

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



## **TESIS DOCTORAL**

Búsqueda y validación de biomarcadores predictivos de respuesta a los inhibidores de FGFR en cáncer de pulmón

Discovery and validation of FGFR inhibition predictive biomarkers of response in lung cancer

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Santiago García Borrego

DIRECTORES

Prof. Luis Gonzaga Paz-Ares Rodríguez

Dra. Irene Ferrer Sánchez

Dra. Cristina Cirauqui Armendáriz

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica



**TESIS DOCTORAL**

**Búsqueda y validación de biomarcadores predictivos de respuesta a los inhibidores de FGFR en cáncer de pulmón**

**Discovery and validation of FGFR inhibition predictive biomarkers of response in lung cancer**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Santiago García Borrego

DIRECTORES

Prof. Luis Gonzaga Paz-Ares Rodríguez

Dra. Irene Ferrer Sánchez

Dra. Cristina Cirauqui Armendáriz

Madrid, 2024





Trabajo realizado bajo el amparo científico de la **Unidad de Investigación Clínica en Cáncer de Pulmón H12O-CNIO**, perteneciente al Instituto de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre, al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), al CIBERONC y a la Universidad Complutense de Madrid, para optar al grado de Doctor en Investigación Biomédica.

El proyecto ha sido financiado con una beca **Junta Provincial Madrid Predoctoral AECC 2018** (PRDMA18018GARC) de la Fundación Científica de la Asociación Española Contra el Cáncer.



# AGRADECIMIENTOS



Quiero expresar mi sincero agradecimiento a las personas que han contribuido significativamente al desarrollo de esta tesis doctoral. Este proyecto no habría sido posible sin el apoyo y la colaboración de individuos excepcionales y valiosos recursos.

En primer lugar, agradezco a mi director de tesis, **Luis**, por ofrecerme esta oportunidad de haber formado parte de su grupo y realizar la tesis en un laboratorio donde he tenido los recursos y medios ideales para la labor investigadora. Quiero también agradecer a mis directoras **Irene** y **Cristina**, por su dedicación a lo largo de este arduo pero gratificante proceso. Sus conocimientos y mentoría han sido fundamentales para dar forma a esta investigación. Muchas gracias a mi tutor **Francisco Pérez Vizcaíno** por su ayuda con los temas de la universidad y a la coordinadora **Ángeles Vicente**, quién siempre ha mostrado disposición para solventar mis dudas.

Mi más profundo agradecimiento a mis compañerxs de laboratorio, cuya colaboración y discusiones han enriquecido enormemente mi perspectiva científica. La sinergia de nuestro equipo ha creado un entorno propicio para el intercambio de ideas y el progreso colectivo. No quisiera dejarme a nadie de los que han estado en este camino, desde las personas que han estado en mis inicios (**Álvaro Q, María P, Patri Y, Laura G, María José, Pablo, Eva, Laura O, Rocío S, Ángela, Javi**), pasando por las que me han ido acompañando en los años de aprendizaje (**Ángel, Patri C, Ana, Alba S, Nuria, Juanma, Arantxa, Ali, Lore, David, Patri P, Rocío, Álvaro U, Itziar**), hasta las personas que se han incorporado en estos últimos años (**Inés, María G, Joan, Jose, Jaime, Sara, Laura R, Marta, Miguel, Belén, Iván H, Raquel**). Dedico este logro a cada unx de vosotrxs, cuyo esfuerzo y dedicación han dejado una marca indeleble en esta investigación.

Agradecer también a todo el grupo de colon (**Bea S, Bea G, Bea R, Jacin, Carlos, Alberto, ...**), al grupo de Jon (**Gorka** y **Carmen**), y demás compañerxs del H120, en especial a **Jose Luis Solorzano**, por mostrarte siempre disponible y enseñarme de IHQ.

