

Marzo de 2017

# MEMORIA CIENTÍFICA DE PROYECTO DE LA FUNDACIÓN INTHEOS

---

**TÍTULO DEL PROYECTO:**

ESTUDIO DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE TUMORES PEDIÁTRICOS MEDIANTE SECUENCIACIÓN

---

**COORDINADOR CIENTÍFICO:**

Dra. Blanca López-Ibor Aliño (Jefe de la Unidad de Oncología y Hematología Pediátrica. Grupo HM Hospitales).

Dr. Fernando López Ríos (Jefe del Laboratorio de Dianas Terapéuticas. Grupo HM Hospitales).

---

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:**

Dra. Blanca López-Ibor Aliño (Jefe de la Unidad de Oncología y Hematología Pediátrica. Grupo HM Hospitales).

Dr. Fernando López Ríos (Jefe del Laboratorio de Dianas Terapéuticas. Grupo HM Hospitales).

**Otros investigadores:**

Dra. Blanca Herrero Velasco (Médico Adjunto de la Unidad de Oncología y Hematología Pediátrica. Grupo HM Hospitales).

Dra. Bárbara Angulo Biedma (Laboratorio de Dianas Terapéuticas. Grupo HM Hospitales).

Dra. Pilar Areal Hidalgo (Médico Adjunto de la Unidad de Oncología y Hematología Pediátrica. Grupo HM Hospitales).

**Colaboradores:**

Amaia Cavero (Estudiante de Medicina de Universidad CEU).

Teresa Torres (Estudiante de Medicina de Universidad CEU).

---

**INSTITUCIÓN – HOSPITAL:**

Grupo HM Hospitales. Fundación investigación HM (FIHM).

---

---

**OBJETIVO DEL PROYECTO:**

1. Secuenciación de tumores de pacientes diagnosticados en la UOHP con un tumor sólido que no ha respondido a tratamiento convencional (quimioterapia, radioterapia, cirugía).
  2. Secuenciación de tumores de pacientes diagnosticados en la UOHP con tumores incurables desde el momento del diagnóstico.
- 

**NECESIDAD E IMPORTANCIA DEL PROYECTO:**

Buscar mutaciones para la cuales existan fármacos dirigidos en pacientes pediátricos con tumores sólidos incurables al diagnóstico o que hayan recaído o progresado tras tratamiento convencional y sin otras opciones de tratamiento.

---

**DURACIÓN DEL PROYECTO:**

Dos años (este es el segundo año del proyecto)

---

**RESUMEN:****ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA:**

La incidencia del cáncer infantil y del adolescente (1200 casos nuevos/año) es muy inferior a la del cáncer del adulto. El comportamiento biológico de los tumores pediátricos así como su evolución tampoco es superponible a la de los adultos. El 30% de los pacientes pediátricos tienen leucemia aguda, el 30% tumores cerebrales y el resto, corresponden otros tumores como neuroblastoma, tumor de Wilms, tumores óseos, tumores germinales, retinoblastoma...

En los últimos años los estudios moleculares en oncología están desarrollándose a un ritmo acelerado. Los estudios de mutaciones en las células tumorales se están realizando de manera más o menos rutinaria tanto en las leucemias como en los tumores sólidos del adulto, pero este campo no está casi estudiado en el caso del cáncer pediátrico.

En el contexto de la oncología personalizada es cada vez más importante tener un conocimiento de las alteraciones moleculares de cada tumor. La identificación de dichas alteraciones moleculares permite el diseño de un tratamiento dirigido adecuado.

Es importante destacar la heterogeneidad molecular que presentan los tumores pediátricos. Por eso, en estos tumores, es interesante plantear una búsqueda de mutaciones para las que existan dianas terapéuticas conocidas. Esto debería tener implicaciones terapéuticas en el manejo de los pacientes con tumores más agresivos.

Una enfermedad incurable en oncología pediátrica es aquella que tiene menos de un 20% de supervivencia a los dos años del diagnóstico. Los tratamientos convencionales curan más del 80% de los tumores infantiles. El 20% de los pacientes que no se curan con los tratamientos estándar son los que más se beneficiarían de una oncología personalizada, basada en el estudio de mutaciones en las células tumorales para buscar dianas terapéuticas dirigidas frente a ellas.

