combinación FGFRinh más un inhibidor de PI3K. Sólo 9 casos alcanzaron ClinBen con el bloqueo FGFR: 3 pacientes con cáncer de mama (1 11q/FGFR2amp/FGFR2 mRNAh, 1 FGFR1amp, 1 FGFR1mut (N546K)), 2 pacientes con colangiocarcinoma (1 FGFR2trans (FGFR2-CASP7), 1 FGFR2mut(W290C)/FGFR2 mRNAh), 2 pacientes con carcinoma adenoide quístico del área de cabeza y cuello (1 glándula parótida FGFR1 mRNAh, 1 glándula lagrimal FGFR1-2 mRNAh), 1 paciente con un cáncer de colon (FGFR1mut (I529M)) y 1 paciente con un xantastrocitoma (FGFR1trans (FGFR1 E17-TACC1 E7)). Cabe destacar que, la paciente afecta de cáncer de mama FGFR1amp con ClinBen había progresado a una primera terapia con FGFRinh y, sin embargo, presentó estabilidad mantenida durante más de 50 meses al recibir un MTKI posterior. Aunque algunos pacientes presentaron incipientes signos de eficacia, con reducción del tamaño tumoral en la primera evaluación de respuesta, no alcanzaron el criterio de ClinBen al progresar antes de los 4 meses de tratamiento.

La **figura 17** recoge el porcentaje de cambio en las lesiones diana de los pacientes, si llegaron a recibir al menos una dosis del inhibidor de FGFR, según el subtipo tumoral y sus características moleculares:



ClinBen	INHIBIDOR FGFR	ALTERACIÓN FGFR/FGF
NO	FGFRinh	FGFR3mut (T689M)
NO	FGFRinh	FGFR3 mRNA
NO	FGFRinh	FGFR1mut (N546K)
NO	FGFRinh	FGFR4 mRNA
NO	FGFRinh	FGFR2mut (G238R)
NO	FGFRinh	FGFR1amp
NO	MTKI	FGFR4mut (R72C; G199D)
NO	FGFRinh	FGFR2amp
NO	FGFRinh	FGFR1amp
NO	FGFRinh	FGFR1amp
NO	FGFRinh	FGFR1mut (H46Q)
NO	MTKI	FGFR1amp
NO	FGFRinh	FGFR1amp
NO	FGFRinh (previo PI3Kinh)	FGFR2mut (N549D)
NO	MTKI	FGFR1amp
NO	FGFRinh	FGFR1amp
NO	FGFRinh	FGFR2amp
SI	FGFRinh	FGFR1mut (I529M)
N/A	NO	FGFR2mut (D240G)
N/A	NO	FGFR2mut (K649E; K650E)
N/A	NO	FGFR1amp
N/A	NO	FGFR1amp + mRNA Ah FGFR1
N/A	NO	FGFR1amp + FGFR1mut (W4C)
N/A	NO	FGFR1mut (S134D)
N/A	NO	FGFR2mut (R330Q)
N/A	NO	FGFR3mut (R248C)
N/A	NO	FGFR3-TACC3trans
N/A	NO	FGFR2mut (K659E)
N/A	NO	FGFR1amp
N/A	NO	FGFR1amp
N/A	NO	FGFR1amp + FGFR1mut (S219P SNP)
N/A	NO	FGFR1amp
N/A	NO	FGFR3mut (splice site 445+2delTAGG)
SI	FGFRinh	FGFR1 mRNA + FGFR2 mRNA
NO	FGFRinh	FGFR1 mRNA + FGFR2 mRNA
SI	FGFRinh	FGFR3 mRNA
SI	MTKI (previo FGFRinh)	FGFR2mut (W290C) + FGFR2 mRNA
NO	MTKI	FGFR1 mRNA
NO	MTKI	FGFR1amp
SI	FGFRinh	FGFR1amp
SI	FGFRinh	FGFR1mut (N546K)
NO	FGFRinh	FGFR2amp + FGFR2 mRNA + I19-amp
NO	MTKI (previo FGFRinh)	FGFR3 mRNA
SI	FGFRinh	FGFR1amp
SI	FGFRinh	FGFR3-CASP7trans
SI	FGFRinh	FGFR1-TACC3trans

Abreviaciones: amp (amplificado); mRNA (altos niveles expresión mRNA); mut (mutación); trans (translocación); FGFRinh (inhibidor selectivo del FGFR); MTKI (Inhibidor Multi-Tirosina quinasa); PI3Kinh (inhibidor PI3K); N/A (No Aplica).

Figura 17. Porcentaje de cambio en las lesiones diana de los pacientes incluidos en el proyecto FGFR 360° RESISTANCE según el subtipo tumoral y sus características moleculares. Del total de 46 pacientes incluidos, 15 pacientes fueron finalmente fallo de *screening* para la inclusión en ensayo y no recibieron inhibidores del FGFR (N/A). Del resto, 6 pacientes fueron tratados con MTKI (verde) y 25 recibieron FGFRinh (azul). Los pacientes se consideraron no-respondedores si presentaban un incremento >20% de las lesiones diana y/o progresión de las lesiones no-diana (NTL) y/o progresión clínica (Clinical). A pesar de que hubo 13 pacientes que presentaron cierta reducción del tamaño tumoral, sólo 9 de ellos alcanzaron ClinBen sin progresar durante los 4 primeros meses de tratamiento.

La implementación de este protocolo traslacional nos ha permitido obtener una valiosa serie de muestras biológicas *FGFR:FGF*-alteradas, con las que profundizar en el conocimiento de esta vía de señalización intracelular:

- Las muestras de plasma (ADNct) seriadas obtenidas de cada uno de los 46 pacientes, han sido utilizadas para validar nuevos métodos de análisis del ADNct, como herramienta de monitorización de la evolución genómica de estos pacientes.
- El perfil molecular obtenido mediante el análisis NGS de las muestras de pacientes *FGFR*-mutados (n=20), ha sido utilizado para la caracterización funcional *in vitro* del potencial oncogénico de las 19 variantes detectadas.
- En global, se han recogido 46 biopsias diagnósticas basales de todos los pacientes y 28 biopsias previo al inicio de tratamiento con un inhibidor del *FGFR*. El análisis comparativo mediante técnicas de ultra-secuenciación génica de los PDXs y las biopsias realizadas en curso de tratamiento (n=7) y a la progresión tras recibir un inhibidor del *FGFR* (n=8), así como de las muestras de las autopsias de los pacientes (n=3), ha permitido estudiar la heterogeneidad tumoral y los posibles mecanismos de resistencia (**figura 18**).
- La implantación de nuevas biopsias (n=42) ha contribuido a ampliar significativamente la colección *VHIO* de PDXs *FGFR*-alterados, aportando 18 PDXs establecidos *de novo*, tal y como refleja la **tabla 9** (porcentaje de desarrollo de al menos un modelo animal trasplantado del 43%). Las tasas de éxito de implantación del injerto han sido variables, dependiendo del tipo tumoral y reflejando en parte su biología agresiva: tumor mülleriano mixto maligno (TMMM) tubárico-endometrial (1/1; 100%), ca. escamoso esófago (1/1; 100%), melanoma (1/1; 100%), colon (5/7; 71%), mama (8/17; 47%), ca. urotelial (1/4; 25%), colangiocarcinoma (1/5; 20%), sin que se

establecieron ninguna de las biopsias procedentes de ca. gástricos (n=2), ca. cabeza y cuello (n=2), hepatocarcinoma (n=1) ni ca. endometrial (n=1).

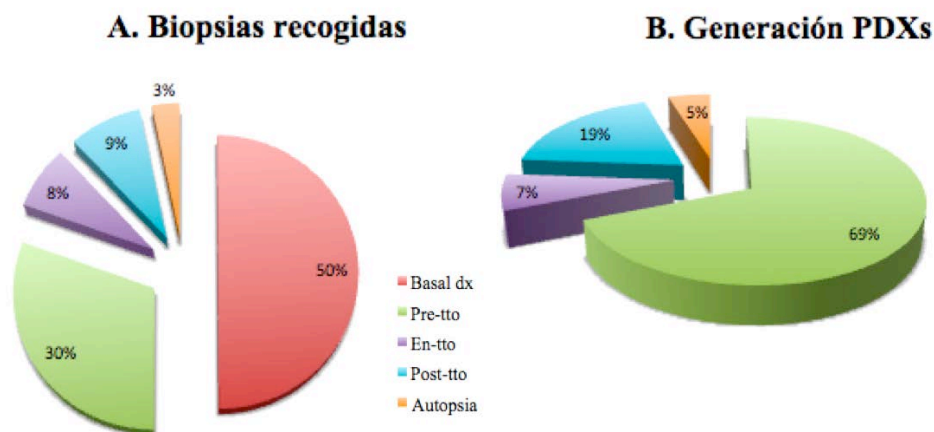


Figura 18. Correlación de las biopsias *FGFR*-alteradas recogidas y generación de nuevos PDXs en distintos momentos evolutivos de la enfermedad. A. En total se han recogido biopsias pertenecientes a 92 momentos del evolutivo de la enfermedad de los distintos pacientes, de las cuales 46 muestras son del diagnóstico de la enfermedad (basal dx; 50%), 28 muestras pre-tratamiento (pre-tto; 30%), 7 muestras en curso de tratamiento (en-tto; 8%) y 8 muestras post-tratamiento (post-tto; 9%) con inhibidores del *FGFR*. En 3 pacientes (3%) se han obtenido múltiples muestras de la autopsia a la progresión. B. Se han implantado 42 nuevas biopsias para intentar generar nuevos PDXs *FGFR*-alterados, obtenidas en la mayoría de los casos, pre-tto con inhibidores del *FGFR* (n=29; 69%). También se han implantado algunas biopsias obtenidas en-tto (n=3; 7%), post-tto (n=8; 19%) o en la autopsia (n=2; 5%). Ninguno de los pacientes disponía de un PDX generado a partir de su biopsia basal dx.

Tabla 9 Colección de biopsias tumorales con aberraciones del *FGFR:FGF* implantadas *de novo* en modelos murinos en el marco del proyecto *FGFR 360° RESISTANCE*.

PDX	TIPO TUMORAL	ALTERACIÓN <i>FGFR:FGF</i>	STATUS PDX	CO-ALTERACIONES DEL PACIENTE
VS-PDX317	Colon adenocarcinoma	FGFR1amp	<i>perdido</i>	TP53-APCmut; SMAD4loss
HP-CTAX20	Colon adenocarcinoma	FGFR1amp	<i>perdido</i>	TP53-APCmut; SMAD4loss
VS-PDX288	Cáncer mama triple negativo	FGFR1amp	estable	
VS-PDX296	Cáncer mama triple negativo	FGFR1amp	estable	
VS-PDX297	Cáncer ER+/HER2- mama	FGFR1amp	<i>perdido</i>	MYC-ZNF703amp; TP53-MSH2- CDKN2Bmut
VS-PDX325	Cáncer ER+/HER2- mama	FGFR1amp	estable	
JAL-PDX469	Cáncer ER+/HER2- mama	FGFR1amp	<i>perdido</i>	
VS-PDX387	Cáncer ER+/HER2- mama	FGFR1amp	<i>perdido</i>	ESR1mut
VS-PDX396	Cáncer ER+/HER2- mama	FGFR1amp	estable	ESR1mut

VS-PDX420	Cáncer mama ER+/HER2-	FGFR1amp	estable	ESR1mut
VS-PDX404	Cáncer mama ER+/HER2-	FGFR1amp	estable	ESR1mut
VS-PDX414	Cáncer mama ER+/HER2-	FGFR1amp	estable	ESR1mut
VS-PDX422	Cáncer mama triple negativo	FGFR1amp	perdido	gBRCA2mut
VS-PDX343	Cáncer mama ER+/HER2-	FGFR1amp FGFR1mut (W4C)	estable	PI3KCAamp
VS-PDX353	Cáncer mama ER+/HER2-	FGFR1amp FGFR1 SNP (S219P)	<i>perdido</i>	
VS-PDX322	Carcinoma esófago SCC	FGFR2 amplificado	estable	TP53-ASXL1mut; CDKN2A/Bloss
AV-PDXT12	Adenocarcinoma gástrico	FGFR2amp	<i>perdido</i>	
LF-PDXT15	Adenocarcinoma gástrico	FGFR2amp	<i>perdido</i>	
VS-PDX306	Cáncer mama triple negativo	FGFR2amp 11q-amp FGFR2 mRNAh	<i>perdido</i>	CCDN1-CDK4amp; TP53mut; SMAD4loss
HP-CTAX23	Colon adenocarcinoma	FGFR1mut (S134D)	estable	BRAF-RNF43-TP53mut
HP-M4X2	Colon adenocarcinoma	FGFR1mut (I529M)	estable	APC-KRAS-TP53mut; MSS; CEA positivo
HP-CTAX30	Colon adenocarcinoma	FGFR1mut (I529M)	estable	APC-KRAS-TP53mut; MSS; CEA positivo
JAL-PDX479	Cáncer mama ER+/HER2-	FGFR1mut (H46Q)	<i>perdido</i>	
JAL-PDX593	Cáncer mama ER+/HER2-	FGFR1mut (N546K)	<i>perdido</i>	
JAL-PDX593.2	Cáncer mama ER+/HER2-	FGFR1mut (N546K)	<i>perdido</i>	
AV-PDX30	Carcinosarcoma endometrial/TMMMt	FGFR2mut (N549D)	estable	PI3KCAmut
HP-CTAX32	Colon adenocarcinoma	FGFR2mut (G238R)	estable	BRAFmut, CEA positivo
HP-CTAX044	Colon adenocarcinoma	FGFR2mut (K659E)	estable	
VS-PDX400	Colangiocarcinoma	FGFR2mut (W290C) FGFR2 mRNAh	<i>perdido</i>	IDH1mut
JAL-PDX66	Colangiocarcinoma	FGFR2mut (W290C) FGFR2 mRNAh	<i>perdido</i>	
AV-PDX26	Carcinoma endometrial	FGFR3mut (T689M)	<i>perdido</i>	TNNB1-PI3KCAmut
AV-PDX27	Carcinoma urotelial	FGFR3mut (R248C)	estable	
AV-PDX31	Melanoma	FGFR3 splice445+2delTAGG	estable	PTENmut , MYCamp
VS-PDX368	Colangiocarcinoma	FGFR2-CASP7trans	estable	PI3KCAmut
VS-PDX371	Colangiocarcinoma (ascitis)	FGFR2-CASP7trans	perdido	PI3KCAmut
AV-PDXT16	Colangiocarcinoma (autopsia)	FGFR2-CASP7trans	<i>perdido</i>	PI3KCAmut
AV-PDXT21	Carcinoma glándula lagrimal	FGFR1 mRNAh FGFR2 mRNAh	<i>perdido</i>	
AV-PDXT17	Carcinoma urotelial	FGFR3 mRNAh	<i>perdido</i>	
AV-PDXT18	Carcinoma urotelial	FGFR3 mRNAh	<i>perdido</i>	
AV-PDXT22	Carcinoma urotelial	FGFR3 mRNAh 11q-amp	<i>perdido</i>	CCND1amp
AV-PDXT14	Carcinoma escamoso larínge (autopsia)	FGFR3 mRNAh	<i>perdido</i>	
VS-PDX338	Hepatocarcinoma	FGFR4/βklotho mRNAh	<i>perdido</i>	

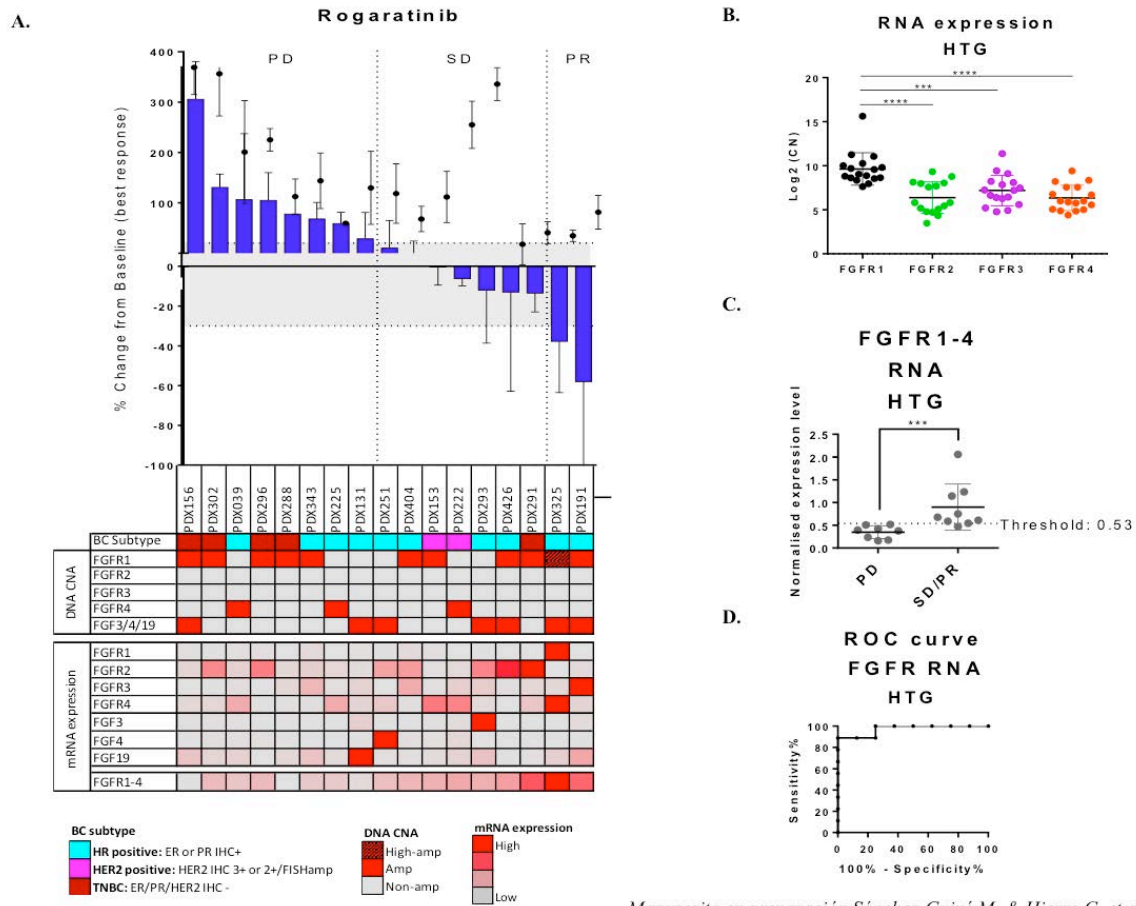
Abreviaciones: amp (amplificado); mut (mutado); mRNAh (altos niveles de expresión mRNA); trans (translocado).

7.2.2. *Identificación de biomarcadores predictivos y evaluación de la actividad anti-proliferativa y anti-angiogénica de los FGFRinh en modelos PDXs FGFR-amplificados.*

De la colección completa *VHIO* de PDXs *FGFR*-alterados, se han seleccionado 17 modelos *FGFR:FGF*-amplificados de cáncer de mama para correlacionar *in vivo* la eficacia anti-tumoral de un FGFRinh con los posibles determinantes moleculares predictivos de respuesta (p.ej. amplificaciones génicas, niveles de expresión mRNA o niveles de proteína de los distintos genes del *FGFR:FGF*) (221).

El panel *MSK-IMPACT™* ha identificado 11 PDXs *FGFR1*-amplificados (PDX156, PDX302, PDX296, PDX288, PDX343, PDX404, PDX153, PDX426, PDX291, PDX325, PDX191), 4 de ellos con co-amplificación del *11q* (PDX156, PDX426, PDX325, PDX191). Además, se han identificado 3 PDXs sólo con la amplificación del *11q* (PDX131, PDX251, PDX293), y 3 PDXs adicionales *FGFR4*-amplificados (PDX039, PDX225, PDX222). No se ha detectado ningún modelo *FGFR2/3*-amplificado. En esta cohorte de PDXs seleccionados había 10 modelos con receptores hormonales positivos (IHC+ ER/PR), 2 modelos HER2 positivos (IHC 3+ HER2 o IHC 2+/FISH amplificado) y 5 modelos de cáncer de mama triple negativo (IHC-ER/PR/HER2).

Tras evaluar la eficacia de rogaratinib en estos 17 PDXs, se han objetivado 2 respuestas parciales (PDX191 y PDX325), 7 estabilizaciones (PDX291, PDX426, PDX293, PDX222, PDX153, PDX404, PDX251) y 8 progresiones (PDX131, PDX225, PDX343, PDX288, PDX296, PDX039, PDX302, PDX156), tal y como se observa en el *waterfall plot* **figura 19A**. Hay que destacar que se ha objetivado un enriquecimiento por cáncer de mama subtipo luminal entre los PDXs sensibles al FGFRinh.



Manuscrito en preparación Sánchez-Guixé M. & Hierro C. et al.

Figura 19. Evaluación de biomarcadores predictivos a FGFRinh en modelos PDXs *FGFR:FGF*-amplificados de cáncer de mama. **A.** Evaluación de la eficacia y análisis de los potenciales determinantes moleculares de respuesta: alteración en el número de copias (CNA) *FGFR1-4/11q* mediante *MSK-IMPACTTM* y niveles de expresión del mRNA evaluados por *HTG EdgeSeq®*. Los modelos se consideraban amplificados si CNA ≥ 4 copias totales del gen. En el *heatmap* se objetiva una expresión diferencial de niveles de *FGFR1-4* mRNA entre los PDXs respondedores (rojo) y los no respondedores (gris). **B.** Los niveles de expresión de *FGFR1* mRNA son significativamente más elevados que el resto de *FGFR* en modelos PDXs *FGFR1*-amplificados. **C.** *FGFR1-4* mRNA se correlaciona con los PDXs sensibles al FGFRinh (punto de corte *HTG EdgeSeq®* 0.53). **D.** Curva ROC de correlación de *FGFR1-4* mRNA con la eficacia al FGFRinh.

Tras completar la caracterización molecular de estos 17 PDXs, destacan algunas observaciones (ver *heatmap* **figura 19A**):

- La amplificación de un gen *FGFR:FGF* no siempre se traduce en alta expresión de mRNA de dicho receptor o ligando (p.ej. PDX191 con CNA *FGFR1* pero sin mRNAh *FGFR1*).

- Pueden detectarse niveles relativamente altos de mRNAh que no se correspondan con el gen *FGFR:FGF* amplificado subyacente (p.ej. PDX291 con CNA *FGFR1* pero mRNAh FGFR2).
- A pesar de que los PDXs *FGFR1*-amplificados presentan una tendencia a mayor expresión FGFR1 mRNAh, los modelos pueden co-expresar niveles variables de mRNA de múltiples *FGFR:FGF* a la vez (p.ej. PDX325 con elevado CNA *FGFR1* y co-amplificación del *11q* pero mRNAh FGFR1 y FGFR4) (**figura 19B**).

A raíz de estos hallazgos en el laboratorio, decidimos analizar con más detalle los niveles de mRNA de los FGFR, pero desarrollando un nuevo biomarcador sumatorio de FGFR1-4 mRNAh. Para ello, realizamos una normalización génica de los valores de expresión mRNA de los cuatro receptores de acuerdo con el valor más alto dentro del grupo para cada gen, y luego calculamos el sumatorio de FGFR1-4 mRNA para cada PDX individual. Los resultados obtenidos indican que la sensibilidad a un FGFRinh en los modelos *FGFR:FGF*-amplificados de PDXs cáncer de mama se correlaciona con los niveles de este biomarcador compuesto que con los niveles de amplificación génica o mRNA individuales de cada receptor (**figura 19C**). FGFR1-4 mRNAh es capaz de discriminar los PDXs respondedores de los no-respondedores (punto de corte = 0.53), con unas curvas ROC de alta especificidad (100%) y alta sensibilidad (88.9%) según la tecnología *HTG EdgeSeq*® (**figura 19D**). Además, estos resultados se han validado mediante las otras dos técnicas adicionales con que se ha caracterizado la colección de PDXs, veáse *nCounter*® y qRT-PCR.

El análisis a nivel proteico de los FGFR1/2/3 muestra que: la sobreexpresión de FGFR1 y FGFR3, evaluada mediante western blot, se ha asociado a eficacia anti-tumoral en concordancia con aquellos PDXs que presentan FGFR1 mRNAh (p.ej. PDX325) o FGFR3 mRNAh (p.ej. PDX191). La IHC FGFR2 ha presentado una correlación moderada con sus respectivos niveles de FGFR2 mRNAh (datos no incluidos en esta tesis; manuscrito en

preparación Sánchez-Guixé M. & Hierro C. *et al*). Sin embargo, consideramos que para propósitos clínicos, es más fiable disponer de un biomarcador FGFR1-4 mRNAh, ya que las técnicas de IHC no están adecuadamente optimizadas para el análisis de *FGFR1/3/4* o *FGFs*, y existen limitaciones pre-analíticas todavía pendientes de resolver (p.ej. evaluación cualitativa con alta variabilidad patólogo-dependiente).

Tras obtener estos resultados en los PDXs, hemos evaluado si FGFR1-4 mRNAh podía validarse como biomarcador predictivo en una cohorte disponible de pacientes con cáncer de mama tratadas con MTKI (**figura 20**). Las muestras de parafina disponibles de 9 pacientes han sido analizadas con el mismo panel OBP *HTG EdgeSeq*®, 8 de las cuáles habían sido preseleccionadas para recibir el MTKI debido a que su tumor era *FGFR1*-amplificado. De éstas, 4 pacientes habían recibido previamente un FGFRinh selectivo sin eficacia, aunque 2 de las pacientes tuvieron que abandonar el tratamiento precozmente debido a la toxicidad inaceptable presentada en curso del primer ciclo de ensayo -pacientes 7 y 8-. Una de las 9 pacientes de la cohorte se consideró candidata a recibir MTKI debido al beneficio previo que había presentado a un fármaco anti-angiogénico -paciente 6-.

A diferencia de lo que ocurre con FGFRinh en PDXs, FGFR1-4 mRNAh no es un biomarcador predictivo capaz de discriminar a las pacientes respondedoras (n=5) de las no-respondedoras (n=4) a MTKI. Cabe destacar que 2 de las pacientes que habían recibido FGFRinh, presentaron ClinBen al recibir un MTKI posterior -pacientes 7 y 8-. Tampoco se ha encontrado ninguna correlación significativa de los niveles de expresión de mRNA de otras dianas anti-angiogénicas, como VEGFR1-3 o PDGFR α - β y sus ligandos, con la sensibilidad a MTKI (ver *heatmap* **figura 20**).

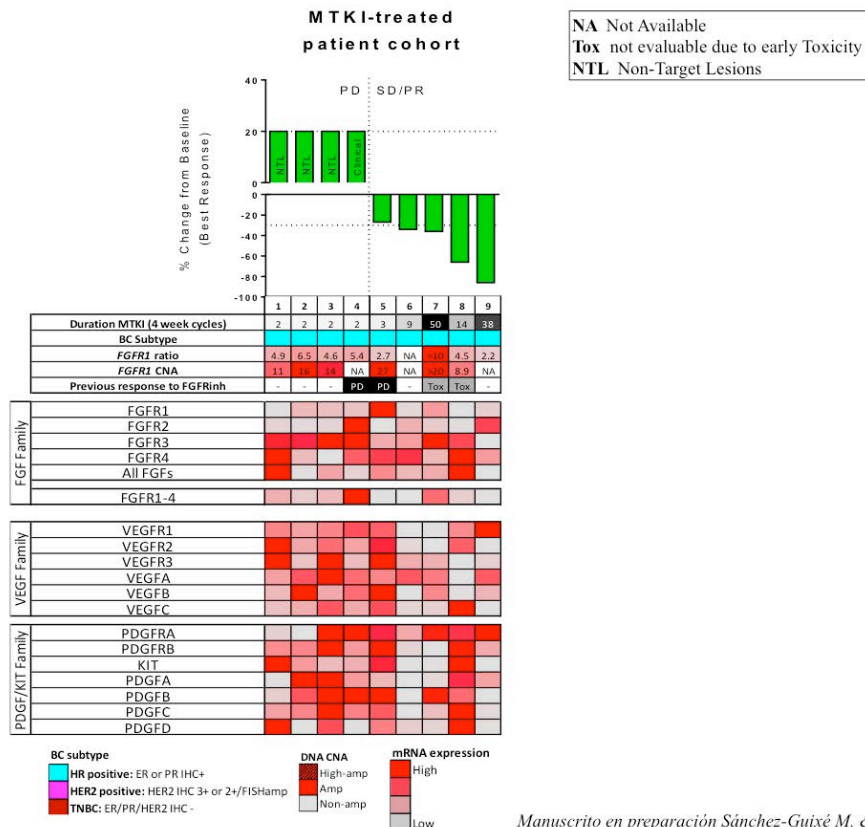


Figura 20. Evaluación de biomarcadores predictivos a MTKI en una cohorte de pacientes con cáncer de mama. Comparación de la eficacia anti-tumoral de un MTKI en 5 pacientes respondedoras (SD/PR) y 4 no-respondedoras (PD). Las pacientes se consideraron PD si presentaban un incremento >20% de las lesiones diana y/o progresión de las lesiones no-diana (NTL) y/o progresión clínica (Clinical). 8 de las pacientes eran *FGFR1*-amplificadas por FISH, según el criterio de CNA ≥ 6 copias totales del gen *FGFR1*, o con una ratio gen *FGFR1*:centrómero ≥ 2.2 . Los niveles de expresión del mRNA de las distintas dianas han sido evaluados mediante el panel OBP *HTG EdgeSeq*®. En el *heatmap* no se ha objetivado una expresión diferencial de los niveles de VEGFR/VEGF o PDGFR/PDGF mRNA que se correlacione con la sensibilidad del MTKI en pacientes.

Ante los hallazgos de que *FGFR1-4* mRNA es un biomarcador predictivo a los FGFRinh en PDXs, pero no a los MTKI en pacientes con cáncer de mama, decidimos estudiar con mayor profundidad el mecanismo de acción de ambos tipos de inhibidores del FGFR. El hecho de que algunas pacientes hubieran respondido al MTKI y no al FGFRinh inicial, hizo plantearnos que una mayor capacidad anti-angiogénica del MTKI debía ser relevante para traducirse en eficacia en el cáncer de mama. En base a la sensibilidad observada en los experimentos previos, seleccionamos 7 modelos PDXs *FGFR1amp* para comparar la actividad anti-tumoral del MTKI lucitanib con el FGFRinh rogaratinib: Evaluamos los 4 PDXs más resistentes (PDX156, PDX288,

PDX302, PDX343) y los 3 PDXs más sensibles al FGFRinh (PDX291, PDX191, PDX325).

El MTKI demostró una actividad anti-tumoral significativa (de los 7 modelos, sólo el PDX156 no presentó reducción del tamaño tumoral), muy superior a la eficacia observada con FGFRinh, y destacable entre los PDXs con niveles de expresión FGFR1-4 mRNA bajos (p.ej. PDX288, PDX302 y PDX343) (ver *waterfall* de eficacia **figura 21**). Al igual que ocurría en la cohorte de pacientes, los niveles de expresión de otras dianas anti-angiogénicas como VEGFR1-3 o PDGFR α - β y sus ligandos, no se han correlacionado con la sensibilidad al MTKI en PDXs (ver *heatmap* **figura 21**).

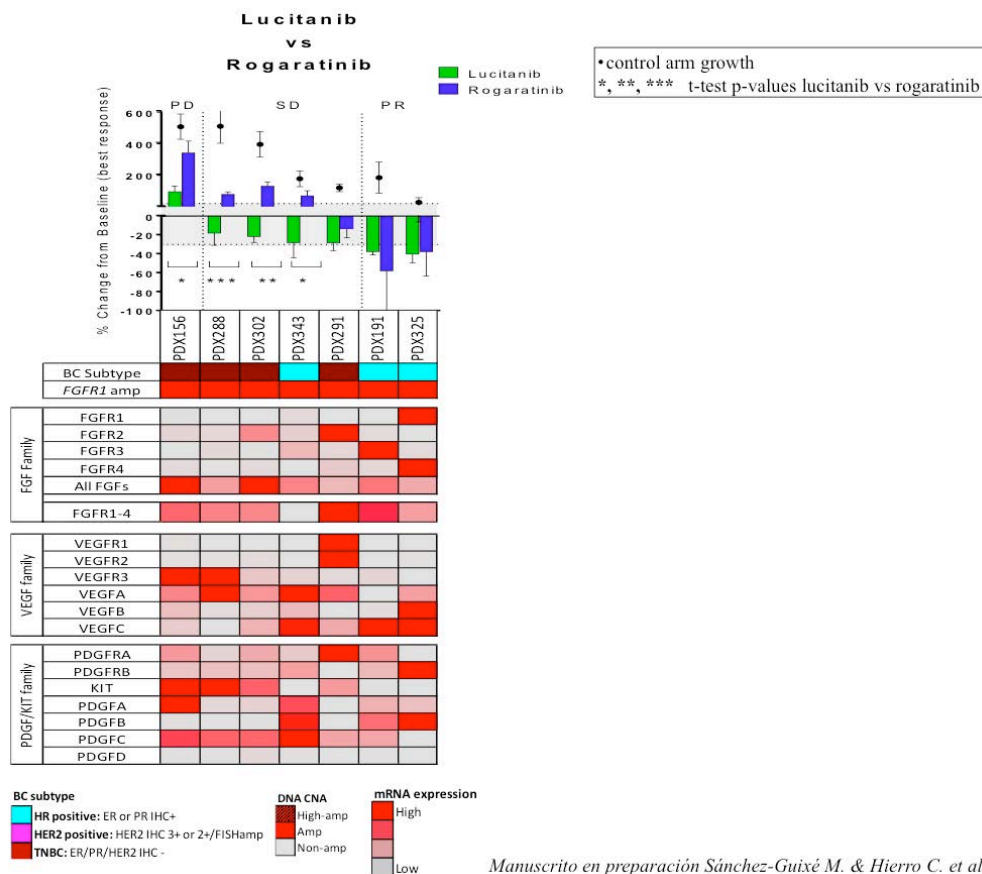
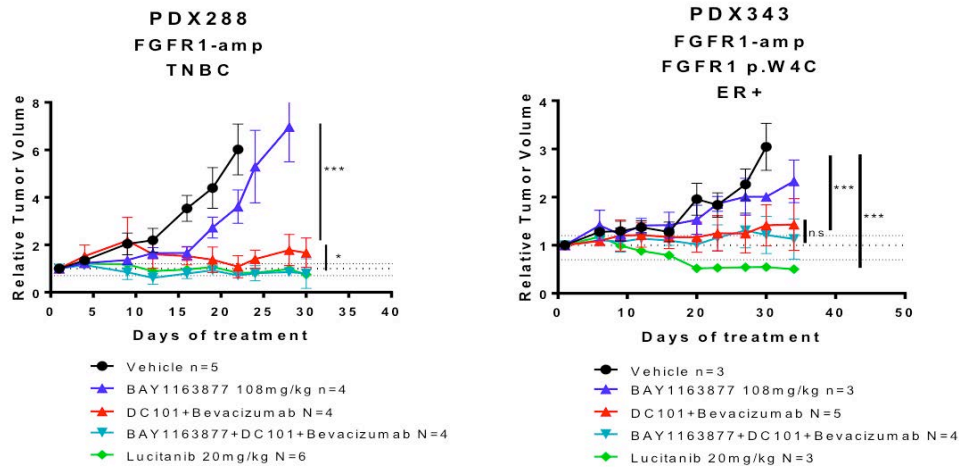


Figura 21. Correlación de la eficacia FGFRinh/MTKI y biomarcadores predictivos en modelos PDXs FGFR:FGF-amplificados de cáncer de mama. Comparación de la eficacia anti-tumoral del MTKI lucitanib con el FGFRinh rogaratinib en 4 PDXs resistentes (PDX156, PDX288, PDX302, PDX343) y 3 PDXs sensibles (PDX291, PDX191, PDX325) al inhibidor selectivo. Los modelos se consideraban *FGFR1*-amplificados si *MSK-IMPACT*TM CNA ≥ 4 copias totales del gen. Los niveles de expresión del mRNA de los distintos genes diana han sido evaluados mediante el panel OBP *HTG EdgeSeq*®. Mientras que la eficacia a rogaratinib se ha correlacionado con *FGFR1-4* mRNAh, lucitanib ha presentado una actividad anti-tumoral superior, independiente de los niveles de expresión mRNA de *FGFR/FGF*, *VEGFR/VEGF* o *PDGFR/PDGF* (6 de los 7 PDXs con reducción del tamaño tumoral).

Teniendo en cuenta los datos disponibles en la literatura avalando las propiedades anti-proliferativas y anti-angiogénicas de los MTKI (90) y los FGFRinh (222), hipotetizamos que el incremento de eficacia anti-tumoral observado con MTKI podía estar relacionado con una mayor actividad anti-angiogénica respecto al FGFRinh. Para reforzar la actividad anti-angiogénica del FGFRinh, plateamos combinar el tratamiento con dos agentes dirigidos contra la vía de *VEGFR:VEGF*. Para este experimento, seleccionamos 2 modelos resistentes al FGFRinh pero sensibles al MTKI, el PDX288 y el PDX343, con los que realizamos experimentos *in vivo* comparando la eficacia de lucitanib con rogaratinib en combinación con bevacizumab, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humano (hVEGF), con DC101, un anticuerpo anti-VEGFR2 murino (mVEGFR2), con tal de asegurar el bloqueo completo de la angiogénesis en PDXs (ver racional en [figura 6](#)).

De acuerdo con nuestra hipótesis, ambos PDXs resistentes al FGFRinh presentaron respuesta al tratamiento combinado de bevacizumab y DC1010, de una magnitud similar a la eficacia alcanzada con lucitanib. La triple combinación de rogaratinib con bevacizumab y DC101 no ofreció beneficio adicional (**figura 22**). Estos resultados sugieren en efecto, que la eficacia observada con MTKI en modelos resistentes a FGFRinh monoterapia está justificada por su potente mecanismo de acción subyacente, debido a un mayor bloqueo anti-angiogénico que prevalece respecto al bloqueo *FGFR:FGF*. Esta hipótesis se ha demostrado en los PDXs, evidenciándose la reducción significativa de la presencia de vascularización, mediante el marcaje CD31+ en la zona tumoral y de un mayor grado de necrosis en los modelos específicamente sensibles al MTKI (datos no incluidos en esta tesis; manuscrito en preparación Sánchez-Guixé M. & Hierro C. *et al*).



Manuscrito en preparación Sánchez-Guixé M. & Hierro C. et al.

Figura 22. Análisis del mecanismo de acción de los inhibidores del FGFR en modelos PDXs *FGFR1*-amplificados de cáncer de mama. Experimentos *in vivo* con PDX288 y PDX343, ambos resistentes a rogaratinib monoterapia (azul). La eficacia de la combinación anti-angiogénica, bevacizumab y DC101 (rojo) es similar a la alcanzada con lucitanib (verde), sin beneficio añadido de la triple combinación con rogaratinib (cian). Análisis estadístico realizado mediante el test ANOVA.

7.2.3. Estudio de la heterogeneidad tumoral y mecanismos de resistencia en pacientes *FGFR*-alterados respondedores inusuales.

7.2.3.1. Caso 30 *FGFR 360°R*: Mecanismos de resistencia en un tumor mülleriano mixto maligno tubárico-endometrial *FGFR2*-mutado sin beneficio a *FGFRinh*.