Quisiera extender mi agradecimiento al CNIO por proporcionar un entorno propicio para la realización de este proyecto, por facilitar el acceso a instalaciones de vanguardia y recursos especializados. Aquí me gustaría nombrar a todas las personas que han estado ahí durante todos estos años, pero me quedaría sin hojas. Destaco a **Raúl, Simone, Oscar, Alfonso, Adri, Aniceto**. A **Lucía A**, gracias por tener una parte de casa tan lejos. A **Gloria**, tu forma de endulzar las tardes, son siempre una alegría. A **Marcel**, mi compañía de tantos fines de semana y festivos.

Vorrei ringraziare **Chiara** per l'opportunità che mi ha dato di soggiornare nel suo laboratorio. Mi sono davvero divertito quei 3 mesi a Torino e ho imparato molto grazie alla gentilezza e all'empatia di tutti i membri del laboratorio: **Cri, Maxi, Ale, Enri, Ross, Pietro, Ewa, Sandra, Ettore, Mirco, Ricciardo** e **Ile**.

## Agradecimientos

Agradezco las contribuciones y el moldeado que he recibido por familiares y amigos durante todo mi viaje académico, que me ha convertido en la persona que soy. En especial el apoyo de **Richi**, mi hermano de sangre malagueña; **Pablo**, quien me hace retroceder a otros tiempos; **Tanis**, mi mentor y guía en mis primeros pasos; **Iván**, por creer en mí más que yo mismo; **Hidalgo**, por levantarme del suelo tantas veces. Vuestras palabras alentadoras y paciencia han sido mi fuente de fortaleza en los momentos desafiantes.

Mención especial quiero darle a **Alba**, por reconducirme tantas veces y darle un toque de color a mi visión del mundo.

Además, reconozco y agradezco el apoyo financiero brindado por el CIBERONC para la asistencia a congresos y la realización de mi estancia doctoral. Especialmente ha sido importante la ayuda financiera de la Asociación Española Contra el Cáncer, cuya beca predoctoral me ha ayudado enormemente a la realización de esta tesis. Durante estos años, he sentido a la AECC como mi familia en Madrid, donde todas las personas me han mostrado un afecto increíble. Especial mención merecen **Ana, Sofía y Toñi**, quienes han descubierto en mí una faceta que desconocía, dirigiéndome en el mundo de la divulgación científica.

Finalmente, agradezco a todas las personas que, de una forma u otra, contribuyeron a este proyecto, directa o indirectamente. Cada aporte, por pequeño que sea, ha dejado una huella significativa en esta investigación.

Este logro es el resultado de un esfuerzo colectivo, y estoy agradecido por haber contado con el respaldo de una red tan valiosa de individuos y recursos.



*“Mientras estaba en la cima del Everest, miré a través del valle hacia el gran pico Makalu y resolví mentalmente una ruta sobre cómo podría escalarse. Me mostró que, aunque estaba en la cima del mundo, no era el fin de todo. Todavía estaba mirando más allá de otros desafíos interesantes.”*

