

ESTUDIO PARA LA INDIVIDUALIZACIÓN DEL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON TUMORES SÓLIDOS AVANZADOS RESISTENTES A TRATAMIENTO ESTÁNDAR E IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS DE SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA A FÁRMACOS ANTIDIANA E INMUNOTERAPIA EN FASE DE DESARROLLO PRECOZ

INVESTIGADORA PRINCIPAL: DRA. VALENTINA BONI

RESUMEN (Objetivos y Metodología del Proyecto)

El mejor conocimiento de las características moleculares del cáncer ha permitido avances extraordinarios en el manejo de esta enfermedad. Los llamados agentes antidiانا (AAD) constituyen una nueva familia de agentes diseñados para bloquear o inactivar químicamente a la molécula diana identificada con el objetivo de destruir la célula cancerosa o de impedir su crecimiento.

Hasta hace pocos años, tan sólo teníamos los fármacos antineoplásicos clásicos (quimioterapia), que atacaban a las células de una manera poco selectiva, reconocían sólo a las células que se multiplicaban con rapidez y las destruían, ocasionando gran toxicidad en aquellos tejidos con gran proliferación: cabello, piel y mucosas, y médula ósea.

Los AAD son fundamentalmente anticuerpos monoclonales o moléculas pequeñas diseñados contra una diana específica que actúan contra el tumor a distintos niveles. Numerosos AAD han demostrado importante eficacia clínica y han cambiado la historia de la enfermedad, algunos ejemplos son el imatinib para la Leucemia Mieloide Crónica, el trastuzumab (antiHER2) en el tratamiento de cáncer de mama. Sin embargo, y a pesar del enorme esfuerzo realizado hasta la fecha, son muy pocas las dianas identificadas sobre las que podemos actuar de una forma eficaz.

Una de las principales razones para este relativo fracaso es la distancia que suele separar las grandes iniciativas de carácter básico, como el TCGA (del inglés The Cancer Genome Atlas), de los ensayos clínicos y los nuevos compuestos en estudio. Aunque cada vez es más frecuente que los ensayos con fármacos lleven asociados análisis moleculares, estos pertenecen exclusivamente al laboratorio que desarrolla una sustancia concreta, careciéndose por tanto de un conocimiento transversal de mecanismos de sensibilidad y resistencia que puedan afectar a familias enteras de compuestos.

Disponiendo de un entorno privilegiado, como una de las mayores unidades de ensayos clínicos de fase 1 del país, con más de 30 estudios clínicos activos, pensamos que es clave la individualización del tratamiento en pacientes con tumores sólidos avanzados, resistentes a tratamientos convencional. Para ello, proponemos llevar a cabo un proyecto para el análisis molecular de dichos tumores y selección del tratamiento, además de poder utilizar estudios "omicos" para el descubrimiento sistemático de factores moleculares de sensibilidad y resistencia a sustancias antitumorales en estudio.

Esto nos permitirá ofrecer nuevas opciones de tratamiento a nuestros pacientes y además con la estrecha colaboración de centros básicos de primer nivel podremos obtener un

conocimiento original y único capaz de incidir de forma directa en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de nuestros pacientes.

El cáncer es una de las enfermedades más letales en nuestro país siendo responsable, aproximadamente, de un tercio de los fallecimientos anuales. (1) A parte del coste humano, esta patología lleva asociada un importante consumo de recursos económicos y un elevado impacto social al afectar no solo al propio paciente sino a todo su entorno.

A pesar de su complejidad, el mejor conocimiento de las bases moleculares del cáncer, ha permitido avances extraordinarios en su manejo. Así, la identificación de las alteraciones en el gen c-kit como verdaderos “driver” moleculares en los tumores GIST (del inglés GastroIntestinal Stromal Tumors) dio lugar, hace más de una década, al desarrollo de la primera terapia antidiaria, imatinib, en tumores sólidos.(2) A este descubrimiento inicial, le han seguido otros tan relevantes como las alteraciones del gen c-erb2 en cáncer de mama y gástrico, las mutaciones activantes del gen EGFR y las traslocaciones del gen ALK en cáncer de pulmón, las mutaciones de los genes BRCA en cáncer de ovario y próstata y las mutaciones del gen BRAF en melanoma. (3-9) Todos ellos representan ejemplos de cómo el desarrollo racional de nuevos fármacos debe estar guiado por adecuados trabajos moleculares, que permitan seguir progresando en terapias cada vez más específicas en pacientes mejor seleccionados. Sin embargo, aún son mayoría los casos en los que no identificamos ninguna de estas dianas y deben ser tratados de forma “empírica” con agentes citotóxicos como la quimioterapia.