En la Unidad de Hematología y Oncología Pediátrica y del Adolescente (UHOP) del Hospital Universitario Madrid Montepríncipe del Grupo Hospitales de Madrid se diagnostican cada año unos 35 pacientes (32 % leucemias y linfomas y 68 % tumores sólidos). Este es el marco en el que se pretende desarrollar un proyecto de investigación de caracterización de tumores pediátricos mediante secuenciación molecular.

El objetivo de este estudio es la identificación de alteraciones moleculares para las que existan fármacos en niños con tumores incurables al diagnóstico y niños con tumores refractarios al tratamiento estándar sin opciones terapéuticas alternativas.

#### MATERIAL Y MÉTODOS:

Este proyecto es el previo a un proyecto más amplio en el que se pretende el estudio mediante secuenciación de todos los tumores pediátricos diagnosticados en la Unidad de Oncología Pediátrica y del adolescente del grupo HM con el fin de abordar desde distintas vías el estudio y tratamiento de los mismos.

Todo ello orientado a un mejor conocimiento de la biología molecular del cáncer infantil y al estudio de la aplicabilidad clínica de los hallazgos moleculares en cuanto a definición de pronóstico y diseño de tratamiento.

Se estudiarán 30 enfermos, buscándose alteraciones relevantes en el tumor desde el punto de vista terapéutico. El diseño del estudio molecular a realizar se basará en la evidencia científica y en la aplicabilidad del resultado. Todos los datos de los pacientes serán tratados de acuerdo con la Ley Orgánica de Protección de Datos (LOPD).

Para ser incluidos en este proyecto los pacientes deben estar diagnosticados de tumor sólido a partir de la primera recaída o de una enfermedad incurable al diagnóstico como tumor cerebral diseminado (meduloblastoma/PNET, ATRT, DIPG, gliomas de alto grado), neuroblastomas diseminados, osteosarcoma metastásico, sarcomas de blandes partes metastásicos y deben recibir tratamiento en la UHOP del grupo HM. Serán excluidos de este estudio los pacientes que se diagnostiquen de un tumor sólido con posibilidad de tratamiento curativo al diagnóstico y todos los pacientes que sean diagnosticados de enfermedades hematológicas malignas.

Para la realización del proyecto se llevará a cabo un abordaje molecular mediante secuenciación masiva con la plataforma Ion Torrent PGMTM (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), utilizando los paneles comerciales Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot v2 (ThermoFisher Scientific) y OncoPrint Focus Assay™ (ThermoFisher Scientific). El primer panel (AmpliSeq) está diseñado para el análisis de mutaciones en 50 genes relevantes en el desarrollo del cáncer. Los genes no son secuenciados en su totalidad, sólo son analizadas aquellas regiones donde se han descrito mutaciones más frecuentes, hasta cubrir más de 2800 mutaciones. El segundo panel (OncoPrint) está diseñado para el análisis de variantes en 52 genes relevantes en el desarrollo del cáncer en tumores sólidos. Las alteraciones que cubre el panel se dividen en mutaciones puntuales (sustituciones, inserciones y deleciones), alteraciones en el número de copias y reordenamientos.

Los datos se analizarán mediante los programas Torrent Suite Software versiones 5.0 y 5.2 y Ion Reporter versiones 5.0 y 5.2 (ThermoFisher Scientific). El análisis bioinformático incluye: (1) el alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia de referencia (GRCh37/hg19) para los genes diana tras filtrado según criterios de calidad; (2) la identificación de variantes; y (3) anotación de las variantes. En determinados casos seleccionados, los resultados serán revisados por la Unidad de Bioinformática Traslacional del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) para confirmación de los hallazgos mediante un algoritmo bioinformático independiente.

Para el panel Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2, se secuenciará en paralelo el ADN extraído de una muestra de sangre periférica de cada paciente como control normal (determinación del origen somático o germinal de las alteraciones encontradas, así como análisis de variaciones en el número de copias de determinados genes).