Edmund Hillary



# I. ÍNDICE DE CONTENIDO



AGRADECIMIENTOS.....VII

I. ÍNDICE DE CONTENIDO.....XIII

II. RESUMEN.....XIX

III. SUMMARY.....XXIII

IV. ÍNDICE DE FIGURAS.....XXVII

V. ÍNDICE DE TABLAS.....XXXI

VI. ABREVIATURAS.....XXXV

**INTRODUCCIÓN.....1**

**1. Cáncer de pulmón.....3**

    1.1 Incidencia y mortalidad.....3

    1.2 Subtipos histológicos.....4

    1.3 Biología molecular del cáncer de pulmón.....5

    1.4 Tratamiento actual.....8

**2. Receptores Tirosina Kinasa (RTKs) como dianas terapéuticas en el cáncer de pulmón.....11**

    2.1 Estructura de los RTKs.....11

    2.2 RTKs y cáncer.....13

    2.3 Receptores FGFR en cáncer.....14

        2.3.1 Características de los FGFR.....14

        2.3.2 Señalización de los FGFR.....14

        2.3.3 Papel de los FGFRs en el cáncer.....16

        2.3.4 FGFR1 y FGFR4 en el cáncer de pulmón.....18

        2.3.5 FGFRs como dianas terapéuticas.....19

**3. Biomarcadores predictivos.....23**

    3.1 Biomarcadores predictivos de respuesta a las terapias dirigidas para el cáncer de pulmón.....23

    3.2 La N-Cadherina como biomarcador predictivo a la terapia dirigida a FGFR.....24

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....27**

**MATERIALES Y MÉTODOS.....31**

**1. Reactivos biológicos.....33**

    1.1 Anticuerpos.....33

    1.2 Sondas de qPCR a tiempo real.....34

1.3 Fármacos.....	34
2. Técnicas de biología molecular.....	34
2.1 Análisis genómicos.....	34
2.1.1 Extracción de ADN.....	34
2.1.2 Secuenciación completa del exoma (WES).....	35
2.2 Análisis de la expresión génica a nivel de ARN mensajero (ARNm).....	35
2.2.1 Extracción de ARN.....	35
2.2.2 Secuenciación completa del transcriptoma (WTS).....	35
2.2.3 Transcriptasa reversa.....	36
2.2.4 PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	36
2.3 Análisis de la expresión a nivel proteico.....	37
2.3.1 Extracción de proteínas.....	37
2.3.2 Cuantificación proteica.....	37
2.3.3 Western Blot (WB).....	38
2.3.4 Inmunohistoquímica (IHQ).....	39
3. Técnicas de biología celular.....	39
3.1 Líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón humanas comerciales.....	39
3.2 Líneas celulares murinas isogénicas.....	40
3.3 Mantenimiento de las líneas celulares.....	41
3.4 Conservación de las líneas celulares.....	41
3.5 Ensayos <i>in vitro</i> .....	42
3.5.1 Ensayos con líneas celulares.....	42
3.5.2 Ensayos con modelos PDXDOs.....	44
4. Técnicas de experimentación animal.....	45
4.1 Modelos de Xenoinjertos de tumores Derivados de Pacientes (PDX).....	45
4.2 Estudios de eficacia de inhibidores de FGFR en modelos PDX.....	47
5. Análisis bioinformáticos.....	48
5.1 Análisis de exomas.....	48
5.2 Análisis del transcriptoma.....	49
5.3 Análisis del repositorio GDSC.....	49
6. Análisis estadísticos.....	50

**RESULTADOS.....53**

**1. Validación del papel de N-Cadherina como biomarcador predictivo de respuesta a la terapia dirigida a FGFR.....55**

**1.1 Caracterización de los niveles de expresión de FGFR y N-Cadherina en una colección de modelos PDX.....55**

**1.2 Evaluación de la respuesta a la inhibición de FGFR en una colección de modelos PDX.....57**

**1.3 Evaluación de otras tecnologías para la determinación de la expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina.....60**

        1.3.1 Caracterización de la expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina de los modelos PDX mediante tinción IHQ.....60

        1.3.2 Caracterización de la expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina de los modelos PDX mediante qPCR.....64

**2. Identificación de otros posibles predictores genómicos y transcriptómicos que definan la sensibilidad a inhibidores de FGFR.....66**

    2.1 Identificación de alteraciones genómicas que puedan predecir la respuesta al tratamiento con inhibidores de FGFR en nuestra colección de PDX.....66

    2.2 Identificación de diferencias en el perfil transcripcional de los modelos PDX según su respuesta al tratamiento con inhibidores de FGFR.....68

    2.3 Identificación mediante herramientas *in silico* de posibles nuevos biomarcadores predictivos de respuesta a la terapia anti-FGFR.....73

**3. Implicación del estado mutacional de KRAS en la respuesta a los inhibidores de FGFR.....76**

    3.1 Estudio *in silico* del papel del estado mutacional de KRAS como biomarcador predictivo de la respuesta a los inhibidores de FGFR.....76

    3.2 Estudio de sensibilidad a los inhibidores de FGFR en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón según su expresión de N-Cadherina y su estado mutacional de KRAS.....79