Desgraciadamente, grandes iniciativas de carácter básico como el TCGA (del inglés The Cancer Genome Atlas), en el que se estudiaron de forma sistemática y mediante diversas plataformas “ómicas” miles de tumores sólidos, no han servido para cambiar esta situación. (10)

Más interesantes, desde el punto de vista práctico, han sido los trabajos realizados sobre pacientes concretos expuestos a terapias antidiaria en los que profundos estudios moleculares aportaron información clave sobre mecanismos de sensibilidad y resistencia a dichos fármacos. Probablemente, uno de los mejores ejemplos sea el publicado por Wagle et al en New England Journal of Medicine en 2014. (11) En este artículo, el estudio de un único paciente con cáncer tiroideo que había progresado tras una respuesta excepcional a everolimus, fármaco inhibidor de mTOR, permitió identificar tanto la razón de dicha sensibilidad extrema (una mutación inactivante en el gen TSC2) como la causa de la resistencia posterior (una mutación activante de mTOR). En una línea similar, los estudios moleculares realizados sobre pacientes con cáncer de pulmón tratados con fármacos inhibidores de EGFR o ALK no solo han permitido identificar los factores de resistencia a los compuestos de primera generación sino desarrollar fármacos segunda y tercera generación para poblaciones específicas. (12-14) De hecho, se han llegado a identificar mutaciones concretas capaces de “resensibilizar” un tumor a la terapia original. (15)

Este enfoque, más exitoso desde el punto de vista clínico que los “monumentales” trabajos básicos como el TCGA, han convertido en rutina la obtención de muestras biológicas de pacientes incluidos en ensayos clínicos con nuevos fármacos en oncología.

Sin embargo, estas muestras generalmente tienen como destino el propio laboratorio farmacéutico que desarrolla una sustancia concreta. Así, los resultados obtenidos de los

estudios moleculares muchas veces no son comunicados, especialmente si el compuesto finalmente no adquiere interés comercial.

Otro inconveniente de esta situación es la “compartimentalización” del conocimiento. Así, aunque es habitual que diferentes empresas trabajen con sustancias similares, pertenecientes a una misma “familias” farmacológica, dado que cada una desarrollará sus propios estudios moleculares, es probable que la experiencia que se alcance sea limitada y “parcheada”. Por tanto, no podemos en muchos casos alcanzar unas conclusiones comunes y homogéneas.

En un intento por paliar esta situación se están llevando a cabo iniciativas como el estudio “Molecular Profiling in Tissue Samples From Patients With Cancer Who Are Exceptional Responders to Treatment” NCT02243592 promovido por el NCI (National Cancer Institute) de Estados Unidos que permite realizar estudios “ómicos” a pacientes que presentaron respuestas excepcionales al tratamiento y cuyo mecanismo se desconozca. (16)

Aunque interesante, éste modelo solo permite estudiar el contexto molecular de la respuesta y no de las resistencias (campo fundamental para conseguir nuevos avances en las terapias oncológicas). Por otra parte, al no incluir poblaciones concretas de forma sistemática, será muy difícil extrapolar sus resultados a la población general.

Por último, cabe destacar cómo el desarrollo de toda una nueva generación de medicamentos (los nuevos inmunoterápicos) está siguiendo el mismo patrón. Así, se repite el mismo fenómeno, careciendo por tanto de predictores moleculares comunes de actividad. Este problema podría ser más relevante en el futuro próximo si, como parece, los esquemas de combinación son finalmente considerados más activos.

Dado que las unidades de Fase I son el primer lugar donde estas combinaciones están siendo probadas, parecen el lugar idóneo para una rápida detección de factores predictivos de respuesta y toxicidad.