El caso 30 se trata de una mujer que tenía 61 años en el momento de su inclusión en el proyecto *FGFR 360° RESISTANCE*, sin hábitos tóxicos, que como único antecedente destacable había sido diagnosticada y tratada eficazmente de tuberculosis genital a los 26 años, sin recidivas posteriores. Su historia oncológica se remonta a junio 2014 a raíz de un episodio de metrorragias, realizándose una histerectomía y doble anexectomía. El resultado de la anatomía patológica reveló un tumor mülleriano mixto maligno (TMMM) de probable origen tubárico-endometrial, con elementos de condrosarcoma y epiteliales (componente endometrioide, escamoso, seroso e

indiferenciado), invadiendo el ovario izquierdo, la trompa de Falopio ipsilateral y menos del 50% del miometrio uterino. En el estudio de extensión con TC posterior se objetivaron múltiples adenopatías retroperitoneales patológicas e implantes tumorales peritoneales, por lo que se consideró una paciente afecta de un TMMM candidata a tratamiento sistémico. La paciente recibió 6 ciclos de quimioterapia paliativa con carboplatino/paclitaxel hasta noviembre 2014, alcanzando respuesta parcial como mejor respuesta (223). Desafortunadamente, sólo 2 meses después presentó nueva progresión a nivel de la carcinomatosis peritoneal y adenopatías intra-abdominales. Desde enero hasta marzo 2015 recibió 3 ciclos de doxorubicina liposomal pegilada, sin beneficio alguno (224).

Dado que se trataba de una paciente sin antecedentes patológicos destacables, con ECOG 0, afecta de un TMMM estadio IV refractaria a 2 líneas de tratamiento previas, se valoró como posible candidata a participar en un ensayo fase 1 en la *UITM-VHIO*. La caracterización molecular dentro del programa de *pre-screening VHIO* de la muestra de archivo del diagnóstico inicial detectó una doble mutación en *FGFR2* (N549D) y *PI3KCA* (E81K) mediante *AmpliconSeq panel v.3.0*. ([Anexo 3](#)). Dado que la *FGFR2*mut (N549D) estaba reportada como una mutación oncogénica en la literatura, se discutió con la paciente la posibilidad de administrar terapia experimental dirigida con un *FGFRinh* disponible, que aceptó.

En julio 2015, la paciente fue incluida en un ensayo fase 1 testando un *FGFR1-3inh* reversible combinado con un *PI3K(α)inh*, del que recibió un total de 4 ciclos, con excelente tolerancia. La paciente presentó estabilidad sin reducción de tamaño según criterios RECIST v.1.1. en el primer TC tras 2 meses de tratamiento, aunque presentó progresión serológica (elevación Ca 125) y radiológica de las lesiones no-diana tras completar el ciclo 4, con aparición de nuevas metástasis hepáticas. En noviembre 2015, la paciente accedió a la realización de una biopsia hepática a la progresión de este primer ensayo con *FGFR1-3inh* reversible. Una muestra de dicha lesión hepática fue implantada para generar el AV-PDX30 (Grupo de Resistencia Farmacológica

y Xenografts del Instituto Catalán de Oncología (ICO)-IDIBELL; Investigador principal Dr. Alberto Villanueva).

Posteriormente, dado el ECOG mantenido de la paciente, y sin toxicidades residuales a los tratamientos previos, en enero 2016 se incluyó en un segundo ensayo fase 1 testando un FGFR1-4inh irreversible, al que la paciente progresó rápidamente en curso del primer ciclo. La paciente fue finalmente éxitus por fallo multiorgánico en febrero 2016, siendo autorizada la realización de una autopsia investigacional en el marco de este Proyecto. La **figura 23A** ilustra la evolución clínica de esta paciente.

Los TMMM son neoplasias muy raras, que pueden originarse a nivel ginecológico o extra-gonadal, considerándose los primarios de las trompas de Falopio como entidades extremadamente infrecuentes (0.1-0.5% de los tumores ginecológicos) (225). Los TMMM son neoplasias bifásicas, con un componente mesenquimal y otro epitelial maligno, que a día de hoy se clasifican dentro de la categoría de carcinosarcomas. Su patogénesis sigue siendo desconocida, aunque existen algunas teorías: 1) la teoría de la conversión, postula que estos tumores surgen de la transformación metaplásica de una célula neoplásica en otro tipo; 2) la teoría de la combinación, que se basa en que ambas poblaciones celulares se originarían a partir de una célula totipotente neoplásica precursora; y finalmente 3) la teoría de la colisión, que propone que estas neoplasias surgen de la mezcla de dos poblaciones neoplásicas independientes (p.ej. sarcoma y carcinoma) (226). Son neoplasias de comportamiento agresivo con mal pronóstico, y dada su extrema baja incidencia, no existe un tratamiento estándar establecido. Los pacientes afectados de TMMM suelen estar infra-representados en los ensayos clínicos precoces, y existe escasa información disponible en relación a los potenciales *drivers* de su carcinogénesis, por lo que el análisis genómico en profundidad de este caso 30 puede ofrecer información muy valiosa en relación a esta rara entidad.

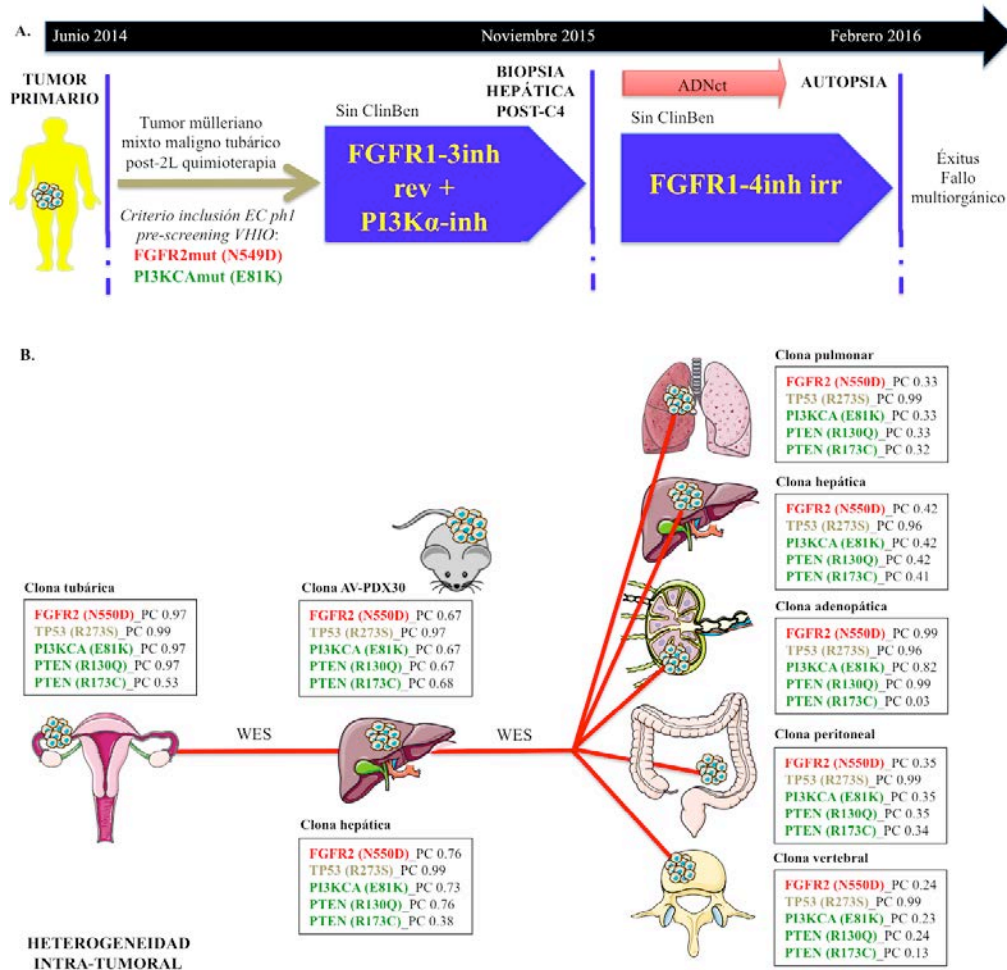


Figura 23. Evolución clínica y caracterización genómica del caso 30 *FGFR 360*^R. **A.** Tratamientos oncoespecíficos y obtención de muestras biológicas seriadas de la paciente con un tumor mülleriano mixto maligno (TMMM) tubárico-endometrial; **B.** Comparación del análisis WES pre-FGFRinh rev/PI3K(α)inh –biopsia TMMM basal- con post-combinación –biopsia hepática/AV PDX30-, y autopsia investigacional post-FGFRinh irr.

Las mutaciones del *FGFR2* se han descrito hasta en el 12% de los adenocarcinomas de endometrio (64, 65), y aunque en menor incidencia, también hay datos que sugieren que algunas *FGFR2*mut pueden contribuir en la patogénesis de un subgrupo de tumores de ovario (227). Sin embargo, más allá de algún caso reportado, no existen datos en relación al rol que la vía *FGFR:FGF* puede desempeñar en la carcinogénesis de los TMMM. Datos preclínicos disponibles han demostrado el valor predictivo de respuesta de

algunas de las mutaciones *FGFR2* a los FGFRinh (157), y de hecho, han sido el punto de partida para establecer la racional de la doble terapia dirigida en tumores *PI3KCA*-mutados *FGFR*-dependientes (78). Sin embargo, en nuestro caso la paciente no presentó beneficio clínico a la combinación de un FGFRinh con PI3K(α)inh, a pesar de la detección mediante el *pre-screening* local *VHIO* de una doble mutación en *FGFR2* (N549D) y *PI3KCA* (E81K), así que nos planteamos qué mecanismos de resistencia intrínseca subyacentes podían explicar esta falta de eficacia.

Los resultados de la ultra-secuenciación realizados de este caso mediante WES han revelado que se trata de una neoplasia con marcada heterogeneidad intra-tumoral, ya que encontramos hasta 5 clonas tumorales principales portadoras de mutaciones en los genes *FGFR2* (N550D), *TP53* (R273S), *PI3KCA* (E81K), *PTEN* (R130Q) y *PTEN* (R173C) (**figura 23B**). La mutación en *FGFR2* (N550D) se considera una variante de significado incierto (VSI), sin que existan todavía datos disponibles en relación a su potencial oncogénico, aunque se ha asociado a síndromes del desarrollo esquelético anómalos (228). Esta *FGFR2*mut (N550D) se trata probablemente de la misma mutación inicial *FGFR2* (N549D), y consideramos que la diferencia es debida a las particularidades intrínsecas de las técnicas de análisis empleadas en *VHIO* respecto *MDACC* (p.ej. utilización de una transcripción distinta para anotar la mutación). Resulta interesante además revisar con más detalle cada una de las otras variantes génicas detectadas en esta paciente (54):

- *TP53*mut (R273S): *TP53* es el gen supresor de tumores más comúnmente alterado en cánceres humanos, siendo las mutaciones *TP53* más frecuentes en tumores uterinos (35%). La variante R273S es una mutación *missense*. Se considera una variante probablemente patogénica, dado que su localización en un aminoácido crucial del gen sugiere una pérdida de función de la proteína resultante. La presencia de clonas *TP53* mutantes predispone al desarrollo y a la promoción de la supervivencia de las células cancerosas, asociándose a respuestas terapéuticas ineficaces y un peor pronóstico. Sin embargo, el

progresivo mayor conocimiento de las variantes TP53mut ha demostrado que no todas las mutaciones tendrían efectos celulares equivalentes, y que por lo tanto, son necesarios más estudios funcionales para discernir las consecuencias pato-biológicas asociadas con cada una de ellas, como sería el caso de esta R273S (229).

- PI3KCAmut (E81K): *PI3KCA* es uno de los oncogenes más frecuentemente alterados en cáncer, con mutaciones descritas en el 46.12% de los tumores uterinos. La variante E81K es una mutación *missense*, ya descrita previamente en el TCGA de cáncer de endometrio. A pesar de datos conflictivos en la literatura, se la considera una variante probablemente patogénica dado que afecta una región *hotspot* del gen –dominio de unión a la subunidad reguladora p85-, cuya proteína resultante induciría una activación constitutiva de la vía PI3K/AKT/mTOR, implicada en el crecimiento celular, supervivencia, proliferación y motilidad.
- PTENmut (R130Q y R173C): *PTEN* es un gen supresor de tumores comúnmente alterado en cáncer, con el mayor porcentaje de alteraciones detectado en tumores uterinos (mutaciones 62.19%). Ambas variantes R130Q y R173C son mutaciones *missense*, ya descritas previamente en el TCGA de cáncer de endometrio. Se considera que ambas mutaciones son variantes probablemente patogénicas, ya que la predicción *in silico* es que la proteína PTEN resultante se traduciría en una fosfatasa inactiva, que no podría defosforilar PIP₃ y por consiguiente, conllevaría a la activación constitutiva de AKT/mTOR.

Dada la ausencia de datos específicos de cada una de estas variantes en TMMM, se evaluó más detenidamente su oncogenicidad mediante la tecnología *FACTTM* (ver [6.1.2.2.1](#)). El análisis funcional ha confirmado el papel oncogénico individual de FGFR2mut (N549D) y PI3KCAmut (E81K) en esta histología. Además, el análisis conjunto *FACTTM* ha objetivado que

ambas mutaciones potencian la activación de la vía de señalización *FGFR:FGF* (**figura 14A**), confirmándose el bloqueo mediante un FGFRinh en el modelo de predicción de respuesta *in vitro* (**figura 14B**). A pesar de ello, el status de pérdida de PTEN inducido por la doble mutación oncogénica en R130Q y R173C podría justificar la falta de eficacia al PI3Kinh (22), avalando la reactivación redundante de la vía *MAPK* como mecanismo adicional de resistencia intrínseca a los FGFRinh/ PI3K(α)inh (230).

Nuestra paciente fue incluida en el ensayo clínico fase I testando la combinación del FGFR1-3inh reversible infigratinib con el PI3K(α)inh alpelisib (ClinicalTrial.gov NCT01928459). A pesar de que el ensayo estaba enriquecido con cohortes de pacientes molecularmente seleccionados, no se observó actividad sinérgica en la población con alteraciones duales en *FGFR* y *PI3KCA* (DCR global 9.7%), sólo reportando alguna respuesta esporádica (199). El estudio escaló las dosis administradas hasta las dosis plenas de ambos fármacos, 300 mg/día continuo de alpelisib durante 4 semanas e infigratinib 125 mg/día las primeras 3 semanas de cada ciclo. Sin embargo, el 71% de los pacientes precisó al menos una interrupción o reducción de dosis debido a la toxicidad presentada, por lo que las dosis subóptimas recibidas podrían haber influenciado en parte en la escasa eficacia observada.

Estos datos son consistentes con la experiencia previa que demuestra que la presencia de mutaciones en *PI3KCA* y la mayoría de las alteraciones *FGFR* por sí solas son generalmente insuficientes para predecir la respuesta agnóstica independiente de histología. Además, estos resultados indican la necesidad de una evaluación más rigurosa de los posibles biomarcadores, antes de asumir que las combinaciones de fármacos son la estrategia idónea para tumores con múltiples aberraciones moleculares. En este sentido, el análisis genómico central realizado mediante el panel NGS-*Foundation One*®, confirmó la presencia de las subpoblaciones mutadas *FGFR2-PI3KCA-PTEN*, aunque en este caso, no fue capaz de detectar alteraciones adicionales para ayudar a caracterizar el tumor de esta paciente (**figura 24A**). Sin embargo, es

interesante destacar el hallazgo de múltiples VSI mediante el análisis WES que nosotros llevamos a cabo, implicando distintas vías de señalización celular (**figura 24B**):

- Vía MAPK: RPS6KA5mut (E206), RASA2mut (L50V), PTPRRmut (F527C), PPP3CBmut (E368), MAP3K5mut (R1014W) e IL1R1mut (E214).
- Vía PI3K: PTENmut (F341V) y MTORmut (G1270D).
- Vía JAK/STAT: LEPRmut (S60L), IL20RAmut (S323Y), IFNGR2mut (S257L) y CREBBPmut (R1392).
- Otros receptores tirosina quinasa: NTRK3mut (K27N) y FLT1mut (D1052Y).

Se desconoce por ahora el papel que cada una de estas VSI haya podido tener en la carcinogénesis de este TMMM. Sin embargo, a priori parece tratarse de un tumor hipermutado, con una tasa de mutación por muestra de 10 mutaciones/Mb -promedio de 500 mutaciones por muestra, con una región secuenciada de 50 Mb-. Sin embargo, no se han detectado mutaciones en los genes clásicos asociados al sd.Lynch hereditario –*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*- que nos permitan etiquetarlo como un tumor MSI-H/dMMR. Aún así, la extrema heterogeneidad intra-tumoral y el hallazgo de algunas alteraciones moleculares concretas (p.ej. TP53mut, PI3KCAmut o PTENmut), apuntan a que existan otros mecanismos subyacentes en este tumor que le hayan conferido el característico fenotipo-hipermutado de los tumores dMMR (231). En este caso concreto, las VSI podrían haber actuado como múltiples eventos subclonales *drivers*, e hipotetizamos que incluso alguna de ellas podría estar implicada como mecanismo de evasión inmune, favoreciendo la progresión tumoral mediante la señalización anómala de la vía del interferón (p.ej. VSI en la vía JAK/STAT).

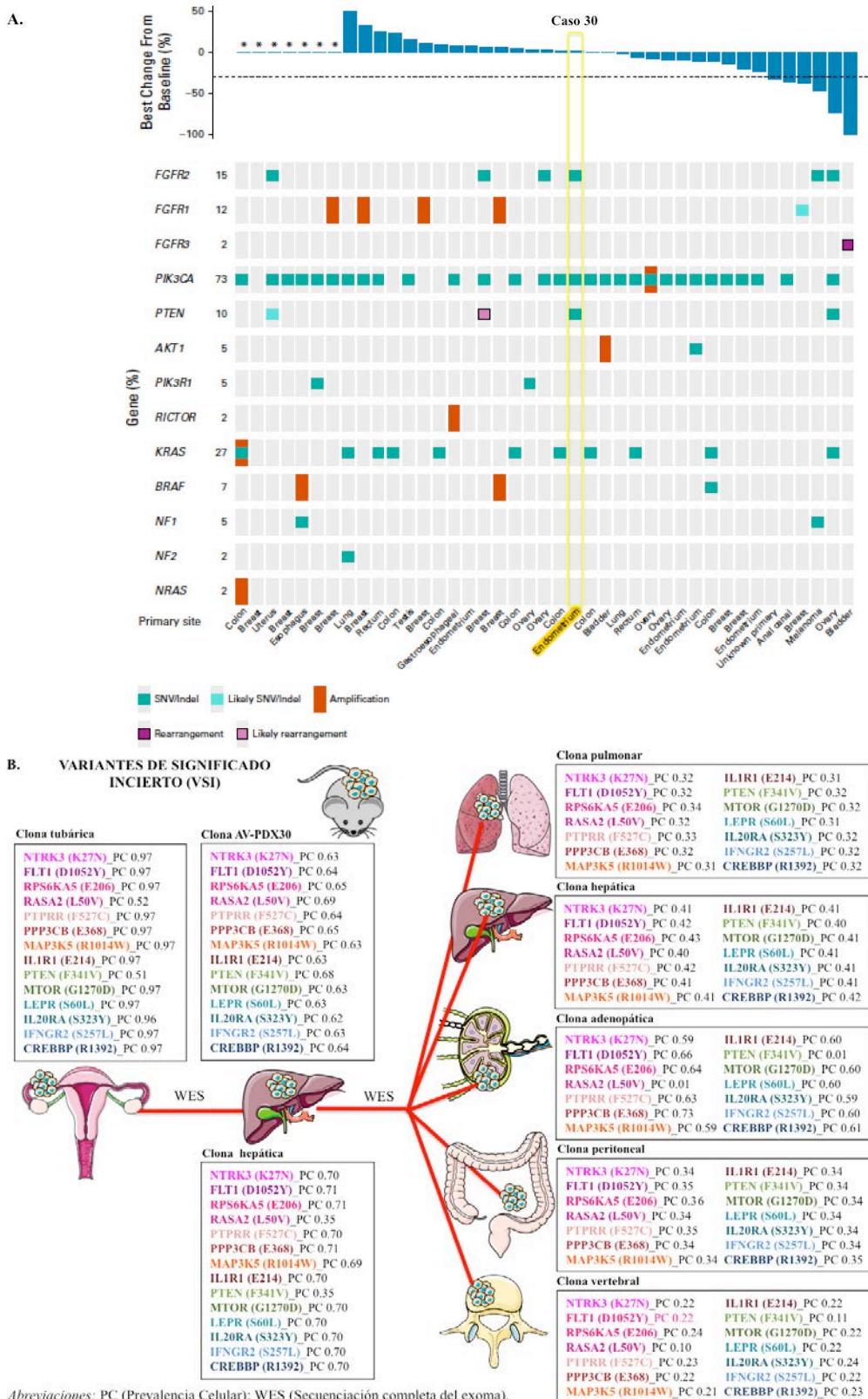


Figura 24. Diferencias en las alteraciones somáticas detectadas mediante NGS-panel versus WES.
A. Waterfall plot de eficacia y hallazgos genómicos detectados mediante *FoundationOne*® en el EC ph1 con FGFRinh infigratinib + PI3Kininh alpelisib (199): el caso 30 (amarillo) no presentó ClinBen (SD sin reducción tamaño tumoral < 4 meses); **B.** VSI detectadas mediante WES en un TMM tubárico-endometrial.

7.2.3.2. Caso 66 *FGFR 360°R*: Mecanismos de resistencia en un colangiocarcinoma *FGFR2*-translocado con beneficio clínico a *FGFRinh*.

El caso 66 se trata de una mujer que tenía 49 años en el momento de su inclusión en el proyecto *FGFR 360° RESISTANCE*, ex-fumadora de ½ paquete al día desde hacía 4 años, sin comorbilidades significativas. Su historia oncológica se remonta a noviembre 2014 a raíz de síndrome tóxico y dolor abdominal post-prandial, con el hallazgo de un adenocarcinoma de vía biliar diseminado con múltiples metástasis hepáticas y pulmonares, adenopatías mediastínicas y retroperitoneales, carcinomatosis peritoneal. Se consideró a la paciente candidata a quimioterapia paliativa con cisplatino/gemcitabina, de la que recibió un total de 6 ciclos hasta marzo 2015, alcanzando estabilidad radiológica como mejor respuesta (232). Tras un descanso terapéutico, se diagnosticó de nueva progresión pulmonar en junio 2015. Recibió entonces 12 ciclos de una segunda línea paliativa con FOLFOX6, presentando de nuevo estabilización global de la enfermedad (233). En diciembre 2015 se suspendió dicho esquema de tratamiento al confirmarse progresión a nivel hepático.

Considerándose una paciente joven, sin antecedentes patológicos destacables, afecta de un colangiocarcinoma estadio IV refractaria a 2 líneas de tratamiento previas, se valoró como posible candidata a participar en un ensayo fase 1 en la *UITM-VHIO*. La caracterización molecular dentro del programa de *pre-screening VHIO* de la muestra de archivo del diagnóstico inicial detectó una translocación *FGFR2-CASP7* mediante *NanoString® fusion panel v.4.0*. ([Anexo 2](#)). Se discutió entonces con la paciente la posibilidad de administrar terapia experimental dirigida con un *FGFRinh*, tras confirmarse como criterio de inclusión para la fase de expansión de un ensayo la misma *FGFR2-CASP7*trans, mediante su test de *pre-screening* central en ADNct.

En marzo 2016, la paciente fue incluida en un ensayo fase 1 testando un *FGFR1-4inh* reversible, del que recibió un total de 4 ciclos hasta junio 2016, con excelente tolerancia. La paciente presentó estabilidad según criterios

RECIST v.1.1. durante 4 meses de tratamiento, con reducción del tamaño tumoral (-23% en las lesiones diana). En julio 2016, la paciente accedió a la realización de una biopsia a la progresión del FGFR1-4inh, obteniéndose una muestra de la metástasis hepática en franca progresión. Una muestra de dicha lesión hepática fue implantada para generar el PDX368 (Grupo de Terapia Experimental *VHIO*; Investigador principal Dra. Violeta Serra).

Posteriormente, dado el ECOG 1 de la paciente, asintomática y sin toxicidades residuales a los tratamientos previos, se incluyó en un segundo ensayo fase 1 testando un anti-angiogénico, al que la paciente progresó rápidamente. La paciente fue finalmente éxitus por fallo hepático en septiembre 2016, siendo autorizada la realización de una autopsia investigacional en el marco de este Proyecto. La **figura 25A** ilustra la evolución clínica de esta paciente.

El análisis mediante RNAseq de las muestras disponibles del caso ha revelado la persistencia de la FGFR2-CASP7trans como evento clonal a lo largo de la evolución de la enfermedad de la paciente, ya que encontramos la misma fusión en la biopsia hepática realizada en julio 2016 a la progresión del FGFRinh, así como en 2 de las lesiones biopsiadas en la autopsia de septiembre 2016 – metástasis pulmonar y hepática- (**figura 25B**). Aunque la secuenciación RNA de la muestra hepática basal no ha confirmado la presencia de la FGFR2-CASP7trans, detectada en ADNct y confirmada mediante *NanoString*® en la misma biopsia de noviembre 2014, se considera que factores analíticos han podido limitar la sensibilidad de dicha técnica (p.ej. antigüedad >5 años FFPE con degradación del RNA). Esta misma causa podría justificar que el RNAseq no haya detectado la translocación en la metástasis biliar obtenida durante la autopsia (p.ej. tiempo de fijación y conservación no adecuados durante el proceso de recogida).

Tratándose de una paciente con un colangiocarcinoma refractario, que presentó beneficio clínico a una tercera línea de tratamiento con FGFRinh, consideramos que esta translocación *FGFR2-CASP7* tenía un rol

probablemente oncogénico, actuando como *driver* del tumor. Aunque no disponemos de datos específicos en tumores de vías biliares, la translocación *FGFR2-CASP7* [t(10:10)(q25;q26)] sí ha sido previamente descrita como oncogénica en cáncer de mama (228). De hecho, la mayoría de las proteínas de fusión oncogénicas *FGFR2* han sido descritas en colangiocarcinomas, y comparten características comunes: un extremo N'-terminal (5') *FGFR* casi idéntico, incorporando el dominio de inmunoglobulinas y tirosina quinasa, fusionado con un gen asociado en el extremo C'-terminal (3'), que invariablemente contiene un motivo de oligomerización/dimerización (234). La proteína de fusión resultante con el gen *CASP7*, que en condiciones biológicas normales codifica una caspasa implicada en apoptosis e inflamación, es capaz de mediar la oligomerización que desencadena la activación de la quinasa *FGFR* y, por consiguiente, su cascada de señalización (235).

Las alteraciones moleculares del *FGFR* se han descrito en el 10-16% de colangiocarcinomas intrahepáticos (iCCA). Como ocurre con nuestro caso 66, predominan las translocaciones del *FGFR2*, sobretodo en pacientes jóvenes (20% en menores de 40 años) con un curso de la enfermedad más indolente (mOS 37 meses iCCA *FGFRalt* versus 20 meses iCCA *wild-type*; $p < 0.001$) (236). Por ello, se ha considerado que el tratamiento con *FGFRinh* puede tener un impacto positivo en este subgrupo seleccionado de pacientes iCCA *FGFR2alt*. En 2019, Bahleda R. *et al* reportaron los resultados del ensayo fase 1 con el *FGFR1-4inh* erdafitinib, en el que se incluyeron 11 colangiocarcinomas, 8 de ellos portadores de una translocación *FGFR* (ClinicalTrial.gov NCT01703481) (110). Precisamente, nuestra paciente fue incluida en este ensayo clínico (**figura 25C**), en el que se observaron 3 respuestas parciales (ORR 27%), con una mediana de duración de la respuesta de 11.4 meses entre los respondedores. Sin embargo, en el estudio no se realizaron análisis adicionales en los subtipos histológicos de respondedores, ni para evaluar la eficacia del *FGFRinh* entre las distintas alteraciones (p.ej. mutaciones versus fusiones), ni entre las distintas variantes (p.ej. translocaciones específicas *FGFR2-BICC1* versus *FGFR2-CASP7*), debido en

parte al pequeño tamaño muestral. Tampoco se realizó un análisis más exhaustivo de las posibles co-alteraciones moleculares existentes en los pacientes, y que podrían justificar las diferencias de eficacia. En este contexto, y dado que no existía evidencia del valor oncogénico *FGFR2-CASP7* en colangiocarcinomas, decidimos testar la eficacia del FGFRinh rogaratinib en el PDX368. Los resultados de nuestro experimento *in vivo* han demostrado la sensibilidad del modelo al FGFRinh, cuya proliferación tumoral es *FGFR*-dependiente (**figura 25D**).

Además, decidimos realizar un análisis más detallado del caso mediante WES, con tal de identificar algún posible mecanismo de resistencia que nos justificara porque la paciente dejó de beneficiarse del FGFRinh tras sólo 4 ciclos de tratamiento. Los resultados de la ultra-secuenciación han revelado la existencia de un tumor con marcada heterogeneidad intra-tumoral inicial, ya que encontramos 3 clonas tumorales portadoras de mutaciones en los genes *MAP2K3* (R94L), *CACNA1C* (E1913K) e *IL9R* (G331R), además de la clona *driver* *FGFR2-CASP7*. Resulta interesante revisar con más detalle cada una de las variantes génicas detectadas en esta paciente (237):

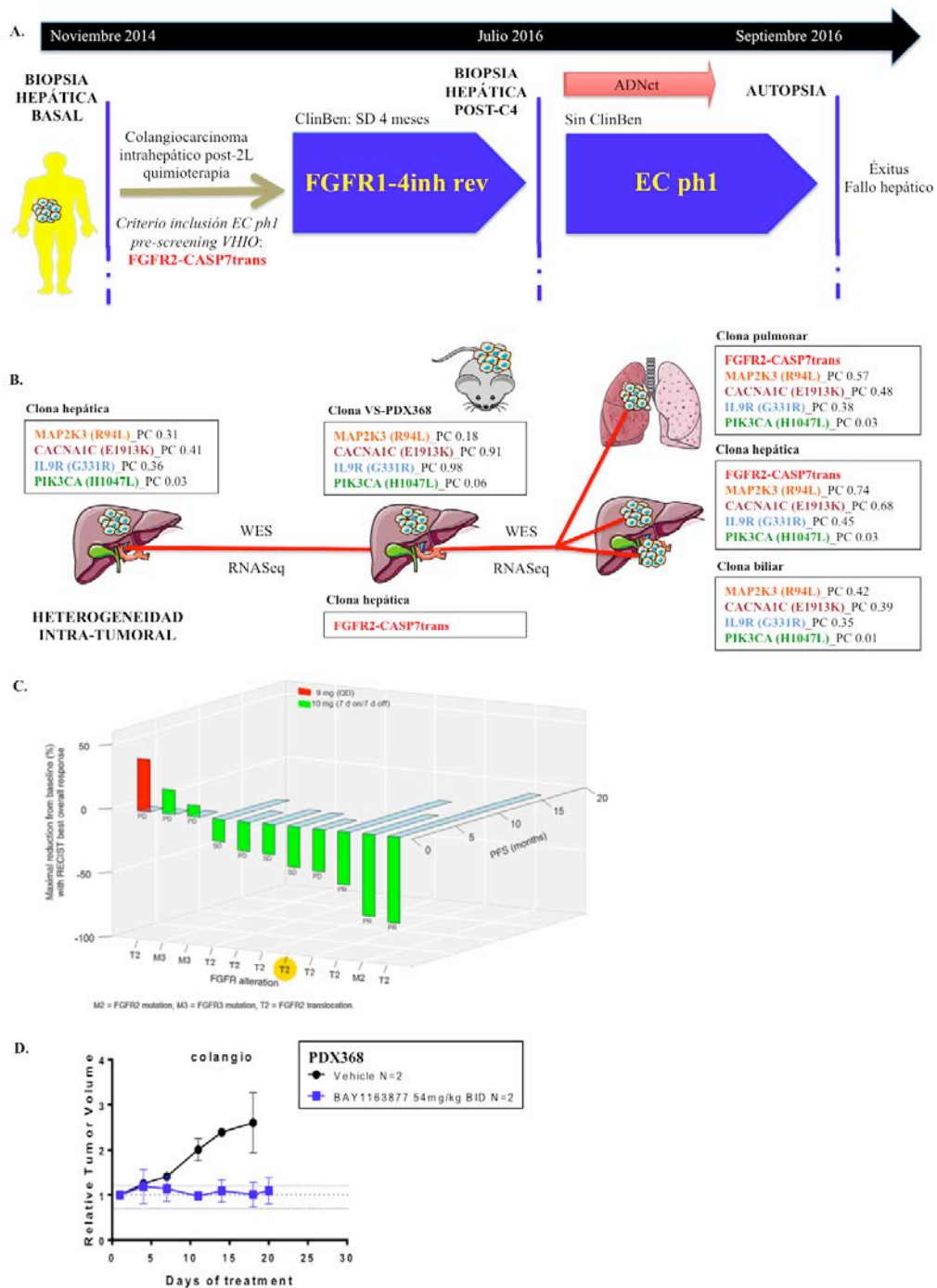
- *MAP2K3*mut (R94L): *MAP2K3*, también conocido como *MEK3* o *MKK3*, es un gen que codifica una proteína quinasa que forma parte de la vía de las MAPKs, implicada en la cascada de señalización intracelular en respuesta al estrés ambiental. En el caso de tumores *RAS* mutados, la activación de la quinasa *MAP2K3* induce la fosforilación de la subunidad p38 de *MAPK14*, cuya activación constitutiva conduce a la transformación oncogénica de las células. Han sido descritas múltiples aberraciones moleculares de *MAP2K3* en distintos tipos tumorales, aunque ninguna por el momento en colangiocarcinomas. De hecho, la variante génica R94L es una mutación *splice-site* que no está todavía reportada en la literatura, por lo que se considera una variante de significado incierto.

- **CACNA1Cmut (E1913K):** *CACNA1C* es un gen que codifica la subunidad alfa-1C de un canal de calcio. Muchas de las alteraciones asociadas con *CACNA1C* se han relacionado con anomalías en la repolarización iónica de membrana, arritmias cardíacas como el síndrome de Timothy o el síndrome del QT largo. Asimismo, se han descrito múltiples aberraciones moleculares *CACNA1C* en distintos tipos tumorales, aunque en colangiocarcinomas sólo se han descrito CNA (2.8%). La variante E1913K es una mutación *missense*, considerada una variante de significado incierto, reportada previamente en el TCGA de melanoma. De hecho, existen datos contradictorios en relación a la implicación de *CACNA1C* en los mecanismos de adhesión y proliferación celular del cáncer, dependiendo del subtipo histológico (238): se ha descrito sobreexpresión de *CACNA1C* en neoplasias colónicas y gástricas, atribuyéndole un rol oncogénico, mientras que en tumores de endometrio, *CACNA1Cmut* se ha asociado con menor expresión mRNA, relacionado con un mejor pronóstico (239).
- **IL9Rmut (G331R):** *IL9R* es un gen que codifica una proteína constituyente del complejo receptor de la citoquina IL-9. Alteraciones en *IL9R* se han asociado a asma e inmunodeficiencia severa combinada, evidenciando el rol de la vía de señalización *JAK/STAT* en la modulación del sistema inmunológico. Hasta la fecha, no se han descrito alteraciones génicas en *IL9R* entre los distintos tipos de tumores sólidos, aunque hay datos que apuntan a la sobreexpresión de *IL9R* como un factor de mal pronóstico en hepatocarcinomas (240). La variante G331R es una mutación *missense*, considerada por ahora una variante de significado incierto.

Nuestros resultados sugieren que el iCCA de la paciente 66 era un tumor heterogéneo, constituido por una clona celular principal cuya *FGFR2-CASP7trans* actuó como *driver* oncogénico inicial. Cabe destacar que el análisis de ultra-secuenciación no ha detectado la adquisición de nuevas

mutaciones policlonales *gatekeeper* por parte de las células FGFR2-CASP7trans, como se han descrito en la literatura (170). Sin embargo, la coexistencia inicial de otras clonas celulares *MAP2K3/CACNA1C/IL9R*-mutadas a bajas frecuencias alélicas, y el incremento en la subclonalidad de éstas, justificaría la progresión inevitable de esta paciente, probablemente debido al crecimiento, selección y diseminación global de estas poblaciones no *FGFR*-dependientes bajo presión terapéutica del *FGFR*inh. En concreto, destaca la proliferación significativa de la clona *MAP2K3*mut (R94L) a lo largo de la evolución de la enfermedad, aumentando su prevalencia celular desde el diagnóstico inicial (0.31) hasta el momento del éxitus (metástasis pulmonar 0.57; hepática 0.74; biliar 0.42).

Existen datos controvertidos en relación al rol de *MAP2K3* en cáncer. Por un lado, la sobreexpresión de la proteína *MAP2K3* ha sido identificada como un factor de mal pronóstico en pacientes con cáncer de colon avanzado (241). En esta línea, existen datos *in vitro* que han demostrado que la deplección de *MAP2K3* disminuye la proliferación en líneas celulares de cáncer de colon, potenciado *in vivo* con la administración combinada de 5FU-quimioterapia (242). Por el contrario, la disminución en la expresión de *MAP2K3* se ha correlacionado con la tumorigénesis del cáncer de mama, ya que su activación participaría en la transición a senescencia (243). Estos datos dejan entrever el rol pleiotrópico que *MAP2K3* ejerce en los distintos tejidos, existiendo evidencias de funciones pro-tumorales o onco-supresivas dependiendo del tipo celular y del contexto biológico (244). Por lo tanto, es difícil discernir el papel que *MAP2K3* ha podido ejercer en la carcinogénesis de un colangiocarcinoma, señalando la necesidad de realizar estudios funcionales adicionales para determinar la contribución que la variante R94L y la activación redundante de la vía de las MAPKs hayan podido tener en nuestro caso.



Abreviaciones: trans (translocación); ClinBen (Beneficio Clínico); SD (Estabilidad); FGFRinh (inhibidor selectivo FGFR); rev (reversible); EC ph1 (ensayo clínico fase 1); PC (Prevalencia Celular); WES (Secuenciación completa del exoma); RNAseq (secuenciación RNA).

Figura 25. Evolución clínica y caracterización genómica del caso 66 *FGFR 360*^R. **A.** Tratamientos oncoespecíficos y obtención de muestras biológicas seriadas de la paciente con colangiocarcinoma (CCA); **B.** Comparación del análisis WES pre-FGFRinh –biopsia hepática basal- con post-FGFRinh –biopsia hepática/PDX368-, y autopsia investigacional; **C.** Gráfico 3D combinado del *waterfall plot* de eficacia y *swimmer plot* de duración de la respuesta de los pacientes con CCA *FGFR*-alterado incluidos en el EC ph1 con FGFRinh erdafitinib (110): el caso 66 (amarillo) presentó ClinBen con SD (-25% lesiones diana) durante 4 meses; **D.** Experimento de eficacia *in vivo* confirma la sensibilidad del modelo PDX368 al FGFRinh rogaratinib monoterapia (azul).

7.2.3.3. Caso 32 *FGFR 360°R*: Evolución clonal de un cáncer de colon *FGFR1*-mutado con estabilidad prolongada en curso de *FGFRinh*.

El caso 32 se trata de una mujer que tenía 53 años en el momento de su inclusión en el proyecto *FGFR 360° RESISTANCE*, sin hábitos tóxicos de interés ni comorbilidades significativas. Su historia oncológica se remonta a septiembre 2011, con el diagnóstico endoscópico de una neoplasia vegetante sub-oclusiva en el colon izquierdo, compatible con un adenocarcinoma moderadamente diferenciado de sigma *KRAS*-mutado (G12C)/MSS. El estudio de extensión confirmó enfermedad diseminada a nivel hepático, con una única metástasis necrótica de 7 cm en segmento VIII, y una adenopatía ilíaca externa izquierda patológica –ambas con captación SUV 11 y 3 en el PET-TAC, respectivamente-. Se consideró a la paciente candidata a quimioterapia de inducción, alcanzando respuesta parcial tras 3 meses de tratamiento con el triplete FOLFOXIRI (245). Revalorado el caso por el equipo multidisciplinar en el comité de tumores colorrectal/hepato-bilio-pancreático, se consideró tributaria de hepatectomía central con resección de los segmentos IV-V-VIII en febrero 2012. Una muestra de dicha lesión hepática fue implantada para generar el PDX M4X2 (Grupo de Células Madre y Cáncer *VHIO*; Investigador principal Dr. Héctor G. Palmer). Tras su recuperación, en abril 2012 se procedió a una cirugía oncológica reglada del primario colónico mediante una sigmoidectomía con anastomosis T-T. El resultado anatomo-patológico final objetivó un ypT4pN1 (3 ganglios/15 totales) con invasión linfovascular y perineural positiva, márgenes negativos, completando posteriormente quimioterapia con esquema FOLFOX6 durante 6 meses más.