        3.2.1 Caracterización de la expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.....79

        3.2.2 Estudio de sensibilidad al tratamiento con AZD4547 del panel de 13 líneas de adenocarcinoma de pulmón con alta expresión de FGFR1/4.....81

    3.3 Estudio de la implicación de diferentes mutaciones en KRAS en la resistencia a la terapia anti-FGFR utilizando diferentes modelos *in vitro*.....82

        3.3.1 Caracterización de líneas celulares isogénicas con diferentes mutaciones de KRAS.....82

        3.3.2 Estudio de la sensibilidad de las líneas celulares isogénicas a la terapia anti-FGFR.....84

3.4 Evaluación de la eficacia de la combinación de los inhibidores de la vía de FGFR y KRAS en el tratamiento de líneas celulares.....	85
3.5 Evaluación de la eficacia de la combinación de los inhibidores de la vía de FGFR y KRAS en el tratamiento de modelos PDXDOs.....	90
3.5.1 Estudio de la sensibilidad de los modelos PDXDOs a la terapia anti-FGFR.....	90
3.5.2 Evaluación de la respuesta a la terapia combinada (Inhibidor FGFR + Inhibidor de MEK) en los modelos PDXDOs.....	92
3.5.3 Evaluación de la respuesta a la terapia combinada (Inhibidor FGFR + Inhibidor de KRAS G12C) en los modelos PDXDOs.....	94
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>117</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>121</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>125</b>

## II. RESUMEN



El cáncer de pulmón es el tipo de tumor responsable del mayor número de muertes asociadas a cáncer en el mundo. El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) es el subtipo mayoritario y se caracteriza por un número relevante de alteraciones en genes conductores. Estas han dado lugar al desarrollo de terapias dirigidas a tales alteraciones moleculares y constituyen la base de la paradigmática y exitosa medicina de precisión en este contexto. Uno de los genes frecuentemente alterado, bien por mutación, amplificación y/o sobreexpresión, en el CPNM, es el gen de *FGFR1*. Sin embargo, hasta la fecha, los inhibidores de FGFR han demostrado limitada eficacia en la clínica con tasas de respuesta en el rango del 5-10 %. Es preciso, por tanto, la identificación y validación preclínica de biomarcadores predictivos que permitan identificar correctamente a los potenciales beneficiarios de esta terapia.

En ese sentido, nuestro grupo ha identificado la determinación de la expresión conjunta de FGFR y de N-Cadherina como posible biomarcador predictivo de respuesta a la terapia anti-FGFR. En este trabajo, nos propusimos validar su papel como biomarcador predictivo utilizando una cohorte más amplia de modelos *in vivo* derivados de tumores de pacientes (PDX) y diferentes técnicas de medición de expresión de estos biomarcadores (WB, IHQ y qPCR). Confirmamos que la expresión de N-Cadherina, evaluada preferiblemente por WB, era necesaria para que los modelos respondan al tratamiento con AZD4547 (el 100 % de los modelos que respondieron tenían alta expresión de N-Cadherina). Sin embargo, únicamente un tercio de los modelos con sobreexpresión de FGFR y N-Cadherina respondieron al tratamiento. En definitiva, resulta necesario identificar otros biomarcadores complementarios que nos ayuden a estratificar mejor los tumores que puedan responder a la terapia anti-FGFR.

Con esta premisa, y valiéndonos de la caracterización genómica y transcriptómica de nuestros modelos PDX, buscamos patrones diferenciales que definieran los modelos “No Respondedores” frente a los “Respondedores”. A nivel genómico, encontramos un tercer biomarcador: el estado mutacional del gen *KRAS*. Observamos que diversas mutaciones en este gen (*G12A*, *G12C* y *G12D*) se relacionan con la ausencia de respuesta a la terapia anti-FGFR. De este modo, encontrábamos una tasa de respuestas del 66,7 % en los tumores con sobreexpresión de FGFR y N-Cadherina y que presentaban *KRAS wt*. Por otro lado, definimos una firma transcripcional que apoya el papel como biomarcador de la señalización FGFR (vimos mayor activación de vías relacionadas como Akt en los modelos “Respondedores”), de N-Cadherina (mayor activación en “Respondedores”) y de la señalización *KRAS* (sobreactivada en los modelos “No Respondedores”). El análisis transcripcional también nos sugirió otros mecanismos que pudieran estar contribuyendo a explicar la ausencia de respuesta de los tumores con alta expresión de FGFR, N-Cadherina, y *KRAS wt*. En esta dirección, encontramos una sobreactivación