Nuestro proyecto propone emplear estudios moleculares para analizar los tumores de pacientes y determinar si tienen anomalías genéticas para las cuales existen medicamentos dirigidos (es decir “mutaciones viables o sobre las que se puede actuar”) y asigna el tratamiento según esa anomalía. Sobre la base de la anomalía genética detectada en el tumor se elegirá un específico ensayo clínico. En nuestra Unidad disponemos de un amplio port folio de ensayos clínicos con nuevas drogas. Esto nos permitirá de seleccionar en base al estudio genético el mejor ensayo para cada paciente. En primer lugar, se examinarán las muestras de tumores sobre las cuales se llevará a cabo un estudio de secuenciación del ADN, inmunohistoquímica (IHC) y de Fluorescencia in situ (FISH). En el caso en el cual se obtenga suficiente material se llevarán a cabo estudios “ómicos” (non solo de secuenciación como también metilación y expresión génica). Adicionalmente de forma sistemática se recogerán muestras de sangre y de tumor en puntos claves de la historia clínica del paciente, como antes de empezar el tratamiento, en la mejor respuesta y a la progresión. Las biopsias de tumor se efectuarán solo en los casos estén previstas por el ensayo en el cual el paciente participa y/o bien porque se han considerado clínicamente necesarias.

Esta propuesta, única y original, permitirá identificar de forma precoz nuevos mecanismos de sensibilidad y resistencia a familias de fármacos con mecanismos de acción similares independientemente de quién sea el promotor de cada ensayo particular y individualizar el tratamiento por cada uno de nuestros pacientes.

De forma resumida, se propondrá a cada paciente candidato a ser incluido en ensayo en nuestra unidad, la posibilidad de donar muestras de sangre y tumor para el presente estudio. En los casos en que por protocolo o necesidad asistencial se requiera una nueva biopsia se proporcionará la posibilidad de donar el excedente de tejido de dicha biopsia. Sobre dichas muestras se empleará una amplia batería de estudios “ómicos” que serán llevados a cabo por colaboradores básicos de primer nivel con los que nuestro grupo trabaja desde hace años.

La interpretación de los resultados se realizará mediante adecuados estudios de bioinformática, capaces de integrar las distintas plataformas, agrupando los resultados en rutas comunes y mecanismos de resistencia con un racional molecular común.

En definitiva, proponemos acercar la investigación básica al desarrollo de fármacos en etapas tempranas como la mejor forma de identificar precozmente tanto mecanismos de sensibilidad como de resistencia a familias de fármacos antitumorales.

Estos hallazgos permitirían no solo guiar el diseño de sustancias nuevas, capaces de vencer las resistencias, sino seleccionar mejor los pacientes candidatos por ser portadores de factores de sensibilidad previamente desconocidos.

Como conclusión proponemos una nueva aproximación a las nuevas terapias en oncología, que permita un conocimiento transversal de los mecanismos de sensibilidad y resistencia, partiendo directamente de pacientes reales en tratamiento.

De esta manera acortaremos la separación entre ciencia básica y práctica clínica y avanzaremos de forma ágil hacia la individualización de los tratamientos en oncología.

HIPÓTESIS

El estudio sistemático de muestras biológicas (tejido tumoral) procedentes de pacientes incluidos en ensayos clínicos Fase I, permitirá individualizar el tratamiento para cada paciente e identificar mecanismos de sensibilidad y resistencia comunes a fármacos de una misma familia terapéutica. Esta estrategia será válida tanto para fármacos antitumorales como para los nuevos inmunoterápicos.

Para ello se buscarán marcadores capaces de definir el complejo sistema “tumor-huésped” y su interacción con nuevos fármacos.

En primer lugar, se caracterizará el tumor desde el punto de vista molecular antes del tratamiento, esto incluirá estudio genómico, de expresión y de proteínas tanto en el tumor que en tejido/fluidos periféricos.

En segundo lugar, se caracterizará el huésped (paciente) en el cual se llevarán a cabo estudios de farmacogenómica ADN germinal (extraído de sangre periférica) dará igualmente lugar a la identificación de variantes germinales en línea germinal (polimorfismos) al fin de definir las capacidades metabólicas y el estado inmunológico de cada paciente.

OBJETIVOS

Objetivo primario

Identificar, mediante el empleo sistemático de tres plataformas “ómicas” (Next Generation Sequencing [Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology)] para estudio del exoma, Infinium Methylation EPIC bead chip para el estudio del metiloma y paneles GX Human Immunology V2 y Pancancer, de Nanostring Inc Nanostring para estudios de expresión de RNA) y el análisis bioinformático integrativo correspondiente, alteraciones moleculares que estén presentes de forma diferente en casos respondedores y resistentes a fármacos antitumorales e inmunoterapia en cáncer.

Objetivo secundario

Identificar, mediante estudios de secuenciación del exoma (Next Generation Sequencing [Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology)]) variantes en línea germinal (polimorfismos/SNPs) asociados a toxicidad por fármacos antitumorales e inmunoterapia en cáncer.