En caso que fuera necesario y cuando así lo requiera el perfil molecular de algunos tumores, se completará el estudio de secuenciación masiva mediante otras aproximaciones (por ejemplo hibridación "in situ", inmunohistoquímica), con el fin de identificar cualquier posible alteración con valor predictivo o de tratamiento.

Los pacientes y sus familias serán informados del proyecto y tras resolver las posibles dudas que presenten se firmará un consentimiento informado por los padres y por el paciente si éste es mayor de 16 años.

---

#### **Nº PACIENTES BENEFICIADOS**

PACIENTES ESTUDIADOS DESDE EL INICIO DEL ESTUDIO:

- Se han realizado estudios moleculares en muestras tumorales de 38 pacientes de la unidad. 13 pacientes se estudiaron en el último periodo (memoria 2017).
- En 19 de estas muestras tumorales se ha realizado estudios de secuenciación masiva.

PACIENTES CON RESULTADOS POSITIVOS EN DICHOS ESTUDIOS:

- En 10 pacientes se encontraron mutaciones para las que se conoce un tratamiento dirigido:
    - o En 5 pacientes se utilizaron dichos tratamientos dirigidos frente a la mutación implicada. Gracias al tratamiento dirigido dos pacientes se encuentran estables en el momento actual. Los otros 3 pacientes fallecieron a pesar del tratamiento dirigido.
    - o En los otros 5 pacientes en los que se encontró una diana molecular para tratamiento dirigido no se ha utilizado dicho tratamiento. En 4 de ellos por estabilidad clínica (no precisando tratamiento en el momento actual), y otro por fallecimiento por complicaciones postquirúrgicas.
- 

#### **DIFUSIÓN DE RESULTADOS**

La publicación de los resultados de este proyecto están en fase de primer manuscrito para una revista científica con factor de impacto.

Parte de los resultados obtenidos han sido enviados (pendiente de aceptación) al X Congreso Nacional de Hematología y Oncología Pediátrica (SEHOP) que se celebrará en Madrid del 25 al 27 de Mayo de 2017.

- Comunicación con el título “SARCOMA EPITELOIDE REFRACTARIO. RESPUESTA A TRATAMIENTO CON PAZOPANIB”. I. Martínez, P. Areal, B. Herrero, M. Villa, B. López-Ibor.

Parte de los resultados obtenidos han sido presentados en el IX Congreso Nacional de Hematología y Oncología Pediátrica (SEHOP) celebrado en Santander del 19 al 21 de Mayo de 2016.

- Comunicación oral con el título “ESTUDIO MOLECULAR DE TUMORES CEREBRALES PEDIÁTRICOS PARA LA BÚSQUEDA DE TRATAMIENTO DIRIGIDO”. B. Herrero, I. Martínez, M. Villa, F. López Ríos, B. López-Ibor. Presentada por M. Villa

Parte de los resultados obtenidos han sido presentados en el Congreso Internacional de Oncología Pediátrica (SIOP): 47<sup>th</sup> Congress of the International Society of Pediatric Oncology (SIOP) celebrado en Ciudad del Cabo (Sudáfrica) del 8 al 11 de Octubre de 2015:

- Póster “SEARCHING FOR TARGETED TREATMENT FOR PEDIATRIC TUMORS BY NEXT GENERATION SEQUENCING” B. Herrero, B- Angulo, I. Martínez, S. Hernández, M. Villa,

F. López-Ríos, B. López-Ibor. La comunicación fue presentada como un póster con exposición oral. Obteniéndose el premio al mejor póster del congreso.

- Póster con el título “MANAGEMENT OF PROGRESSING BRAIN STEM ANAPLASTIC GANGLIOGLIOMA WITH A MOLECULAR BASED THERAPY” I. Martínez, B. Herrero, M.D. Corral, M. Villa, B. Angulo, A. Duque, C. Rubio, S. García Duque, B. López-Ibor.
-