La paciente inició entonces un seguimiento activo estrecho, diagnosticándose de recaída ganglionar en octubre 2013, a raíz de una elevación progresiva del marcador tumoral CEA y aumento de tamaño de la adenopatía ilíaca externa izquierda. Ante ausencia de enfermedad en otras localizaciones, se consideró candidata a cirugía de rescate mediante linfadenectomía ilíaca. Inició

tratamiento complementario posterior con esquema DeGramont, del que sólo pudo recibir 1 único ciclo dada hematotoxicidad residual persistente (246), objetivándose la aparición de adenopatías retroperitoneales múltiples al cabo de pocos meses.

Considerándose una paciente joven, sin antecedentes patológicos destacables, afecta de un adenocarcinoma de sigma estadio IV refractaria al tratamiento estándar del cáncer de colon (5FU/leucovorin, oxaliplatino, irinotecan), se valoró entonces como posible candidata a participar en un ensayo fase 1 en la *UITM-VHIO*. La caracterización molecular dentro del programa de *pre-screening VHIO* de la muestra de archivo más reciente, veáse ganglio iliaco resecado, detectó una mutación en el gen *FGFR1* (I529M) mediante *AmpliconSeq panel v.3.0*. ([Anexo 3](#)). Según los datos disponibles en la literatura, se consideró que esta *FGFR1mut* (I529) era una variante de significado incierto, cuya relevancia oncogénica aún no estaba definida. Aún así, se discutió con la paciente la posibilidad de administrar terapia experimental dirigida dentro de un ensayo clínico testando un *FGFRinh*.

En noviembre 2014, la paciente fue incluida en un ensayo fase 1 testando un *FGFR1-4inh* irreversible, del que recibió un total de 13 ciclos hasta agosto 2015, con excelente tolerancia. La paciente presentó una estabilidad mantenida según criterios RECIST v.1.1. durante los 10 meses de tratamiento, con claro beneficio clínico por desaparición de dolor lumbar secundario a sus adenopatías retroperitoneales. Finalmente, la paciente salió de estudio por progresión radiológica confirmada, con aparición de una nueva metástasis en segmento VIII hepático y adenopatías subcarinales. En diciembre 2015, la paciente accedió a la realización de una biopsia a la progresión del *FGFR1-4inh*, obteniéndose una muestra de la metástasis *de novo* de la cúpula hepática. De la implantación exitosa de dicha muestra se generó el PDX CTAX30 en el mismo laboratorio *VHIO*.

Posteriormente, dado el excelente ECOG 0 de la paciente, asintomática y sin toxicidades residuales a los tratamientos previos, se incluyó en un segundo

ensayo fase 1 testando un inmunoconjugado, pero la paciente progresó rápidamente. Se valoró entonces la posibilidad de realizar quimioterapia sistémica de nuevo, con escaso beneficio, siendo finalmente éxitus por fallo hepático. La **figura 26A** ilustra la evolución clínica de esta paciente.

El análisis mediante WES de las muestras disponibles de esta paciente ha revelado la existencia de un tumor policlonal al diagnóstico inicial de la enfermedad. La tríada de mutaciones clonales en *APC-KRAS-TP53* detectada en la metástasis hepática reseca en febrero del 2012 encaja a la perfección con la carcinogénesis tradicional asociada al cáncer de colon (**figura 26B**). Se ha descrito que el cáncer de colon puede surgir de uno o de la combinación de tres mecanismos diferentes, la inestabilidad cromosómica (CIN), el fenotipo de islas CpG metiladas (CIMP) y la inestabilidad de microsatélites (MSI) (247). En el caso de un cáncer de colon esporádico, la vía clásica CIN habría empezado con la adquisición de la mutación en el gen *APC* de las células de la mucosa colónica normal, induciendo la proliferación celular y generación de un adenoma. Posteriormente, la mutación del oncogén *KRAS* habría permitido progresar dicha lesión precursora, cuya transformación final a un carcinoma habría sido desencadenada por la inactivación del gen supresor de tumores *TP53* (248). La **figura 26C** esquematiza el rol de estas tres mutaciones somáticas en el desarrollo del caso 32.

De hecho, los perfiles moleculares de ambos modelos preclínicos generados a lo largo de 4 años de evolución del tumor, el PDX M4X2 en febrero 2012 y el PDX CTAX30 en diciembre 2015, conservan las mismas características que observamos en la metástasis hepática inicial, avalando la naturaleza troncal de las 3 clonas principales -prevalencia celular APCmut 0.53, KRASmut 0.44 y TP53mut 0.96, respectivamente-. Resulta interesante revisar con más detalle cada una de las variantes génicas detectadas en esta paciente, descritas en el TCGA del cáncer de colon (249):

- APCmut (R876): *APC* es un gen supresor de tumores que codifica para una proteína antagonista de la vía de señalización *Wnt*, implicada

además en la migración celular, adhesión, activación de la transcripción y apoptosis. Las aberraciones moleculares en *APC* se han descrito hasta en el 66% de cánceres de colon, siendo las mutaciones la alteración más frecuente (64%). La variante R876 es una mutación *nonsense*. Se considera una variante de significado incierto, aunque la mayoría de estas mutaciones dan como lugar a proteínas truncadas con pérdida de su función, traduciéndose en una APCmut patogénica.

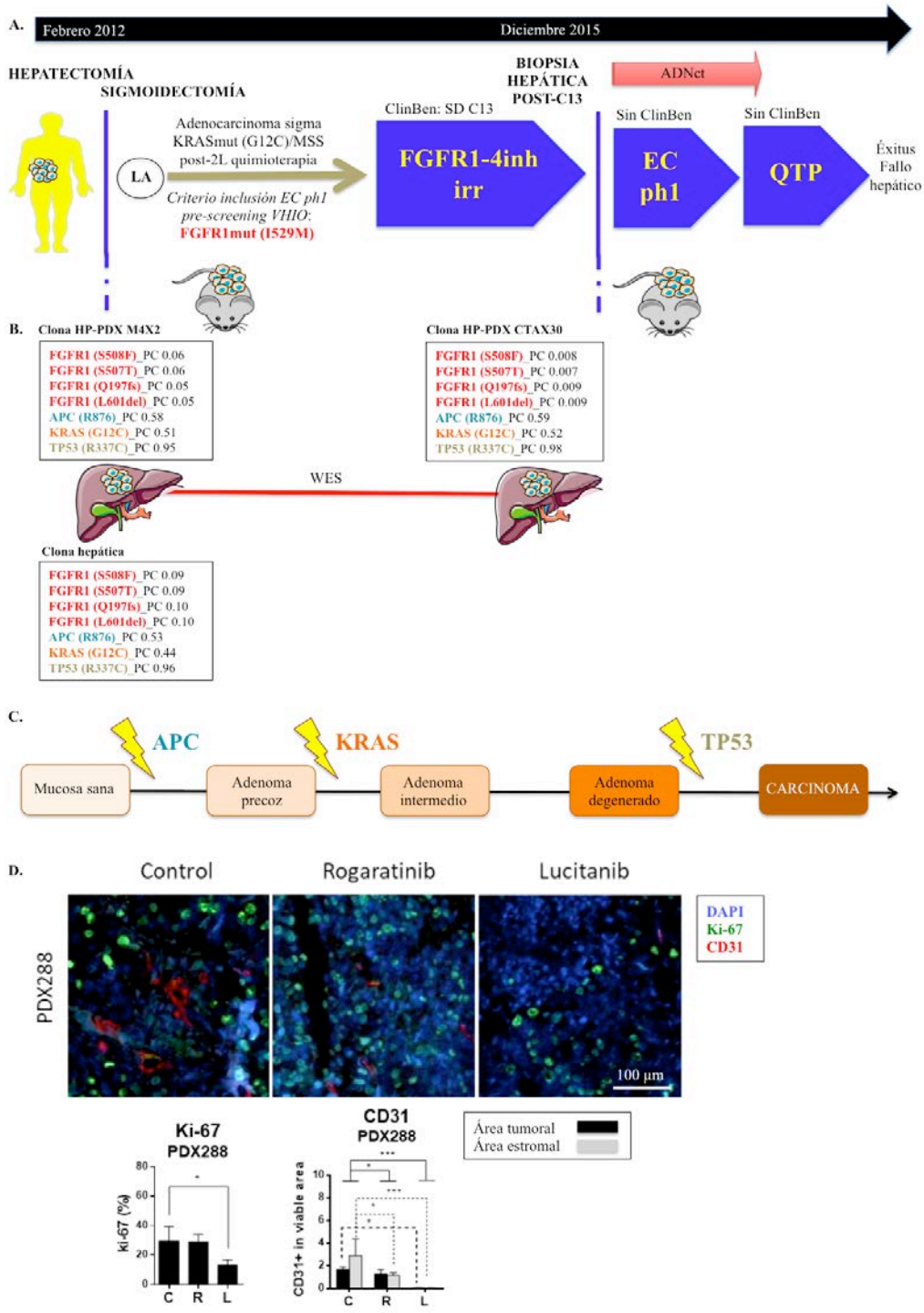
- KRASmut (G12C): *KRAS* es un oncogén que codifica para una proteína de la superfamilia de las GTPasas. La simple sustitución de un aminoácido es responsable de mutaciones activadoras, cuya proteína resultante se ha implicado en la patogénesis de múltiples neoplasias humanas, entre ellas el cáncer de colon (36%). Precisamente, las posiciones de aminoácidos que más frecuentemente albergan mutaciones en *KRAS* son G12, G13 y Q61. La variante G12C es una mutación *missense*. Se considera una variante patogénica, ya que codifica una proteína resultante con ganancia de función.
- TP53mut (R337C): *TP53* es un gen supresor de tumores que codifica para una proteína implicada en la regulación de la expresión de otros genes diana en respuesta al estrés celular, mediante su unión al DNA y activación de la transcripción. Es el gen supresor de tumores más frecuentemente alterado en cánceres humanos, habiéndose descrito mutaciones *TP53* hasta en el 60% de cánceres de colon (250). La variante R337C es una mutación *missense*. Se considera una variante probablemente patogénica, dado que su localización en el dominio de tetramerización altera la unión al DNA, esencial para que TP53 desarrolle su función como factor de transcripción.

La secuenciación completa del exoma del tumor inicial ha detectado además 4 mutaciones *FGFR1* distintas (S508F; S507T; Q197fs; L601del), todas ellas variantes de significado incierto, sin que existan por ahora datos disponibles en la literatura en relación a su potencial oncogénico *in silico*. Cabe destacar

que todas ellas difieren de la mutación inicial en *FGFR1* (I529M) que había sido detectada mediante el panel de *pre-screening* local *VHIO*, probablemente debido a particularidades técnicas intrínsecas de los métodos utilizados para el análisis de las biopsias (p.ej. filtros distintos empleados en el análisis bioinformático para detectar variantes). De todos modos, *FGFR1mut* (I529M) también se considera una variante de significado incierto, cuya evaluación *in vitro* mediante la tecnología *FACTTM* ha descartado su valor oncogénico (ver [7.1.2.1.](#)). Todas estas mutaciones del *FGFR1* aparecen como eventos subclonales, presentes en <10% de las células del tumor inicial, datos que llevan a replantearnos que el cáncer de colon de esta paciente no presentaba una dependencia real de la vía del *FGFR*, y que invariablemente habría progresado al *FGFRinh*. De hecho, existe escasa evidencia del papel que la vía *FGFR:FGF* desempeña en los cánceres de colon, más allá de la sobreexpresión de *FGFR4/FGF9* descrita como mecanismo de resistencia a terapia anti-EGFR (75).

A día de hoy, los anticuerpos monoclonales anti-VEGF forman parte del arsenal terapéutico para el cáncer de colon avanzado (251). Dado que nuestra paciente nunca había recibido terapia anti-angiogénica en combinación con quimioterapia, hipotetizamos que la estabilidad radiológica prolongada que presentó podría estar justificada por el efecto anti-angiogénico parcial asociado al *FGFRinh*. En la **figura 26D** se presentan algunos de los datos *in vivo* obtenidos en nuestro laboratorio utilizando un modelo PDX no relacionado con la paciente en estudio, y demostrando que los *FGFRinh* no tienen prácticamente efecto anti-proliferativo en modelos PDXs *FGFRinh*-resistentes (p.ej. PDX288 no presenta diferencias Ki-67 cuando comparamos los brazos de control (C) *versus* rogaratinib (R)). En cambio, observamos que el *FGFRinh* sí es capaz de inhibir la vascularización sobretudo a nivel estromal, demostrando un beneficio anti-angiogénico en tumores no *FGFR*-dependientes (p.ej. PDX288 con reducción CD31 comparando C *versus* R). Estos resultados avalarían las observaciones de nuestro caso clínico, ya que la paciente nunca presentó disminución del tamaño tumoral (no efecto anti-

proliferativo *FGFR*-mediado) pero sí estabilización prolongada (efecto anti-angiogénico) al *FGFR1*-4inh recibido.



Abreviaciones: LA (linfadectomía); mut (mutación); ClinBen (Beneficio Clínico); SD (Estabilización); FGFRinh (inhibidor selectivo FGFR); irr (irreversible); EC ph1 (ensayo clínico fase 1); QTP (Quimioterapia); PC (Prevalencia Celular); WES (Secuenciación completa del exoma).

Figura 26. Evolución clínica y caracterización genómica del caso 32 *FGFR 360R*. **A.** Tratamientos oncoespecíficos y obtención de muestras biológicas seriadas de la paciente con cáncer de colon KRASmut/MSS; **B.** Comparación del análisis WES pre-FGFRinh -hepatectomía y PDX M4X2- con post-FGFRinh -PDX CTAX30-; **C.** Carcinogénesis clásica de un cáncer de colon esporádico; **D.** Efecto anti-angiogénico de rogaratinib en un modelo PDX FGFRinh-resistente: IHC del marcador de proliferación celular Ki-67 (verde) y de vascularización CD31 (rojo) han sido evaluadas en tumores sin tratamiento (C), tratados con rogaratinib (R) o lucitanib (L) en el PDX288 no-FGFR dependiente. Los núcleos celulares aparecen teñidos mediante DAPI (azul). Test estadístico ANOVA unidireccional para Ki-67 y ANOVA bidireccional para CD31.

8. DISCUSIÓN

8.1. ESTUDIO RETROSPECTIVO: Análisis exploratorio de biomarcadores predictivos de respuesta en pacientes con cáncer avanzado tratados con pan-inhibidores del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFRinh).

La desregulación de la vía del *FGFR:FGF* se ha descrito como un evento común en la carcinogénesis en tumores sólidos humanos, y teniendo en cuenta las múltiples alteraciones moleculares descritas en los distintos tipos tumorales, la inhibición de la vía del *FGFR* emerge como una prometedora estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer. En los últimos años, múltiples FGFRinh selectivos de segunda (pan-*FGFR1-4*) y tercera generación (*FGFR* ultra-selectivos) han sido testados en distintos ensayos fase 1 en *UITM-VHIO*: infigratinib (BGJ398; NCT01004224), infigratinib + alpelisib (BGJ398+BYL719; NCT01928459), debio1347 (NCT01948297), erdafitinib (JNJ-42756493; NCT01703481) -reversibles-, futibatinib (TAS120; NCT02052778) y PRN1371 (NCT02608125) -irreversibles-, roblitinib (FGF401; NCT02325739) y fisogatinib (BLU554; NCT02508467) -*FGFR4* específicos-. Sin embargo, a pesar de la evidencia preclínica esperanzadora que habían demostrado, los resultados de eficacia clínica han sido limitados. Esto ha puesto de manifiesto la necesidad de identificar biomarcadores predictivos fiables a los FGFRinh.

Los resultados del análisis retrospectivo de nuestra cohorte de 36 pacientes FGFRalt tratados sugieren que el ClinBen con FGFRinh en el subgrupo de pacientes FGFRamp está enriquecido con pacientes que presentan altos niveles de expresión de *FGFR* mRNA y/o co-amplificación de los genes de los ligandos *IIq*, sin que se haya podido demostrar una correlación entre ClinBen con el ratio de amplificación del gen *FGFR*. Llama la atención que 4 de los 7

pacientes que alcanzan ClinBen presentan expresión de mRNA_h, y cabe destacar que uno de los pacientes con un carcinoma de cabeza y cuello presentó ClinBen a pesar de no tener mRNA_h detectable en su muestra tumoral, objetivándose amplificación de los genes de los ligandos *FGF3-4-19* en este caso concreto. La falta de material archivo disponible y/o imposibilidad de re-biopsiar a los pacientes de este subgrupo FGFRamp, muchos de ellos ya fallecidos en el momento del análisis retrospectivo, ha impedido confirmar la presencia de FGFR mRNA_h en los 2 pacientes respondedores afectos de cáncer de pulmón, así como validar la hipótesis de que los no-respondedores presentan niveles comparativamente más bajos de FGFR mRNA a pesar de estar amplificados.

En cambio, la eficacia al bloqueo FGFR en la población de pacientes FGFRmut estaría limitada a la funcionalidad y clonalidad de la FGFRmut adquirida, así como a la ausencia de otras mutaciones activadoras en vías de señalización *downstream*. En nuestra serie exploratoria, destaca que el único paciente FGFRmut con ClinBen es un paciente afecto de una neoplasia de vejiga que presenta una mutación en *FGFR3* (S249C) clonal, cuyo potencial oncogénico ya descrito se ha validado *in vitro*, y sin otras co-mutaciones en las vías de las MAPKs ni PI3K. La novedosa implementación de la tecnología *FACTTM* nos ha permitido demostrar *a posteriori* que dos de las variantes de significado incierto detectadas mediante NGS, *FGFR1* (I529M) y *FGFR2* (G238R), carecían de potencial oncogénico, justificando así la falta de eficacia al FGFRinh recibido en ambos pacientes con cáncer de colon FGFRmut. Asimismo, la validación *in vitro* de los otros eventos subclonales detectados en 5 de los pacientes, ha confirmado que se trata de mutaciones activadoras en los genes *PI3KCA*, *PTEN*, *KRAS* y *BRAF*, avalando quizás la falta de ClinBen en estos casos. Este sería el ejemplo de la paciente afecta de un cáncer de endometrio portadora de una variante de significado incierto que *FACTTM* ha confirmado como activadora en *FGFR3* (T689M), en quien la co-existencia de una mutación *PI3KCA* (R88Q) oncogénica, podría haber limitado claramente su sensibilidad al bloqueo FGFR en monoterapia; tal vez la administración de

doble terapia dirigida en combinación con un PI3Kin hubiera dado lugar a mayor eficacia.

Resulta especialmente interesante destacar los casos de los pacientes que recibieron dos terapias con FGFRinh sucesivas. En el caso del paciente afecto de cáncer de vejiga FGFR3mut (S249C), observamos que progresó a la terapia con un FGFRinh irreversible tras haber presentado ClinBen a un primer FGFRinh reversible. En este caso concreto, la falta de respuesta a la segunda terapia dirigida podría explicarse por la adquisición de mecanismos de resistencia secundaria, que justificarían la ausencia de beneficio a pesar de un perfil molecular inicial claramente predictivo de respuesta. En el caso de la paciente afectada de cáncer de endometrio-tubárico *FGFR2* (N549D), *PI3KCA* (E81K) y *PTEN* (R130Q; R173C), todas las mutaciones demostraron valor oncogénico *in vitro* por separado. La evidencia preclínica disponible con líneas celulares y xenografts de tumores de endometrio *FGFR2*-mutados, había confirmado la sinergia de la combinación de un FGFRinh con un PI3KCAinh (252), y el análisis conjunto *FACTTM* con las mutaciones *FGFR2* (N549D) y *PI3KCA* (E81K) demostró que, efectivamente, ambas mutaciones potenciaban la activación de la vía de señalización. Además, en esta paciente, el análisis de predicción de respuesta *in vitro* a la terapia dirigida fue positivo, objetivándose inhibición de la vía *FGFR:FGF* mediante la terapia con un FGFRinh reversible. Cabría pues esperar que la paciente hubiese presentado ClinBen al recibir un FGFRinh combinado con un PI3Kin, pero sin embargo, la paciente progresó rápidamente a esta terapia inicial, y al posterior tratamiento con un FGFRinh irreversible. La falta de respuesta en esta paciente podría justificarse por la presencia de potenciales mecanismos de resistencia primaria en el tumor (p.ej. doble mutación en *PTEN* (22) u otros mecanismos desconocidos), o incluso por el uso inadecuado de los agentes dirigidos escogidos (p.ej. dosis subóptimas).

En realidad, los datos obtenidos nos aportan un nuevo ángulo de visión desde el que reflexionar sobre los ensayos de Medicina de Precisión que se han

realizado hasta ahora. Ser críticos con las limitaciones en la metodología implementada en los primeros estudios con agentes dirigidos es fundamental para aprender de los errores y planificar una futura traducción de la medicina genómica a una práctica clínica más exitosa. Uno de los mejores ejemplos lo tenemos con el desarrollo de los inhibidores de BRAF (BRAFinh). Vemurafenib demostró eficacia en pacientes afectados de melanoma *BRAF* V600E-mutados durante su desarrollo inicial en un ensayo fase 1 (253). La posterior identificación de la re-activación de la vía de las MAPKs como mecanismo de escape a este inhibidor permitió la aprobación del tratamiento combinado de un inhibidor de MEK y BRAFinh (254). Sin embargo, los intentos de replicar el mismo resultado con BRAFinh en otros contextos no tuvieron el mismo éxito. El ensayo *VE-basket* testando vemurafenib en tumores *BRAF* V600E-mutados no-melanoma, demostró que el rol biológico de las mutaciones *BRAF* no es homogéneo, ya que la vía de señalización podría desempeñar un papel distinto en cada tejido, con diferentes mecanismos de resistencia asociados (255). Estos resultados sirvieron para concienciar a la comunidad científica de que no se puede generalizar los resultados obtenidos con un agente dirigido en un tumor concreto, ya que el status molecular por sí solo no es suficiente para predecir la respuesta en otros contextos histológicos. Además, estudios como el basket *SUMMIT*, han demostrado que la eficacia a un fármaco dirigido (p.ej. inhibidores de HER2) podría estar influenciada por la clase de alteración molecular (p.ej. amplificación > mutación), el gen implicado (p.ej. *HER2* > *HER3*) o incluso el dominio afectado (p.ej. dominio quinasa > porción extracelular) (256).

En primer lugar, aunque resulte obvio, es imprescindible ampliar nuestros conocimientos sobre la biología molecular del cáncer y las repercusiones de sus aberraciones más comunes. Desde que se publicaron algunos de los primeros análisis de secuenciación de tumores (39, 48, 52), hemos descubierto que la cifra de alteraciones moleculares posibles es en realidad mucho mayor que la de las anomalías genómicas reportadas. Y es que a través de los múltiples sistemas de procesamiento alternativo del ADN, como los mecanismos epigenéticos, el organismo humano es capaz de generar distintas

isoformas de proteínas con funciones radicalmente diferentes a partir de un único molde genético, en función del contexto histológico (257). Así pues, el cáncer debería entenderse como un nuevo paradigma de enfermedad molecular, en el que no sólo encontramos mutaciones puntuales clásicas, alteraciones en el número de copias o nuevas fusiones génicas, sino que hay que tener en cuenta otras variables como la funcionalidad y clonalidad de estas alteraciones, su evolución temporo-espacial, así como todos aquellos mecanismos de modulación de la expresión génica que pueden ayudarnos a comprender mejor la correlación genotipo-fenotipo de cada tumor.

En segundo lugar, la Medicina Personalizada dispone ahora de las enormes posibilidades de las técnicas de la secuenciación masiva NGS, que nos aportan gran cantidad de información para caracterizar los tumores, pero que sin las herramientas ni el conocimiento adecuado para analizarlas y ponerlas en contexto clínico, no permiten su aplicabilidad de forma rutinaria. Es muy común que al realizar un análisis NGS de la muestra tumoral de un paciente, nos encontremos con variantes génicas alteradas, aunque el impacto sobre la funcionalidad final de la proteína que traducen sea incierto. Una de las principales limitaciones precisamente de esta llamada Medicina de Precisión ha sido la falta de precisión en sí misma, ya que nos hemos estado basando en predicciones bioinformáticas cuya veracidad ha sido difícil de validar. Es por ello que para poder aportar valor a los pacientes con cáncer, muchas de estas variantes de significado incierto deberían confirmarse o descartarse mediante estudios funcionales debidamente diseñados en sistemas celulares apropiados, aunque todavía esté limitado fuera del ámbito de la investigación. A día de hoy, muchos investigadores están haciendo un gran esfuerzo en implementar protocolos traslacionales en paralelo al desarrollo de nuevos fármacos, para refinar la comprensión biológica que las diferentes alteraciones moleculares implican en los distintos tumores (256).

Sólo mediante la preselección de la población FGFRalt podremos evitar eventos adversos innecesarios a pacientes con bajas posibilidades de éxito e

incrementaremos las posibilidades de éxito en los pacientes con alta probabilidad de respuesta al bloqueo FGFR. El análisis de nuestra población a estudio presenta como claras limitaciones que se trata de una *n* pequeña (*n*=36 pacientes), que es un análisis retrospectivo y que existe una gran heterogeneidad de los subtipos tumorales analizados así como en los FGFRinh recibidos. Asimismo, la ausencia de suficiente material de archivo, ha limitado que se pueda ampliar la caracterización molecular de las muestras utilizadas para el análisis con tal de corroborar algunos de los hallazgos exploratorios detectados.

Aún así, teniendo en cuenta estos resultados incipientes, el diseño futuro de nuevos ensayos con FGFRinh debería plantear la incorporación de una estrategia de pre-selección conjunta basada en las alteraciones génicas (mut/amp) más la determinación de los niveles de expresión del mRNA de los FGFR y FGFs, con tal de enriquecer la población FGFRamp con FGFR mRNAh y/o co-amplificación del *11q*. Mediante esta estrategia, también incrementaríamos la posibilidad de detectar potenciales candidatos que, sin presentar alteraciones génicas pero FGFR mRNAh, podrían beneficiarse de recibir estos agentes dirigidos. Para ello, resulta imprescindible en un futuro evaluar el papel de una plataforma de expresión génica (p.ej. *nCounter*[®]), que nos permita definir y validar un punto de corte fiable de los niveles de mRNAh, a partir de los cuales podamos pre-seleccionar aquellos pacientes con mayores posibilidades de respuesta a los FGFRinh. En el caso de la población FGFRmut, la indicación de FGFRinh debería considerarse sólo en pacientes con eventos clonales, cuya actividad oncogénica estuviera validada funcionalmente, sin presentar co-mutaciones adicionales en otras vías de señalización. El análisis funcional *FACT*TM de las distintas variantes del *FGFR* puede aportar más precisión a la predicción de la respuesta a los FGFRinh, especialmente en caso de dudas en presencia de combinaciones o variantes de significado incierto. La complejidad de las interacciones de las distintas alteraciones génicas detectadas en un mismo paciente FGFRmut representa un reto que complica cada vez más la selección de los mejores algoritmos terapéuticos.

En realidad, la utilización de una estrategia de pre-selección molecular ampliada, combinando NGS con una plataforma de expresión génica y una tecnología de análisis funcional *in vitro*, emerge como una opción prometedora no sólo para el binomio FGFRalt-FGFRinh, sino que bien podría adaptarse al proceso de desarrollo de agentes dirigidos para otros oncogenes, cuyo valor predictivo está todavía por discernir (p.ej. inhibidores de MET en tumores portadores de amplificaciones/mRNAh versus mutaciones de *MET*).

Hasta la fecha, los resultados presentados en este estudio representan una de las primeras cohortes de pacientes FGFRalt tratados con FGFRinh disponibles en la literatura. En base a estas observaciones, se ha diseñado el ensayo fase 2 multicéntrico académico *Basket of Baskets* (ClinicalTrial.gov ID NCT03767075), en el que se va a explorar una cohorte de pacientes con mutaciones *FGFR* patogénicas versus una cohorte FGFRmut con VSI, así como una cohorte de pacientes con amplificaciones *FGFR* con sobreexpresión mRNA-proteína versus una cohorte FGFRamp sin sobreexpresión (258). Además de ser un trabajo generador de hipótesis, cabe destacar la multidimensionalidad con la que se ha llevado a cabo, combinando la correlación de datos clínico-moleculares disponibles de los pacientes y la implementación de una nueva tecnología de evaluación funcional *in vitro* para contribuir a ampliar el conocimiento de la biología de la vía del *FGFR:FGF*, y así ayudarnos a discernir la presencia de potenciales mecanismos de resistencia en distintos momentos evolutivos de la enfermedad.

8.2. ESTUDIO PROSPECTIVO: Implementación del proyecto traslacional *FGFR 360° RESISTANCE*.

A lo largo de la historia de la medicina existen casos muy ilustrativos de eventos raros que nos han conducido a descubrir nuevas curas para enfermedades (259). Sin embargo, la comunidad científica había sido incapaz de explicar durante años algunos de los éxitos atípicos observados en pacientes con cáncer, bien porque no se disponía del conocimiento suficiente sobre su biología o porque aún no se habían inventado las herramientas adecuadas para su estudio. Pero afortunadamente, todo cambió hace dos décadas, cuando empezó a ser posible analizar genómicamente los tumores de los pacientes respondedores (260).

En la actualidad, existe un cambio de paradigma en el desarrollo de nuevos fármacos cuando, en lugar de asumir que un ensayo clínico es fallido si no funciona para la mayoría de los pacientes, se enfoca el interés en aquellos pacientes ocasionales que sí se benefician la droga en cuestión. En el año 2012, el equipo del *MSKCC* publicó un estudio innovador en el que investigaban las características moleculares de una paciente afecta de cáncer de vejiga que alcanzó una respuesta completa mantenida con everolimus –inhibidor de mTORC1-. La secuenciación completa del genoma de su tumor primario demostró que la paciente era portadora de una mutación en el gen *TSC1*, sugiriendo por primera vez que los inhibidores de mTOR podían ser más efectivos en pacientes cuyos tumores presentaran mutaciones somáticas en *TSC1* (261). Además, con la implementación de esta metodología, Solit D.B. *et al* demostraron la viabilidad de utilizar tecnologías de ultra-secuenciación en el ámbito clínico, para identificar determinantes moleculares de sensibilidad en tumores sólidos genéticamente heterogéneos.

Desde entonces, se han iniciado múltiples iniciativas para identificar alteraciones moleculares entre aquellos pacientes que han presentado respuestas inesperadas a tratamientos estándar o agentes investigacionales

(262). Por ejemplo, el *National Cancer Institute (NCI)* de los E.U.A impulsó en 2015 una “iniciativa de respondedores excepcionales”, un estudio retrospectivo a nivel nacional para recopilar muestras biológicas de pacientes que se hubieran beneficiado drásticamente de fármacos ya aprobados por la FDA, con el objetivo de identificar potenciales biomarcadores predictivos de respuesta (ClinicalTrials.gov ID NCT02243592) (263). En realidad, los respondedores excepcionales son *outliers* o casos atípicos que sirven como medida para evaluar cómo de improbable es alcanzar un resultado favorable a cierto tratamiento en una enfermedad concreta (264). Por otro lado, en Oncología también podemos encontrarnos con casos atípicos de pacientes que presentan respuestas inusualmente pobres, a pesar de haber individualizado un tratamiento dirigido según la presencia de cierto biomarcador predictivo. Precisamente, el programa de “respondedores inusuales” del *MDACC* surgió como iniciativa para estudiar más detenidamente todos los casos atípicos de interés, cuya caracterización molecular puede contribuir a esclarecer las diferencias de eficacia a nuevos tratamientos.

La existencia de todos estos casos atípicos, favorables o desfavorables, demuestra cuán complejo es el ámbito de la Medicina de Precisión, pues todavía existen múltiples desafíos que deben superarse antes de poder personalizar los tratamientos oncológicos: la heterogeneidad y evolución clonal de los tumores, la dificultad de obtención y calidad de las biopsias, las limitaciones de los análisis moleculares así como la falta de fármacos efectivos contra la mayoría de aberraciones moleculares (265). Ahora, que la mayoría de ensayos clínicos están implementando estrategias de pre-selección molecular desde fases muy precoces, parece imprescindible construir programas de apoyo a la investigación clínico-traslacional, que proporcionen la información necesaria para realizar una medicina basada en la evidencia (266). En este contexto, en el año 2014 iniciamos este proyecto *FGFR 360° RESISTANCE* en la *UITM-VHIO*, una ambiciosa plataforma traslacional implementada en paralelo al desarrollo de ensayos fase 1 con inhibidores del FGFR, con el objetivo de obtener muestras biológicas seriadas de pacientes *FGFR*-alterados que nos permitieran profundizar en la biología de la vía

FGFR:FGF a posteriori.

Durante los 4 años de duración del Proyecto, se han incluido 46 pacientes seleccionados molecularmente por sus aberraciones *FGFR:FGF*. Las pacientes con cáncer de mama representan la mayoría de nuestra cohorte (n=17), así como las amplificaciones del *FGFR/11q* han sido la alteración más detectada mediante el programa de *pre-screening* molecular *VHIO* (n=21) (25). Cabe destacar que sólo el 67% de los pacientes recibió al menos una dosis de un inhibidor del FGFR, ya que algunos fueron finalmente fallo de *screening* para participar en ensayos clínicos. Estos datos todavía reflejan el perfil global de los pacientes derivados para considerar su inclusión en ensayos fase 1, a menudo pacientes politratados con alto riesgo de deterioro clínico, como ejemplifica la mediana de 4 líneas previas recibidas en nuestra serie. Además, la mayoría de estos ensayos en fase precoz tienen criterios de inclusión muy restrictivos, una condición que potencialmente excluye aquellos pacientes que más fidedignamente representarían nuestro entorno clínico real (267).

Evaluar el efecto de un nuevo fármaco sobre su diana terapéutica en tejido tumoral e identificar biomarcadores que puedan correlacionarse con la eficacia ha adquirido un papel cada vez más relevante en el desarrollo precoz de fármacos. Sin embargo, durante años ha existido mucha controversia en torno a la seguridad y las consideraciones éticas derivadas de la obtención de las biopsias realizadas con fines investigacionales, sopesando el riesgo de daño al paciente sin una perspectiva clara de beneficio directo. Datos previos reportados en una serie de 155 pacientes incluidos en ensayos fase 1, objetivó un mayor porcentaje de obtención de biopsias obligatorias (86.6%) en comparación con las biopsias opcionales (4.4%), con un riesgo asociado de complicaciones graves del 1.4% (268). Del total de muestras de tejido recogidas en el *FGFR 360° RESISTANCE*, un 30% corresponden a biopsias realizadas *de novo* previo al inicio del tratamiento experimental, un porcentaje que decae paulatinamente cuando contabilizamos las biopsias opcionales realizadas en curso de tratamiento (8%) o a la progresión tras recibir un inhibidor del FGFR (9%), con sólo un 3% de muestras pertenecientes a las

autopsias en caliente. Afortunadamente, no se ha reportado ninguna complicación ni ninguna muerte relacionada con dichas biopsias. Nuestra experiencia demuestra que las biopsias investigacionales se pueden realizar de forma segura y con éxito seleccionando cuidadosamente a los pacientes según sus características individuales, en consenso con el equipo de expertos implicados en el procedimiento, y siempre con las precauciones adecuadas.

Adicionalmente, cada vez es más evidente que son necesarios modelos preclínicos que recapitulen la heterogeneidad de los tumores humanos para un desarrollo más eficiente de los nuevos agentes dirigidos. En este sentido, los modelos PDXs representan un gran avance, aunque hay que ser conscientes de los desafíos que implican. Por un lado, hay que tener en cuenta la alta demanda de recursos necesarios para establecer y mantener estos bancos de tumores “vivos” (174). Además, las tasas de éxito de los injertos pueden variar notablemente según el tipo tumoral (p.ej. 33% ca. pancreático *versus* 29% colangiocarcinoma), la procedencia de la muestra (p.ej. 69% lesión metastásica *versus* 15% tumor primario) o la técnica de biopsia (p.ej. 73% quirúrgica *versus* 14% guiada por imagen) (269). En el contexto de nuestro Proyecto hemos implantado 42 nuevas biopsias de múltiples tipos tumorales, obtenidas en el 100% de los casos mediante técnicas guiadas por imagen a partir de lesiones metastásicas o de tumores primarios, según facilidad de acceso. Con una tasa global de éxito del injerto del 42.9%, hemos generado 18 nuevos PDXs de distintos tipos tumorales: mama (n=8), colon (n=5), esófago (n=1), anejos (n=1), vías biliares (n=1), piel (n=1) y vejiga (n=1). Esto ha permitido ampliar el repositorio *VHIO* de PDXs con hasta 33 modelos *FGFR*-alterados, representando un valioso arsenal de modelos correlativos imprescindibles para validar algunas de las hipótesis generadas a raíz de nuestras observaciones previas.

Sólo el 29% de los casos tratados en nuestra cohorte *FGFR 360° RESISTANCE* se beneficiaron del bloqueo *FGFR*. Aún así, hemos podido inferir algunas pistas relevantes de estos pocos respondedores excepcionales. En primer lugar, los 2 pacientes que alcanzaron mayor eficacia al *FGFR*inh

fueron aquellos con tumores portadores de translocaciones del *FGFR* (1 colangiocarcinoma *FGFR2-CASP7*trans y 1 xantastrocitoma *FGFR1-TACC1*trans), avalando el rol oncogénico de estos nuevos genes de fusión y su papel como biomarcadores predictivos a los FGFRinh en un amplio abanico de neoplasias (235). Además, en línea con lo que ya habíamos observado en nuestra serie retrospectiva *VHIO*, 4 de los pacientes que presentaron ClinBen presentaban niveles elevados de FGFR mRNA (1 mama *11q/FGFR2amp/FGFR2* mRNAh, 1 colangiocarcinoma *FGFR2mut(W290C)/FGFR2* mRNAh, 1 carcinoma de glándula parótida *FGFR1* mRNAh y 1 carcinoma de glándula lagrimal *FGFR1-2* mRNAh). Y finalmente, al igual que en el caso descrito previamente en la **figura 14**, hemos detectado otra paciente afecta de cáncer de mama *FGFR1amp*, con expresión *FGFR1* mRNA desconocida que, a pesar de progresar a un FGFRinh, también presentó beneficio al MTKI posterior con una estabilidad mantenida durante 50 meses.

Así pues, una de las primeras hipótesis que pretendíamos evaluar *in vivo* era el rol potencial de FGFR mRNAh como biomarcador predictivo de respuesta a FGFRinh en el contexto de cáncer de mama *FGFR:FGF*-amplificado. De hecho, el 67% de los pacientes con sobreexpresión *FGFR1-3* mRNA sin alteraciones genéticas aparentes, alcanzaron una respuesta objetiva en el ensayo pivotal fase 1 con rogaratinib (270). En nuestra serie observamos también que no todos los PDXs con una amplificación *FGFR* sobreexpresan mRNAh o la proteína correspondiente, y por el contrario, detectamos niveles FGFR mRNAh sin CNA en algunos modelos. Todavía se desconocen los mecanismos moleculares subyacentes por los que tumores sin alteraciones genómicas presentan niveles FGFR mRNAh (p.ej. PDX191 con *FGFR3* mRNAh sin CNA). En algunos casos, la existencia de mecanismos epigenéticos podrían justificar la modulación en la expresión de los genes *FGFR* (271). En otros, hipotetizamos que podrían existir translocaciones del *FGFR* que no hubieran sido detectadas, teniendo en cuenta que el panel local *VHIO NanoString fusion v.4.0* incluye un número limitado de fusiones. La

evaluación futura de nuestras muestras mediante paneles de fusión alternativos o RNAseq nos permitirá indagar la presencia de translocaciones que impliquen otros promotores, desconocidas hasta la fecha (272).