DISEÑO: estudio observacional prospectivo de identificación de factores moleculares.

Serán incluidos todos los pacientes atendidos en la unidad de ensayos Fase I START del Hospital Madrid Norte Sanchinarro que se consideren elegibles para algún ensayo clínico con terapias antitumorales o inmunoterapia.

Se espera un reclutamiento de 75 casos/ año, estando previstos dos años de reclutamiento.

El presente estudio consta de 3 Etapas:

- 1) Recogida de datos y muestras: en esta fase se realizará una base de datos que contenga las características clínicas y moleculares de cada paciente. Además, se obtendrá un biobanco de muestras de tumor y/o fluidos de cada paciente.
- 2) Análisis “omica”: en esta fase se obtendrán la caracterización molecular del tumor y del “huésped” en pacientes extremos seleccionados en base a respuesta y/o toxicidad. En concreto se estudiarán, utilizando tecnología “omica”, las características moleculares del tumor y del “huésped” que puedan explicar la respuesta, las toxicidades, la resistencia primaria y secundaria a fármacos en desarrollo clínico de fase 1.
- 3) Análisis del impacto de dichos marcadores en el desarrollo de los fármacos y en la selección de los pacientes que participan en ensayo clínico de fase 1.

Reclutamiento de pacientes

Pacientes con diagnóstico de cáncer a los que se les considera candidatos a ensayo de fase 1 y son valorados en la Unidad de START Madrid en el Centro Integral Oncológico Clara Campal y finalmente participan en un ensayo de fase 1. Todos los pacientes incluidos firmarán consentimiento informado específico. Dichos pacientes se considerarán elegibles para el estudio si cumplen con los criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión

- Edad ≥ 18 años
- Firma de consentimiento informado
- Diagnóstico de cáncer confirmado histológicamente
- Posibilidad y voluntad de cumplir con los procedimientos del ensayo
- Criterios de exclusión
- No disponibilidad de tejido para realizar el estudio
- Incapacidad para proveer consentimiento informado

El estudio se llevará a cabo según los principios de experimentación humana establecidos en la Declaración de Helsinki. En todos los casos, se obtendrá el consentimiento informado del paciente tras una entrevista personal donde se le informará verbalmente y por escrito de los potenciales riesgos de los procedimientos de ensayo.

Recogida de datos clínicos

Los datos clínicos de la cohorte prospectiva se recogerán mediante un CRD electrónico, que será diseñado por la investigadora principal (IP) del estudio (Dra. Valentina Boni).

Se creará una base de datos anonimizada con un código propio del estudio, en la que se recogerán las siguientes variables clínicas: Edad, diagnóstico oncológico (Tumor en el que se realiza el estudio, incluyendo histología, breve descripción del fenotipo y estadio), tratamiento

recibido y respuesta a tratamiento previos, fármacos concomitantes, mecanismo de acción del fármaco de fase 1 que van a recibir, toxicidades clínicamente significativas desarrolladas durante dicho tratamiento, respuesta obtenida con dicho tratamiento, carga tumoral, tiempo libre de progresión y supervivencia global.

La base de datos se registrará en la Agencia Española de Protección de datos, de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos.

A partir de esta base de datos seleccionaremos los pacientes con respuestas extremas y/o con toxicidades importante.

La toxicidad se evaluará según los criterios establecidos en el National Cancer Institute Common Toxicity Criteria, versión 4.0.

La evaluación de la eficacia se efectuará en base a los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos, tales como respuesta completa, respuesta parcial, no cambio o tiempo hasta progresión de la enfermedad serán las principales variables dependientes del estudio y se evaluarán según el RECIST y irRECIST. Se realizarán las pruebas de imágenes según práctica clínica habitual en ensayos clínicos de fase 1 (antes de recibir el tratamiento y se repetirá cada 6-8 semanas) y/o cuando considerado clínicamente necesario. La tasa de respuestas objetivas y la duración de la respuesta, limitada a aquellos pacientes con enfermedad medible, se realizará de acuerdo a los criterios WHO. El tiempo hasta la progresión se controlará desde el momento de la administración de los fármacos hasta la progresión de la enfermedad. El tiempo de supervivencia global se calculará desde la administración del fármaco hasta la muerte.