de genes previamente relacionados con la resistencia intrínseca a los inhibidores de FGFR, como los transportadores ABC, o con la resistencia a otros inhibidores de los receptores tirosina kinasa, como las alteraciones del metabolismo lipídico y glucolítico, de la remodelación del microambiente tumoral, y de la inhibición de la necroptosis.

Posteriormente, profundizamos en el estudio del papel del estado mutacional de *KRAS* en la respuesta a la terapia anti-FGFR. En un análisis *in silico* inicial, utilizando el repositorio GDSC, observamos que las mutaciones de *KRAS* (especialmente la *G12V*) se asociaban a cierto grado de resistencia a los inhibidores de FGFR en las líneas celulares de adenocarcinoma. Utilizando líneas isogénicas murinas con diferentes mutaciones clínicamente relevantes de *KRAS*, confirmamos que la presencia de tales mutaciones confería resistencia frente a la terapia anti-FGFR, especialmente la mutación *G12V*. Como consecuencia, testamos la eficacia de la terapia de combinación de un inhibidor de FGFR con un inhibidor de la señalización KRAS (el inhibidor de MEK, trametinib) en las líneas isogénicas *KRAS mut*, y observamos que la combinación era sinérgica. Estos resultados fueron validados en modelos preclínicos derivados de tumores de paciente (organoides derivados de PDX o PDXDOs), en los que la combinación de la inhibición de FGFR con la inhibición de la señalización KRAS (con un inhibidor indirecto de la vía como el trametinib o con un inhibidor específico de mutación [*G12C*] como el sotorasib) resultó tener un efecto sinérgico.

En vista de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, se proponen tres escenarios divergentes en relación con la terapia anti-FGFR en el CPNM. Un primer escenario de ausencia de respuesta a la terapia anti-FGFR, donde se encuentran los tumores con sobreexpresión de FGFR y una baja expresión de N-Cadherina. Un segundo contexto en el que comprobamos que los tumores que responden a la terapia anti-FGFR se relacionan con un estado *KRAS wt* y la coexpresión de altos niveles de FGFR y de N-Cadherina. El tercer escenario correspondería con aquellos tumores *KRAS mut* con alta expresión de FGFR, independientemente de los niveles de N-Cadherina, que no responden a los inhibidores de FGFR en monoterapia, pero sí podrían responder a la combinación de estos con inhibidores de la señalización KRAS. La adecuada identificación de estos contextos moleculares en los tumores de los pacientes con cáncer de pulmón podría ayudar en la estratificación y selección de la mejor opción terapéutica para dichos pacientes.

# III. SUMMARY



Lung cancer is the type of tumor responsible for the highest number of cancer-related deaths worldwide. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the predominant subtype characterized by a significant number of driver gene alterations. These have led to the development of therapies targeting such molecular alterations, forming the basis of the paradigmatic precision medicine successfully applied in this context. One of the genes frequently altered in NSCLC, either by mutation, amplification, and/or overexpression, is the *FGFR1* gene. However, to date, FGFR inhibitors have demonstrated limited efficacy in the clinic with response rates in the range of 5-10 %. Therefore, the identification and preclinical validation of predictive biomarkers are necessary to identify potential beneficiaries of this therapy correctly.

In this regard, our group has identified the combined expression of FGFR and N-Cadherin as a possible predictive biomarker for the response to anti-FGFR therapy. In this work, we aimed to validate its role as a predictive biomarker using a broader cohort of *in vivo* models derived from patient tumors (PDX) and different techniques to measure the expression of these biomarkers (WB, IHC, and qPCR). We confirmed that N-Cadherin tumor expression, assessed by WB, was necessary for the models to respond to treatment with AZD4547 (100 % of responding models revealed high N-Cadherin expression). In contrast, only one-third of the models with overexpression of FGFR and N-Cadherin responded to treatment. In conclusion, it is necessary to identify other complementary biomarkers that help us better stratify tumors that may respond to anti-FGFR therapy.