Los resultados obtenidos con nuestros PDXs de cáncer de mama indican que existe una mejor correlación de eficacia del FGFRinh con los niveles de FGFR1-4 mRNAh que con el CNA o mRNA individual de cada uno de los genes *FGFR*. Estos hallazgos refuerzan los datos que avalaban el papel del mRNA como biomarcador predictivo al rogaratinib en modelos preclínicos de cáncer de colon y pulmón (205). Aún así, por el momento consideramos que este biomarcador compuesto es potencialmente válido sólo en nuestra cohorte de PDXs, ya que para la evaluación de FGFR1-4 mRNAh realizamos un sumatorio de los niveles mRNA de cada uno de los *FGFR* expresados en cada modelo, previa normalización génica de los valores de FGFR2-3-4 en relación al FGFR1. Por lo tanto, estos resultados deben ser interpretados con cautela, y validados en una cohorte externa de pacientes con cáncer de mama, con un mayor número de muestras. De confirmarse su validez, nuestros resultados podrían justificar la implementación de nuevas estrategias de *pre-screening* molecular basadas en tecnologías de análisis transcriptómico, como la plataforma *nCounter*®, cuya capacidad de detectar el biomarcador FGFR1-4 mRNAh en muestras de archivo de parafina ha quedado demostrada. Esto supondría una aproximación novedosa dentro del programa de desarrollo de los FGFRinh, todavía focalizado mayoritariamente en pacientes con *FGFR* CNA (273), incorporando pacientes con cáncer de mama FGFR1-4 mRNAh no-amplificadas con posibilidades de beneficiarse de un FGFRinh.

En este sentido, en un primer intento de extrapolar nuestro biomarcador compuesto en una cohorte disponible de pacientes con cáncer de mama tratadas con MTKI, FGFR1-4 mRNAh no ha sido capaz de discriminar a las pacientes respondedoras de las no-respondedoras. Estos resultados podrían estar justificados en parte por disponer de una *n* de casos muy pequeña (*n*=9), un factor que también ha supuesto una limitación para llevar a cabo un análisis no-supervisado de los perfiles de expresión obtenidos con *HTG EdgeSeq*®

entre ambos subgrupos. Por otra parte, resulta obvio pensar que existen diferencias intrínsecas en relación al mecanismo de acción de los FGFRinh respecto a los MTKI, por lo que los determinantes moleculares de sensibilidad podrían no ser los mismos para ambos tipos de inhibidores. Así pues, la segunda incógnita que quisimos despejar fue discernir porque algunos tumores sin beneficio a FGFRinh podían ser todavía sensibles a MTKI, como en el caso de las pacientes 7 y 8 de esta cohorte de pacientes.

En nuestros experimentos *in vivo*, el MTKI lucitanib ha demostrado una actividad anti-tumoral significativamente superior a la eficacia observada con el FGFRinh rogaratinib. La caracterización mecanística de ambos tipos de inhibidores FGFR se ha llevado a cabo mediante el análisis de las diferencias en las tinciones IHC del índice proliferativo/Ki-67 y necrosis vascular/CD31, evaluadas con microscopia fluorescente. Se han identificado dos fenotipos tumorales (datos no incluidos en esta tesis; manuscrito en preparación Sánchez-Guixé M. & Hierro C. *et al*). En el caso de los PDXs FGFR1-4 mRNAh sensibles a FGFRinh, se ha observado un doble efecto anti-proliferativo y anti-angiogénico con ambos fármacos lucitanib y rogaratinib. En cambio, en el caso de los PDXs resistentes a FGFRinh sin sobreexpresión FGFR1-4 mRNAh, se ha objetivado un marcado predominio de la necrosis tumoral secundaria a la muerte celular por hipoxia, evidenciando que lucitanib actúa fundamentalmente como un potente fármaco anti-angiogénico en los cánceres de mama no *FGFR*-dependientes. De hecho, estos datos han sido corroborados en dos de los modelos resistentes al rogaratinib monoterapia, el PDX288 y el PDX343, cuya respuesta al tratamiento combinado de bevacizumab y DC1010 ha sido similar a la eficacia alcanzada con lucitanib.

Gracias a estos datos preclínicos, podemos especular que la eficacia observada a los MTKI en los casos de pacientes y/o PDXs no respondedores a FGFRinh está relacionada con su mayor efecto anti-angiogénico, asociado primordialmente a la inhibición de VEGF/VEGFR1-3 (274). Sin embargo, al igual que ocurría en la cohorte de pacientes, tampoco se han podido correlacionar en PDXs los niveles de expresión de dianas anti-angiogénicas

como VEGFR1-3 o PDGFR α - β y sus ligandos, con la sensibilidad al MTKI. El futuro desarrollo de ensayos clínicos con MTKI deberá pues considerar un diseño más racional, con estrategias de enriquecimiento que amplíen la inclusión más allá de la población cáncer de mama *FGFR:FGF*-amplificada, con tumores angiogénesis-dependientes (275). Para ello, sin duda habrá que esperar los resultados del análisis retrospectivo de las muestras de pacientes tratadas con estos MTKI mediante técnicas de ultra-secuenciación, con tal de identificar pistas adicionales sobre potenciales biomarcadores predictivos a estos fármacos anti-angiogénicos.

Finalmente, de entre todos los casos incluidos en el proyecto *FGFR 360° RESISTANCE*, se han seleccionado 3 casos de respondedores inusuales, cuyas muestras han sido analizadas mediante técnicas de ultra-secuenciación génica WES y RNAseq. La implementación de NGS ha demostrado ser una herramienta muy útil en tumores raros, ampliando nuevos horizontes terapéuticos según el perfil genómico obtenido (276). Los TMMM, son tumores considerados raros (≤ 5 casos/100.000 habitantes/año) y en los que se suele extrapolar el tratamiento de otras neoplasias ginecológicas (277). A pesar de la detección de un potencial biomarcador dual *FGFR2mut/PI3KCAmut*, la paciente 30 no presentó beneficio a la combinación de una doble terapia dirigida, aunque los datos *in vitro* *FACTTM* habían confirmado el valor oncogénico de ambas y su potencial respuesta al *FGFRinh*. Una primera hipótesis sobre esta falta de eficacia radicaría en la existencia de una doble *PTENmut* (R130Q y R173C), ya que la pérdida de expresión de *PTEN* se ha asociado a un fenotipo resistente a la inhibición *PI3K(α)inh* (278). Además, la reactivación de la señalización de la vía *MAPK* habría ejercido de mecanismo adicional de resistencia a la inhibición *PI3K* alfa-selectiva con alpelisib (230), y por consiguiente, al bloqueo *FGFR* con *infigratinib*.

La aplicación de paneles customizados NGS, veáse *AmpliconSeq VHIO* o *FoundationOne®*, había identificado genes sospechosos de mediar la carcinogénesis en este TMMM, y por lo tanto, su selección como biomarcador

predictivo para un potencial tratamiento personalizado. Sin embargo, el hecho de tratarse de paneles con un número limitado de alteraciones génicas implicó que nos perdiésemos en parte la detección de otros determinantes moleculares, señales que nos indicaran que existían otros mecanismos posiblemente implicados en la progresión de dicho tumor. El análisis genómico ampliado del caso 30 mediante WES ha revelado la presencia de múltiples VSI en distintas vías de señalización: MAPK, PI3K, JAK/STAT y otros receptores tirosina quinasa. Así que como segunda hipótesis, consideramos que estas VSI podrían haber actuado como mutaciones subclonales *driver* del tumor, aunque a día de hoy, las tenemos que considerar dianas terapéuticas pobres de forma individual dada la falta de evidencia disponible en relación a su oncogenicidad.

Recientemente, se han identificado *TP53*, *RNF43*, *ARID1A*, *PI3KCA*, *KRAS* y *PTEN* como los genes *driver* más frecuentemente mutados en el subgrupo de tumores MSI-H (231). En nuestro caso, la presencia de TP53mut, PI3KCAmut y doble PTENmut en el contexto de un tumor con múltiples VSI, avalaría la hipótesis de que pudiera existir algún mecanismo patogénico dMMR inductor de un fenotipo-hipermutado. De hecho, los tumores uterinos se sitúan en el espectro de los cánceres humanos que pueden acumular un mayor porcentaje de mutaciones somáticas detectadas por megabase de DNA tumoral o carga mutacional tumoral (TMB) (279). La evidencia científica actual sugiere que los tumores con alto TMB contienen un gran número de neoantígenos tumorales que pueden ser reconocidos como no-proprios, provocando una activación específica del sistema inmune contra las células tumorales (280, 281). Así pues, TMB se postula como un potencial biomarcador predictivo a la inmunoterapia (282), aunque todavía es necesario correlacionar la determinación de este TMB mediante paneles de secuenciación con WES. Además, hay que considerar que los umbrales específicos de TMB para predecir respuesta a inhibidores del punto de control (ICI) no están todavía bien definidos entre los distintos tipos tumorales, mucho menos todavía en una entidad tan rara como son los TMMM.

Ante estos resultados WES, probablemente hubiera sido interesante priorizar en esta paciente el tratamiento con ICI antes que con la terapia dirigida. De hecho, existe ya algún caso reportado en la literatura de TMMM refractario, MSS *POLE*-mutado con TMB elevado (169 mutaciones/Mb) y co-mutaciones en *PI3KCA*, *PTEN* y *FGFR2*, que presentó respuesta duradera a tratamiento con ICI pembrolizumab (283). Desafortunadamente, la falta de preservación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) del paciente no nos ha permitido obtener un PDX humanizado, con el que caracterizar mejor las múltiples VSI. Con un modelo animal humanizado hubiésemos evaluado si el conjunto de estas VSI adquiridas desde el inicio de la enfermedad le han conferido una ventaja evolutiva, testando la eficacia *in vivo* de nuevos ICI o combinaciones, y su correlación con potenciales biomarcadores predictivos en carcinosarcomas (p.ej. PD-1, PD-L1, IDO) (284).

En segundo lugar, nos interesó estudiar con más detalle el caso 66 debido al hallazgo de una translocación *FGFR2-CASP7* como potencial biomarcador predictivo de respuesta a un FGFRinh en un colangiocarcinoma. Los tumores de vías biliares son un grupo heterogéneo de neoplasias de mal pronóstico, en el que actualmente se identifican distintos perfiles mutacionales según el subtipo clínico y localización anatómica: colangiocarcinoma intrahepático (iCCA), extrahepático (eCCA), perihiliar o vesícula biliar (285). Esta heterogeneidad genética ha subrayado la importancia de detectar estos determinantes moleculares, algunos con claras implicaciones pronósticas y predictivas: en una serie de 195 pacientes (78% iCCA; 22% eCCA) analizados mediante el panel *MSK-IMPACTTM*, se identificaron alteraciones genéticas con posible traducción terapéutica en el 47% de los pacientes, permitiendo la inclusión en ensayos o terapias dirigidas en el 16% de los casos (p.ej. iCCA IDH1mut 30% o FGFR2trans 14%) (286).

En 2017, Javle M. *et al* reportaron datos muy prometedores de eficacia anti-tumoral con el FGFR1-3inh infigratinib en el subgrupo de iCCA FGFR2trans, con DCR del 83.3% y PFS de 5.8 meses (IC 95%, 4.3-7.6 meses) (121). Sin embargo, a pesar de que nuestra paciente presentó una disminución precoz de

la carga tumoral (-23% en lesiones diana) con erdafitinib, acabó progresando tan sólo 4 meses después del inicio de la terapia dirigida. Por ello, decidimos secuenciar las muestras recogidas de esta paciente, incluyendo las obtenidas en una autopsia en caliente, con el objetivo de discernir si el tumor había adquirido algún mecanismo de resistencia. En el análisis dirigido hemos descartado la aparición de mutaciones policlonales *gatekeeper* en *FGFR2* (171), pero WES ha identificado hasta 4 poblaciones de células genéticamente distintas, todas ellas presentes ya desde el inicio de la enfermedad: *FGFR2-CASP7trans*, *MAP2K3mut*, *CACNA1Cmut* e *IL9Rmut*. Dado que ninguna clona tumoral ha aparecido *de novo* tras el tratamiento con FGFRinh, podemos inferir que la heterogeneidad intra-tumoral de este tumor ha tenido un rol principal como mecanismo de resistencia intrínseco (287).

Además, el incremento progresivo de células *MAP2K3mut* en las distintas muestras obtenidas durante la evolución de la enfermedad, hace plantearnos la reactivación de la vía de señalización MAPK como potencial mecanismo de resistencia redundante (168). Dado que no existen datos al respecto, en una siguiente fase de nuestro Proyecto pretendemos evaluar *in silico* el valor oncogénico de la *splice-variant* detectada R94L, con tal de determinar si el transcrito de mRNA resultante genera una proteína *MAP2K3* capaz de activar o inactivar la vía de las MAPKs en el contexto histológico específico de iCCA. Adicionalmente, disponemos del PDX368 para evaluar el efecto pro-tumoral de esta *MAP2K3mut* (R94L), y testar *in vivo* la eficacia de nuevas estrategias de combinación de FGFRinh que permitan revertir dicha resistencia (242). La revolución de la Medicina de Precisión ha llegado para quedarse en el ámbito de los tumores de vías biliares, aunque de momento está sólo limitada a pequeños subgrupos de pacientes molecularmente seleccionados. Los resultados de ensayos fase 3 con inhibidores IDH1 en iCCA *IDH1*-mutados son alentadores, así como los distintos FGFRinh en desarrollo en iCCA *FGFR2*-translocados (288). El análisis de los respondedores inusuales como nuestro caso puede ser de gran utilidad a la hora de comprender mejor los mecanismos de resistencia a estas nuevas dianas terapéuticas, un factor clave para diseñar tratamientos dirigidos en colangiocarcinomas (289).

Finalmente, seleccionamos el caso 32 por tratarse de un cáncer de colon *FGFR1*-mutado (I529M) que alcanzó una estabilidad radiológica mantenida durante 10 meses, a pesar de que no se ha descrito un claro rol de la vía del *FGFR:FGF* en la carcinogénesis colónica. Además, los datos *in silico* e *in vitro* demostraron que se trataba de una variante de significado incierto no patogénica, por lo que quisimos entender mejor porqué esta paciente se había beneficiado de recibir terapia dirigida con FGFRinh. Con el análisis WES hemos demostrado que el tumor inicial de esta paciente era policlonal, cuyo desarrollo y evolución ha sido mediado principalmente por la vía clásica CIN, a través de mutaciones somáticas adquiridas en los genes *APC* (R876)/*KRAS* (G12C)/*TP53* (R337C). Sin embargo, gracias a la tecnología NGS hemos descartado que las mutaciones subclonales *FGFR1* detectadas (S508F; S507T; Q197fs; L601del) fueran los verdaderos *drivers* del tumor.

Sabemos que el cáncer de colon avanzado se beneficia de la terapia anti-angiogénica (290, 291). En 2013, Grothey A. *et al* reportaron los resultados del ensayo fase 3 *CORRECT*, en el que demostraron la eficacia de regorafenib, un MTKI con actividad inhibitoria VEGFR1-3/TIE2/KIT/RET/BRAF/PDGFR/FGFR, en pacientes con cáncer de colon refractario a tratamiento estándar [mOS 6.4m regorafenib *versus* 5m placebo; HR 0.77 (IC 95%, 0.64-0.94); p=0.0052] (292). De nuestros experimentos preclínicos, hemos deducido que la eficacia de los MTKI (p.ej. lucitanib) en tumores no *FGFR*-dependientes está mediada sobretodo por su drástica reducción de la vascularización, induciendo una marcada necrosis (**figura 26D**). En el caso de esta paciente, naïve de tratamiento con anti-VEGF, la estabilidad alcanzada probablemente traduzca el efecto anti-angiogénico parcial del FGFR1-4inh recibido, aunque sospechamos que la eficacia hubiera sido probablemente mayor de recibir un MTKI como regorafenib. Recientemente, han surgido nuevas drogas dirigidas contra alteraciones específicas en *KRAS*, entre ellas los inhibidores AMG-510, MRTX-849, JNJ-74699157 y LY-3499446, con actividad inhibitoria covalente prometedora en *KRAS* (G12C) y que podrían haber resultado en actividad antitumoral en la

paciente (293). La generación de 2 modelos preclínicos derivados de esta paciente con alteración en KRASmut (G12C), el PDX M4X2 y PDX CTAX30, supone una herramienta muy valiosa para testar *in vivo* los KRASinh^{G12C} que están desarrollándose dentro del programa de ensayos fase 1 *VHIO*, y así contribuir a delinear qué subgrupo de pacientes son los que podrían beneficiarse más de recibir estos nuevos fármacos (294).

En resumen, la implementación de este proyecto traslacional *FGFR 360° RESISTANCE* nos ha permitido obtener un valioso repositorio de muestras biológicas, directamente procedentes de pacientes cuyos tumores albergaban múltiples alteraciones distintas en la vía *FGFR:FGF*. En una primera fase, los experimentos realizados *in vivo* y el análisis NGS de las biopsias de algunos respondedores inusuales nos han permitido obtener respuestas a algunas de las hipótesis generadas a lo largo de estas primeras etapas del desarrollo precoz de FGFRinh. Indudablemente, este arsenal de muestras y modelos preclínicos supondrán una valiosa herramienta que nos permitirá avanzar en el conocimiento de esta vía molecular, guiando adecuadamente un desarrollo optimizado de los distintos inhibidores del FGFR.

A nuestro entender, el desarrollo de este proyecto representa un claro ejemplo de estudio piloto de Medicina Personalizada: el *FGFR 360° RESISTANCE* ha sido capaz de integrar la información de las distintas alteraciones moleculares del *FGFR:FGF* y su análisis funcional, el tratamiento de pacientes con terapia dirigida, con la obtención de muestras diversas, incluyendo autopsias en caliente, hasta la generación de PDXs con los que realizar estudios *in vivo*. De hecho, nuestros resultados demuestran que la puesta a punto y desarrollo de un proyecto traslacional de estas características es posible, no sólo en el campo de la vía del *FGFR* sino también en el propio ámbito de la Medicina de Precisión.

9. CONCLUSIONES

9.1. La sensibilidad al FGFRinh rogaratinib se correlaciona mejor con los niveles de FGFR1-4 mRNA que con los niveles de amplificación génica o mRNA individuales de cada *FGFR* en PDXs *FGFR*-amplificados de cáncer de mama.

9.2. La plataforma *Nanostring*® *nCounter* emerge como una tecnología de *pre-screening* molecular fiable que permite analizar los niveles de expresión FGFR mRNA en muestras de archivo de parafina.

9.3. La tecnología *FACT*TM es una herramienta de análisis funcional *in vitro* útil para discernir la oncogenicidad de variantes de significado incierto *FGFR*.

9.4. En PDXs FGFR1-4 mRNA sensibles a FGFRinh, existe un doble efecto anti-proliferativo y anti-angiogénico, tanto con el MTKI lucitanib como con el FGFRinh rogaratinib. Sin embargo, en cánceres de mama no *FGFR*-dependientes, la eficacia con el MTKI en PDXs resistentes a FGFRinh es debida a su mayor efecto anti-angiogénico.

9.5. La aplicación de paneles de secuenciación dirigidos limita la detección alteraciones moleculares. El análisis mediante *WES* y RNAseq permite caracterizar mejor genómicamente a los respondedores inusuales.

9.6. La ultra-secuenciación de tumores *FGFR*-alterados ha evidenciado una marcada heterogeneidad intra-tumoral mantenida a lo largo de la evolución de la enfermedad, contribuyendo así a la falta de sensibilidad a los FGFRinh.

10. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

10.1. La colaboración realizada durante este proyecto traslacional con el Laboratorio de Genómica del Cáncer *VHIO* (Investigadora principal Dra. Ana Vivancos), ha permitido validar la plataforma *Nanostring*® *nCounter* como tecnología de *pre-screening* molecular para identificar potenciales pacientes candidatos a recibir terapia con FGFRinh, avalando el rol de los niveles de FGFR mRNA como biomarcador predictivo. Precisamente, se ha escogido la plataforma *Nanostring*® *nCounter* porque a raíz de las observaciones de esta tesis, se ha validado su aplicabilidad en la clínica, permitiendo el análisis de expresión mRNA en muestras de archivo parafinadas. A raíz de la experiencia adquirida, el laboratorio de Genómica del Cáncer *VHIO* ha sido designado como laboratorio central del ensayo multicéntrico académico fase 2 *Basket of Baskets* (*Study Chair* Dr. Jordi Rodón), cuyo objetivo es la implementación de una plataforma que permita evaluar distintos agentes dirigidos en poblaciones de pacientes molecularmente seleccionados (ClinicalTrial.gov ID NCT03767075) (258). El ensayo evaluará la administración de FGFRinh en distintas cohortes de pacientes, en base a algunas de nuestras hipótesis:

- Brazo 2A: Pacientes con mutaciones *FGFR1-3* patogénicas.
- Brazo 2B: Pacientes con mutaciones *FGFR4* patogénicas o *FGFR1-3* VSI.
- Brazo 2C: Pacientes con cualquier tumor sólido, excepto cáncer de mama o gástrico, con alta amplificación *FGFR1-3* (NGS equivalente a FISH ratio>6) y alta expresión mRNA *FGFR1-3* (> percentil 95 de la población general con cáncer) evaluada con *Nanostring*® *nCounter*.
- Brazo 2D: Pacientes con cualquier tumor sólido, excepto cáncer de mama o gástrico, con alta amplificación *FGFR1-3* (NGS equivalente a FISH ratio>6) pero sin alta expresión mRNA *FGFR1-3* (< percentil 95 de la población general con cáncer) evaluada con *Nanostring*® *nCounter*.

10.2. Desde el Grupo de Terapia Experimental *VHIO* (Investigadora principal Dra. Violeta Serra/Investigadora colaboradora Dra. Cinta Hierro) se ha solicitado una propuesta de beca *FIS* del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) para caracterizar con mayor detalle los distintivos moleculares del cáncer de mama metastásico, en el contexto concreto de progresión a terapia endocrina y a los inhibidores de la quinasa dependiente de las ciclinas 4/6 (CDK4/6inh). Este proyecto pretende desarrollar una plataforma diagnóstica optimizada, que permita guiar en tiempo real la elección de tratamientos dirigidos en pacientes refractarias a CDK4/6inh. Además, la propuesta tiene como objetivo evaluar la activación de la vía del FGFR como potencial mecanismo de resistencia a estos CDK4/6inh (295). En el marco de esta iniciativa, se incluirá la evaluación de los niveles de FGFR1-4 mRNAh en el panel de post-CDK4/6inh *pre-screening* molecular, además de utilizar los modelos PDXs *FGFR*-alterados de cáncer de mama generados en el *FGFR 360° RESISTANCE* para testar nuevas estrategias terapéuticas (p.ej. combinaciones FGFRinh +/- CDK4/6inh, entre otras).

10.3. En línea con la hipótesis de que la activación de la vía del *FGFR* es un mecanismo de resistencia a los CDK4/6inh, se establecerá un proyecto de colaboración entre el Grupo de Terapia Experimental *VHIO* (Investigadora principal Dra. Violeta Serra) y el Grupo de Investigación en Cáncer de Mama del *Institute of Cancer Research (ICR)* (Investigador principal Prof. Nick Turner). En el contexto del ensayo clínico *PALOMA-3* en pacientes con cáncer de mama metastásicas tratadas con palbociclib, analizaremos los datos de expresión génica de las muestras de las pacientes evaluadas mediante HTG *EdgeSeq*® (209). Estas muestras nos servirán como cohorte externa de validación de nuestro potencial biomarcador compuesto FGFR1-4 mRNAh en pacientes, determinado previamente sólo en PDXs de cáncer de mama. Además, el objetivo es identificar aquel subgrupo de pacientes cuya alta expresión de FGFR1-4 mRNAh justifique la resistencia a la terapia recibida con CDK4/6inh, y que por lo tanto, pudieran ser candidatas a recibir tratamiento con FGFRinh.

10.4. Además, está en marcha una colaboración adicional entre el Grupo de Terapia Experimental *VHIO* (Investigadora principal Dra. Violeta Serra/Investigadora colaboradora Dra. Cinta Hierro) y el Laboratorio de Patología Molecular del *Netherlands Cancer Institute (NKI)* (Investigador principal Dr. Jos Jonkers/Postdoc Daniel Zingg), cuyo objetivo es investigar la posible existencia de fusiones *FGFR* desconocidas o no detectadas previamente, como biomarcadores predictivos de respuesta al bloqueo FGFR en cáncer de mama. Para ello, se ha seleccionado una cohorte de pacientes *HUVH* con cáncer de mama metastásicas, tratadas dentro de ensayos fase 1 con MTKI y/o FGFRinh. El análisis mediante RNAseq de las muestras de archivo disponibles – biopsias tumorales de las pacientes o PDXs- pretende identificar translocaciones del *FGFR* que expliquen las diferencias de eficacia entre respondedoras *versus* no-respondedoras (272).

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
3. Rodon J. An (only) partially established paradigm of drug development of targeted therapies. *Eur J Cancer*. 2014;50(12):2037-9.
4. 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.
5. 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.
6. Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, LeCesne A, Reichardt P, Blay JY, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet*. 2004;364(9440):1127-34.
7. Blay JY, Le Cesne A, Ray-Coquard I, Bui B, Duffaud F, Delbaldo C, et al. Prospective multicentric randomized phase III study of imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors comparing interruption versus continuation of treatment beyond 1 year: the French Sarcoma Group. *J Clin Oncol*. 2007;25(9):1107-13.
8. 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.
9. 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.

10. Chin L, Gray JW. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature*. 2008;452(7187):553-63.
11. 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.
12. 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.
13. Chabner BA. Approval after phase I: ceritinib runs the three-minute mile. *Oncologist*. 2014;19(6):577-8.
14. Hierro C, Braña I, Rodon J, Tabernero J. Chapter 10. Molecular diagnosis and biomarkers: application and limits. *ESMO Handbook of translational research*. 2015(second edition).
15. 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.
16. Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC. TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov*. 2015;5(1):25-34.
17. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med*. 2018;378(8):731-9.
18. Drilon A, Siena S, Ou SI, Patel M, Ahn MJ, Lee J, et al. Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov*. 2017;7(4):400-9.
19. Lassen UN, Albert CM, Kummar S, Van Tilburg CM, Dubois SG, Georger B, et al. Larotrectinib efficacy and safety in TRK fusion cancer: an expanded clinical dataset showing consistency in an age and tumor agnostic approach. *Ann Oncol*. 2018;29(suppl_8):abstr 4090.
20. Hierro C, Azaro A, Argiles G, Elez E, Gomez P, Carles J, et al. Unveiling changes in the landscape of patient populations in cancer early drug development. *Oncotarget*. 2017;8(8):14158-72.

21. 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.
22. 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)Kalpha inhibitor. *Nature*. 2015;518(7538):240-4.
23. 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.
24. 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.
25. Dienstmann R, Rodon J, Prat A, Perez-Garcia J, Adamo B, Felip E, et al. Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Ann Oncol*. 2014;25(3):552-63.
26. Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem*. 2011;149(2):121-30.
27. Raju R, Palapetta SM, Sandhya VK, Sahu A, Alipoor A, Balakrishnan L, et al. A Network Map of FGF-1/FGFR Signaling System. *J Signal Transduct*. 2014;2014:962962.
28. Wesche J, Haglund K, Haugsten EM. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J*. 2011;437(2):199-213.
29. Touat M, Ileana E, Postel-Vinay S, Andre F, Soria JC. Targeting FGFR Signaling in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(12):2684-94.
30. Chae YK, Ranganath K, Hammerman PS, Vaklavas C, Mohindra N, Kalyan A, et al. Inhibition of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) pathway: the current landscape and barriers to clinical application. *Oncotarget*. 2017;8(9):16052-74.
31. Brooks AN, Kilgour E, Smith PD. Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(7):1855-62.

32. Teven CM, Farina EM, Rivas J, Reid RR. Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes Dis.* 2014;1(2):199-213.
33. Zhou M, Wang X, Phung V, Lindhout DA, Mondal K, Hsu JY, et al. Separating Tumorigenicity from Bile Acid Regulatory Activity for Endocrine Hormone FGF19. *Cancer Res.* 2014;74(12):3306-16.
34. Owen BM, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Tissue-specific actions of the metabolic hormones FGF15/19 and FGF21. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(1):22-9.
35. Koizumi M, Komaba H, Fukagawa M. Parathyroid function in chronic kidney disease: role of FGF23-Klotho axis. *Contrib Nephrol.* 2013;180:110-23.
36. Oladipupo SS, Smith C, Santeford A, Park C, Sene A, Wiley LA, et al. Endothelial cell FGF signaling is required for injury response but not for vascular homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(37):13379-84.
37. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell.* 2005;8(4):299-309.
38. Jiang T, Gao G, Fan G, Li M, Zhou C. FGFR1 amplification in lung squamous cell carcinoma: A systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer.* 2015;87(1):1-7.
39. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature.* 2012;489(7417):519-25.
40. Azuma K, Kawahara A, Sonoda K, Nakashima K, Tashiro K, Watari K, et al. FGFR1 activation is an escape mechanism in human lung cancer cells resistant to afatinib, a pan-EGFR family kinase inhibitor. *Oncotarget.* 2014;5(15):5908-19.
41. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014;511(7511):543-50.
42. Schultheis AM, Bos M, Schmitz K, Wilsberg L, Binot E, Wolf J, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) amplification is a potential therapeutic target in small-cell lung cancer. *Mod Pathol.* 2014;27(2):214-21.

43. Pardo OE, Latigo J, Jeffery RE, Nye E, Poulsom R, Spencer-Dene B, et al. The fibroblast growth factor receptor inhibitor PD173074 blocks small cell lung cancer growth in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2009;69(22):8645-51.
44. Goke F, Bode M, Franzen A, Kirsten R, Goltz D, Goke A, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 amplification is a common event in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Mod Pathol.* 2013;26(10):1298-306.
45. Koole K, Brunen D, van Kempen PM, Noorlag R, de Bree R, Liefstink C, et al. FGFR1 Is a Potential Prognostic Biomarker and Therapeutic Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2016;22(15):3884-93.
46. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature.* 2017;541(7636):169-75.
47. Sugiura K, Ozawa S, Kitagawa Y, Ueda M, Kitajima M. Co-expression of aFGF and FGFR-1 is predictive of a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2007;17(3):557-64.
48. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490(7418):61-70.
49. Turner N, Pearson A, Sharpe R, Lambros M, Geyer F, Lopez-Garcia MA, et al. FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* 2010;70(5):2085-94.
50. Lee HJ, Seo AN, Park SY, Kim JY, Park JY, Yu JH, et al. Low prognostic implication of fibroblast growth factor family activation in triple-negative breast cancer subsets. *Ann Surg Oncol.* 2014;21(5):1561-8.
51. Plantamura I, Casalini P, Dugnani E, Sasso M, D'Ippolito E, Tortoreto M, et al. PDGFRbeta and FGFR2 mediate endothelial cell differentiation capability of triple negative breast carcinoma cells. *Mol Oncol.* 2014;8(5):968-81.
52. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011;474(7353):609-15.
53. Roidl A, Berger HJ, Kumar S, Bange J, Knyazev P, Ullrich A. Resistance to chemotherapy is associated with fibroblast growth factor receptor 4 up-regulation. *Clin Cancer Res.* 2009;15(6):2058-66.

54. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497(7447):67-73.
55. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014;507(7492):315-22.
56. Armstrong K, Ahmad I, Kalna G, Tan SS, Edwards J, Robson CN, et al. Upregulated FGFR1 expression is associated with the transition of hormone-naive to castrate-resistant prostate cancer. *Br J Cancer*. 2011;105(9):1362-9.
57. Fernanda Amary M, Ye H, Berisha F, Khatri B, Forbes G, Lehovskiy K, et al. Fibroblastic growth factor receptor 1 amplification in osteosarcoma is associated with poor response to neo-adjuvant chemotherapy. *Cancer Med*. 2014;3(4):980-7.
58. Gartside MG, Chen H, Ibrahim OA, Byron SA, Curtis AV, Wellens CL, et al. Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. *Mol Cancer Res*. 2009;7(1):41-54.
59. Bell K, Gaffney D, Martinez Cardona G, Karkera J, Platero S. Co-amplification of FGF receptors and ligands in FGFR inhibitor-sensitive cell lines. *Cancer Res*. 2015;75(15 suppl):abstr 4326.
60. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202-9.
61. Betts G, Valentine H, Pritchard S, Swindell R, Williams V, Morgan S, et al. FGFR2, HER2 and cMet in gastric adenocarcinoma: detection, prognostic significance and assessment of downstream pathway activation. *Virchows Arch*. 2014;464(2):145-56.
62. Su X, Zhan P, Gavine PR, Morgan S, Womack C, Ni X, et al. FGFR2 amplification has prognostic significance in gastric cancer: results from a large international multicentre study. *Br J Cancer*. 2014;110(4):967-75.
63. Guarneri V, Dieci MV, Conte P. Relapsed triple-negative breast cancer: challenges and treatment strategies. *Drugs*. 2013;73(12):1257-65.
64. Krakstad C, Birkeland E, Seidel D, Kusonmano K, Petersen K, Mjos S, et al. High-throughput mutation profiling of primary and metastatic endometrial cancers identifies KRAS, FGFR2 and PIK3CA to be frequently mutated. *PLoS One*. 2012;7(12):e52795.

65. Byron SA, Gartside M, Powell MA, Wellens CL, Gao F, Mutch DG, et al. FGFR2 point mutations in 466 endometrioid endometrial tumors: relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 mutations and clinicopathological features. *PLoS One*. 2012;7(2):e30801.
66. Graham RP, Barr Fritcher EG, Pestova E, Schulz J, Sitailo LA, Vasmatazis G, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 translocations in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*. 2014;45(8):1630-8.
67. Arai Y, Totoki Y, Hosoda F, Shiota T, Hama N, Nakamura H, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2014;59(4):1427-34.
68. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, et al. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet*. 1999;23(1):18-20.
69. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*. 2017;171(3):540-56.e25.
70. Wang R, Wang L, Li Y, Hu H, Shen L, Shen X, et al. FGFR1/3 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(15):4107-14.
71. Singh D, Chan JM, Zoppoli P, Niola F, Sullivan R, Castano A, et al. Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science*. 2012;337(6099):1231-5.
72. Parker BC, Annala MJ, Cogdell DE, Granberg KJ, Sun Y, Ji P, et al. The tumorigenic FGFR3-TACC3 gene fusion escapes miR-99a regulation in glioblastoma. *J Clin Invest*. 2013;123(2):855-65.
73. Sawey ET, Chanrion M, Cai C, Wu G, Zhang J, Zender L, et al. Identification of a therapeutic strategy targeting amplified FGF19 in liver cancer by Oncogenomic screening. *Cancer Cell*. 2011;19(3):347-58.
74. Poh W, Wong W, Ong H, Aung MO, Lim SG, Chua BT, et al. Klotho-beta overexpression as a novel target for suppressing proliferation and fibroblast growth factor receptor-4 signaling in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*. 2012;11:14.

75. Mizukami T, Togashi Y, Naruki S, Banno E, Terashima M, de Velasco MA, et al. Significance of FGF9 gene in resistance to anti-EGFR therapies targeting colorectal cancer: A subset of colorectal cancer patients with FGF9 upregulation may be resistant to anti-EGFR therapies. *Mol Carcinog.* 2017;56(1):106-17.
76. Li SQ, Cheuk AT, Shern JF, Song YK, Hurd L, Liao H, et al. Targeting wild-type and mutationally activated FGFR4 in rhabdomyosarcoma with the inhibitor ponatinib (AP24534). *PLoS One.* 2013;8(10):e76551.
77. Reis-Filho JS, Simpson PT, Turner NC, Lambros MB, Jones C, Mackay A, et al. FGFR1 emerges as a potential therapeutic target for lobular breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2006;12(22):6652-62.
78. Gozgit JM, Squillace RM, Wongchenko MJ, Miller D, Wardwell S, Mohemmad Q, et al. Combined targeting of FGFR2 and mTOR by ponatinib and ridaforolimus results in synergistic antitumor activity in FGFR2 mutant endometrial cancer models. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;71(5):1315-23.
79. Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, et al. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell.* 2007;11(1):83-95.
80. Yoshiji H, Harris SR, Thorgeirsson UP. Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 1997;57(18):3924-8.
81. Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, Wolff RA, Eng C, Glover KY, et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol.* 2010;28(3):453-9.
82. Wang K, Ji W, Yu Y, Li Z, Niu X, Xia W, et al. FGFR1-ERK1/2-SOX2 axis promotes cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis in FGFR1-amplified lung cancer. *Oncogene.* 2018;37(39):5340-54.
83. Catenacci DVT, Rha SY, Bang YJ, Wainberg ZA, Chao J, Lee KW, et al. Updated antitumor activity and safety of FPA144, an ADCC-enhanced,

- FGFR2b isoform-specific monoclonal antibody, in patients with FGFR2b+ gastric cancer. *J Clin Oncol*. 2017;35(15_suppl):abstr 4067.
84. Gong SG. Isoforms of receptors of fibroblast growth factors. *J Cell Physiol*. 2014;229(12):1887-95.
85. Yamamoto Y, Matsui J, Matsushima T, Obaishi H, Miyazaki K, Nakamura K, et al. Lenvatinib, an angiogenesis inhibitor targeting VEGFR/FGFR, shows broad antitumor activity in human tumor xenograft models associated with microvessel density and pericyte coverage. *Vasc Cell*. 2014;6:18.
86. Schlumberger M, Tahara M, Wirth LJ, Robinson B, Brose MS, Elisei R, et al. Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(7):621-30.
87. Hilberg F, Roth GJ, Krssak M, Kautschitsch S, Sommergruber W, Tontsch-Grunt U, et al. BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res*. 2008;68(12):4774-82.
88. Reck M, Kaiser R, Mellemegaard A, Douillard JY, Orlov S, Krzakowski M, et al. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(2):143-55.
89. Konecny GE, Kolarova T, O'Brien NA, Winterhoff B, Yang G, Qi J, et al. Activity of the fibroblast growth factor receptor inhibitors dovitinib (TKI258) and NVP-BGJ398 in human endometrial cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(5):632-42.
90. Andre F, Bachelot T, Campone M, Dalenc F, Perez-Garcia JM, Hurvitz SA, et al. Targeting FGFR with dovitinib (TKI258): preclinical and clinical data in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(13):3693-702.
91. Konecny GE, Finkler N, Garcia AA, Lorusso D, Lee PS, Rocconi RP, et al. Second-line dovitinib (TKI258) in patients with FGFR2-mutated or FGFR2-non-mutated advanced or metastatic endometrial cancer: a non-randomised, open-label, two-group, two-stage, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2015;16(6):686-94.