1) **Muestras de sangre:**

Después de obtener el consentimiento informado, se obtendrán muestras de sangre de los pacientes antes de comenzar tratamiento (muestra C1D1), 28 días después del inicio del tratamiento (C1D28), a la progresión, y en el caso en el cual el paciente desarrolla una toxicidad relevante secundaria al tratamiento (definida como cualquier toxicidad que determine interrupción en la administración del fármaco durante más de 2 semanas y/o considerada G3 o G4 por CTCAE v 4.0). Se recogerán 30 mL de sangre periférica de cada paciente en cuatro tubos: tres de EDTA o heparina y uno para extracción de ARN.

La sangre se utilizará para inmunofenotipado, genotipado de HLA, determinación de biomarcadores solubles y secuenciación masiva (incluido el análisis de SNPs). También para la extracción de ARN y análisis de las muestras mediante la plataforma nanostring con la tecnología nCounter.

En los casos en que se prevea emplear inmunoterapia, se realizará el inmunofenotipado de las muestras de sangre. Se determinará para ello la proporción de diferentes poblaciones de linfocitos y los niveles de expresión de los marcadores de coestimulación de las células T en preparados de sangre periférica mediante citometría de flujo. Los análisis pueden incluir, pero no estar limitados a, las proporciones de células T, B y células NK, proporción de células T efectoras y de memoria y los niveles de expresión de PD-1, PD-L1, PD-L2, ICOS, and Ki67.

Además, se tratará de cuantificar las células MDSC antes y después del tratamiento. También se solicitará el genotipado de los HLA mediante técnicas de laboratorio estándar. Los biomarcadores solubles, como citoquinas, receptores solubles y antígenos de tumor se caracterizarán y se cuantificarán en suero. Los análisis incluirán, pero no estarán limitados a, CD25 soluble, PD-1 soluble, LAG-3 soluble y CXCL-9. Las muestras de suero también se pueden utilizar para la determinación de las respuestas específicas de antígeno del tumor y explorar así cuales son los anticuerpos antitumorales más asociados a la respuesta clínica. Los niveles de anticuerpos se determinarán mediante ensayos de multiplexing y ELISAs.

2) Muestras de tumor:

Las muestras de tumor corresponderán a muestras de archivo o bien de biopsias recogidas a la progresión del paciente (siempre y cuando sean realizadas como parte de la práctica asistencial o hayan sido exigidas por el correspondiente ensayo clínico, generándose un remanente de tejido).

Las muestras de tumor (parafinadas o frescas) se cortarán en secciones de 2-4 um para su tinción con eosina y hematoxilina que permitirán la identificación de la zona tumoral y no tumoral dentro del bloque. Las demás secciones se utilizarán para teñir mediante inmunohistoquímica para diferentes anticuerpos. En los casos en que se prevea utilizar inmunoterapia también determinaremos la presencia y composición de subpoblaciones de TILs (linfocitos infiltrantes de tumor), empleando marcadores de células T y marcadores de macrófagos.

Dos patólogos independientes analizarán las muestras así procesadas y las discrepancias se solucionarán mediante discusión entre ambos.

En todos los casos se realizará un proceso de doble disociación que garantice que la muestra continúe anónima. De esta forma los investigadores básicos no conocerán los resultados clínicos y se garantizará la objetividad del estudio y el anonimato de los casos.

Se aislará ADN de las zonas tumoral y no tumoral identificados para realizar la evaluación de mutaciones somáticas, neoepítomos y metilaciones. El ADN se procesará de forma similar a la descrita en el apartado anterior utilizando los kits de extracción adecuados para muestras parafinadas o para congeladas según proceda.

Identificación de variantes genéticas germinales asociadas a la respuesta por inmunoterapia. Para esta identificación se utilizará el ADN aislado de sangre periférica. La secuenciación del exoma completo (WES, Whole exome sequencing) para la identificación de las variantes codificantes se realiza usando 5-6 µg del ADN aislado de la sangre de cada paciente. Brevemente, después de la fragmentación de ADN, el exoma se capturará con el sistema SureSelect (Human All Exon V5, Agilent Technology). El tamaño y la concentración de la librería se determinará mediante su análisis en un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology) y la secuenciación del exoma se realizará con una cobertura media de >50X usando HiSeq2000 (Illumina) con la tecnología de paired-end de 75-pb.