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ortiz MV, Kobos R, Walsh M et al. Integrating Genomics Into Clinical Pediatric Oncology Using the Molecular Tumor Board at the Memorial Sloan Kettering Cancer Center. *Pediatr Blood Cancer*. 2016 Aug;63(8):1368-74
2. Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008; 455: 1069-1075.
3. Bell D, Berchuck A, Birrer M, et al. (Cancer Genome Atlas Research Network). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474: 609-615.
4. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, et al. (Cancer Genome Atlas Network). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490: 61-70.
5. Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, et al. (Cancer Genome Atlas Research Network). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487: 330-337.
6. Hammerman PS, Lawrence MS, Voet D, et al (Cancer Genome Atlas Research Network). Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012; 489: 519-525.
7. Liu P, Morrison C, Wang L, et al. Identification of somatic mutations in non-small cell lung carcinomas using whole-exome sequencing. *Carcinogenesis* 2012; 33: 1270-1276.
8. Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 349-361.
9. Brennan C.W, Verhaak R.G, McKenna A, et al (Cancer Genome Atlas Research Network). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013; 155: 462-477.
10. Creighton CJ, Morgan M, Gunaratne PH, et al (Cancer Genome Atlas Research Network). Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013; 499: 43-49.
11. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, et al (Cancer Genome Atlas Research Network). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014; 511: 543-550.
12. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatinpaclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361: 947-957.
13. Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 958-967.
14. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 239-246.
15. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996; 2: 561-566.
16. Rubin BP, Singer S, Tsao C, et al. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 8118-8121.
17. 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; 344: 783-792.
18. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al; ToGA Trial Investigators. 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, randomized controlled trial. *Lancet* 2010; 376: 687-697
19. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363: 809-819.
20. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; 364: 2507-2516.
21. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic

- colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2091–2096.
22. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013; 369: 1023-1034.
  23. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 1693-1703.
  24. Iyer G, Hanrahan AJ, Milowsky MI, et al. Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. *Science* 2012; 338: 221.
  25. Rush S, Foreman N, Liu A. Brainstem ganglioglioma successfully treated with vemurafenib. *J Clin Oncol* 2013; 31: e159-160.
  26. George RE, Sanda T, Hanna M, et al. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 2008; 455: 975-978.
  27. Hammerman PS, Sos ML, Ramas AH, et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discovery* 2011; 1: 78-89.
  28. Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat Genet* 2009; 41: 1127-1132.
  29. Villarroel MC, Rajeshkumar NV, Garrido-Laguna I, et al. Personalizing cancer treatment in the age of global genomic analyses: PALB2 gene mutations and the response to DNA damaging agents in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 3-8.
  30. Perotti D, Hohenstein P, Bongarzone I, et al. Is Wilms tumor a candidate neoplasia for treatment with WNT/ $\beta$ -catenin pathway modulators?--A report from the renal tumors biology-driven drug development workshop. *Mol Cancer Ther* 2013; 12: 2619-2627.
  31. Tao J, Jiang MM, Jiang L, et al. Notch activation as a driver of osteogenic sarcoma. *Cancer Cell* 2014; 26: 390-401.
  32. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet* 2014; 46: 444-50
  33. Paugh BS, Broniscer A, Qu C, Miller CP, et al. Genome-wide analyses identify recurrent amplifications of receptor tyrosine kinases and cell-cycle regulatory genes in diffuse intrinsic pontine glioma. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3999-4006.
  34. Moreno L. ALK-targeted therapy for poor-prognosis childhood cancers. *Lancet Oncol* 2013; 14: 439-440.
  35. Guagnano V, Kauffmann A, Wöhrle S, et al. FGFR genetic alterations predict for sensitivity to NVP-BGJ398, a selective pan-FGFR inhibitor. *Cancer Discov* 2012; 2: 1118-1133.
  36. Ray-Coquard I, Blay JY, Italiano A, et al. Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *Lancet Oncol* 2012; 13: 1133-11
  37. Harris MH, DuBois SG, Glade Bender JL et al. Multicenter feasibility study of tumor molecular profiling to inform therapeutic decisions in advanced pediatric solid tumors. The individualized Cancer Therapy (iCat) Study. *JAMA Oncol*. 2016 Jan 28. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5689. [Epub ahead of print].
  38. Saulnier Sholler GL, Bond JP, Bergendahl G, et al. Feasibility of implementing molecular-guided therapy for the treatment of patients with relapsed or refractory neuroblastoma. *Cancer Med*. 2015 Jun;4(6):871-8
-