92. Soria JC, DeBraud F, Bahleda R, Adamo B, Andre F, Dientsmann R, et al. Phase I/IIa study evaluating the safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lucitanib in advanced solid tumors. *Ann Oncol.* 2014;25(11):2244-51.
93. Hui R, Pearson A, Cortes Castan J, Campbell C, Poirot C, Azim Jr. HA, et al. Lucitanib for the treatment of HR+ HER2- metastatic breast cancer (MBC) patients (pts): results from the multicohort phase II FINESSE trial. *Ann Oncol.* 2018;29(suppl_8):289PD.
94. Rodon J, Peltola K, Azaro A, Castenon Alvarez E, Garratt C, Leskinen H, et al. Phase 1 study of ODM-203, a selective dual FGFR/VEGFR inhibitor, in patients with advanced solid tumours. *Ann Oncol.* 2016;27(suppl_6):370P.
95. Papadopoulos KP, El-Rayes BF, Tolcher AW, Patnaik A, Rasco DW, Harvey RD, et al. A Phase 1 study of ARQ 087, an oral pan-FGFR inhibitor in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer.* 2017;117(11):1592-9.
96. Venetsanakos E, Brameld KA, Phan VT, Verner E, Owens TD, Xing Y, et al. The Irreversible Covalent Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor PRN1371 Exhibits Sustained Inhibition of FGFR after Drug Clearance. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(12):2668-76.
97. Andre F, Ranson M, Dean E, Varga A, Van der Noll R, Stockman P, et al. Results of a phase I study of AZD4547, an inhibitor of fibroblast growth factor receptor, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Res.* 2013;73(8 suppl):LB145.
98. Kilgour E, Ferry D, Saggese M, Arkenau H, Rooney H, Smith N, et al. Exploratory biomarker analysis of a phase I study of AZD4547, an inhibitor of fibroblast growth factor receptor (FGFR), in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2014;32(suppl_5):abstr 11010.
99. Arkenau H, Saggese M, Hollebecque A, Mathewson A, Lemech C, Landers D, et al. A phase 1 expansion cohort of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitor AZD4547 in patients (pts) with advanced gastric (GC) and gastroesophageal (GOJ) cancer. *J Clin Oncol.* 2014;32(suppl_5):abstr 2620.
100. Paik PK, Shen R, Berger MF, Ferry D, Soria JC, Mathewson A, et al. A Phase Ib Open-Label Multicenter Study of AZD4547 in Patients with

Advanced Squamous Cell Lung Cancers. *Clin Cancer Res.* 2017;23(18):5366-73.

101. Nogova L, Sequist LV, Perez Garcia JM, Andre F, Delord JP, Hidalgo M, et al. Evaluation of BGJ398, a Fibroblast Growth Factor Receptor 1-3 Kinase Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors Harboring Genetic Alterations in Fibroblast Growth Factor Receptors: Results of a Global Phase I, Dose-Escalation and Dose-Expansion Study. *J Clin Oncol.* 2017;35(2):157-65.

102. Voss MH, Hierro C, Heist RS, Cleary JM, Meric-Bernstam F, Tabernero J, et al. A Phase I, Open-Label, Multicenter, Dose-escalation Study of the Oral Selective FGFR Inhibitor Debio 1347 in Patients with Advanced Solid Tumors Harboring FGFR Gene Alterations. *Clin Cancer Res.* 2019;25(9):2699-707.

103. Joerger R, Soo B, Cho B, Navarro Mendivil A, Sayehli C, Richly H, et al. Phase I study of the pan-fibroblast growth factor receptor inhibitor BAY 1163877 with expansion cohorts for patients based on tumour FGFR mRNA expression levels. *Ann Oncol.* 2016;27(6):360O-PR.

104. Joerger M, Soo RA, Cho BC, Navarro A, Sayehli CM, Richly H, et al. A novel mRNA-based patient selection strategy identifies fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitor-sensitive tumors: Results from rogaratinib Phase-1 study. *Ann Oncol.* 2017;28(suppl_5):379P.

105. Joerger M, Cassier P, Penel N, Cathomas R, Richly H, Schostak M, et al. Rogaratinib treatment of patients with advanced urothelial carcinomas prescreened for tumor FGFR mRNA expression. *J Clin Oncol.* 2018;36(suppl_6):abstr 494.

106. Michael M, Bang YJ, Park YS, Kang YK, Kim TM, Hamid O, et al. A Phase 1 Study of LY2874455, an Oral Selective pan-FGFR Inhibitor, in Patients with Advanced Cancer. *Target Oncol.* 2017;12(4):463-74.

107. Tabernero J, Bahleda R, Dienstmann R, Infante JR, Mita A, Italiano A, et al. Phase I Dose-Escalation Study of JNJ-42756493, an Oral Pan-Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol.* 2015;33(30):3401-8.

108. Soria J, Italiano A, Cervantes A, Tabernero J, Infante J, Lara P, et al. Safety and activity of the pan-fibroblast growth factor receptor (FGFR)

inhibitor erdafitinib in phase 1 study patients with advanced urothelial carcinoma. *Ann Oncol.* 2016;27(6):781PD.

109. Soria JC, Strickler JH, Govindan R, Chai S, Chan N, Quiroga-Garcia V, et al. Safety and activity of the pan-fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitor erdafitinib in phase 1 study patients (Pts) with molecularly selected advanced cholangiocarcinoma (CCA). *J Clin Oncol.* 2017;35(suppl_15):abstr 4074.

110. Bahleda R, Italiano A, Hierro C, Mita A, Cervantes A, Chan N, et al. Multicenter Phase I Study of Erdafitinib (JNJ-42756493), Oral Pan-Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor, in Patients with Advanced or Refractory Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2019;25(16):4888-97.

111. Tolcher AW, Papadopoulos KP, Patnaik A, Wilson K, Thayer S, Zanghi J, et al. A phase I, first in human study of FP-1039 (GSK3052230), a novel FGF ligand trap, in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol.* 2016;27(3):526-32.

112. Bahleda R, Meric-Bernstam F, Goyal L, Tran B, He H, Winkler R, et al. Phase I dose-escalation study of TAS-120, a highly selective, covalently bound FGFR inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Res.* 2018;78(13 suppl):abstr CT121.

113. Meric-Bernstam F, Arkenau HT, Tran B, Bahleda R, Kelley R, Hierro C, et al. Efficacy of TAS-120, an irreversible fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitor, in cholangiocarcinoma patients with FGFR pathway alterations who were previously treated with chemotherapy and other FGFR inhibitors. *Ann Oncol.* 29(suppl_5):O-001.

114. Piha-Paul S, Hierro C, Funk J, Gourlay S, Smith P, Venetsanakos E, et al. A phase 1, multicenter, dose-escalation study of PRN1371, an irreversible covalent FGFR1-4 kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors, followed by expansion cohorts in patients with FGFR genetic alterations. *J Clin Oncol.* 2016;34:TPS2602.

115. O'Donnell P, Goldman JW, Gordon MS, Shih K, Choi YJ, Lu D, et al. A Phase I Dose-escalation Study of MFGR1877S, a Human Monoclonal Anti-fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) Antibody, in Patients (pts) with Advanced Solid Tumors. *Eur J Cancer.* 2012;48(suppl_6):621P.

116. Chan SL, Yen C-J, Schuler M, Lin C-C, Choo SP, Weiss K-H, et al. Ph I/II study of FGF401 in adult pts with HCC or solid tumors characterized by FGFR4/KLB expression. *Cancer Res.* 2017;77(13 suppl):abstr CT106.
117. Kim R, Sarker D, Macarulla T, Yau T, Choo SP, Meyer T, et al. Phase 1 safety and clinical activity of BLU-554 in advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *Ann Oncol.* 2017;28(suppl_5):365O.
118. FDA. FDA approves first targeted therapy for metastatic bladder cancer. Available from URL: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-targeted-therapy-metastatic-bladder-cancer> [accessed April 12th, 2019].
119. FDA. FDA grants accelerated approval to pemigatinib for cholangiocarcinoma with an FGFR2 rearrangement or fusion. Available from URL: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-pemigatinib-cholangiocarcinoma-fgfr2-rearrangement-or-fusion> [accessed April 17th, 2020].
120. Helsten T, Elkin S, Arthur E, Tomson BN, Carter J, Kurzrock R. The FGFR Landscape in Cancer: Analysis of 4,853 Tumors by Next-Generation Sequencing. *Clin Cancer Res.* 2016;22(1):259-67.
121. Javle M, Lowery M, Shroff RT, Weiss KH, Springfield C, Borad MJ, et al. Phase II Study of BGJ398 in Patients With FGFR-Altered Advanced Cholangiocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2018;36(3):276-82.
122. Javle M, Kelley RK, Roychowdhury S, Weiss KH, Abou-Alfa GK, Macarulla T, et al. LBA28 Updated results from a phase II study of infigratinib (BGJ398), a selective pan-FGFR kinase inhibitor, in patients with previously treated advanced cholangiocarcinoma containing FGFR2 fusions. *Ann Oncol.* 2018;29(suppl_8):LBA28.
123. Tan L, Wang J, Tanizaki J, Huang Z, Aref AR, Rusan M, et al. Development of covalent inhibitors that can overcome resistance to first-generation FGFR kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(45):E4869-77.
124. Voss MH, Hierro C, Heist RS, Cleary JM, Meric-Bernstam F, Gandhi L, et al. Debio 1347, an oral FGFR inhibitor: Results from a first-in-human,

phase I dose-escalation study in patients with FGFR genomically activated advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2017;35(15_suppl):abstr 2500.

125. Kumar-Sinha C, Kalyana-Sundaram S, Chinnaiyan AM. Landscape of gene fusions in epithelial cancers: seq and ye shall find. *Genome Med.* 2015;7:129.

126. Loriot Y, Necchi A, Park SH, García-Donas J, Huddart R, Frederick Burgess E, et al. Erdafitinib (ERDA; JNJ-42756493), a pan-fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitor, in patients (pts) with metastatic or unresectable urothelial carcinoma (mUC) and FGFR alterations (FGFRa): Phase 2 continuous versus intermittent dosing. *J Clin Oncol.* 2018;36(6_suppl):abstr 411.

127. Siefker-Radtke AO, Necchi A, Park SH, García-Donas J, Huddart RA, Burgess EF, et al. First results from the primary analysis population of the phase 2 study of erdafitinib (ERDA; JNJ-42756493) in patients (pts) with metastatic or unresectable urothelial carcinoma (mUC) and FGFR alterations (FGFRalt). *J Clin Oncol.* 2018;36(suppl):abstr 4503.

128. Babina IS, Turner NC. Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(5):318-32.

129. Weiss J, Sos ML, Seidel D, Peifer M, Zander T, Heuckmann JM, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med.* 2010;2(62):62ra93.

130. Zhang J, Zhang L, Su X, Li M, Xie L, Malchers F, et al. Translating the therapeutic potential of AZD4547 in FGFR1-amplified non-small cell lung cancer through the use of patient-derived tumor xenograft models. *Clin Cancer Res.* 2012;18(24):6658-67.

131. Wynes MW, Hinz TK, Gao D, Martini M, Marek LA, Ware KE, et al. FGFR1 mRNA and protein expression, not gene copy number, predict FGFR TKI sensitivity across all lung cancer histologies. *Clin Cancer Res.* 2014;20(12):3299-309.

132. Ebi H KH, Yano S. Both amplification and protein expression are required to predict FGFR tyrosine kinase inhibitor sensitivity in lung cancer. *Cancer Res.* 2015;75(suppl_15):abstr 749.

133. Nuciforo P, Radosevic-Robin N, Ng T, Scaltriti M. Quantification of HER family receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2015;17:53.
134. Pearson A, Smyth E, Babina IS, Herrera-Abreu MT, Tarazona N, Peckitt C, et al. High-Level Clonal FGFR Amplification and Response to FGFR Inhibition in a Translational Clinical Trial. *Cancer Discov.* 2016;6(8):838-51.
135. Rooney C, Geh C, Williams V, Heuckmann JM, Menon R, Schneider P, et al. Characterization of FGFR1 Locus in sqNSCLC Reveals a Broad and Heterogeneous Amplicon. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149628.
136. Brichory F, Pokorska-Bocci A, Nuciforo P, Rigotti S, Lembrez N, Vuagniaux G, et al. The activity of the FGFR selective inhibitor Debio 1347 is correlated with high mRNA expression. *Cancer Res.* 2017;77(13 suppl):abstr 2088.
137. Hierro C, Rodon J, Tabernero J. Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor/FGF Inhibitors: Novel Targets and Strategies for Optimization of Response of Solid Tumors. *Semin Oncol.* 2015;42(6):801-19.
138. Schram AM, Voss MH, Hyman DM. Genome-Driven Paradigm for the Development of Selective Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitors. *J Clin Oncol.* 2017;35(2):131-4.
139. Leroy L, Cousin S, Italiano A. Genetic determinants of response to fibroblast growth factor receptor inhibitors in solid tumours. *Eur J Cancer.* 2017;81:102-5.
140. Hierro C, Alsina M, Sanchez M, Serra V, Rodon J, Tabernero J. Targeting the fibroblast growth factor receptor 2 in gastric cancer: promise or pitfall? *Ann Oncol.* 2017;28(6):1207-16.
141. Solit DB, Rosen N. Resistance to BRAF inhibition in melanomas. *N Engl J Med.* 2011;364(8):772-4.
142. Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature.* 2012;483(7387):100-3.
143. Fidler IJ, Hart IR. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science.* 1982;217(4564):998-1003.

144. Nicolson GL, Lembo TM, Welch DR. Growth of rat mammary adenocarcinoma cells in semisolid clonogenic medium not correlated with spontaneous metastatic behavior: heterogeneity in the metastatic, antigenic, enzymatic, and drug sensitivity properties of cells from different sized colonies. *Cancer Res.* 1988;48(2):399-404.
145. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature.* 2010;467(7319):1114-7.
146. Dalerba P, Kalisky T, Sahoo D, Rajendran PS, Rothenberg ME, Leyrat AA, et al. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. *Nat Biotechnol.* 2011;29(12):1120-7.
147. Roberts PJ, Stinchcombe TE, Der CJ, Socinski MA. Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy? *J Clin Oncol.* 2010;28(31):4769-77.
148. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* 2005;2(3):e73.
149. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366(10):883-92.
150. De Mattos-Arruda L, Ng CKY, Piscuoglio S, Gonzalez-Cao M, Lim RS, De Filippo MR, et al. Genetic heterogeneity and actionable mutations in HER2-positive primary breast cancers and their brain metastases. *Oncotarget.* 2018;9(29):20617-30.
151. Drilon A, Li G, Dogan S, Gounder M, Shen R, Arcila M, et al. What hides behind the MASC: clinical response and acquired resistance to entrectinib after ETV6-NTRK3 identification in a mammary analogue secretory carcinoma (MASC). *Ann Oncol.* 2016;27(5):920-6.
152. Russo M, Misale S, Wei G, Siravegna G, Crisafulli G, Lazzari L, et al. Acquired Resistance to the TRK Inhibitor Entrectinib in Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* 2016;6(1):36-44.

153. Drilon A, Nagasubramanian R, Blake JF, Ku N, Tuch BB, Ebata K, et al. A Next-Generation TRK Kinase Inhibitor Overcomes Acquired Resistance to Prior TRK Kinase Inhibition in Patients with TRK Fusion-Positive Solid Tumors. *Cancer Discov.* 2017;7(9):963-72.
154. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2005;352(8):786-92.
155. Goyal L, Shi L, Liu LY, Fece de la Cruz F, Lennerz JK, Raghavan S, et al. TAS-120 Overcomes Resistance to ATP-Competitive FGFR Inhibitors in Patients with FGFR2 Fusion-Positive Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Discov.* 2019;9(8):1064-79.
156. Bunney TD, Wan S, Thiagarajan N, Sutto L, Williams SV, Ashford P, et al. The Effect of Mutations on Drug Sensitivity and Kinase Activity of Fibroblast Growth Factor Receptors: A Combined Experimental and Theoretical Study. *EBioMedicine.* 2015;2(3):194-204.
157. Byron SA, Chen H, Wortmann A, Loch D, Gartside MG, Dehkhoda F, et al. The N550K/H mutations in FGFR2 confer differential resistance to PD173074, dovitinib, and ponatinib ATP-competitive inhibitors. *Neoplasia.* 2013;15(8):975-88.
158. Chell V, Balmanno K, Little AS, Wilson M, Andrews S, Blockley L, et al. Tumour cell responses to new fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and identification of a gatekeeper mutation in FGFR3 as a mechanism of acquired resistance. *Oncogene.* 2013;32(25):3059-70.
159. Datta J, Damodaran S, Parks H, Ocrainiciuc C, Miya J, Yu L, et al. Akt Activation Mediates Acquired Resistance to Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor BGJ398. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(4):614-24.
160. Cowell JK, Qin H, Hu T, Wu Q, Bhole A, Ren M. Mutation in the FGFR1 tyrosine kinase domain or inactivation of PTEN is associated with acquired resistance to FGFR inhibitors in FGFR1-driven leukemia/lymphomas. *Int J Cancer.* 2017;141(9):1822-9.
161. Grygielewicz P, Dymek B, Bujak A, Gunerka P, Stanczak A, Lamparska-Przybysz M, et al. Epithelial-mesenchymal transition confers

resistance to selective FGFR inhibitors in SNU-16 gastric cancer cells. *Gastric Cancer*. 2016;19(1):53-62.

162. Wang J, Mikse O, Liao RG, Li Y, Tan L, Janne PA, et al. Ligand-associated ERBB2/3 activation confers acquired resistance to FGFR inhibition in FGFR3-dependent cancer cells. *Oncogene*. 2015;34(17):2167-77.

163. Kim SM, Kim H, Yun MR, Kang HN, Pyo KH, Park HJ, et al. Activation of the Met kinase confers acquired drug resistance in FGFR-targeted lung cancer therapy. *Oncogenesis*. 2016;5(7):e241.

164. Jovcheva E, Ogata S, Van De Ven K, Paulussen C, Van de Weyer I, Wolf HD, et al. Identification of alternative mechanisms of resistance to FGFR inhibitor treatment in FGFR1-amplified large cell compared to FGFR1-amplified small cell lung cancer models. *Cancer Res*. 2014;74(suppl_19):LB-329.

165. Kotani H, Ebi H, Kitai H, Nanjo S, Kita K, Huynh TG, et al. Co-active receptor tyrosine kinases mitigate the effect of FGFR inhibitors in FGFR1-amplified lung cancers with low FGFR1 protein expression. *Oncogene*. 2016;35(27):3587-97.

166. Adachi Y, Watanabe K, Kita K, Kitai H, Kotani H, Sato Y, et al. Resistance mediated by alternative receptor tyrosine kinases in FGFR1-amplified lung cancer. *Carcinogenesis*. 2017;38(11):1063-72.

167. Chang J, Wang S, Zhang Z, Liu X, Wu Z, Geng R, et al. Multiple receptor tyrosine kinase activation attenuates therapeutic efficacy of the fibroblast growth factor receptor 2 inhibitor AZD4547 in FGFR2 amplified gastric cancer. *Oncotarget*. 2015;6(4):2009-22.

168. Bockorny B, Rusan M, Chen W, Liao RG, Li Y, Piccioni F, et al. RAS-MAPK Reactivation Facilitates Acquired Resistance in FGFR1-Amplified Lung Cancer and Underlies a Rationale for Upfront FGFR-MEK Blockade. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(7):1526-39.

169. Malchers F, Ercanoglu M, Schutte D, Castiglione R, Tischler V, Michels S, et al. Mechanisms of Primary Drug Resistance in FGFR1-Amplified Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(18):5527-36.

170. Goyal L, Saha SK, Liu LY, Siravegna G, Leshchiner I, Ahronian LG, et al. Polyclonal Secondary FGFR2 Mutations Drive Acquired Resistance to

- FGFR Inhibition in Patients with FGFR2 Fusion-Positive Cholangiocarcinoma. *Cancer Discov.* 2017;7(3):252-63.
171. Smyth EC, Babina IS, Turner NC. Gatekeeper Mutations and Intratumoral Heterogeneity in FGFR2-Translocated Cholangiocarcinoma. *Cancer Discov.* 2017;7(3):248-9.
172. Kim SY, Ahn T, Bang H, Ham JS, Kim J, Kim ST, et al. Acquired resistance to LY2874455 in FGFR2-amplified gastric cancer through an emergence of novel FGFR2-ACSL5 fusion. *Oncotarget.* 2017.
173. Lau WM, Teng E, Huang KK, Tan JW, Das K, Zang Z, et al. Acquired Resistance to FGFR Inhibitor in Diffuse-Type Gastric Cancer through an AKT-Independent PKC-Mediated Phosphorylation of GSK3beta. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(1):232-42.
174. Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9(6):338-50.
175. Zhang X, Claerhout S, Prat A, Dobrolecki LE, Petrovic I, Lai Q, et al. A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Research.* 2013;73(15):4885-97.
176. Zhang XC, Zhang J, Li M, Huang XS, Yang XN, Zhong WZ, et al. Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenograft models with genetic aberrations within EGFR, KRAS and FGFR1: useful tools for preclinical studies of targeted therapies. *J Transl Med.* 2013;11:168.
177. Grinshpun A, Gavert N, Granit RZ, Masuri H, Ben-Porath I, Breuer S, et al. Ev vivo organ culture as potential prioritization tool for breast cancer targeted therapy. *Cancer Biol Ther.* 2018:1-4.
178. Jang J, Kim HK, Bang H, Kim ST, Kim SY, Park SH, et al. Antitumor Effect of AZD4547 in a Fibroblast Growth Factor Receptor 2-Amplified Gastric Cancer Patient-Derived Cell Model. *Transl Oncol.* 2017;10(4):469-75.
179. Wang Y, Ding X, Wang S, Moser CD, Shaleh HM, Mohamed EA, et al. Antitumor effect of FGFR inhibitors on a novel cholangiocarcinoma patient derived xenograft mouse model endogenously expressing an FGFR2-CCDC6 fusion protein. *Cancer Lett.* 2016;380(1):163-73.

180. Sullivan LA, Brekken RA. The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition. *MAbs*. 2010;2(2):165-75.
181. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*. 2009;15(3):220-31.
182. Hierro C, Serrano M, Ruiz-Pace F, Martin-Liberal J, Ochoa de Olza M, Azaro A, et al. Molecular markers predicting response to selective Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitors (FGFRinh) in patients (pts) with FGFR-amplified (amp) or mutated (mut) tumors. *J Clin Oncol*. 2017;35(suppl):abstr 2581.
183. Rodon J, Saura C, Dienstmann R, Vivancos A, Ramon y Cajal S, Baselga J, et al. Molecular prescreening to select patient population in early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(6):359-66.
184. 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.
185. Malkov VA, Serikawa KA, Balantac N, Watters J, Geiss G, Mashadi-Hossein A, et al. Multiplexed measurements of gene signatures in different analytes using the Nanostring nCounter Assay System. *BMC Res Notes*. 2009;2:80.
186. Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev*. 2011;32(4):177-95.
187. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med*. 2003;9(5):189-95.
188. Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, Kundra R, Zhang H, Wang J, et al. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol*. 2017;2017.
189. Kamal M, Tarcic G, Dureau S, Edelheit O, Barbash Z, Lecerf C, et al. Revisited analysis of a SHIVA01 trial cohort using functional mutational analyses successfully predicted treatment outcome. *Mol Oncol*. 2018;12(5):594-601.

190. Harhaj EW, Sun SC. Regulation of RelA subcellular localization by a putative nuclear export signal and p50. *Mol Cell Biol.* 1999;19(10):7088-95.
191. Herrmann A, Vogt M, Monnigmann M, Clahsen T, Sommer U, Haan S, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of persistently activated STAT3. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 18):3249-61.
192. Cohen-Saidon C, Cohen AA, Sigal A, Liron Y, Alon U. Dynamics and variability of ERK2 response to EGF in individual living cells. *Mol Cell.* 2009;36(5):885-93.
193. Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J.* 2004;380(Pt 2):297-309.
194. Hierro C, Sánchez-Guixé M, Ruiz-Pace F, Jiménez J, Maynes L, Azaro A, et al. FGFR 360 Resistance: Establishing a translational research framework in FGFR-altered (FGFRalt) patients (pt) treated with fibroblast growth factor receptor inhibitors (FGFRinh). *Annals of Oncology (2017) 28 (suppl_5): v573-v594 (DOI 101093/annonc/mdx390).* 2017.
195. Bello E, Colella G, Scarlato V, Oliva P, Berndt A, Valbusa G, et al. E-3810 is a potent dual inhibitor of VEGFR and FGFR that exerts antitumor activity in multiple preclinical models. *Cancer Res.* 2011;71(4):1396-405.
196. Holmstrom TH, Moilanen AM, Ikonen T, Bjorkman ML, Linnanen T, Wohlfahrt G, et al. ODM-203, a Selective Inhibitor of FGFR and VEGFR, Shows Strong Antitumor Activity, and Induces Antitumor Immunity. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(1):28-38.
197. Guagnano V, Furet P, Spanka C, Bordas V, Le Douget M, Stamm C, et al. Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase. *J Med Chem.* 2011;54(20):7066-83.
198. Fritsch C, Huang A, Chatenay-Rivauday C, Schnell C, Reddy A, Liu M, et al. Characterization of the novel and specific PI3Kalpha inhibitor NVP-BYL719 and development of the patient stratification strategy for clinical trials. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(5):1117-29.

199. Hyman DM, Tran B, Paz-Ares L, Machiels J-P, Schellens JH, Bedard PL, et al. Combined PIK3CA and FGFR Inhibition With Alpelisib and Infigratinib in Patients With PIK3CA-Mutant Solid Tumors, With or Without FGFR Alterations. *J Clin Oncol Precis Oncol*. published online October 16, 2019.
200. Nakanishi Y, Akiyama N, Tsukaguchi T, Fujii T, Sakata K, Sase H, et al. The fibroblast growth factor receptor genetic status as a potential predictor of the sensitivity to CH5183284/Debio 1347, a novel selective FGFR inhibitor. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(11):2547-58.
201. Perera TPS, Jovcheva E, Mevellec L, Vialard J, De Lange D, Verhulst T, et al. Discovery and Pharmacological Characterization of JNJ-42756493 (Erdafitinib), a Functionally Selective Small-Molecule FGFR Family Inhibitor. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(6):1010-20.
202. Kalyukina M, Yosaatmadja Y, Middleditch MJ, Patterson AV, Smaill JB, Squire CJ. TAS-120 Cancer Target Binding: Defining Reactivity and Revealing the First Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) Irreversible Structure. *ChemMedChem*. 2019;14(4):494-500.
203. Brameld KA, Owens TD, Verner E, Venetsanakos E, Bradshaw JM, Phan VT, et al. Discovery of the Irreversible Covalent FGFR Inhibitor 8-(3-(4-Acryloylpiperazin-1-yl)propyl)-6-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxyphenyl)-2-(methylamino)pyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-one (PRN1371) for the Treatment of Solid Tumors. *J Med Chem*. 2017;60(15):6516-27.
204. Weiss A, Adler F, Buhles A, Stamm C, Fairhurst RA, Kiffe M, et al. FGF401, A First-In-Class Highly Selective and Potent FGFR4 Inhibitor for the Treatment of FGF19-Driven Hepatocellular Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2019;18(12):2194-206.
205. Grunewald S, Politz O, Bender S, Heroult M, Lustig K, Thuss U, et al. Rogaratinib: A potent and selective pan-FGFR inhibitor with broad antitumor activity in FGFR-overexpressing preclinical cancer models. *Int J Cancer*. 2019.
206. Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. 2012;15(2):171-85.

207. Falcon BL, Chintharlapalli S, Uhlik MT, Pytowski B. Antagonist antibodies to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) as anti-angiogenic agents. *Pharmacol Ther.* 2016;164:204-25.
208. Cheng DT, Mitchell TN, Zehir A, Shah RH, Benayed R, Syed A, et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology. *J Mol Diagn.* 2015;17(3):251-64.
209. Turner NC, Liu Y, Zhu Z, Loi S, Colleoni M, Loibl S, et al. Cyclin E1 Expression and Palbociclib Efficacy in Previously Treated Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2019;37(14):1169-78.
210. Wei Q, Ye Z, Zhong X, Li L, Wang C, Myers RE, et al. Multiregion whole-exome sequencing of matched primary and metastatic tumors revealed genomic heterogeneity and suggested polyclonal seeding in colorectal cancer metastasis. *Ann Oncol.* 2017;28(9):2135-41.
211. Byron SA, Van Keuren-Jensen KR, Engelthaler DM, Carpten JD, Craig DW. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. *Nat Rev Genet.* 2016;17(5):257-71.
212. Engelhardt A, Shen YM, Mansmann U. Constructing an ROC Curve to Assess a Treatment-Predictive Continuous Biomarker. *Stud Health Technol Inform.* 2016;228:745-9.
213. Pal SK, Rosenberg JE, Hoffman-Censits JH, Berger R, Quinn DI, Galsky MD, et al. Efficacy of BGJ398, a Fibroblast Growth Factor Receptor 1-3 Inhibitor, in Patients with Previously Treated Advanced Urothelial Carcinoma with FGFR3 Alterations. *Cancer Discov.* 2018.
214. Gessi M, Abdel Moneim Y, Hammes J, Waha A, Pietsch T. FGFR1 N546K mutation in a case of papillary glioneuronal tumor (PGNT). *Acta Neuropathol.* 2014;127(6):935-6.
215. Burke JE, Perisic O, Masson GR, Vadas O, Williams RL. Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110alpha (PIK3CA). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(38):15259-64.

216. Rudd ML, Price JC, Fogoros S, Godwin AK, Sgroi DC, Merino MJ, et al. A unique spectrum of somatic PIK3CA (p110alpha) mutations within primary endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2011;17(6):1331-40.
217. Han SY, Kato H, Kato S, Suzuki T, Shibata H, Ishii S, et al. Functional evaluation of PTEN missense mutations using in vitro phosphoinositide phosphatase assay. *Cancer Res.* 2000;60(12):3147-51.
218. Stolze B, Reinhart S, Bullinger L, Frohling S, Scholl C. Comparative analysis of KRAS codon 12, 13, 18, 61, and 117 mutations using human MCF10A isogenic cell lines. *Sci Rep.* 2015;5:8535.
219. Yuan W, Stawiski E, Janakiraman V, Chan E, Durinck S, Edgar KA, et al. Conditional activation of Pik3ca(H1047R) in a knock-in mouse model promotes mammary tumorigenesis and emergence of mutations. *Oncogene.* 2013;32(3):318-26.
220. Zheng G, Tseng LH, Chen G, Haley L, Illei P, Gocke CD, et al. Clinical detection and categorization of uncommon and concomitant mutations involving BRAF. *BMC Cancer.* 2015;15:779.
221. Hierro C, Sánchez-Guixé M, Jiménez J, Garralda E, Saura C, Nuciforo P, et al. FGFR1-4 high mRNA expression (mRNA_h) as predictive biomarker for FGFR inhibitors in breast cancer (BC). *Annals of Oncology* (2020) 31 (suppl_1): S13-S15 (DOI 101016/annonc/annonc83).
222. Kwak Y, Cho H, Hur W, Sim T. Antitumor Effects and Mechanisms of AZD4547 on FGFR2-Deregulated Endometrial Cancer Cells. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(10):2292-302.
223. Dasanu CA, Iskandar AS, Hwang A, Kerr WT, Farrell S, Grover M, et al. Management and clinical outcomes in uterine malignant mixed Mullerian tumor: Lessons from a single-institution series. *J Oncol Pharm Pract.* 2020;26(3):688-91.
224. Rose PG, Maxson JH, Fusco N, Mossbrugger K, Rodriguez M. Liposomal doxorubicin in ovarian, peritoneal, and tubal carcinoma: a retrospective comparative study of single-agent dosages. *Gynecol Oncol.* 2001;82(2):323-8.
225. Zhang Q, Liu A, Wu JJ, Niu M, Zhao Y, Tian SF, et al. Primary malignant mixed Mullerian tumors of the fallopian tube with cervix

- metastasis: A rare case report and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(28):e11311.
226. Wang C, Liu R, Huang F, Wei H, Yu L. Rare primary malignant mixed Mullerian tumor of the mediastinum: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(42):e12903.
227. Byron SA, Gartside MG, Wellens CL, Goodfellow PJ, Birrer MJ, Campbell IG, et al. FGFR2 mutations are rare across histologic subtypes of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2010;117(1):125-9.
228. Gallo LH, Nelson KN, Meyer AN, Donoghue DJ. Functions of Fibroblast Growth Factor Receptors in cancer defined by novel translocations and mutations. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(4):425-49.
229. Sabapathy K, Lane DP. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(1):13-30.
230. Ebbesen SH, Scaltriti M, Bialucha CU, Morse N, Kasthuber ER, Wen HY, et al. Pten loss promotes MAPK pathway dependency in HER2/neu breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(11):3030-5.
231. von Loga K, Woolston A, Punta M, Barber LJ, Griffiths B, Semiannikova M, et al. Extreme intratumour heterogeneity and driver evolution in mismatch repair deficient gastro-oesophageal cancer. *Nat Commun*. 2020;11(1):139.
232. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med*. 2010;362(14):1273-81.
233. Lamarca A, Palmer DH, Wasan HS, Ross PJ, Ma YT, Arora A, et al. ABC-06 | A randomised phase III, multi-centre, open-label study of active symptom control (ASC) alone or ASC with oxaliplatin / 5-FU chemotherapy (ASC+mFOLFOX) for patients (pts) with locally advanced / metastatic biliary tract cancers (ABC) previously-treated with cisplatin/gemcitabine (CisGem) chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 37, no 15_suppl (May 20, 2019) 4003-4003DOI: 101200/JCO20193715_suppl4003.

234. Li F, Peiris MN, Donoghue DJ. Functions of FGFR2 corrupted by translocations in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020;52:56-67.
235. Wu YM, Su F, Kalyana-Sundaram S, Khazanov N, Ateeq B, Cao X, et al. Identification of targetable FGFR gene fusions in diverse cancers. *Cancer Discov.* 2013;3(6):636-47.
236. Jain A, Borad MJ, Kelley RK, Wang Y, Abdel-Wahab R, Meric-Bernstam F, et al. Cholangiocarcinoma With FGFR Genetic Aberrations: A Unique Clinical Phenotype. *JCO Precision Oncology* - published online January 17, 2018 DOI: 101200/PO1700080.
237. Farshidfar F, Zheng S, Gingras MC, Newton Y, Shih J, Robertson AG, et al. Integrative Genomic Analysis of Cholangiocarcinoma Identifies Distinct IDH-Mutant Molecular Profiles. *Cell Rep.* 2017;18(11):2780-94.
238. Wang CY, Lai MD, Phan NN, Sun Z, Lin YC. Meta-Analysis of Public Microarray Datasets Reveals Voltage-Gated Calcium Gene Signatures in Clinical Cancer Patients. *PLoS One.* 2015;10(7):e0125766.
239. Qiao Z, Jiang Y, Wang L, Wang L, Jiang J, Zhang J. Mutations in KIAA1109, CACNA1C, BSN, AKAP13, CELSR2, and HELZ2 Are Associated With the Prognosis in Endometrial Cancer. *Front Genet.* 2019;10:909.
240. Li HJ, Sun QM, Liu LZ, Zhang J, Huang J, Wang CH, et al. High expression of IL-9R promotes the progression of human hepatocellular carcinoma and indicates a poor clinical outcome. *Oncol Rep.* 2015;34(2):795-802.
241. Stramucci L, Pranteda A, Stravato A, Amoreo CA, Pennetti A, Diodoro MG, et al. MKK3 sustains cell proliferation and survival through p38DELTA MAPK activation in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2019;10(11):842.
242. Baldari S, Ubertini V, Garufi A, D'Orazi G, Bossi G. Targeting MKK3 as a novel anticancer strategy: molecular mechanisms and therapeutical implications. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1621.
243. Jia M, Souchelnytskyi N, Hellman U, O'Hare M, Jat PS, Souchelnytskyi S. Proteome profiling of immortalization-to-senescence

- transition of human breast epithelial cells identified MAP2K3 as a senescence-promoting protein which is downregulated in human breast cancer. *Proteomics Clin Appl*. 2010;4(10-11):816-28.
244. Stramucci L, Pranteda A, Bossi G. Insights of Crosstalk between p53 Protein and the MKK3/MKK6/p38 MAPK Signaling Pathway in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018;10(5).
245. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol*. 2007;25(13):1670-6.
246. Montagnani F, Chiriatti A, Turrisi G, Francini G, Fiorentini G. A systematic review of FOLFOXIRI chemotherapy for the first-line treatment of metastatic colorectal cancer: improved efficacy at the cost of increased toxicity. *Colorectal Dis*. 2011;13(8):846-52.
247. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*. 2016;13(1):120-35.
248. Scarpa M, Castagliuolo I, Castoro C, Pozza A, Scarpa M, Kotsafti A, et al. Inflammatory colonic carcinogenesis: a review on pathogenesis and immunosurveillance mechanisms in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(22):6774-85.
249. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7.
250. Nakayama M, Oshima M. Mutant p53 in colon cancer. *J Mol Cell Biol*. 2019;11(4):267-76.
251. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2014;371(17):1609-18.
252. Packer LM, Geng X, Bonazzi VF, Ju RJ, Mahon CE, Cummings MC, et al. PI3K Inhibitors Synergize with FGFR Inhibitors to Enhance Antitumor Responses in FGFR2(mutant) Endometrial Cancers. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(4):637-48.

253. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(9):809-19.
254. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med.* 2014;371(20):1877-88.
255. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay JY, et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med.* 2015;373(8):726-36.
256. Hyman DM, Piha-Paul SA, Won H, Rodon J, Saura C, Shapiro GI, et al. HER kinase inhibition in patients with HER2- and HER3-mutant cancers. *Nature.* 2018;554(7691):189-94.
257. Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet.* 2012;13(10):679-92.
258. Brana I, Massard C, Baird RD, Opdam F, Schlenk RF, De 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. 101200/JCO20193715_supplTPS3151 *Journal of Clinical Oncology* 37, no 15_suppl.
259. Damaso CR. Revisiting Jenner's mysteries, the role of the Beaugency lymph in the evolutionary path of ancient smallpox vaccines. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(2):e55-e63.
260. Subbiah IM, Subbiah V. Exceptional responders: in search of the science behind the miracle cancer cures. *Future Oncol.* 2015;11(1):1-4.
261. Iyer G, Hanrahan AJ, Milowsky MI, Al-Ahmadie H, Scott SN, Janakiraman M, et al. Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. *Science.* 2012;338(6104):221.
262. Tsimberidou AM, Said R, Staudt LM, Conley BA, Takebe N. Defining, Identifying, and Understanding "Exceptional Responders" in Oncology Using the Tools of Precision Medicine. *Cancer J.* 2019;25(4):296-9.
263. Printz C. NCI launches exceptional responders initiative: researchers will attempt to identify why some patients respond to treatment so much better than others. *Cancer.* 2015;121(6):803-4.

264. Nishikawa G, Luo J, Prasad V. A comprehensive review of exceptional responders to anticancer drugs in the biomedical literature. *Eur J Cancer*. 2018;101:143-51.
265. Meric-Bernstam F, Farhangfar C, Mendelsohn J, Mills GB. Building a personalized medicine infrastructure at a major cancer center. *J Clin Oncol*. 2013;31(15):1849-57.
266. Kurnit KC, Dumbrava EEI, Litzenburger B, Khotskaya YB, Johnson AM, Yap TA, et al. Precision Oncology Decision Support: Current Approaches and Strategies for the Future. *Clin Cancer Res*. 2018;24(12):2719-31.
267. Duma N, Kothadia SM, Azam TU, Yadav S, Paludo J, Vera Aguilera J, et al. Characterization of Comorbidities Limiting the Recruitment of Patients in Early Phase Clinical Trials. *Oncologist*. 2019;24(1):96-102.
268. El-Osta H, Hong D, Wheeler J, Fu S, Naing A, Falchook G, et al. Outcomes of research biopsies in phase I clinical trials: the MD anderson cancer center experience. *Oncologist*. 2011;16(9):1292-8.
269. Hernandez MC, Bergquist JR, Leiting JL, Ivanics T, Yang L, Smoot RL, et al. Patient-Derived Xenografts Can Be Reliably Generated from Patient Clinical Biopsy Specimens. *J Gastrointest Surg*. 2019;23(4):818-24.
270. Schuler M, Cho BC, Sayehli CM, Navarro A, Soo RA, Richly H, et al. Rogaratinib in patients with advanced cancers selected by FGFR mRNA expression: a phase 1 dose-escalation and dose-expansion study. *Lancet Oncol*. 2019;20(10):1454-66.
271. Bauer K, Berger D, Zielinski CC, Valent P, Grunt TW. Hitting two oncogenic machineries in cancer cells: cooperative effects of the multi-kinase inhibitor ponatinib and the BET bromodomain blockers JQ1 or dBET1 on human carcinoma cells. *Oncotarget*. 2018;9(41):26491-506.
272. Ross DS, Liu B, Schram AM, Razavi P, Lagana SM, Zhang Y, et al. Enrichment of Kinase Fusions in ESR1 Wild Type, Metastatic Breast Cancer Revealed by a Systematic Analysis of 4,854 Patients. *Ann Oncol*. 2020.
273. Turner NC, Krop IE, Bardia A, Damodaran S, Martin M, Benhadji KA, et al. Abstract OT2-07-01: A phase 2 study of futibatinib (TAS-120) in metastatic breast cancers harboring fibroblast growth factor receptor (FGFR)

amplifications (FOENIX-MBC2). *Cancer Res* 2020;80(4 Suppl):Abstract nr OT2-07-01DOI: 101158/1538-7445.