El análisis de imagen se hará mediante el software de análisis de Illumina "Real Time Analysis", y los programas GEM y BFAST, para el alineamiento de las secuencias del genoma humano. La identificación de variantes de nucleótido único (SNVs, Single Nucleotide variants) y los "indels" serán realizados mediante el programa SAMtools. El filtrado de variantes, selección de candidatos y análisis de datos se realizará de manera similar, basándonos en nuestras experiencias previas en este tipo de estudios.

Mediante el estudio de eQTL (expression Quantitative Trait Loci) en los genes diana de los fármacos, identificaremos variantes reguladoras. Los genes codificantes para PD1 y PDL1 están muy conservados y admiten pocos cambios que afecten a la proteína (ver por ejemplo el Exome Variant Server). Por tanto, las variantes que afectan a la expresión génica pueden tener una relevancia especial. Para identificar los eQTLs usaremos bases de datos libres (como por ejemplo la del Wellcome Trust sobre la variación en la expresión génica). Seleccionaremos 10-15 variantes independientes en los genes diana y otras proteínas reguladoras que pueden ser clave en el sistema inmune para un genotipado posterior. El genotipado se hará con sondas fluorescentes tipo Taqman en el Detection System 7900HT (Applied Biosystems) usando un total de 200 ng de ADN para cada muestra. La asociación de las variantes identificadas en líneas germinales con la respuesta a tratamiento se realizará usando el correspondiente análisis estadístico corregido para las variantes clínicas más relevantes.

Metiloma

Los estudios de metilación se llevarán a cabo con el Infinium Methylation EPIC bead chip que interroga más de 850.000 CpGs y proporciona una cobertura inigualable de islas CpG, genes refseq, cromatina abierta (ENCODE), sitios de unión de factores de transcripción (ENCODE) y potenciador FANTOM5. Los resultados son un "pan-enhacer" y regiones codificantes del metiloma que puede ser utilizado para los EWAS (Epigenome Wide Associations Studies). En los casos que reciban inmunoterapia se compararán los niveles de los patrones de metilación entre linfocitos T infiltrantes y periféricos y se analizará su relación con los resultados de los tratamientos administrados.

Análisis del transcriptoma

El ARN aislado del tumor y la sangre periférica se analizará utilizando el GX Human Immunology V2 y Pancancer, ambos Kits de Nanostring Inc para determinar después del análisis de los resultados cuales son los genes que se expresan. Esta tecnología ha sido elegida por su reproductibilidad, punto clave para una potencial implementación en la práctica asistencial.

Evaluación de mutaciones somáticas y neoepítomos

Para esta evaluación se utilizará el ADN aislado de zonas tumorales y no tumorales de las muestras de tejido. El procesamiento de las muestras y el WES se realizará usando kits y protocolos similares a los descritos en las secciones anteriores.

Los datos de las mutaciones obtenidos de la secuenciación del exoma de las muestras tumorales llevará al descubrimiento de las potenciales mutaciones "driver" que contribuyen a

la patogenia del cáncer renal incluyendo dianas para terapia conocidas o en proceso de descubrimiento.

Clasificaremos las muestras de acuerdo con el número de mutaciones en las zonas de codificación de proteínas seleccionando las mutaciones que sean no sinónimas, de ruptura de marco de lectura o sin sentido. Anotaremos las consecuencias de estas mutaciones usando el software "Variant effect Predictor" de Ensemble y aplicaremos las diferentes metodologías computacionales para evaluar el impacto funcional de cada mutación como SIFT, Mutation Assessor, Polyphen y CONDEL y predecir si una determinada alteración es patogénica.

Haremos esto para cada muestra por separado. También aplicaremos métodos para identificar mutaciones "driver" para cáncer (MuSiC, OncodriveFM, OncodriveCLUST and ActiveDriver) de la misma forma presentada en el análisis en Pan-Cancer (Tamborero et al. Sci Rep.2013).

Para identificar neoepítomos, incorporaremos predicciones bioinformáticas de la unión de MSC class I, modelos de la unión con el receptor de las células T, análisis dependiente de paciente del tipo específico de HLA y análisis de homología de epítomos.

Análisis de datos

Los datos generados en este estudio serán analizados por la unidad de bioestadística del CNIO. De forma resumida: En primer lugar, se realizará un análisis descriptivo de la población del estudio. Se establecerán las frecuencias de distribución e intervalos de confianza al 95% de las variables cualitativas. Se determinarán medidas de tendencia central (media y mediana) así como de dispersión (desviación estándar y varianza) para variables cuantitativas. Se realizarán estudios de normalidad para toda variable cuantitativa.