274. Guffanti F, Chila R, Bello E, Zucchetti M, Zangarini M, Ceriani L, et al. In Vitro and In Vivo Activity of Lucitanib in FGFR1/2 Amplified or Mutated Cancer Models. *Neoplasia*. 2017;19(1):35-42.

275. Hui R, Pearson A, Cortes J, Campbell C, Poirot C, Azim HA, Jr., et al. Lucitanib for the Treatment of HR(+)/HER2(-) Metastatic Breast Cancer: Results from the Multicohort Phase II FINESSE Study. *Clin Cancer Res*. 2020;26(2):354-63.

276. Groisberg R, Hong DS, Roszik J, Janku F, Tsimberidou AM, Javle M, et al. Clinical Next-Generation Sequencing for Precision Oncology in Rare Cancers. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(7):1595-601.

277. Vale-Fernandes E, Rodrigues F, Serrano P, Silva AI. Primary malignant mixed Mullerian tumour of the fallopian tube: a rare and difficult but possible diagnosis. *BMJ Case Rep*. 2015;2015.

278. Juric D, Baselga J, Janku F, Wheler JJ, Westin SN, Moulder SL, et al. Tumor genetic testing for patient selection in phase I clinical trials: the case of PI3K inhibitors

PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(8):765-6.

279. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-21.

280. 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.

281. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2014;371(23):2189-99.

282. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol.* 2019;30(1):44-56.
283. Bhangoo MS, Boasberg P, Mehta P, Elvin JA, Ali SM, Wu W, et al. Tumor Mutational Burden Guides Therapy in a Treatment Refractory POLE-Mutant Uterine Carcinosarcoma. *Oncologist.* 2018;23(5):518-23.
284. Hacking S, Chavarria H, Jin C, Perry A, Nasim M. Landscape of Immune Checkpoint Inhibition in Carcinosarcoma (MMMT): Analysis of IDO-1, PD-L1 and PD-1. *Pathol Res Pract.* 2020;216(4):152847.
285. Ruzzenente A, Fassan M, Conci S, Simbolo M, Lawlor RT, Pedrazzani C, et al. Cholangiocarcinoma Heterogeneity Revealed by Multigene Mutational Profiling: Clinical and Prognostic Relevance in Surgically Resected Patients. *Ann Surg Oncol.* 2016;23(5):1699-707.
286. Lowery MA, Ptashkin R, Jordan E, Berger MF, Zehir A, Capanu M, et al. Comprehensive Molecular Profiling of Intrahepatic and Extrahepatic Cholangiocarcinomas: Potential Targets for Intervention. *Clin Cancer Res.* 2018;24(17):4154-61.
287. Krook MA, Bonneville R, Chen HZ, Reeser JW, Wing MR, Martin DM, et al. Tumor heterogeneity and acquired drug resistance in FGFR2-fusion-positive cholangiocarcinoma through rapid research autopsy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2019;5(4).
288. Lamarca A, Barriuso J, McNamara MG, Valle JW. Molecular targeted therapies: ready for "prime time" in biliary tract cancer. *J Hepatol.* 2020.
289. Krook MA, Lenyo A, Wilberding M, Barker H, Dantuono M, Bailey KM, et al. Efficacy of FGFR Inhibitors and Combination Therapies for Acquired Resistance in FGFR2-Fusion Cholangiocarcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2020;19(3):847-57.
290. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2335-42.
291. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-

- line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 2008;26(12):2013-9.
292. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2013;381(9863):303-12.
293. Nagasaka M, Li Y, Sukari A, Ou SI, Al-Hallak MN, Azmi AS. KRAS G12C Game of Thrones, which direct KRAS inhibitor will claim the iron throne? *Cancer Treat Rev.* 2020;84:101974.
294. Klempner SJ, Hata AN. Can the Help Match the Hype? KRAS(G12C)-Specific Inhibitors and Beyond. *Cancer Discov.* 2020;10(1):20-2.
295. Formisano L, Lu Y, Servetto A, Hanker AB, Jansen VM, Bauer JA, et al. Aberrant FGFR signaling mediates resistance to CDK4/6 inhibitors in ER+ breast cancer. *Nat Commun.* 2019;10(1):1373.
296. Miron B, Peled N, Barbash Z, Edelheit O, Vidne M, Sharivkin R, et al. Functional characterization of mutations and their interaction using the novel functional annotation for cancer treatment (FACT) platform. *Ann Oncol.* 2016;27(suppl 6):1168P.

12. ANEXOS

12.1. Anexo 1: Relación de ensayos con FGFRinh monoterapia en tumores sólidos.

(Acceso a *Clinicaltrials.gov* a fecha de 25/05/2020).

1) *Lung-MAP: AZD4547 as second-line therapy in treating FGFR positive patients with recurrent stage IV squamous cell lung cancer.*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT02965378>. FGFRinh: AZD4547.

2) *National Lung Matrix Trial: Multi-drug Phase II Trial in Non-Small Cell Lung Cancer.*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT02664935>. FGFRinh: AZD4547.

3) *Treatment With AZD4547 for Recurrent Malignant Glioma Expressing FGFR-TACC Gene Fusion" (TARGET).*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT02824133>. FGFRinh: AZD4547.

4) *Targeted Therapy Directed by Genetic Testing in Treating Patients With Advanced Refractory Solid Tumors, Lymphomas, or Multiple Myeloma (The MATCH Screening Trial).*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT02465060>. FGFRinh: AZD4547 o erdafitinib.

5) *FGFR inhibitor in FGFR Dysregulated Cancer (FIND).*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT03827850>. DRUG: Erdafitinib.

6) *A Study of Erdafitinib Compared With Vinflunine or Docetaxel or Pembrolizumab in Participants With Advanced Urothelial Cancer and Selected Fibroblast Growth Factor Receptore (FGFR) Gene Aberrations.*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT03390504>. FGFRinh: Erdafitinib.

7) *A Study to Evaluate the Clinical Efficacy of JNJ-42756493 (Erdafitinib), A Pan-Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Tyrosine Kinase Inhibitor In Asian Participants With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer, Urothelial Cancer, Esophageal Cancer Or Cholangiocarcinoma.*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT02699606>. FGFRinh: Erdafitinib.

8) *Study to Evaluate the Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of JNJ-42756493 (Erdafitinib) in Participants With Advanced Hepatocellular Carcinoma.*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT02421185>. FGFRinh: Erdafitinib.

9) *Basket Trial in Solid Tumors Harboring a Fusion of FGFR1, FGFR2 or FGFR3 (FUZE Clinical Trial).*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT03834220>. FGFRinh: Debio1347.

10) *A Study of Pemigatinib in Non-muscle Invasive Bladder Cancer Patients With Recurrent Low- or Intermediate-Risk Tumors.*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT03914794>. FGFRinh: Pemigatinib.

11) *Safety and Efficacy of Pemigatinib in Patients With High-risk Urothelial Cancer After Radical Surgery (PEGASUS).*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT04294277>. FGFRinh: Pemigatinib.

12) *Efficacy and Safety of Pemigatinib in Participants With Solid Tumors With FGFR Mutations or Translocations (FIGHT-208).*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT04003623>. FGFRinh: Pemigatinib.

13) *Efficacy and Safety of Pemigatinib in Previously Treated Locally Advanced/Metastatic or Surgically Unresectable Solid Tumor Malignancies Harboring Activating FGFR Mutations or Translocations (FIGHT-207).*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT03822117>. FGFRinh: Pemigatinib.

14) *A Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Pemigatinib Versus Chemotherapy in Unresectable or Metastatic Cholangiocarcinoma - (FIGHT-302).*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT03656536>. FGFRinh: Pemigatinib.

15) *Dose Escalation Pan-FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) Inhibitor (Rogaratinib).*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT01976741>. FGFRinh: Rogaratinib.

16) *Rogaratinib in Patients With Advanced Pretreated Squamous-cell Non-small Cell Lung Cancer (SQCLC).*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT03762122>. FGFRinh: Rogaratinib.

17) *Roll-over Study to Continue Treatment With the Investigational Drug Rogaratinib and to Further Test Its Safety.*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT04125693>. FGFRinh: Rogaratinib.

18) *Futibatinib Vs Gemcitabine-Cisplatin Chemotherapy as 1st-Line Treatment of Patients With Advanced Cholangiocarcinoma (CCA) Harboring FGFR2 Gene Rearrangements (FOENIX-CCA3).*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT04093362>. FGFRinh: Futibatinib.

19) *A Study of TAS-120 in Patients With Metastatic Breast Cancer.*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT04024436>. FGFRinh: Futibatinib.

20) *Study of Oral Infigratinib for the Adjuvant Treatment of Subjects With Invasive Urothelial Carcinoma With Susceptible FGFR3 Genetic Alterations.*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT04197986>. FGFRinh: Infigratinib.

21) *Infigratinib Before Surgery for the Treatment of Upper Tract Urothelial Cancer.*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT04228042>. FGFRinh: Infigratinib.

22) *Phase 3 Study of BGJ398 (Oral Infigratinib) in First Line Cholangiocarcinoma With FGFR2 Gene Fusions/Translocations.*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT03773302>. FGFRinh: Infigratinib.

23) *A Dose Escalation Study in Solid Tumors and a Dose Expansion Study of PRN1371 in Adult Patients With Metastatic Urothelial Carcinoma.*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT02608125>. FGFRinh: PRN1371.

24) *FGF401 in HCC and Solid Tumors Characterized by Positive FGFR4 and KLB Expression.*

URL: <https://clinicaltrials.gov/NCT02325739>. FGFRinh: Roblitinib.

12.2. Anexo 2: *VHIO NanoString® fusion panel v.4.0.*

PANEL DE TRANSLOCACIONES		
EML4 E13-ALK E20	CD44 E1-FGFR2 E3	EIF3E E5-RSPO2 E1
EML4 E20-ALK E20	SLC45A3 E1-FGFR2 E2	EIF3E E5-RSPO2 E2
EML4 E6-ALK E20	FGFR3 E17-AES E2	PTPRK E13-RSPO3 E2
AKAP9 E8-BRAF E9	FGFR3 E17-ELAVL3 E2	PTPRK E1-RSPO3 E2
KIAA1549 E15-BRAF E9	FGFR3 E17-LETM1 intron10	PTPRK E2-RSPO3 E2
KIAA1549 E14-BRAF E9	FGFR3 E17 intron-TACC3 E4	PTPRK E6-RSPO3 E2
KIAA1549 E15-BRAF E11	FGFR3 E17-BAIAP2L1 E2	PTPRK E7-RSPO3 E2
BAG4 E2-FGFR1 E6	FGFR3 E17-TACC3 E4	NAV2 E1-TCF7L1 E4
ERLIN2 E10-FGFR1 E4	FGFR3 E17-TACC3 E8	NAV2 E3-TCF7L1 E4
FGFR1 E17-TACC1 E7	FGFR3 E17-TACC3 E10	VTI1A E2-TCF7L2 E4
FGFR2 E17-AFF3 E8	FGFR3 E17-TACC3 E11	VTI1A E2-TCF7L2 E5
FGFR2 E17-AHCYL1 E2	RANBP17 E28-FGFR3 E1	VTI1A E2-TCF7L2 E6
FGFR2 E17-ATE1 E12	EGFR vIII (E1-E8)	VTI1A E3-TCF7L2 E4
FGFR2 E17-BICC1 E3	MET E13-E15	VTI1A E3-TCF7L2 E5
FGFR2 E17-CASP7 E4	LMNA E2- NTRK1 E10	VTI1A E3-TCF7L2 E6
FGFR2 E17-CCDC147 E2	LMNA E2- NTRK1 E11	VTI1A E4-TCF7L2 E4
FGFR2 E17-CIT E23	LMNA E10- NTRK1 E12	VTI1A E4-TCF7L2 E5
FGFR2 E17-FAM76A E2	LMNA E10- NTRK1 E13	VTI1A E4-TCF7L2 E6
FGFR2 E17-GAB2 E2	TPM3 E7-NTRK1 E10	CCDC6 E1-RET E12
FGFR2 E17-KIAA1967 E5	TPR E21-NTRK1 E10	KIF5B E15-RET E12
FGFR2 E17-MCU E2	ETV6 E5-NTRK3 E15	KIF5B E16-RET E12
FGFR2 E17-OFD1 E3	ETV6 E4-NTRK3 E15	KIF5B E22-RET E12
FGFR2 E17-VCL E15	PAX8 E8-PPARG E2	NCOA4 E8-RET E12
FGFR2 E2-WDR11 E20	PAX8 E9-PPARG E2	PRKAR1A E7-RET E12
FGFR2 E16-KIAA1598 E7	PAX8 E10-PPARG E2	CD74 E6-ROS1 E34
FGFR2 E16-TACC3 E11	EIF3E E1-RSPO2 E1	EZR E10-ROS1 E34
FGFR2 E17-NOL4 E7	EIF3E E1-RSPO2 E2	SLC34A2 E4-ROS1 E32
PANEL DE EXPRESIÓN GÉNICA		
EGFR	ERBB2	ERBB3
ERBB4	ESR1	FGF3
FGF4	FGF19	FGFR1
FGFR2	FGFR3	FGFR4
IRS2	MET	NOTCH1
NOTCH2	NOTCH3	NOTCH4
NTRK1	NTRK2	NTRK3
PDGFRA	RSPO1	RSPO2
RSPO3	RSPO4	

12.3. Anexo 3: *VHIO AmpliconSeq panel v.3.0.*

PANEL DE MUTACIONES		
ABL1	FLT3	NOTCH1
AKT1	GATA1	NOTCH4
AKT2	GNA11	NRAS
AKT3	GNAQ	PDGFRA
ALK	GNAS	PIK3CA
APC	HRAS	PIK3R1
BRAF	IDH1	PIK3R5
CDH1	IDH2	PTEN
CDKN2A	JAK1	RB1
CSF1R	JAK3	RET
CTNNB1	KIT	RUNX1
EGFR	KRAS	SMAD4
ERBB2	MAG	SMARCB1
ERBB3	MAP2K1	SRC
ESR1	MET	STK11
FBXW7	MLH1	TP53
FGFR1	MPL	VHL
FGFR2	MSH6	RNF43
FGFR3	MYC	ZNRF3
FGFR4	NF2	

Características de la secuenciación molecular <i>VHIO-AmpliconSeq</i> de los genes FGFR		
Gen	RefSeq	Residuos interrogados (amplicons)
FGFR1	NM_023110.2	A100-S115
		P123-D132
		E126-N143
		R250-A263
		P469-S477
FGFR2	NM_000141.4	R251-L262
		P303-K313
		P363-F387
		K543-T555
		L576-P594
		N653-N662
FGFR3	NM_000142.4	R248-A261
		E362-v393
		V390-S408
		Y648-N653
		N690-E702
		H791-S801
FGFR4	NM_002011	S123-D135

12.4. Anexo 4: *VHIO NanoString® copy number panel v.2.0.*

PANEL DE VARIACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS		
AKT2	FGFR1	NOTCH3
AKT3	FGFR2	NOTCH4
APC	FGFR3	NTRK1
AT	FGFR4	NTRK2
BRCA1	IGFR1	NTRK3
CCND1	INPP4B	PDGFRA
CCND2	KDR	PIK3CA
CCNE1	KIT	PIK3CB
CDK4	KRAS	PIK3R1
CDK6	MAP2K4	PRKCI
CDKN1A	MAP3K5	PTEN
CDKN2A	MAPK7	RSPO2
CDKN2C	MDM2	SHH
EGFR	MDM4	STK11
ERBB2	MEN1	TERT
ESR1	MET	TP53
FBXW7	MYC	TSC1
FGF19	NF1	VEGFA
FGF4	NOTCH1	VHL
FGF3	NOTCH2	

12.5. Anexo 5: Esquema de la tecnología *FACTTM* (NovellusDx©) (296).

Cada vez existe una mayor evidencia de que los datos de NGS obtenidos del análisis de muestras de pacientes son por sí solas insuficientes, pues es necesario obtener una visión más detallada de los mecanismos que promueven la carcinogénesis en dichos tumores con tal de respaldar mejor las decisiones terapéuticas. En este contexto, la correcta comprensión funcional de los datos de NGS podría identificar precozmente la resistencia a ciertos medicamentos, permitiendo plantear opciones de tratamiento alternativas.

La tecnología *Functional Annotation for Cancer Treatment (FACTTM)*, se ha desarrollado precisamente como una plataforma funcional para el análisis mutacional, que permite discernir aquellas vías de señalización intracelular que están activadas, bien por mutaciones oncogénicas ya conocidas y descritas, así como VSI sin todavía evidencia en la literatura, al mismo tiempo que ofrece la posibilidad de evaluar la respuesta a ciertas terapias dirigidas contra estas dianas. La **figura 27** resume esquemáticamente los pasos implicados en el ensayo celular funcional en el que se basa esta tecnología *FACTTM*.

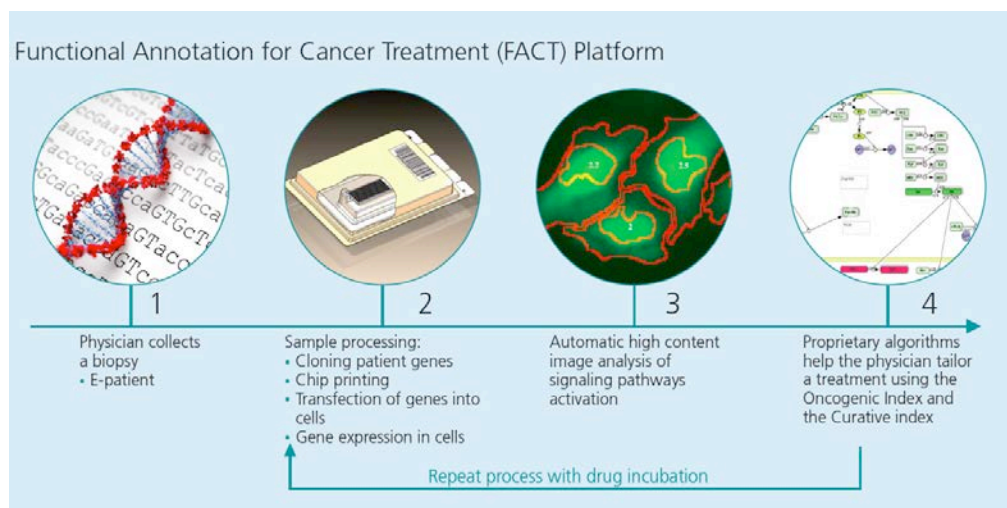


Figura 27. Implementación de la plataforma funcional *FACTTM*. 1. Obtención del informe NGS de una muestra tumoral del paciente; 2. Transfección y expresión génica en células vivas de cáncer de cérvix HeLa de las variantes génicas clonadas con sus correspondientes marcadores fluorescentes, según la vía de señalización intracelular a estudio; 3. Fijación y tinción DAPI, previo escaneado con microscopio fluorescente; 4. Análisis bioinformático mediante un software específico, para correlacionar un algoritmo de cuantificación de fluorescencia nuclear con la activación de la vía de señalización inducida por cada mutación a estudio.

A día de hoy, la tecnología *FACTTM* permite evaluar funcionalmente las mutaciones somáticas de algunos de los principales oncogenes descritos en cáncer, como los genes de la familia *HER* –*EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*-, *cKIT*, *FGFR1/2*, *MET*, *JAK1*, así como de la vía de las MAPKs –*RAS*, *BRAF*, *MEK1/2*- o de la vía de *PIK3CA* –*AKT1/2*, *PTEN*- (**figura 28**).

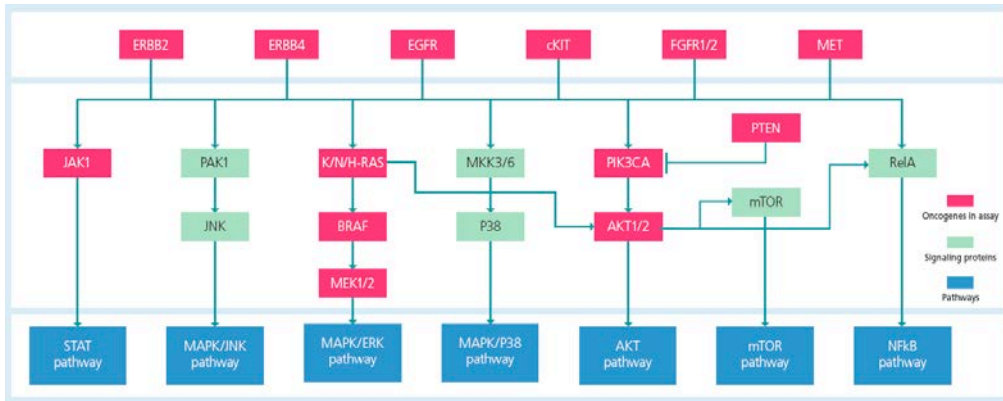


Figura 28. Diagrama simplificado de las principales vías de señalización intracelular analizadas mediante *FACTTM*. Las mutaciones de algunos de los principales oncogenes alterados en cánceres humanos (**rojo**) pueden ser evaluados mediante la tecnología *FACTTM*. Según la vía de señalización de interés, se escoge un marcador u otro al que se añade una sonda fluorescente (**verde**), que suele ser una proteína constituyente de dicha vía intracelular.

Por ejemplo, en el caso de activación de la señalización de la vía MAPKs secundaria a una mutación oncogénica del gen *KRAS*, deberíamos objetivar un incremento de la fluorescencia nuclear de la proteína *ERK2* (**figura 29**).

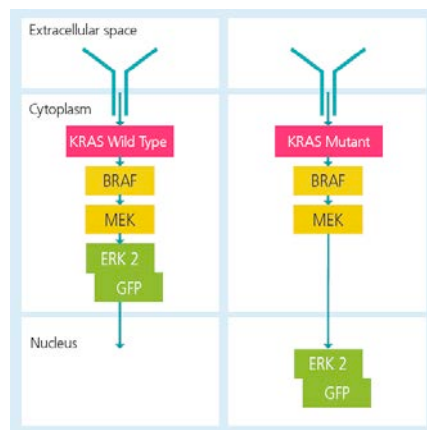


Figura 29. Análisis *FACTTM* de un tumor portador de una mutación somática en el gen *KRAS*. En condiciones basales, un tumor *KRAS wild-type* (WT) no presenta activación de la vía MAPKs (RAS/RAF/MEK/ERK), por lo que al realizar un análisis *FACTTM*, no se detectaría fluorescencia nuclear del marcador ERK2-GFP. En cambio, si al evaluar una variante de significado incierto (VSI) de una mutación en el gen *KRAS*, detectamos que hay un incremento de la presencia de ERK2-GFP nuclear, esto traduce una translocación desde el citosol celular en el contexto de activación de la señalización, y por lo tanto, confiere valor oncogénico a dicha *KRAS* VSI.

12.6. Anexo 6: Hoja informativa *VHIO* de consentimiento informado del Proyecto 360° *RESISTANCE*.

HOJA INFORMATIVA PARA EL PROYECTO: "360° *RESISTANCE*: APLICACIÓN DE UN MODELO TRASLACIONAL PARA ESTUDIAR LA EFICACIA, LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA Y LA HETEROGENEIDAD TUMORAL EN PACIENTES TRATADOS CON FARMACOS DIRIGIDOS A DIANAS MOLECULARES"

Proyecto de investigación titulado: "360° *RESISTANCE*: Aplicación de un modelo traslacional para estudiar la eficacia, los mecanismos de resistencia y la heterogeneidad tumoral en pacientes tratados con fármacos dirigidos a dianas moleculares"

Investigador Principal: Dra. Elena Garralda Cabanas

Sub-investigadores: Dr. Josep Taberero Caturla y Dra. Cinta Hierro Carbó

Servicio: Oncología Medica.

Objetivos:

Le solicitamos su participación en este proyecto cuya finalidad es la investigación de las alteraciones moleculares del cáncer, su posible implicación pronóstica y su impacto en la respuesta/resistencia a diferentes tratamientos oncológicos.

Justificación:

Usted va a ser tratado con un tratamiento dirigido a una diana molecular en base a una alteración que se ha observado en su tumor. Este tratamiento que su médico le explicará ha sido guiado por el resultado de un análisis molecular. Su médico cree que este tratamiento puede ser adecuado para usted porque usted tiene un cáncer avanzado y los resultados del análisis molecular de los tejidos mostraron una alteración identificada que potencialmente podrían beneficiarse de tratamientos dirigidos. Los medicamentos que se podrán utilizarse serán terapias dirigidas que son utilizadas habitualmente como referencia en este centro o terapias dirigidas que estén actualmente evaluándose en ensayos clínicos en este centro.

Le planteamos la posibilidad de participar en este estudio porque aunque el tratamiento ha sido seleccionado en base a marcadores moleculares en biopsias de tumores, no todos los pacientes cuyo tumor tiene una alteración semejante responden al tratamiento. Mediante este estudio quisiéramos estudiar los mecanismos preexistentes de resistencia al tratamiento (resistencia primaria) o su aparición durante tratamiento (desarrollo de resistencia secundaria), así como la influencia de la heterogeneidad del tumor.

Los investigadores de Vall d'Hebrón consideran que el estudio de estos mecanismos de resistencia, estudiados en algunos pacientes preseleccionados por estar en tratamiento con terapias, es de gran importancia para avanzar en el campo de la terapia dirigida. 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 que se estudiaría esto usando xenoinjertos y/o cultivos primarios de las células derivados de la muestra tumoral, análisis de células y ADN tumoral presente en sangre y secuenciación del ADN de última generación del ADN tumoral en sangre y de tejidos tumorales (incluyendo, si disponibles, muestras de autopsia) u otras muestras biológicas (heces, saliva, orina, pelo, piel). Por eso le pedimos su consentimiento para que se pueda recoger muestras de tumor y sangre y otros materiales biológicos (heces, saliva, orina, pelo, piel) durante el tratamiento con un fármaco biológico específico para su tumor 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 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.

El ADN es un elemento que está presente en todas sus células, porque lo ha recibido de sus padres y lleva un código en forma de “genes” que determina sus características físicas personales, como el color de ojos, de piel, etc...

Las diferencias entre unas personas y otras nos pueden ayudar a explicar por qué algunas desarrollan unas enfermedades y otras no. En cáncer, el tumor adquiere alteraciones moleculares que explican su anormal funcionamiento. El conocimiento de estas alteraciones (mutaciones tumorales) es importante para intentar predecir el comportamiento del tumor y determinar el mejor tratamiento.

Las alteraciones moleculares que se estudiarán en este proyecto pueden ser diferentes, tanto pueden ser mutaciones o amplificaciones en genes relacionados con el cáncer, así como alteraciones en la expresión de proteínas, implicadas en la progresión tumoral.

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.

1) Se realizará una biopsia de una lesión metastásica accesible antes de empezar cualquier terapia molecular dirigida y/o de posteriores metástasis en aquellos pacientes tratados en la Unidad de Investigación y Terapia molecular (*UITM*) del Vall d’Hebrón Instituto de Oncología (*VHIO*) y que vayan a ser tratados con un tratamiento dirigido a una diana molecular en base a una alteración que se ha observado en su tumor.

2) Se recogerá una muestra de sangre extra (volumen máximo de 50ml) para evaluar los niveles de células tumorales presentes en su sangre y otra para el ADN tumoral antes de cada vez que su médico reevalúe la eficacia del tratamiento (estadaje de la enfermedad). Esto suele realizarse cada 2-3 meses y suele consistir en un escáner (TAC) o resonancia magnética y un análisis de sangre. Esta muestra se usará para obtener células del sistema inmune, células tumorales, diferentes marcadores de inflamación o ADN tumoral que se puede encontrar en sangre.

- 3) Se podrán recoger otros materiales biológicos (heces, saliva, orina, pelo, piel) para estudios adicionales en diferentes momentos durante el tratamiento con agentes dirigidos: al inicio, en la evaluación de respuesta, si aparición de toxicidad o algún evento interrecurrente, con el objetivo de caracterizar mejor los distintos aspectos que influyen en la respuesta a dichas dianas terapéuticas.
- 4) Se realizará una biopsia tumoral en el momento de la respuesta tumoral en aquellos pacientes tratados con fármacos diana y que se están beneficiando del tratamiento, con el objetivo de caracterizar mejor el tumor 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) Se realizará una biopsia en el momento de la progresión en aquellos pacientes tratados con terapias dirigidas en función del perfil molecular y que se han beneficiado de ellas pero luego esas lesiones dejaron de responder; de este modo se podrá estudiar la resistencia a fármacos y, posiblemente, seleccionar una terapia adicional basada en los resultados del nuevo análisis. La participación en este proyecto no garantiza que usted pueda ser incluido en un protocolo con una terapia dirigida posteriormente a esta segunda biopsia, porque hay situaciones en que no encontramos ninguna alteración molecular que pueda ser diana para dicho tratamiento. Además, en esta situación el equipo médico decidirá, juntamente con el paciente, la posibilidad de inclusión distintos ensayos clínicos disponibles en la unidad.
- 7) En el eventual caso de defunción, se realizara 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.

Biopsia: recogida de células tumorales utilizando un equipo similar a una aguja con una vía o canal. Todas las biopsias incluidas en el protocolo de investigación son procedimientos asistenciales, requeridos según el criterio clínico del investigador a cargo de los pacientes incluidos en los diferentes ensayos.

Uso de las muestras: Parte de la muestra se usara para estudios genéticos del ADN del tumor. Para estos estudios en profundidad se precisa un control interno del/ de la paciente: esta es una de las razones de solicitarle una muestra de sangre. En ella se realizara 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 inmunodeprimidos (xenoinjertos) o cultivadas en placas de plástico (cultivos celulares) con el objetivo de obtener suficiente tumor para realización de estudios posteriores.

Las muestras serán conservadas dentro de la colección *“Identificación de nuevos biomarcadores tumorales de diagnóstico, predictivos de respuesta y resistencia a terapias personalizadas en tumores sólidos”* (numero de colección: C.0003435) cuyo responsable es el Dr. Josep Taberner Caturla que será el último responsable de la custodia de sus muestras. Las muestras se guardarán en su centro hasta el momento del estudio, en condiciones adecuadas para evitar que se deterioren. Las muestras serán codificadas o reversiblemente dissociadas. Esto quiere decir que no irán identificadas con sus datos personales, sino con un código y no será posible relacionarle con ellas. El investigador principal de la colección nº C.0003435, el Dr. Josep Taberner Caturla, guardará ese código, para poder identificarle en caso necesario (por ejemplo, para poder comunicarle información importante, si usted así lo desea). El código no saldrá de este Centro y solamente los médicos que le atienden podrán relacionarle a usted con los resultados de los estudios que se realicen. Su información médica y personal será tratada de forma confidencial y solo tendrán acceso a la misma los miembros del equipo médico que le atienden habitualmente y el personal de base de datos designado a recoger sus datos personales.

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'Hebrón, y en los laboratorio del *VHIO* y del Vall d'Hebrón Instituto de Recerca (*VHIR*). El análisis genómico se realizará tanto en el laboratorio de Genómica del Cáncer (*VHIO*) como en laboratorios externos colaboradores de *VHIO* (como por ejemplo: *Foundation Medicine®* en Cambridge –EEUU-, *Novartis® Next Generation Diagnostics®* (NGDx) lab, MDACC en Houston, -EEUU-...u otros).

Protección de datos personales:

De acuerdo con la Ley 15/1999 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 Dra. Elena Garralda Cabanas, Investigador Principal del Proyecto. por el Hospital Universitario Vall d'Hebrón, o por una institución designada por ella. El acceso a dicha información quedará restringido al personal de base de datos, designado al efecto o a otro personal autorizado que estará obligado a mantener la confidencialidad de la información.

De acuerdo con la ley vigente, tiene usted derecho al acceso de sus datos personales; asimismo, y si está justificado, tiene derecho a su rectificación y cancelación. Si así lo desea, deberá solicitarlo al médico que le atiende en este estudio.

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; 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 genéticos relacionados con el cáncer. 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.

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 el responsable del estudio (Dra. Elena Garralda Cabanas. Teléfono: 93 2746000; 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 Cabanas (93 2746000; extensión 4916)

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL USO DE MUESTRAS DE TEJIDO EN EL ESTUDIO: "APLICACIÓN DE UN MODELO TRASLACIONAL PARA ESTUDIAR LA EFICACIA, LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA Y LA HETEROGENEIDAD TUMORAL"

Yo, _____, he leído la hoja de información que se me ha entregado y he entendido los objetivos del estudio de alteraciones oncogénicas, así como de los riesgos y beneficios potenciales de mi participación en él.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He hablado con: _____ (nombre del investigador).

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Estoy de acuerdo en participar según las condiciones y los procedimientos establecidos y entiendo que puedo cancelar mi participación cuando lo desee, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda realizarse el estudio sobre posibles alteraciones moleculares relacionadas con el cáncer en mi muestra de tejido, sangre y otras muestras de materiales biológicos (heces, saliva, orina, pelo, piel).

DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda realizarse una biopsia antes de iniciar una terapia molecular dirigida, si fuera necesario, en el momento de observarse respuesta y una biopsia al final de dicha terapia, si hubiera progresión.

DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda realizarse una biopsia en el caso de presentar toxicidad a tratamientos con fármacos dirigidos contra dianas específicas, 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 relacionados 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'Hebrón.

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

DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda realizarse la obtención de la muestra para que se genere un modelo de PDX humanizado con dichas muestras.

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 esta información.

_____	_____
Paciente, familiar o representante legal (señalar)	Fecha
_____	_____
Investigador	Fecha

12.7. Anexo 7: Circuito *VHIO* de obtención de muestras de seroteca Proyecto 360° *RESISTANCE*.



CIRCUITO *VHIO* DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SEROTECA PROYECTO 360° *RESISTANCE*

1) Tras la obtención del ICF “Proyecto 360° *RESISTANCE*: Aplicación de un modelo traslacional para estudiar la eficacia, los mecanismos de resistencia y la heterogeneidad tumoral en pacientes tratados con fármacos dirigidos a dianas moleculares”, rellenar la fichas correspondiente al paciente “Seroteca Oncología_Proyecto 360°R”.

2) Tras entregar la ficha a Enfermería Hospital de Día (HD) *UITM*, se extraerá una muestra extra de sangre coincidiendo con una venopunción programada del/la paciente de 20 ml (guardar en 2 tubos de 10 mL cada uno, en tubos con EDTA con tapón lila).

3) Enfermería deberá procesar los 20 mL obtenidos según los siguientes pasos:

- 1° Centrifugado a 15-25°C durante 10 minutos a 1600 g (centrífuga habitual disponible en HD).
- 2° Recoger la fracción plasmática del primer centrifugado, **tubo con tapón azul**.
- 3° Centrifugado a 15-25°C durante 10 minutos a 3000 g (centrífuga habitual disponible en HD).
- 4° Recoger la fracción plasmática resultante y distribuirlo en alícuotas de 2 mL cada una, para congelarlas a -80°C (obtención de **unas 4 alícuotas/extracción/paciente**).

4) Codificar cada una de las alícuotas con información identificativa (información recogida en registro excel muestras de serotecas guardadas en *UITM*, responsable Alicia López).

- Iniciales paciente.
- N° identificativo paciente en dicha seroteca.
- Fecha extracción dicha muestra.

5) Las alícuotas quedarán almacenadas en el congelador de -80°C, situado en la Sala Técnica de *UITM*. Cada seroteca tiene su caja identificada.

6) Las muestras quedarán a disposición del Equipo Investigador correspondiente para su uso futuro en proyectos de investigación.

12.8. Anexo 8: Circuito VHIO de obtención de muestras de autopsia Proyecto 360° RESISTANCE.



**CIRCUITO VHIO DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE AUTOPSIA PROYECTO
360° RESISTANCE**

1. DOCUMENTO FUENTE PARA EL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

NOMBRE Y APELLIDOS PACIENTE:

SAP:

MÉDICO REFERENTE DE ONCOLOGÍA MÉDICA:

1. Adjuntar una copia del consentimiento informado original del “Proyecto 360° RESISTANCE” del paciente.

2. Adjuntar los documentos del certificado de defunción debidamente cumplimentado/autorización HVH de autopsia firmada por la familia del paciente.

3. Adjuntar la petición impresa de la autopsia clínica solicitada vía SAP.

4. Resumen de la historia clínica relevante del paciente para el Servicio de Anatomía Patológica, con tal de poder correlacionar los hallazgos de la autopsia:

- Motivo solicitud:

Autopsia clínica

- Comorbilidades destacables (VHC, VHB, VIH, tuberculosis, cirugías previas, otras):

- Resumen historia oncológica (tumor primario, lesiones metastásicas conocidas, tratamientos):

CIRCUITO VHIO DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE AUTOPSIA PROYECTO

360° RESISTANCE

2. DOCUMENTO FUENTE PARA EL SERVICIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA

NOMBRE Y APELLIDOS PACIENTE:

SAP:

MÉDICO REFERENTE DE ONCOLOGÍA MÉDICA:

1. Una vez confirmado el éxito del paciente, el equipo de oncólogos de guardia debe obtener el consentimiento informado de la autopsia clínica – *documento de autorización de autopsia* disponible en Conserjería HVH-, previamente acordada con la familia, tras completar el certificado de defunción del paciente. (busca Oncología Médica [residente 29390/adjunto 29327](#)).

En el caso de que el paciente fallezca en un centro externo, su oncólogo referente debe gestionar el traslado a Vall d'Hebrón, si es factible - *Ver documento anexo 1 “circuito para el traslado de pacientes candidatos a autopsia clínica desde un centro externo”*-. Una vez el cadáver esté depositado en el Servicio de Microbiología HVH, éste sigue el mismo circuito detallado a continuación.

2. El equipo de oncólogos de guardia debe solicitar la autopsia clínica vía SAP:

Petitori ICS → Proves → Anatomia Patològica → Prestacions autòpsia → Autòpsia adult completa (amb SNC)

Se deberá adjuntar la solicitud impresa junto al certificado de defunción y la autorización de autopsia clínica HVH firmada por la familia (ver documento adjunto “*Autorització d'autòpsia clínica*” al final de este documento) , junto al documento fuente para el Servicio de Anatomía Patológica que acompañará al cadáver.

3. El equipo de oncólogos de guardia debe avisar en días laborables al Servicio de AP ([ext. 6810 o 6809](#)) para contactar con el patólogo que hará la autopsia o, si es festivo, se deberá contactar directamente con el patólogo de guardia ([móvil: 607071194](#)), para informar que se ha tramitado una autopsia dentro del “Proyecto 360° RESISTANCE”, para saber la hora/patólogo que realizará dicha autopsia.

La autopsia se realizará dentro de las primeras 24 horas tras el éxito, pudiendo realizarse:

- En días laborables (Lun-Vie) de 8 a 15h, si llega la documentación de la autopsia antes de las 13h y excepcionalmente, hasta las 19h si llega la documentación antes de las 15h.

- **En días festivos (Sab-Dom) de 8 a 15h**, siempre y cuando la documentación llegue antes de las 12h. Más tarde ya quedaría programada para el día siguiente.

La obtención de las muestras de investigación durará aproximadamente 3 horas (en el contexto de autopsia reglada).

4. **Avisar al oncólogo referente del paciente para informarle de la programación de la autopsia.** Email al Investigador Principal “Proyecto 360° RESISTANCE” (Dra. Elena Garralda, egarralda@vhio.net) y al sub-investigador responsable del ensayo/paciente.

5. **El oncólogo referente del paciente será el responsable de definir las lesiones tumorales de las que se obtendrán las muestras a conservar (a definir según últimas pruebas de imagen del paciente), y de coordinar con el Laboratorio de Patología Molecular la persona que estará presente durante la realización de la autopsia para guiar al patólogo en la obtención e identificación de muestras.**

Se podrán tomar muestras en fresco de las metástasis cerebrales pero no se podrán obtener muestras del LCR.

- **En días laborables (Lun-Vie)**, el oncólogo referente contactará con José Jiménez (móvil 655426224; ext. 6942) para que acuda a la autopsia a la hora programada y recoja las muestras que le irá cediendo el patólogo a lo largo de la autopsia.
- **En días festivos (Sab-Dom)**, un oncólogo referente deberá acudir a la autopsia para la correcta recogida de las muestras según protocolo del Proyecto 360° - *Ver documento anexo 2 “circuito para la recogida de material congelado/formol procedente de autopsias en fines de semana y festivos”*.

6. **De cada una de las zonas indicadas, se deben obtener 3 muestras de tejido para su conservación en distintos medios, debidamente identificadas mediante la referencia de codificación; las muestras se codificarán según número de autopsia y código de localización según proyecto (por ejemplo A16-3 MD1 – “A” autopsia, “16” 2016- “3” tercera autopsia del año, MD1 mama derecha muestra 1-):**

- a) 1ª muestra se conservará en un **TUBO DE CRIOPRESERVACIÓN y SE CONGELARÁ INMEDIATAMENTE EN HIELO SECO/NITRÓGENO LÍQUIDO**, para guardar en el congelador a -80°C. *Recordar que hay que identificar la muestra con su referencia de codificación utilizando un rotulador permanente.*
- b) 2ª muestra se guardará en **UN CASSETTE Y SE DEPOSITARÁ EN UN RECIPIENTE CON FORMOL a TEMPERATURA AMBIENTE**, para su posterior procesamiento y conservación en **PARAFINA**. *Recordar que hay que identificar la muestra con su referencia de codificación utilizando un lápiz.*
- c) 3ª muestra se guardará para fijación de rutina en formol y procesamiento en parafina que servirá para la **CONFIRMACIÓN HISTOLÓGICA CON hematoxilina-**

eosina (H&E) Y EOSINA de la neoplasia en el estudio anatómico-patológico y para la emisión del informe autopsico correspondiente. Tanto las laminillas H&E como los bloques de parafina generados de estas muestras 3ª, se conservarán en el *Archivo del Servicio de Anatomía Patológica*.

- **En días laborables (Lun-Vie)**, acudirá a la autopsia un miembro del *Laboratorio de Patología Molecular*, con los tubos de criopreservación/recipiente de hielo seco y cassettes/recipiente con formol.
 - **En días festivos (Sab-Dom)**, el oncólogo referente será el responsable de recoger previamente los tubos de criopreservación y de guardar las muestras en el contenedor de hielo seco del congelador a -80°C anexo a la sala de autopsias, así como de recoger los cassettes que deberá guardar en un recipiente de formol– *Ver documento anexo 2 “circuito para la recogida de material congelado/ formol procedente de autopsias en fines de semana y festivos”*.
7. Una vez recogidas todas las muestras, en el caso de fin de semana y días festivos, se contactará al *Laboratorio de Patología Molecular* (José Jiménez, [móvil 655426224/ext. 6942](tel:655426224)), para recogida y archivo de las muestras 1ª y 2ª.

Prueba de imagen de referencia (fecha/origen):		
ÓRGANO ORIGEN	REFERENCIA CODIFICACIÓN	DE LESIÓN ESPECÍFICA (x3 MUESTRAS)
CAVIDAD ORAL	CO	
ÁREA ORL	AO	
MAMA	MD (derecha), MI (izquierda)	
PULMÓN	LSD, LMD, LID, LSIZq, LIIZq	
ESÓFAGO	EA (alto), EM (medio), ED (distal)	
ESTÓMAGO	UGE (unión), E (cámara gástrica)	
COLON	CA (ascendente), CT (transverso), CD (descendente), R (recto)	
PÁNCREAS	Pa	
HÍGADO	H	
VÍAS BILIARES	VB	
PERITONEO	Pe	
RIÑÓN	RD (derecho), RI (izquierdo)	
VÍAS URINARIAS	VUD (derecha), VUI (izquierda)	
VEJIGA	V	
OVARIO	OD (derecho), OI (izquierdo)	
ÚTERO	U	
TESTÍCULOS	TD (derecho), TI (izquierdo)	
HUESO	HU	
PARTES BLANDAS	PB	
GANGLIOS	GG	
OTROS Especificar la codificación que se utilice		

Ejemplos de referencia de codificación: *metástasis Mama Derecha= MDI; metástasis Lóbulo Superior Derecho= LSDI, metástasis Cavidad Oral Pilar Amigdalino Derecho= CO PADI*; Así, en el caso de más de una lesión por órgano, se pueden especificar numéricamente las distintas lesiones y localizar geográficamente en el dibujo anexo. La persona presente en la autopsia será la encargada de señalar, con la referencia de codificación, las zonas de implantes tumorales de las que se ha obtenido biopsia.

DOCUMENTO ANEXO 1:**Circuito para el traslado de pacientes candidatos a autopsia clínica desde un centro externo**

Para todos aquellos pacientes que fallezcan en centros externos, se establece el siguiente circuito, dónde se detalla el proceso de traslado y la documentación necesaria con tal propósito:

Tras contactarnos la familia del fallecido y expresar su voluntad de proceder con la autopsia clínica, la familia debe facilitarnos el contacto con la funeraria pertinente que se encargará de realizar el traslado del cadáver desde el centro donde se encuentra el cadáver hasta el tanatorio escogido. La familia debe acordar con la funeraria el traslado del cadáver desde el centro hasta Vall d'Hebrón y, posteriormente, desde Vall d'Hebrón hasta el tanatorio una vez realizada la autopsia.

Para pacientes del área de Barcelona, las funerarias más frecuentes con *Àltima@Serveis Funeraris Integrals* (902230238) y *Mémora@Serveis Funeraris de Barcelona* (934841855) – ambas disponen de oficinas en las cercanías de HVH, en la calle Sancho de Ávila 2, 08018 Barcelona.

Para facilitar el traslado, el oncólogo referente puede enviar por email a la funeraria:

- a) Un documento firmado que justifique el motivo del traslado a HVH- ***Ver documento anexo 3 “Justificación de traslado al Hospital Vall d’Hebrón”***.-
- b) Una copia del consentimiento informado del Proyecto *360° RESISTANCE* firmado por el paciente, para que conste su voluntad.
- c) El documento de solicitud de traslado a HVH debidamente cumplimentado – dicho documento se puede solicitar a Conserjería HVH, y debe estar cumplimentado por el oncólogo referente que solicita el traslado del cadáver a HVH, así como cumplimentado y firmado por el familiar que autorice el traslado-. (Ver copia del documento ***“Autorització de trasllat de nounats nascuts vius, nens i adults”*** adjunto al final de este documento.)

El cadáver debe ser trasladado a HVH con una copia del certificado de defunción firmado por el equipo médico del centro donde ha fallecido.

Una vez llegue el transporte de la funeraria a HVH, se debe avisar al celador del servicio de Microbiología (**busca 29481/extensión 6804**) para gestionar el depósito del cadáver a la

morgue. El transporte debe dirigirse a la puerta de entrada del servicio de Microbiología, situado en el edificio del Banco de Sangre.

Es imprescindible que se entreguen etiquetas de identificativas del paciente en el momento de la recepción por parte del celador de Microbiología – estas etiquetas pueden solicitarse en Conserjería HVH, siempre y cuando el paciente tenga un episodio previo abierto en el SAP de HVH-.

Al día siguiente, tras la realización de la autopsia clínica, el oncólogo referente deberá avisar de nuevo al transporte de la funeraria para la recogida del cadáver y traslado desde HVH al tanatorio pertinente. Con tal propósito, la propia funeraria debe realizar un documento (que justifique el motivo de traslado a su tanatorio desde Hospital Vall d'Hebrón)- *Ver documento anexo 4 “Solicitud de traslado al tanatorio desde el Hospital Vall d'Hebrón”*-, debidamente firmado por el familiar que de nuevo autorice el traslado. Este documento quedará como resguardo del traslado en el servicio de Microbiología.

N.B.: Para cualquier duda administrativa, contactar con el Departamento de Medicina Legal (Secretaría 6815) o Conserjería (extensión 6325).

DOCUMENTO ANEXO 2**Circuito para la recogida de material congelado/formol procedente de autopsias en fines de semana y festivos**

Para todas aquellas muestras procedentes de necropsias clínicas, que deban ser recogidas por congelación durante los fines de semana y festivos, se establece el siguiente circuito, dónde se detalla el proceso de congelación, así como el lugar de almacenamiento:

La sala de autopsias del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebrón, está situada en la **planta 1 del edificio de Anatomía Patológica**, en cuya misma planta se dispone de congeladores de -80°C (ver plano). En fines de semana, la puerta principal del servicio de Anatomía se haya cerrada, para poder acceder hay que llamar al interfono localizado en la entrada de la puerta principal del edificio de Anatomía Patológica, y comunicar el nombre de la persona que quiere acceder, el motivo y mostrar la tarjeta idetificativa, si es solicitada. La **sala de congeladores (AP1006) que está junto a la sala de autopsias**, no está cerrada con llave, y el **congelador asignado n°2** para dejar el hielo y las cajas, es del backup del *VHIO*, y al no tener muestras no está cerrado con llave.

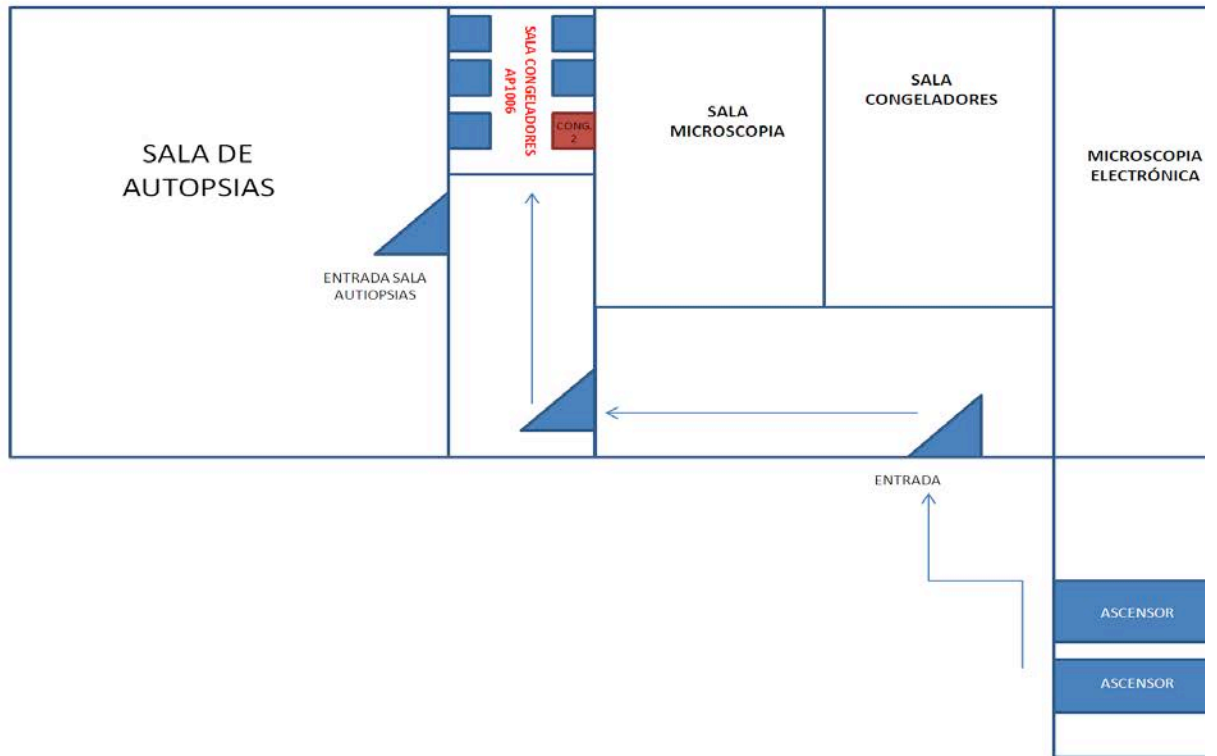
En el congelador n° 2 (ver localización en el plano adjunto), de la sala de congeladores (AP1006) en el estante inferior, se encuentran **crio-cajas archivadoras con criotubos vacíos en su interior, etiquetadas como “criotubos vacíos para muestras de necropsias”**, así como cajas de poliespan con hielo seco en su interior. En el momento de la toma de muestras, dicha crio-caja se introducirá en el interior de la caja con hielo seco y se transportará a la sala de autopsias.

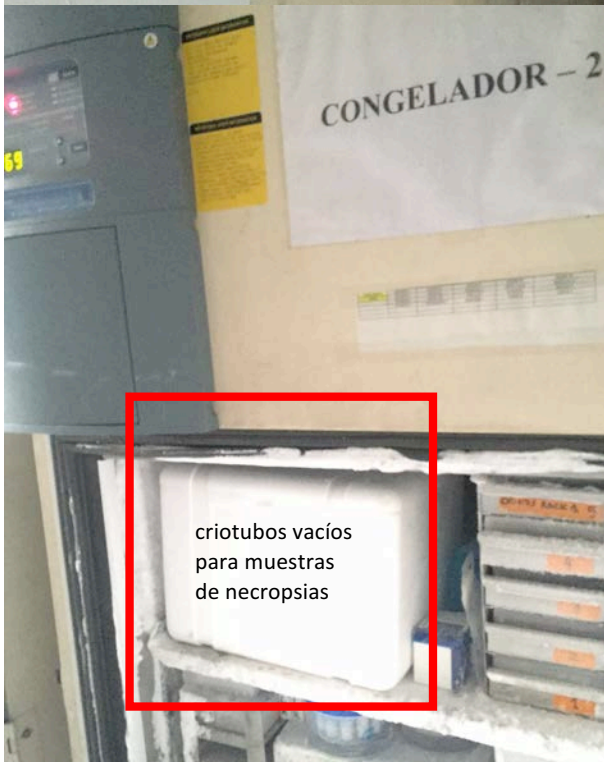
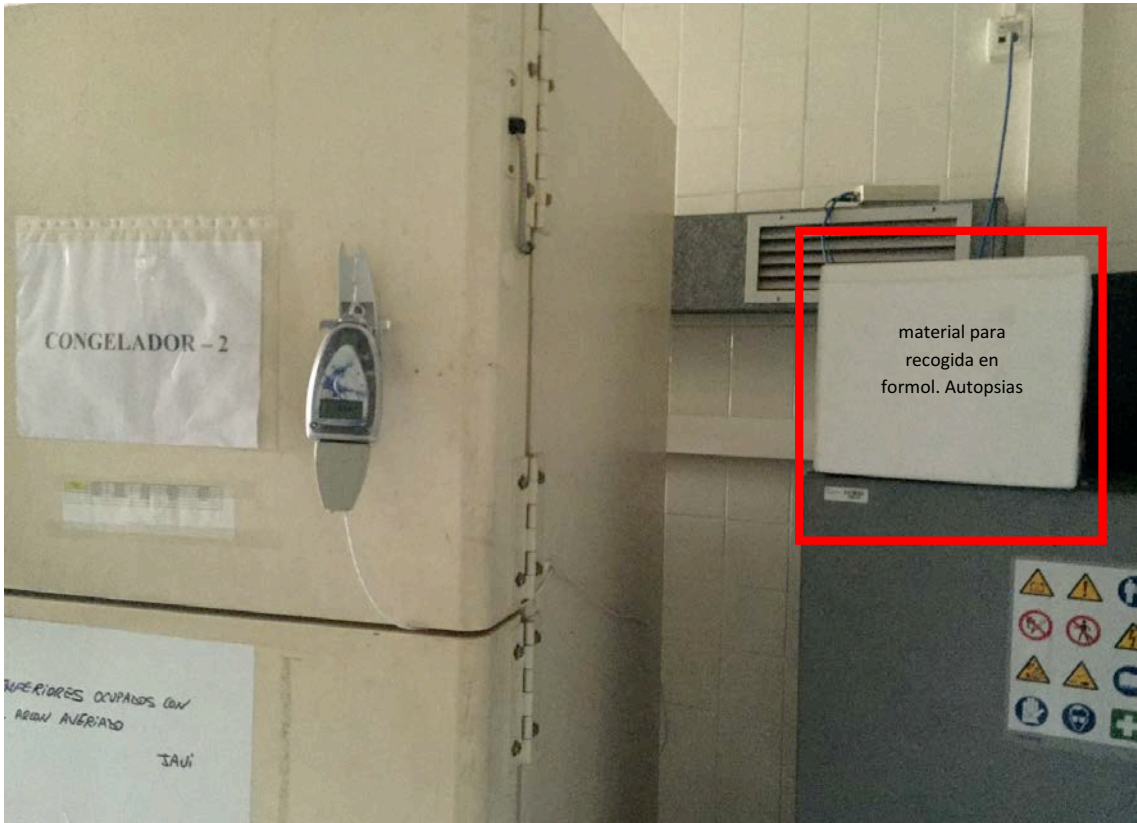
Junto al congelador 2 (**a temperatura ambiente**) se encuentra otra **caja de poliespan etiquetada como “material para recogida en formol”**, en la cual habrán disponibles, cassettes histológicos, recipiente para formol y lápiz para rotular los cassettes (no rotular con rotulador, solo utilizar lápiz). Una vez que el patólogo responsable de la obtención de las muestras, haya seleccionado la zona de interés, dichas muestras serán introducidas en los criotubos vacíos etiquetándolos con un rotulador permanente como se indica en el documento “circuito de autopsias VHIO” en su versión vigente, y las muestras para parafina se colocaran en el interior de los cassettes y a continuación en el recipiente con formol.

Cuando la toma de muestras haya finalizado, la caja de hielo seco con la crio-caja en su interior y las muestras seleccionadas, serán trasladadas nuevamente al congelador n° 2, al estante inferior. Y la caja con el bote en formol se depositará nuevamente a temperatura ambiente junto al congelador n° 2 de la sala de congeladores.

Se comunicará a Jose Jiménez, vía telefónica o correo electrónico, que se han recogido muestras para este proyecto, quien al día laborable siguiente, procederá a almacenar las muestras en su ubicación correcta en los congeladores de -80°C destinados a este fin.

PLANTA 1. EDIFICIO ANATOMÍA PATOLÓGICA





DOCUMENTO ANEXO 3:

JUSTIFICACIÓN DE TRASLADO AL HOSPITAL VALL D'HEBRÓN



VALL D'HEBRON
Institute of Oncology



Fecha del traslado _____

Barcelona

Early Drug Development Program

Phase I Unit (UITM)

Vall d'Hebrón Hospital VHIO

Funeraria encargada del traslado: _____

Apreciado compañero,

Le informo de que el Sr./Sra. _____ es un/a paciente del Servicio de Oncología Médica del Hospital Vall d'Hebrón, que a fecha de _____ firmó un consentimiento informado para participar en un proyecto de investigación traslacional “360° RESISTANCE: aplicación de un modelo traslacional para estudiar la eficacia, los mecanismos de resistencia y la heterogeneidad tumoral en pacientes tratados con fármacos dirigidos a dianas moleculares”, del que es investigador principal la Dra. Garralda.

Con dicho consentimiento, confirmo que el/la paciente autorizó la realización de una autopsia clínica de investigación como última voluntad, en caso de producirse el éxitus como complicación final de su enfermedad oncológica avanzada.

Adjunto una copia escaneada de dicho consentimiento informado, cualquier duda por favor no duden en contactarme.

Cordialmente,

Nombre y apellidos médico responsable: _____

Firma médico responsable:

DOCUMENTO ANEXO 4:

**SOLICITUD DE TRASLADO AL TANATORIO DESDE EL HOSPITAL VALL
D'HEBRÓN**

Sello de la funeraria encargada del traslado:

En/Na (nombre y apellidos del familiar del paciente que autoriza el traslado)
_____ autoriza y delega a la
funeraria _____, para realizar
los trámites referentes a TRASLADO desde el Hospital Vall d'Hebrón al tanatorio
_____ y
POSTERIOR ENTIERRO/INCINERACIÓN del cuerpo de su familiar
_____.

Firma del familiar:

Fecha del traslado _____

Barcelona



Espai per a l'etiqueta

Primer cognom

Segon cognom

Nom

Any de naix.

Província

NHC

Sexe

Autorització d'autòpsia clínica

Cognoms i nom de la persona que signa l'autorització/Apellidos y nombre de la persona que firma la autorización

Parentiu*/Parentesco*

DNI

Autoritzo els serveis mèdics de l'hospital a fer, en cas de defunció, els exàmens quirúrgics pertinents i el consegüent estudi histopatològic.

Autorizo a los servicios médicos del hospital a realizar, en caso de fallecimiento, los exámenes quirúrgicos pertinentes y su consiguiente estudio histopatológico.

Signatura de la persona que autoritza/Firma de la persona que autoriza Data de l'autorització/Fecha de la autorización

Cognoms i nom, signatura i DNI del testimoni (metge, infermera, etc.)/Apellidos y nombre, firma y DNI del testigo (médico, enfermera, etc.)

Revocació d'autorització d'autòpsia clínica

Cognoms i nom de la persona que signa la revocació/Apellidos y nombre de la persona que firma la autorización

Parentiu*/Parentesco*

DNI

Motiu de la revocació/Motivo de la revocación

En la meua condició de familiar del difunt, desitjo anul·lar l'autorització d'autòpsia clínica, prèviament donada.

En mi condición de familiar del difunto, deseo anular la autorización de autopsia clínica, previamente dada.

Signatura de la persona que revoca/Firma de la persona que revoca Data de la revocació/Fecha de la revocación

Cognoms i nom, signatura i DNI del testimoni (metge, infermera, etc.)/Apellidos y nombre, firma y DNI del testigo (médico, enfermera, etc.)

*Ordre de prelación: cònjuges, pares, fills, parents més pròxims, tutors.
Orden de prelación: conyuges, padres, hijos, parientes más próximos, tutores.

HVH 028—N3596—gen. 12



Exemplar per a Anatomia Patològica

Procediment no judicial

• Emissió del certificat mèdic de defunció (CMD)

Es realitza exclusivament en casos de mort natural. S'entén com a mort natural la que té origen endogen, sense que hi hagi sospita o evidència de responsabilitat per part del mateix difunt o d'altres persones. En el cas de les infeccions d'origen exogen, han de ser espontànies.

És imprescindible per a la inscripció de la defunció al Registre Civil i posterior emissió de la llicència per a la inhumació o incineració.

Per emplenar-lo és imprescindible conèixer la causa de la mort o poder deduir-la de la informació que tingueu a la vostra disposició.

Per emplenar-lo també és necessari conèixer la identitat de la persona morta, cosa que es pot fer per tres vies:

- Presentació de document acreditatiu de la identitat: DNI, targeta de residència, passaport o carnet de conduir.
- A causa que el facultatiu coneix el difunt personalment "coneix a ciència certa".
- Una tercera persona, prèvia acreditació d'identitat, que manifesti conèixer el difunt i acrediti la seva identitat. Al CMD s'ha de posar el nom d'aquesta persona i el número del seu document acreditatiu d'identitat.

No utilitzeu abreviatures. L'aturada cardiorespiratòria és una conseqüència, no una causa, i, per tant, no s'ha d'utilitzar. No signeu mai un CMD sense l'exploració prèvia del difunt o document acreditatiu signat per un altre metge, i que s'ha de conservar.

• Circumstàncies especials

Difunt que arriba cadàver: si disposem d'evidència que la causa ha estat natural, mitjançant altres professionals o per la història clínica del pacient, es pot emetre el certificat de defunció.

Difunt sense possibilitat d'identificar per alguna de les tres vies descrites abans: el professional que signa deixa constància veraç de totes les dades, i, per tant, si no podem acreditar la identitat, no és possible signar el document. Si podem acreditar la causa de la mort com a natural, el difunt es traslladarà al dipòsit de l'Hospital amb l'epicrisi i la certificació mèdica sense emplenar. La UCAD iniciarà els tràmits d'identificació corresponents i emplenarà la certificació de defunció.

Difunt del qual podem acreditar la causa de la mort com a natural, i que, amb identificació o sense, no es troben familiars o no s'hi ha pogut contactar. El difunt es traslladarà al dipòsit de l'Hospital amb la certificació de defunció emplenada i totes les dades disponibles del difunt. La UCAD iniciarà els tràmits de localització de familiars i, si no es troben, demanarà als organismes oficials la certificació de no-localització, abans de donar l'autorització per a la inhumació. Si hi ha objectes personals, es dipositaran al Servei de Seguretat i el resguard de recollida (full rosa) s'adjuntarà al plec de documentació que acompanya aquest document.

Procediment judicial

• Criteris per enllestir un procés judicial

La comunicació de defunció al jutjat d'incidències és obligatòria quan hi ha evidència o sospita d'un mecanisme exogen que ha posat en marxa el procés de defunció i, en conseqüència, pot derivar en responsabilitat de la persona o persones que l'han originat. Aquest mecanisme exogen pot ser accidental, suïcida o homicida. Si existeixen dubtes, també és adequat fer la comunicació, perquè l'absència de l'informe mèdic legal podria deixar les parts en indefensió.

• Circumstàncies especials

La mort sobtada de patologia desconeguda és tributària de procés judicial.

Difunt que arriba cadàver: quan no es pugui acreditar la causa de la defunció o es compleixi qualsevol de les circumstàncies descrites a dalt, s'ha d'iniciar el procés judicial.

Mort violenta diferida: quan la defunció es produeix dies o setmanes després de l'acció d'un mecanisme lesional exogen i com a conseqüència de patologies directament o indirectament relacionades. Per exemple: mort per tromboembolisme pulmonar posttraumàtic. Ingress per fractura causal i mort per complicacions secundàries, sense que s'hagi produït l'alta clínica del procés causal.

Infeccions: encara que l'agent patògen tingui un origen exogen, si la infecció ha estat espontània, no es considerarà com a judicial. Però si hi ha evidència o sospita de possible responsabilitat, es comunicarà al jutjat. Per exemple: infeccions posttraumàtiques, punció amb xeringa contaminada, etc.

Procés avortiu no legal: s'ha de comunicar al jutjat.

Difunt sense possibilitat d'identificar per alguna de les tres vies descrites abans: s'ha de fer constar a la notificació de defunció al jutjat.

No es troben familiars o no s'hi ha pogut contactar: la UCAD iniciarà els tràmits de localització de familiars i si no es troben, ho comunicarà al jutjat corresponent.

• Procediment

- I. Demanar a Consergeria la carpeta de documentació (*kit*) judicial
- II. Emplenar el document de notificació de defunció al jutjat d'incidències. (Vegeu punt VI)
- III. Enviar per fax al jutjat d'incidències l'anterior document. Fax 93 554 87 81. Una vegada imprès el report de conformitat, adjuntar-lo a aquest document.
- IV. Deixar passar uns 10 min i trucar al jutjat d'incidències per comunicar l'enviament del fax. Tel. 93 554 86 50. Si és possible, anotar al report del fax el nom de la persona amb qui heu parlat.
- V. Emplenar per SAP l'epicrisi, imprimir el document i introduir-lo al sobre de la documentació (*kit*). Col·locar el sobre dintre de la bossa de plàstic i fixar-la al pit del difunt.
- VI. Els objectes personals s'han de lliurar al Servei de Seguretat. En aquest cas, el resguard de recollida (full rosa) s'ha d'adjuntar a aquest document i al document de notificació al jutjat d'incidències s'ha de fer constar la presència d'objectes personals i el número de registre.
- VII. No es pot fer la certificació mèdica de defunció ni es pot demanar l'autòpsia clínica.
- VIII. Traslladar sempre el difunt al Dipòsit juntament amb el plec de documentació (Autorització de trasllat, Notificació de defunció al jutjat d'incidències, report del fax i, si hi havia objectes personals, comprovant de la recollida per al Servei de Seguretat (full rosa).
- IX. En el supòsit de familiars no localitzables o desconeguts la UCAD s'encarrega de la seva recerca, per la qual cosa s'ha d'aportar tota la informació disponible.

Difunt donant de cos

• Procediment

- I. El certificat de defunció s'ha de lliurar a la família.
- II. La família ha d'anar a qualsevol de les oficines de serveis funeraris de l'Hospital amb el certificat de defunció, i preferiblement (no és imprescindible) amb el carnet de donant i el DNI del difunt.
- III. La donació s'ha de fer en vida, excepte en el cas dels difunts menors d'edat en què pot ser atorgada pels pares.
- IV. Llevat d'excepcions, el cos ha d'anar a la mateixa universitat on s'ha fet la donació.
- V. **Incompatibilitats:** autòpsies clíniques o judicials, donació d'òrgans i teixits i la presència de malalties infectocontagioses (en aquests casos, cal fer una consulta a la universitat corresponent).

**12.9. Anexo 9: Panel de Biomarcadores en Oncología (OBP) HTG
EdgeSeq®.**

CARTA DE GENES INCLUIDOS EN EL OBP PANEL							
A2M	ABCA2	ABCA3	ABCA4	ABCA5	ABCA9	ABCB11	ABCB4
ABCB5	ABCB6	ABCC1	ABCC10	ABCC11	ABCC12	ABCC2	ABCC3
ABCC4	ABCC5	ABCC6	ABCD1	ABCD3	ABCD4	ABCF1	ABCG2
ABCG8	ABHD2	ACACA	ACACB	ACADS	ACKR1	ACKR2	ACKR3
ACKR4	ACLY	ACSL3	ACSL4	ACSL5	ACTA2	ACTB	ACTR1B
ACTR2	ACTR3B	ACVR1B	ACVR1C	ACVR2A	ADAM17	ADAM23	ADAMTS1
ADAR	ADCK3	ADIPOQ	ADIPOR1	ADIPOR2	ADM	ADORA2A	ADORA2B
ADRA1A	ADRA1B	ADRA1D	ADRA2A	ADRA2B	ADRA2C	AFF1	AGER
AGFG1	AGGF1	AGT	AHNAK	AHNAK2	AHR	AHRR	AICDA
AIFM1	AIMP2	AK1	AK2	AK3	AKAP1	AKR1B1	AKR1C3
AKT1	AKT1S1	AKT2	AKT3	ALAS1	ALB	ALCAM	ALDH1A1
ALDH1A3	ALDH2	ALDH4A1	ALDOC	ALK	ALKBH2	ALKBH3	ALPL
AMER1	AMFR	AMH	AMOT	ANAPC2	ANG	ANGPT1	ANGPT2
ANGPTL1	ANGPTL4	ANKRD37	ANLN	ANPEP	ANXA1	ANXA2	ANXA3
ANXA8	AP2B1	APAF1	APBB1	APC	APCS	APEX1	APEX2
APH1B	APOC2	APOC4	APOL3	APP	APPBP2	AQP1	AQP2
AQP4	AQP7	AQP9	AR	ARAF	AREG	ARHGAP44	ARHGEF16
ARID1A	ARID1B	ARID2	ARMC1	ARNT	ARNT2	ASB13	ASB16-AS1
ASB9	ASNS	ASPM	ASXL1	ATAD2	ATF1	ATF2	ATF4
ATF6	ATF6B	ATG12	ATG13	ATG16L1	ATG3	ATG5	ATG7
ATM	ATP5A1	ATP5F1	ATP5G1	ATP6VOC	ATP6V1G2	ATP7A	ATP7B
ATR	ATRX	ATXN1	ATXN3	AURKA	AURKB	AURKC	AXIN1
AXIN2	AXL	B3GNT8	BAD	BAG1	BAG2	BAG3	BAG4
BAG5	BAI1	BAIAP3	BAK1	BAMBI	BAP1	BATF	BAX
BBC3	BBS4	BCAR1	BCAT1	BCCIP	BCL10	BCL2	BCL2A1
BCL2L1	BCL2L10	BCL2L11	BCL2L2	BCL3	BCL6	BCOR	BCR
BDNF	BECN1	BFAR	BHLHE40	BID	BIK	BIRC2	BIRC3
BIRC5	BIRC6	BIRC7	BLM	BLVRA	BMF	BMI1	BMP1
BMP2	BMP4	BMP5	BMP6	BMP7	BMP8A	BMP8B	BMPR1B
BNIP2	BNIP3	BNIP3L	BOC	BOD1	BOK	BRAF	BRCA1
BRCA2	BRIP1	BTC	BTG1	BTG2	BTG3	BTK	BTRC
BUB1	BUB1B	C17orf53	C19orf140	C1orf106	C1orf159	C1orf86	C1QA
C1S	C3	C3AR1	C5	C5AR1	C5orf55	CA12	CA9
CACNA1C	CACNA1D	CACNA1E	CACNA1G	CACNA1H	CACNA2D1	CACNA2D2	CACNA2D3
CACNA2D4	CACNB2	CACNB3	CACNB4	CACNG1	CACNG4	CACNG6	CACYBP
CAD	CADM1	CALD1	CALM1	CALML3	CALML5	CALML6	CALR
CAMK2B	CAMK2N1	CAMKK1	CAMKK2	CAPN1	CAPN2	CAPN3	CAPN5
CAPN6	CAPN7	CAPNS1	CARD11	CARM1	CASP1	CASP10	CASP12
CASP14	CASP2	CASP3	CASP4	CASP5	CASP6	CASP7	CASP8
CASP8AP2	CASP9	CAV1	CAV2	CBL	CBLC	CBX3	CBX5
CCBL2	CCDC103	CCL1	CCL11	CCL13	CCL14	CCL15	CCL16
CCL17	CCL18	CCL19	CCL2	CCL20	CCL21	CCL22	CCL23
CCL24	CCL25	CCL26	CCL27	CCL28	CCL3	CCL4	CCL5
CCL7	CCL8	CCNA1	CCNA2	CCNB1	CCNB2	CCNB3	CCNC
CCND1	CCND2	CCND3	CCNE1	CCNE2	CCNF	CCNG1	CCNG2
CCNH	CCNO	CCNT1	CCR1	CCR10	CCR2	CCR3	CCR4
CCR5	CCR6	CCR7	CCR8	CCR9	CCRL2	CCS	CCT2
CCT3	CCT4	CCT5	CCT6A	CCT6B	CCT7	CD14	CD160
CD163	CD19	CD2	CD209	CD22	CD24	CD27	CD274
CD276	CD28	CD33	CD34	CD38	CD3D	CD4	CD40
CD40LG	CD44	CD47	CD5	CD52	CD55	CD59	CD63
CD68	CD70	CD74	CD79A	CD80	CD83	CD86	CD8A
CDC14A	CDC14B	CDC16	CDC20	CDC25A	CDC25B	CDC25C	CDC34

CDC42	CDC42BPA	CDC6	CDC7	CDCA7	CDH1	CDH13	CDH15
CDH2	CDH3	CDH5	CDK1	CDK16	CDK2	CDK4	CDK5
CDK5R1	CDK5RAP1	CDK6	CDK7	CDK8	CDK9	CDKL5	CDKN1A
CDKN1B	CDKN1C	CDKN2A	CDKN2B	CDKN2C	CDKN2D	CDKN3	CDON
CDX2	CEACAM3	CEACAM5	CEACAM7	CEBPA	CEBPB	CEBPD	CEBPE
CECR6	CELSR2	CENPF	CENPN	CEP55	CES1	CES2	CFLAR
CFTR	CHAD	CHD1	CHD7	CHDH	CHEK1	CHEK2	CHGA
CHI3L1	CHI3L2	CHMP4B	CHPT1	CHRNA1	CHRN1	CHSY1	CHUK
CIC	CIDEA	CIDEB	CIRBP	CITED2	CKB	CKLF	CKMT1A
CKMT2	CKS1B	CKS2	CLCA2	CLCF1	CLDN3	CLIC1	CLIC3
CMC2	CMKLR1	CMTM1	CMTM2	CMTM3	CMTM4	CNIH4	CNOT3
CNPY1	CNPY2	CNPY3	CNPY4	CNTF	CNTFR	COL11A1	COL11A2
COL17A1	COL18A1	COL1A1	COL1A2	COL27A1	COL2A1	COL3A1	COL4A2
COL4A3	COL4A4	COL4A5	COL4A6	COL5A1	COL5A2	COL6A6	COL9A3
COMMD4	COMP	COP5	COX5A	COX7B	CP	CPT1A	CPT1B
CPT1C	CPT2	CRADD	CREB1	CREB3L1	CREB3L3	CREB3L4	CREB5
CREBBP	CRK	CRLF2	CRLS1	CRP	CRTAC1	CRTC2	CRY1
CRYAA	CRYAB	CSDE1	CSF1	CSF1R	CSF2	CSF3	CSFR3
CSNK1A1	CSNK1E	CSNK2A1	CSNK2B	CST6	CSTB	CTGF	CTLA4
CTNNA1	CTNNB1	CTNNBIP1	CTNND2	CTPS1	CTSA	CTSB	CTSC
CTSD	CTSH	CTSL	CTSS	CTSV	CUL2	CUL3	CX3CL1
CX3CR1	CXADR	CXCL1	CXCL10	CXCL11	CXCL12	CXCL13	CXCL14
CXCL16	CXCL2	CXCL3	CXCL14	CXCL16	CXCL2	CXCL3	CXCL5
CXCL6	CXCL8	CXCL9	CXCR1	CXCR2	CXCR3	CXCR4	CXCR5
CXCR6	CXXC4	CXCC5	CYBA	CYBB	CYCS	CYLD	CYP19A1
CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C19	CYP2C8	CYP2C9
CYP2D6	CYP2U1	CYP3A4	CYP3A5	CYP4A22	CYP4V2	CYP7A1	CYP61
DAAM1	DAB2	DAB2IP	DACH1	DAPK1	DAPL1	DAXX	DBI
DCK	DDB2	DDIT3	DDIT4	DDR1	DDX10	DDX17	DDX39B
DDX5	DDX58	DDX59	DEFB1	DEGS1	DENND4A	DEPDC1	DES
DESI1	DFP	DHCR24	DHH	DHX58	DIABLO	DIAPH3	DICER1
DISP1	DISP2	DKC1	DKK1	DKK2	DKK3	DKK4	DLC1
DLGAP5	DLK1	DLL1	DLL3	DLL4	DMC1	DMD	DNAJA1
DNAJA2	DNAJA3	DNAJA4	DNAJB1	DNAJB11	DNAJB12	DNAJB13	DNAJB14
DNAJB2	DNAJB5	DNAJB6	DNAJB7	DNAJB8	DNAJB9	DNAJC1	DNAJC10
DNAJC11	DNAJC12	DNAJC13	DNAJC14	DNAJC15	DNAJC16	DNAJC17	DNAJC18
DNAJC21	DNAJC22	DNAJC3	DNAJC4	DNAJC5	DNAJC5B	DNAJC5G	DNAJC6
DNAJC7	DNAJC8	DNAJC9	DNMT1	DNMT3A	DNTT	DPPA2	DPPA3
DPPA4	DPPA5	DPYSL4	DSC2	DSG3	DSP	DST	DTX1
DTX3	DTX4	DUSP1	DUSP10	DUSP2	DUSP4	DUSP5	DUSP6
DUSP8	DVL1	DVL2	ESF1	ESF3	ESF5	EAF2	EBAG9
EBF4	ECI2	ECT2	EDA2R	EDIL3	EDN1	EEF2K	EFNA1
EFNA2	EFNA3	EFNA5	EFNB1	EFNB2	EGF	EGFR	EGLN1
EGLN2	EGR1	EGR3	EI24	EIF2AK2	EIF4A1	EIF4B	EIF4E
EIF4EBP1	EIF4G1	EIF5B	EIF6	ELAVL1	ELK1	ELL2	ELMO1
EML4	EMP1	EMP3	EN2	ENDOD1	ENDOG	ENG	ENO1
ENTPD1	EOMES	EP300	EPCAM	EPGN	EPHA2	EPHB4	EPO
EPOR	EPS8	ERBB2	ERBB3	ERBB4	ERCC1	ERCC2	ERCC3
ERCC4	ERCC5	ERCC6	ERCC8	EREG	ERG	ERO1L	ERRF1
ESM1	ESR1	ESR2	ESRRB	ETFA	ETS1	ETS2	ETV1
ETV2	ETV4	ETV5	ETV7	EVL	EXO1	EXOC3	EXOSC8
EXT1	EYA1	EZH2	EZR	F10	F11R	F2	F2R
F3	F8	FABP1	FABP4	FABP7	FADD	FAF1	FAM105A
FAM117B	FAM133A	FAM162A	FAM213A	FAM64A	FAM83B	FANCA	FANCB
FANCC	FANCE	FANCF	FANCG	FANCL	FAS	FASLG	FASN
FAT4	FBN1	FBP1	FBX05	FBXW11	FBXW7	FCER2	FCGR1A
FCGR1B	FEM1B	FEN1	FES	FGF1	FGF10	FGF11	FGF12
FGF13	FGF14	FGF16	FGF17	FGF18	FGF19	FGF2	FGF20
FGF21	FGF22	FGF23	FGF3	FGF4	FGF5	FGF6	FGF7
FGF8	FGF9	FGFBP1	FGFR1	FGFR1OP	FGFR2	FGFR3	FGFR4
FGFRL1	FGL2	FHIT	FIGF	FKBP1A	FKBP5	FKBP8	FLII
FLJ10474	FLNA	FLNC	FLOT2	FLRT1	FLTR2	FLTR3	FLT1