En una segunda fase se realizará un análisis por subgrupos, comparando las variables en cada subpoblación con la población global del estudio y entre ellas. Se aplicará el test de la Chi-cuadrado para variables cualitativas, T de Student para las cuantitativas y análisis de la varianza (ANOVA) para variables cuantitativas con más de dos grupos. La correlación entre variables cuantitativas será determinada mediante el coeficiente de Pearson. En el caso de variables cuantitativas que no sigan una distribución normal, se emplearán los correspondientes test no paramétricos. La supervivencia global y libre de progresión se estudiarán mediante las curvas de Kaplan Meier. Se empleará la regresión de Cox para establecer la influencia de otras características basales. Se garantizará un nivel de significación del 5%. Se empleará el programa informático SPSS 17.0 para todos los análisis.

Limitaciones del estudio

Al tratarse de una experiencia original, carecemos de referencias que nos orienten en relación al número de casos a incluir. Por tanto, no es posible hacer un cálculo formal del tamaño muestral, habiéndose hecho una estimación conservadora (75 casos/año) teniendo la unidad una capacidad de reclutamiento potencialmente superior (120 casos nuevos al año).

Por otro lado, las características inherentes a los estudios fase I (empleo de diferentes niveles de dosis, reclutamiento competitivo con otros centros y no especificidad tumoral de muchos

estudios) son elementos que habrán de ser tenidos en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

En cualquier caso, esta limitación es a la vez una ventaja por permitir identificar alteraciones que pueden ser comunes a tumores de distinta histología y con un efecto independiente de la dosis de fármaco empleada.

Reclutamiento y datos clínicos

Este proyecto se realizará en la Unidad de fase 1 de START Madrid, en el Hospital Universitario de Sanchinarro en colaboración directa con los departamentos de Oncología (Centro Oncológico Integrado Clara Campal).

Los miembros que integran el equipo como investigadores clínicos de fase 1 son la Dra. Valentina Boni y la Dra. Elena Garralda, que serán implicado principalmente en el reclutamiento de los pacientes, en la valoración de los efectos tóxicos y de la eficacia del tratamiento.

La Dra. Valentina Boni como investigadora principal será encargada de coordinar el proyecto y de llevar a cabo un seguimiento directo de todos los resultados obtenidos. El Dr. García Donas, el Dr. Alvarez, el Dr. Rodríguez participarán como colaboradores en el proyecto.

Las enfermeras de investigación Esther Ordoñez, Sonia Puerta, Sara Cerdá y Elicier Blanco estarán encargadas de registrar y adjuntar en la historia clínica el consentimiento informado de cada paciente, procesar y almacenar las muestras recogidas durante el ensayo.

Los data manager Laura Varas, Beatriz Tapia y Dalmazio Danini estarán involucrado en la recogida en cuaderno electrónico (CRF) de las datos clínicos/moleculares del estudio y en la creación de la base de datos clínico molecular para análisis de marcadores predictivos de respuesta, resistencia y toxicidad.

Revisión anatomo patológica

Todas las muestras tumorales serán revisadas por dos patólogos independientes que resolverán las dudas por consenso. Dichos patólogos permanecerán “ciegos” respecto a cualquier dato identificativo de los casos o acerca de los tratamientos recibidos por el paciente o su evolución clínica. Los mismos patólogos marcarán las regiones de la muestra con mejores celularidad para el estudio molecular.

Secuenciación masiva de DNA tumoral y germinal y análisis bioinformático

El aislamiento del DNA germinal en sangre periférica y el DNA tumoral de los bloques de parafina se llevarán a cabo en CNIO por Cristina Rguez Lopez de Antona y su equipo. La secuenciación de los exomas germinal y somático de cada caso será realizado mediante subcontratación en el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG) en Barcelona (Baldiriireixac 4, pcbtower 08028 Barcelona) con quien nuestro grupo ha colaborado ya en

múltiples proyectos previos y que dispone de las máximas acreditaciones en relación a la realización de técnicas de next generation sequencing.

El análisis bioinformático de los datos de secuenciación aportados “en crudo” por el CNAG será realizado por un equipo de bioinformática en CNIO. Estudiarán la presencia de variantes de significado incierto, mutaciones germinales y somáticas, calidad del resultado y fiabilidad. Así mismo clasificarán las mutaciones en función de su potencial patogenicidad y relevancia biológica.