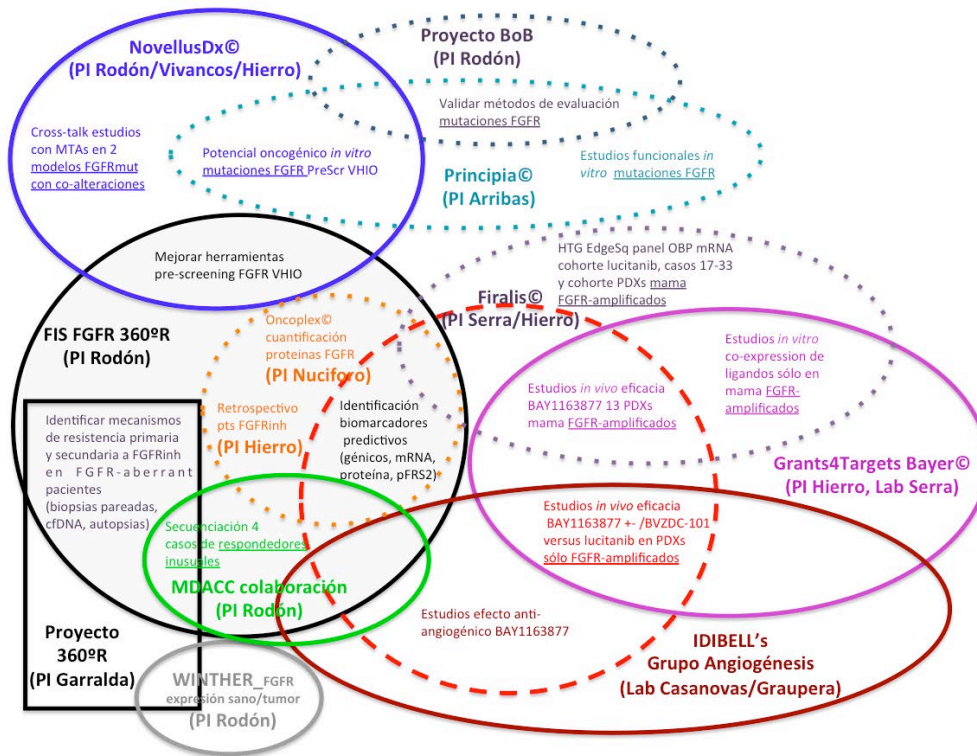
FLT3	FLT3LG	FLT4	FMO3	FMO5	FN1	FOS	FOSL1
FOXA1	FOXA2	FOXC1	FOXC2	FOXD3	FOX E1	FOX11	FOX L2
FOXO1	FOXO3	FOXO4	FOXP1	FOXP3	FOXRED1	FPR1	FRMD6
FRS2	FRS3	FRZB	FST	FTH1	FUBP1	FUS	FUT8
FYN	FZD1	FXD10	FXD2	FZD3	FZD4	FXD5	FXD6
FZD7	FZD8	FZD9	GAA	GAB1	GABBR2	GADD45A	GADD45B
GADD45G	GAL	GALNT3	GALNT5	GAMT	GAPDH	GAS1	GAS6
GATA1	GATA2	GATA3	GATA4	GATA5	GATA6	GBE1	GBP1
GBP2	GBP7	GCLC	GCLM	GDAP1	GDF3	GDF6	GEMIN2
GFAP	GFRA1	GGH	GHR	GJA1	GLI1	GLI2	GLI3
GLIS3	GLUD1	GLUL	GM2A	GML	GMPS	GNA11	GNAI3
GNAQ	GNAS	GNAZ	GNG11	GNG12	GNG4	GNG7	GNGT1
GNGT2	GNL3	GNLY	GPAM	GPAT2	GPC4	GPD2	GP ER1
GPI	GPNMB	GPR126	GPR160	GPR17	GPR180	GPSM2	GRB10
GPR17	GPR180	GPSM2	GRB10	GRB2	GREM1	GRIA3	GRIN1
GRIN2A	GRIN2B	GRN	GRP	GSC	GSK3A	GSK3B	GSN
GSR	GSTA2	GSTM1	GSTM3	GSTP1	GSTA2	GSTM1	GSTM3
GSTP1	GTF2H3	GTSE1	GUCY1A3	GUK1	GYS1	GYS2	GZMA
GZMB	GZMH	H2AFX	H3F3A	H3F3C	HAND1	HAVCR2	HBEGF
HDAC1	HDAC10	HDAC11	HDAC2	HDAC3	HDAC4	HDAC5	HDAC6
HDAC7	HDAC8	HECTD4	HELLS	HERC3	HERPUD1	HES1	HES5
HEY1	HEY2	HEYL	HGF	HHAT	HHEX	HHIP	HIC1
HIF1A	HIF1AN	HIF3A	HIST1H3H	HJURP	HK2	HLA-A	HLA-B
HLA-E	HMGA1	HMGA2	HMGB1	HMGB2	HMGB3	HMGCR	HMGCS2
HMGXB3	HMOX1	HNF1A	HNF1B	HNF4A	HNRNPA1	HNRNPA2B1	HNRNPU
HOXA10	HOXA11	HOXA9	HOXB13	HOXD1	HPGD	HPN	HPSE
HRAS	HRK	HSD17B12	HSD17B4	HSF1	HSF2	HSF4	HSP90AA1
HSP90B1	HSPA12A	HSPA14	HSPA1A	HSPA1B	HSPAIL	HSPA2	HSPA4
HSPA4L	HSPA5	HSPA6	HSPA8	HSPA9	HSPB1	HSPB2	HSPB3
HSPB6	HSPB7	HSPB8	HSPBAP1	HSPD1	HSPE1	HSPH1	HTT
HUS1	IBSP	ICAM1	ICOS	ID1	ID2	IDO1	IDO2
IER3	IFI27	IFIT2	IFNA2	IFNA5	IFNAR1	IFNB1	IFNG
IFNGR1	IFNL3	IFNW1	IFRD1	IFT52	IGF1	IGF1R	IGF2
IGFR2	IGFBP1	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP4	IGFBP5	IGFBP6	IGFBP7
IHH	IKBKB	IKBKG	IL10	IL10RA	IL10RB	IL11	IL11RA
IL12A	IL12B	IL12RB2	IL13	IL13RA2	IL15	IL16	IL17A
IL17F	IL17RB	IL17RD	IL18	IL19	IL1A	IL1B	IL1R1
IL1R2	IL1RAP	IL1RN	IL2	IL20	IL20RA	IL20RB	IL21
IL22	IL22RA1	IL22RA2	IL23A	IL23R	IL24	IL27	IL2RA
IL2RB	IL2RG	IL3	IL33	IL3RA	IL4	IL4R	IL5
IL5RA	IL6	IL6R	IL6ST	IL7	IL7R	IL9	ILK
INF A family	INHBA	INHBB	INPP5J	INS	INSR	INTS7	IRAK1
IRAK2	IRAK3	IRF1	IRF2	IRF3	IRF4	IRF5	IRF6
IRF7	IRF8	IRF9	IRGM	IRS1	IRS2	ISG15	ISL1
ITGA2	ITGA3	ITGA4	ITGA5	ITGA6	ITGA7	ITGA8	ITGA9
ITGAM	ITGAV	ITGB1	ITGB2	ITGB3	ITGB4	ITGB6	ITGB7
ITGB8	ITLN2	ITM2A	ITPKB	JAG1	JAG2	JAK1	JAK2
JAK3	JMJD1C	JMJD6	JPH3	JUN	JUNB	JUND	KAT2B
KAT5	KATNBL1	KCND2	KCNIP1	KCNK5	KCTD11	KDM1A	KDM3A
KDM3B	KDM4B	KDM5B	KDM5C	KDM6A	KDM7A	KDR	KEAP1
KIF14	KIF2C	KIF3A	KIF3B	KIF5B	KIT	KITLG	KL
KLB	KLF12	KLF17	KLF4	KLHDC10	KLK1	KLK2	KLK3
KLK4	KLK5	KLRB1	KLRD1	KLRG1	KMT2B	KMT2C	KMT2D
KNG1	KNTC1	KPNA2	KRAS	KREMEN1	KRT13	KRT14	KRT16
KRT17	KRT18	KRT19	KRT5	KRT6A	KRT7	KRT8	KSR1
L1CAM	LAG3	LAMA1	LAMA3	LAMA5	LAMB3	LAMB4	LAMC2
LAMC3	LAMP5	LAMTOR3	LAT	LATS1	LATS2	LCN1	LCN2
LECT1	LEF1	LEFTY1	LEFTY2	LEP	LEPR	LETMD1	LFNG
LGALS1	LGALS3	LIF	LIFR	LIG1	LIG3	LIG4	LIN28A
LIN28B	LIN9	LINC00886	LIPA	LIPE	LMO2	LOX	LOXL1
LPCAT1	LPL	LRG1	LRIG1	LRMP	LRP12	LRP1B	LRP2
LRP5	LRP6	LRRFIP2	LRRK2	LTA	LTA4H	LTB	LTBP1

LTBR	LTF	LTN1	LY96	LYN	LYVE1	LYZ	MACC1
MAD2L1	MADCAM1	MADD	MAF	MAFF	MAG	MAGEA1	MAGEA10-MAGEA5
MAGEA11	MAGEA2	MAGEA4	MAGEB1	MAGEB2	MAGEB3	MAGEC1	MAGEC2
MAGED1	MAGED2	MAGEE1	MAGEF1	MAGEL2	MALT1	MAML1	MAML2
MAOA	MAOB	MAP1B	MAP1LC3A	MAP2K1	MAP2K2	MAP2K3	MAP2K4
MAP2K5	MAP2K6	MAP2K7	MAP3K1	MAP3K12	MAP3K13	MAP3K14	MAP3K2
MAP3K3	MAP3K4	MAP3K5	MAP3K8	MAP4K1	MAP7D1	MAPK1	MAPK10
MAPK11	MAPK12	MAPK13	MAPK14	MAPK3	MAPK6	MAPK7	MAPK8
MAPK8IP2	MAPK9	MAPKAPK2	MAPKAPK3	MAPK8IP2	MAPK9	MAPKAPK2	MAPKAPK3
MAPKAPK5	MAPKAPK5-AS1	MAPRE2	MAPT	MAT2A	MAX	MAZ	MBL2
MCC1	MCL1	MCM2	MCM3	MCM4	MCM5	MCM6	MCM7
MDC1	MDK	MDM2	MDM4	MECOM	MED1	MED12	MED23
MED24	MEF2C	MEIS1	MELK	MEN1	MERTK	MESP1	MET
METM	MFNG	MGA	MGAT4A	MGEA5	MGMT	MGST1	MIA
MIF	MIXL1	MK167	MKNK1	MLF1	MLH1	MLH3	MLLT3
MLLT4	MLPH	MLYCD	MME	MMP11	MMP14	MMP2	MMP3
MMP7	MMP9	MMS19	MNAT1	MOB1B	MOS	MPG	MPL
MPO	MRE11A	MRPL13	MS4A1	MSH2	MSH3	MSH4	MSH5
MSH6	MSI1	MSL2	MSN	MSR1	MST1	MST1R	MSTN
MT1A	MT1X	MT2A	MTA1	MTCP1	MTDH	MTFP1	MTHFD1
MTMR2	MTOR	MTSS1	MUC1	MUTYH	MVP	MX1	MXI1
MYB	MYBL1	MYBL2	MYC	MYCL	MYCN	MYD88	MYLIP
MYOD1	NAB2	NAIP	NAMPT	NANOG	NAP1L1	NASP	NAT1
NAT2	NAT8L	NAV2	NBN	NCAM1	NCAPD3	NCK2	NCOA1
NCOA2	NCOA3	NCOA4	NCOR1	NCOR2	NDC80	NDRG1	NEIL1
NEIL2	NEIL3	NEK2	NES	NF1	NF2	NFAT5	NFATC1
NFATC3	NFATC4	NFE2L2	NFE2L3	NFKB1	NFKB2	NFKBIA	NFKBIE
NFKBIZ	NGF	NGFR	NGFRAP1	NKD1	NKX2-1	NKX2-5	NKX3-1
NLK	NLRP3	NME1	NME7	NMU	NMT	NOD1	NOD2
NODAL	NOG	NOL3	NOLC1	NOS2	NOS3	NOCTH1	NOTCH2
NOTCH4	NOV	NOX1	NOX4	NPC1	NPM1	NPM2	NPPB
NPR1	NQO1	NROB1	NROB2	NR1H3	NR1H4	NR1I2	NR3C1
NR4A1	NR4A3	NR5A2	NR5A2	NR6A1	NRAS	NRG1	NRG2
NRG3	NRG4	NRIP1	NRP1	NRP2	NSD1	NT5E	NTF3
NTHL1	NTN3	NTRK1	NTRK2	NUDT13	NUF2	NUMB	NUMBL
NUP62	NUPR1	NUSAP1	OAS1	OASL	OAZ1	OCN	ODC1
OGG1	OLIG2	OLR1	OMD	OPCML	OR10J3	ORC6	ORM1
ORM2	OSM	OTX2	P4HA1	P4HB	PA2G4	PABPC1	PAF1
PAG1	PAICS	PAK1	PAK1IP1	PAK3	PAK7	PALB2	PALM2-AKAP2
PARK7	PARP1	PARP2	PARP3	PARP4	PAX3	PAX5	PAX6
PAX8	PBRM1	PBX1	PBX3	PCK1	PCNA	PCNX	PCOLCE
PCSK6	PDCD1	PDCD1LG2	PDGFA	PDGFB	PDGFC	PDGFD	PDGFRA
PDGFRB	PDIA4	PKD1	PKD2	PDLIM7	PDPK1	PDPN	PDZK1
PECAM1	PELP1	PER1	PEX12	PF4	PF4V1	PFDN1	PFDN2
PFKFB1	PFKFB2	PFKFB3	PFKFB4	PFKL	PGC	PGF	PGR
PHB	PHB2	PHF6	PHGDH	PIAS1	PIAS2	PIAS3	PIAS4
PIDD1	PIK3C2A	PIK3C3	PIK3CA	PIK3CB	PIK3CD	PIK3CG	PIK3R1
PIK3R2	PIK3R3	PIK3R5	PIM1	PIM2	PIM3	PIN1	PINX1
PIR	PITRM1	PITX2	PKM	PKMYT1	PKP1	PLA1A	PLA2G10
PLA2G2A	PLA2G3	PLA2G4A	PLA2G4C	PLA2G4E	PLA2G4F	PLA2G5	PLAT
PLAU	PLAUR	PLCB1	PLCB4	PLCE1	PLCG1	PLCG2	PLD1
PLEK2	PLG	PLK1	PLK2	PLK3	PLK4	PMAIP1	PMEP1
PML	PMS1	PMS2	PMS2P3	PNKP	PNPLA2	POLB	POLD1
POLD2	POLD3	POLD4	POLE2	POLL	POLR2D	POLR2H	POLR2J
PORCN	POU5F1	PPAP2A	PPAP2B	PPARD	PPARG	PPARGC1A	PPARGC1B
PPAT	PPBP	PPIA	PPIB	PPID	PPM1D	PPP1R15A	PPP2CA
PPP2CB	PPP2R1A	PPP2R1B	PPP2R2B	PPP2R2C	PPP2R4	PPP3CA	PPP3CB
PPP3CC	PPP3R1	PPP3R2	PRAME	PRC1	PRDM1	PRDM14	PRDM2
PRDX6	PRF1	PRICKLE1	PRKAA1	PRKAA2	PRKAB1	PRKAB2	PRKACA

PRKACB	PRKACG	PRKAG1	PRKAG2	PRKAG3	PRKAR1A	PRKAR1B	PRKAR2A
PRKAR2B	PRKCA	PRKCB	PRKCD	PRKCE	PRKCG	PRKCZ	PRKDC
PRKG1	PRKX	PRL	PRLR	PRMT1	PRMT6	PRMT8	PROK1
PROK2	PROM1	PRR15L	PSG2	PSIP1	PSMD2	PSMD7	PSMG1
PSRC1	PTCH1	PTCH2	PTCHD1	PTCHD2	PTCHD3	PTCRA	PTDSS1
PTEN	PTGR1	PTGS1	PTGS2	PTHLH	PTK2	PTN	PTP4A1
PTPN1	PTPN11	PTPN5	PTPRC	PTPRR	PTTG1	PTTG2	PUS1
PVR	PYCARD	PYCR1	PYGL	QDPR	QSOX2	RAB23	RAB25
RAB27B	RAB4A	RAB6B	RAC1	RAC2	RAC3	RACGAP1	RAD1
RAD17	RAD18	RAD21	RAD23A	RAD23B	RAD50	RAD51	RAD51B
RAD51C	RAD51D	RAD52	RAD54L	RAD9A	RAF1	RAG1	RALA
RAMP1	RAMP2	RAMP3	RAP1A	RARA	RARB	RASA1	RASA4
RASAL1	RASD1	RASGRF1	RASGRF2	RASGRP1	RASGRP2	RASSF1	RASSF7
RB1	RB1CC1	RBBP8	RBL1	RBL2	RBM10	RBP1	RBPJ
RBPMS2	RBX1	RECQL5	REL	RELA	RELB	RELN	REST
RET	RFC1	RFC3	RFC4	RGS2	RHEB	RHOA	RHOB
RHOU	RIF1	RIN1	RIPK1	RIPK2	RIPK3	RIT1	RND2
RNF149	RNF4	RNF43	RNH1	RORC	ROS1	RPA1	RPA3
RPL13	RPL35	RPL5	RPRM	RPS4X	RPS6KA1	RPS6KA5	RPS6KA6
RPS6KB1	RPS6KB2	RPS7	RPTOR	RRAS2	RRM1	RRM2	RRM2B
RSPO1	RSPO2	RTN1	RTN4RL1	RUNDC1	RUNX1	RUNX1T1	RUNX2
RUNX3	RUVBL1	RXRG	S100A2	S100A4	S100A6	S100A7A	S100A8
S100B	S1PR1	SACS	SAFB	SALL4	SAP30	SAV1	SCAPER
SCN1A	SCN3A	SCUBE1	SCUBE2	SEC14L2	SEC22C	SEC61G	SELE
SELM	SENP1	SERPINA3	SERPINA9	SERPINB2	SERPINB5	SERPINC1	SEPINE1
SERPINF1	SERPINB5	SERPINC1	SERPINE1	SEPIF1	SERPINH1	SERTAD1	SETBP1
SETD2	SF3A1	SF3B1	SF3B5	SFN	SFRP1	SFRP2	SFRP4
SGK1	SGK2	SH2B1	SH3PXD2A	SHC1	SHC2	SHC3	SHC4
SHH	SHMT1	SIAH1	SIL1	SIN3A	SIN3B	SIRT1	SIRT2
SIRT3	SIRT4	SIX1	SKP2	SLA	SLAMF7	SLC10A1	SLC10A2
SLC11A1	SLC15A1	SLC15A2	SLC16A1	SLC16A2	SLC16A3	SLC19A1	SLC19A2
SLC19A3	SLC22A1	SLC22A2	SLC22A3	SLC22A6	SLC22A7	SLC22A8	SLC22A9
SLC25A13	SLC25A3	SLC25A4	SLC26A2	SLC27A4	SLC28A1	SLC28A2	SLC28A3
SLC29A1	SLC29A2	SLC2A1	SLC2A13	SLC2A14	SLC2A2	SLC2A3	SLC2A4
SLC31A1	SLC38A2	SLC38A5	SLC39A6	SLC3A1	SLC3A2	SLC45A3	SLC5A1
SLC5A3	SLC5A4	SLC7A11	SLC7A5	SLC7A6	SLC7A7	SLC7A8	SLC7A9
SLCO1A2	SLCO1B1	SLCO1B3	SLCO2A1	SLCO2B1	SLCO3A1	SLCO4A1	SLIT2
SLK	SMAD1	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SMAD5	SMAD7	SMAD9
SMARCA4	SMARCB1	SMC1A	SMC1B	SMC3	SMC4	SMO	SMPDL3B
SMS	SMUG1	SNAI1	SNAI2	SNAI3	SNCA	SNRPB	SOCS1
SOCS2	SOCS3	SOCS4	SOCS5	SOD1	SOD2	SORBS1	SORD
SORT1	SOS1	SOS2	SOST	SOX10	SOX15	SOX17	SOX2
SOX3	SOX7	SOX9	SP1	SPARC	SPATA2	SPC25	SPDEF
SPEF1	SPHK1	SPI1	SPINK1	SPINK5	SPOP	SPP1	SPRY1
SPRY2	SPRY4	SQSTM1	SRA1	SRC	SREBF1	SRF	SRM
SRSF1	SRSF2	SSX1	STAB1	STAG2	STAM	STAT1	STAT2
STAT3	STAT4	STAT5A	STAT5B	STAT6	STC1	STC2	STEAP1
STEAP4	STK11	STK3	STK32A	STK36	STK39	STMN1	STRADA
STRADB	STUB1	STX11	STX1A	SUFU	SULT1A1	SULT1B1	SULT2A1
SUMO1	SUSD3	SUV39H2	SWAP70	SYCP2	SYK	SYNCRIP	SYP
T	TADA3	TAGLN	TAL1	TAP1	TAP2	TAT	TAZ
TBK1	TBL1X	TBL1XR1	TBL1Y	TBP	TBX21	TBX3	TBL1Y
TBP	TBX21	TBX3	TCF3	TCF4	TCF7	TCF7L1	TCL1A
TCL1B	TCP1	TDG	TDGF1	TEK	TEP1	TERF1	TERF2IP
TERT	TESC	TET2	TFDP1	TFDP2	TFF1	TFF3	TFPI2
TGFA	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFB1	TGFBR1	TGFBR2	THAP11
THBS1	THBS2	THBS4	THEM4	THPO	THY1	TIAM1	TICAM1
TIE1	TIFA	TIMP1	TIMP2	TIMP3	TINF2	TIPARP	TIRAP
TK1	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7
TLR8	TLR9	TLX1	TMEFF1	TMEM116	TMEM123	TMEM132A	TMEM45A
TMEM45B	TMEM57	TMEM74B	TMPRSS2	TMSB10	TNC	TNF	TNFAIP2
TNFAIP3	TNFRSF10A	TNFRSF10B	TNFRSF10C	TNFRSF10D	TNFRSF11B	TNFRSF12A	TNFRSF14

TNFRSF17	TNFRSF1B	TNFRSF21	TNFRSF25	TNFRSF4	TNFRSF8	TNFRSF9	TNFSF10
TNFSF11	TNFSF13B	TNFSF14	TNFSF5	TNFSF8	TNFSF9	TNKS	TNKS2
TNN	TNNC2	TNNI2	TNNI3	TNR	TNXB	TOLLIP	TOMM40
TOP1	TOP2A	TOP2B	TOP3A	TOP3B	TOR1A	TP53	TP53AIP1
TP53BP2	TP53I3	TP63	TP73	TPD52	TPI1	TPO	TPX2
TRADD	TRAF2	TRAF3	TRAF6	TRAF7	TREX1	TRIM28	TRIM72
TRIP13	TRIP4	TRRAP	TSC1	TSC2	TSC22D1	TSC22D3	TSHR
TSLP	TSPAN13	TSPAN14	TSPAN7	TSPYL5	TTC9	TTF1	TTK
TUBB3	TWIST1	TWIST2	TXN	TXNIP	TXNL1	TXNL4B	TXNRD1
TYK2	TYMP	TYMS	U2AF1	UBB	UBE2C	UBE2I	UBE2T
UBE2Z	UBE3A	UBXN2A	UGT1A1	UGT1A4	UGT1A6	UGT2B7	ULK1
UNG	UQCRFS1	USF1	USF2	USMG5	UTF1	UTY	VAMP8
VANGL2	VAPA	VASH1	VCAM1	VCAN	VDAC1	VDAC2	VDR
VEGFA	VEGFB	VEGFC	VGLL4	VHL	VIPR1	VPS13A	VSNL1
VTCN1	WASL	WEE1	WHSC1	WHSC1L1	WIF1	WIP1	WISP1
WISP2	WNT1	WNT10A	WNT10B	WNT11	WNT16	WNT2	WNT2B
WNT3	WNT3A	WNT4	WNT5A	WNT5B	WNT6	WNT7A	WNT7B
WNT8A	WNT8B	WNT9A	WNT9B	WT1	WWC1	WWOX	XAB2
XBP1	XCL1	XCL2	XCR1	XIAP	XPA	XPC	XRCC1
XRCC2	XRCC3	XRCC4	XRCC5	XRCC6	XRCC6BP1	YAP1	YBX3
YWHAH	YY1	ZAK	ZBTB10	ZBTB16	ZBTB32	ZEB1	ZEB2
ZFP36L1	ZFP42	ZFX	ZHX2	ZIC1	ZIC2	ZNF189	ZNF385B
ZNF420	ZNF502	ZNF552	ZNF589	ZNF805			

12.10. Anexo 10: Esquema de la relación de proyectos de colaboración establecidos en el marco del Proyecto *FGFR 360° RESISTANCE*.



12.11. Anexo 11: Publicaciones del doctorando en el área de trabajo descrita.

1. Hollebeque, A. Italiano, C. Hierro, A. Mita, A. Cervantes, N. Chan, M. Awad, E. Calvo, V. Moreno, R. Govindan, A. Spira, M. Gonzalez, B. Zhong, A. Santiago-Walker, I. Poggesi, T. Parekh, L. Sullivan-Chang, H. Xie, J. Infante, J. Tabernero. **Multicenter Phase I Study of Erdafitinib (JNJ-42756493), Oral Pan-Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor, in Patients with Advanced or Refractory Solid Tumors.** *Clin Cancer Res* 2019; 25: 4888-97.

2. MH. Voss, C. Hierro, RS. Heist, JM. Cleary, F. Meric-Bernstam, J. Tabernero, F. Janku, L. Gandhi, AJ. Iafrate, D. Borger, N. Ishii, Y. Kirpicheva, V. Nicolas-Metral, A. Pokorska-Bocci, A. Vaslin CHessex, H. Youyou, C. Zanna, K. Flaherty, J. Baselga. **A Phase I, Open-label, Multicenter, Dose-Escalation Study of the Oral Selective FGFR inhibitor Debio 1347 in Patients with Advanced Solid Tumors Harboring FGFR Gene Alterations.** *Clin Cancer Res.* 2019; 25:2699-707.

3. C. Hierro, J. Tabernero. **Chapter 5. Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) inhibitors: enhancing therapeutic strategies for solid tumors.** In: B. Bonavida, series editor; *Cancer sensitizing agents for chemotherapy.* D.E. Johnson, editor; Volume 3 *Targeting Cell Survival Pathways to Enhance Response to Chemotherapy.* San Francisco: Elsevier©; 2018. p. 102-121. (ISBN 978-0-12-816432-7).

4. C. Hierro, M. Alsina, M. Sánchez-Guixé, V. Serra, J. Rodón, J. Tabernero. **Targeting the fibroblast growth factor receptor 2 in gastric cancer: promise or pitfall?.** *Ann Oncol* 2017 Jun 1;28(6):1207-1216.

5. C. Hierro, J. Rodón, J. Tabernero. **FGFR/FGF Inhibitors: Novel targets and strategies for response in solid tumors.** *Semin Oncol* 2015 Dec;42(6):801-819.

Abstracts presentados en congresos nacionales e internacionales:

2020 Targeted Anticancer Therapies (TAT) ESMO meeting. Paris (Francia).

- Póster (abstr-29P): **FGFR1-4 high mRNA expression (mRNAh) as predictive biomarker for FGFR inhibitors in breast cancer (BC).** (*Ann Oncol*, vol 31, suppl 1, 2020:S13-S15; DOI: 10.1016/annonc/annonc83).
- Autores: C. Hierro, M. Sánchez-Guixé, J. Jiménez, E. Garralda, C. Saura, P. Nuciforo, A. Vivancos, J. Tabernero, J. Rodon, V. Serra.

2019 International Association for Breast Cancer Research Conference (IABCR). Egmond aan Zee (Holanda).

- Póster: **High mRNA expression (mRNAh) of FGFR1-4 sensitize for selective FGFR inhibitors (FGFRinh) in Breast Cancer (BC) PDXs.**
- Autores: M. Sánchez-Guixé, C. Hierro, E. Monelli, F. Brasó-Maristany, M. Parés, M. Guzmán, J. Grueso, O. Rodríguez, J. Jiménez, M. Scaltriti, A. Vivancos, A. Prat, C. Saura, P. Nuciforo, O. Casanovas, M. Graupera, J. Rodon, V. Serra.

2018 ESMO Asia Annual Meeting. Singapur (Singapur).

- Mini-oral (abstr-155O): **Efficacy of TAS-120, an Irreversible Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor (FGFRi), in Patients With Cholangiocarcinoma and FGFR Pathway Alterations Previously Treated With Chemotherapy and Other FGFRi.** (*Ann Oncol*, vol 29, suppl 9, 2018; DOI: 10.1093/annonc/mdy432).

- Autores: B. Tran, F. Meric-Bernstam, H.T. Arkenau, R. Bahleda, R. Kelley, C. Hierro, D. Ahn, A. Zhu, M. Javle, R. Winkler, H. He, J. Huang, L. Goyal.

2018 ESMO XX World Congress on Gastrointestinal Cancer. Barcelona (España).

- Oral (O-001): **Efficacy of TAS-120, an irreversible fibroblast growth factor receptor (FGFR) inhibitor, in cholangiocarcinoma patients with FGFR pathway alterations who were previously treated with chemotherapy and other FGFR inhibitors.** (*Ann Oncol*, vol 29, suppl 5, 2018; DOI: 10.1093/annonc/mdy149).
- Autores: FM. Bernstam, HT. Arkenau, B. Tran, R. Bahleda, RK. Kelley, C. Hierro, DH. Ahn, AX. Zhu, M. Javle, R. Winkler, H. He, J. Huang, L. Goyal.

2018 AACR Annual Meeting. Chicago (E.U.A).

- Póster (abstr-CT121): **Phase I study of TAS-120, a covalently bound FGFR inhibitor, in patients with advanced solid tumors.** (*Cancer Res*, vol 78, suppl 13, 2018; DOI: 10.1158/1538-7445.AM2018-CT121).
- Autores: R. Bahleda, F. Meric-Bernstam, L. Goyal, B. Tran, H. He, R. Winkler, C. Hierro, HT. Arkenau.

2018 ASCO Gastrointestinal Meeting. San Francisco, California (E.U.A).

- Póster (abstr-447): **Safety and efficacy of the selective FGFR inhibitor Debio1347 in phase 1 study with FGFR genomically activated advanced biliary tract cancer (BTC).** (*J Clin Oncol*, vol 36, suppl 4, 2018; DOI: 10.1200/jco.2018.36.4_suppl.447).
- Autores: JM. Cleary, MH. Voss, F. Meric-Bernstam, C. Hierro, RS. Heist, N. Ishii, Y. Kirpicheva, V. Nicolas-Metral, A. Pokorska-Bocci, A. Vaslin, W. Venetz, C. Zanna, K. Flaherty, J. Tabernero, J. Baselga.

2017 ESMO Annual Meeting. Madrid (España).

- Póster (abstr-1635P): **FGFR 360° RESISTANCE: establishing a translational research framework in FGFR-altered (FGFRalt) patients (pts) treated with fibroblast growth factor receptor inhibitors (FGFRinh).** (*Ann Oncol*, vol 28, suppl 5, 2017; DOI: 10.1093/annonc/mdx390.007).
- Autores: C. Hierro, M. Sánchez-Guixé, F. Ruiz-Pace, J. Jiménez, L. Maynes, A. Azaro, J. Martin-Liberal, M. Ochoa de Olza, I. Braña, M. Vieito, A. Villanueva, H.G. Palmer, J. Arribas, P. Nuciforo, A. Vivancos, E. Garralda, R. Dienstmann, J. Tabernero, V. Serra, J. Rodon.

2017 ASCO Annual Meeting. Chicago (E.U.A).

- Oral (abstr-2500): **Debio1347, an oral FGFR inhibitor: Results from a first-in-human phase I dose-escalation study in patients with FGFR genomically activated advanced solid tumors.** (*J Clin Oncol*, vol 35, suppl 15, 2017; DOI: 10.1200/jco.2017.35.15_suppl.2500).
- Autores: MH. Voss, C. Hierro, RS. Heist, JM. Cleary, F. Meric-Bernstam, L. Gandhi, N. Ishii, Y. Kirpicheva, V. Nicolas-Metral, A. Pokorska-Bocci, D. Purcea, A. Vaslin, C. Moulon, C. Zanna, K. Flaherty, J. Tabernero, J. Baselga.

2017 ASCO Annual Meeting. Chicago (E.U.A).

- Póster (abstr-2581): **Molecular markers predicting response to selective Fibroblast Growth Factor Receptor inhibitors (FGFRinh) in patients (pts) with FGFR-amplified (amp) or mutated (mut) tumors.** (*J Clin Oncol*, vol 35, suppl 15, 2017; DOI: 10.1200/jco.2017.35.15_suppl.2581).
- Autores: C. Hierro, M. Serrano, F. Ruiz-Pace, J. Martin-Liberal, M. Ochoa de Olza, A. Azaro, I. Brana, M. Vieito, M. Alsina, JM Perez Garcia, H. Verdaguer, T. Macarulla, M. Sanchez, V. Serra, P. Nuciforo, A. Vivancos, E. Garralda, R. Dienstmann, J. Tabernero, J.

Rodon.

2017 ASCO Annual Meeting. Chicago (E.U.A).

- Póster (abstr-TPS2616): **A phase 1, multicenter, dose-escalation study of PRN1371, an irreversible covalent FGFR1-4 kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors, followed by expansion cohorts in patients with FGFR genetic alterations.** (*J Clin Oncol*, vol 35, suppl 15, 2017; DOI: 10.1200/jco.2017.35.15_suppl.TPS2616).
- Autores: SA. Piha-Paul, C. Hierro, V. Boni, V. Moreno, NM. Hahn, R. Lynn Bitting, T. Michael Bauer, RR. Aggarwal, S. Gourlay, P. Smith, E. Venetsanakos, F. Meric-Bernstam, K. Brameld, D. Karr, J. Tabernero.

2017 ASCO Annual Meeting. Chicago (E.U.A).

- Póster (abstr-4074): **Safety and Activity of the Pan-Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Inhibitor Erdafitinib in Phase 1 Study Patients (Pts) with Molecularly Selected Advanced Cholangiocarcinoma (CCA).** (*J Clin Oncol*, vol 35, suppl 15, 2017; DOI: 10.1200/jco.2017.35.15_suppl.4074).
- Autores: JC. Soria, JH. Strickler, R. Govindan, S. Chai, N. Chan, V. Quiroga-Garcia, R. Bahleda, C. Hierro, B. Zhong, M. Gonzalez, AE. Santiago-Walker, TV. Parekh, FR. Luo, L. Sullivan-Chang, H. Xie, J. Tabernero.

2017 ASMS Conference on Mass Spectrometry and allied topics. Indianapolis (E.U.A).

- Póster (abstr-289996): **Quantification of FGFR protein expression in solid tumors by targeted mass spectrometry and correlation with FGFR gene amplification status.**
- Autores: A. Chambers, S. Schwartz, Y. Tian, R. Fasani, M. Díaz Delgado, C. Hierro, J. Rodon, S. Sellappan, F. Cecchi, S. Benz, T.

Hembrough, P. Nuciforo.

2016 San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, Texas (E.U.A).

- Póster (abstr-P6-07-16): **Quantitative proteomic analysis of FGFR by mass spectrometry may improve identification of FGFR amplified tumors sensitive to inhibitor therapy.** (*Cancer Res*, vol 77, suppl 4, 2015; DOI: 10.1158/1538-7445. SABCS16-P6-07-16).
- Autores: S. Schwartz, Y. Tian, R. Fasani, MD. Delgado, C. Hierro, J. Rodon, S. Sellappan, F. Cecchi, T. Hembrough, P. Nuciforo.

2016 ASCO Annual Meeting. Chicago (E.U.A).

- Póster (abstr-TPS2602): **A phase 1, multicenter, dose escalation study of PRN1371, an irreversible covalent FGFR1-4 kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors, followed by expansión cohorts in patients with FGFR genetic alterations.** (*J Clin Oncol*, vol 34, suppl 15, 2016; DOI: 10.1200/jco.2016.34.15_suppl.TPS2602).
- Autores: SA. Piha-Paul, C. Hierro, JO. Funk, S. Gourlay, P. Smith, E. Venetsanakos, F. Meric-Bernstam, J. Tabernero.

2015 18th ECCO - 40th ESMO European Cancer Congress. Viena (Austria).

- Póster (abstr-3032A): **Activity and safety profile of lucitanib in patients with advanced thymic epithelial tumours.** (*Eur J Cancer*, vol 51, suppl 3, 2015; DOI: 10.1016/S0959-8049(16)31675-6).
- Autores: B. Besse, A. Gazzah, N. Girard, C. Hierro, E. Felip, F. DeBraud, G. Camboni, F. Dubois, C. Leger, F. Legrand, R. Robert, P. Therasse, JC. Soria.

2015 IASCL, 16th World Conference on Lung Cancer. Denver, Colorado (E.U.A).

- Oral (Mini 25.07-ID 2153): **Clinical activity of lucitanib in patients with advanced thymic epithelial tumors.**

- Autores: B. Besse, A. Gazzah, N. Girard, C. Hierro, J. Tabernero, F. DeBraud, G. Camboni, F. Dubois, C. Leger, F. Legrand, R. Robert, P. Therasse, J.C. Soria.

2015 ASCO Annual Meeting. Chicago (E.U.A).

- Póster (abstr-2540): **Preliminary clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of Debio1347 (CH5183284), a novel FGFR inhibitor.** (*J Clin Oncol*, vol 33, suppl 15, 2015; DOI: 10.1200/jco.2015.33.15_suppl.2540).
- Autores: C. Zanna, A. Vaslin, M. Henner Voss, R.S. Heist, C. Hierro, J.G. Supko, K. Nakai, N. Ishii, A. Menetrey, M.C. Roubaudi-Fraschini, J. Cordier, J. Douchain, V. Nicolas-Metral.