Estudios en plataforma Nanostring

Serán realizados, mediante colaboración, por la Unidad de oncología Molecular del Hospital Doce de Octubre, con la que nuestro grupo trabaja de forma habitual.

Estudios de metilación

Serán realizados por el Dr. Juan Sandoval responsable de la Unidad de Epigenética de la Fundación de Investigación del Hospital La Fe de Valencia, colaborador habitual de nuestro grupo.

PRESUPUESTO

1. Gastos de personal	
Técnico de investigación (2 años), soporte en análisis estadístico, data entry	20.000
SUBTOTAL	20.000
2. Gastos de ejecución	
a) Adquisición de bienes y contratación de servicios (inventariable, fungible y otros gastos).	
Material fungible: Tubos EDTA 10ml, tubos Vacutaines plus plastic serum tube without coactivator, RHA later thermofish, Kits de extracción de DNA y RNA.	10.000
-Estudio molecular Mediante Oncomine focus assay (Laboratorio de Dianas terapéutica, Servicio de Anatomía patológica de HM Sanchinarro)	150.000
GENETRACER BIOTECH	63.888
-Exoma	(52.800+11.088(IVA 21%))
Secuenciación exomas completos utilizando la química Hi-Q, en el secuenciador IonProtonTM con el chip PI v3.	15.600,00
Análisis Bioinformático del Exoma	4.800
Transcriptoma	
Creación a partir de RNA total (al menos 10 ng/muestra) y Secuenciación de librerías de Ion Ampliseq	9.000,00
Transcriptome Human Gene Expression (Chip P1 y química Hi-Q) de Ion Proton.	
Análisis Bioinformático del transcriptoma (8 muestras).	
Comprehensive Cancer Panel	1.200,00
Creación y Cuantificación de las librerías AmpliseqTM y secuenciación librería Hi-Q, 200pb en Ion Proton (4 muestras/chip). Identificación de variantes genéticas en Ion Reporter software	27.600,00
SUBTOTAL	223.888€

b) Viajes y dietas	
Inscripción, viajes y dietas de los miembros del equipo investigador a congresos internacionales. Estancias cortas en otros laboratorios para aprender técnicas.	4.000
SUBTOTAL	4.000
SUBTOTAL GASTOS EJECUCIÓN	247.888€
TOTAL AYUDA SOLICITADA	247.888€

El proyecto solicitado prevé un Reclutamiento de **150 pacientes en el año**.

En dichos pacientes se efectuará análisis molecular mediante Oncomine focus assay. Se seleccionarán 24 pacientes de particular interés debido a la respuesta al tratamiento para efectuar análisis completo de exoma, transcriptoma y estudio de variantes genéticas.

Duración del ensayo: **2 años** -> 1 año para reclutamiento de pacientes

1 año para estudio y análisis de datos

Bibliografía

- 1- Informe de la Sociedad Española de Oncología Médica: “Las cifras del cáncer en España”. 2014
- 2- Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med*. 2001 Apr 5;344(14):1052-6.
- 3- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001 Mar 15;344(11):783-92.
- 4- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010 Aug 28;376(9742):687-97.
- 5- Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med*. 2005 Jul 14;353(2):133-44.
- 6- Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013 Jun 20;368(25):2385-94.
- 7- Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2012 Apr 12;366(15):1382-92.
- 8- Mateo J, Carreira S, Sandhu S, et al. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2015 Oct 29;373(18):1697-708.
- 9- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 26;363(9):809-19.
- 10- <http://cancergenome.nih.gov>.
- 11- N.Wagle, B.Grabiner, E.Van Allen Response and Acquired Resistance to Everolimus in Anaplastic Thyroid Cancer *N Engl J Med* 2014; 371:1426-1433 October 9, 2014
- 12- Shaw AT, Kim DW, Mehra R, et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014 Mar 27;370(13):1189-97.
- 13- Gadgeel SM, Gandhi L, Riely GJ, et al. Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (AF-002JG): results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study. *Lancet Oncol*. 2014 Sep;15(10):1119-28.
- 14- Park K, Tan EH, O'Byrne K, et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2016 Apr 12. pii: S1470-2045(16)30033-X.
- 15- Shaw AT, Friboulet L, Leshchiner I, et al. Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F. *N Engl J Med*. 2016 Jan 7;374(1):54-61.
- 16- <https://clinicaltrials.gov>. Último acceso 24 de abril de 2016