With this premise and leveraging the genomic and transcriptomic characterization of our PDX models, we sought differential patterns that defined 'Non-Responders' versus 'Responders.' At the genomic level, we found a third biomarker: the mutational status of the *KRAS* gene. We observed that different mutations in this gene (*G12A*, *G12C*, and *G12D*) are related to the lack of response to anti-FGFR therapy. Thus, we found a response rate of 66.7 % in tumours with overexpression of FGFR and N-Cadherin that had *wild-type KRAS*. On the other hand, we found a transcriptional signature supporting the role as a biomarker for FGFR signalling (greater activation of related pathways such as Akt in 'Responders'), N-Cadherin (higher activation in 'Responders'), and KRAS signalling (overactivated in 'Non-Responders'). The transcriptional analysis also suggested other mechanisms that could be contributing to explaining the lack of response of tumours with high expression of FGFR, N-Cadherin, and *wild-type KRAS*. In this direction, we found an overactivation of genes previously related to intrinsic resistance to FGFR inhibitors, such as ABC transporters, or resistance to other tyrosine kinase receptor inhibitors, such as alterations in lipid and glycolytic metabolism, remodelling of the tumour microenvironment, and inhibition of necroptosis.

Subsequently, we delved into the study of the role of the mutational status of *KRAS* in the response to anti-FGFR therapy. In an initial *in silico* analysis, using the GDSC repository, we observed that *KRAS* mutations (especially *G12V*) were associated with a certain degree of resistance to FGFR inhibitors in adenocarcinoma cell lines. Using murine isogenic lines with different clinically relevant mutations in *KRAS*, we confirmed that the presence of such mutations conferred resistance to anti-FGFR therapy, especially the *G12V* mutation. As a result, we tested the efficacy of combination therapy with an FGFR inhibitor and a *KRAS* signalling inhibitor (MEK inhibitor, trametinib) in *KRAS mutant* isogenic lines, and we observed that the combination was synergistic. These results were validated in preclinical models derived from patient tumours (organoids derived from PDX or PDXDOs), where the combination of FGFR inhibition with *KRAS* signalling inhibition (with an indirect pathway inhibitor like trametinib or with a mutation-specific inhibitor [G12C] like sotorasib) was synergistic.

Given the results obtained in this doctoral thesis, three divergent scenarios are proposed regarding anti-FGFR therapy in NSCLC. A first scenario of no response to anti-FGFR therapy, where tumours with overexpression of FGFR and low N-Cadherin expression are found. A second context in which we verify that tumours responding to anti-FGFR therapy are characterized by *wild-type KRAS* status and co-expression of FGFR with high levels of N-Cadherin. The third scenario would correspond to those *KRAS mutant* tumours with high expression of FGFR (regardless of N-Cadherin levels) that do not respond to FGFR inhibitors in monotherapy but could respond to the combination of these with *KRAS* signalling inhibitors. The accurate identification of these molecular contexts in lung cancer patient tumours could help in the stratification and selection of the best therapeutic option for these patients.

# IV. ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más prevalentes a nivel mundial.....3

Figura 2. Clasificación histológica del cáncer de pulmón.....5

Figura 3. Frecuencia de las alteraciones más relevantes en la práctica clínica descritas en adenocarcinoma de pulmón.....6

Figura 4. Frecuencia de las alteraciones más relevantes en la práctica clínica descritas en carcinoma escamoso de pulmón.....8

Figura 5. Características estructurales generales y mecanismo de activación de un RTK.....12

Figura 6. Componentes de la vía de señalización de FGFR.....16

Figura 7. Panorama clínico actual de los inhibidores de FGFR.....19

Figura 8. Esquemas de tratamiento de las matrices utilizadas para testar las diferentes combinaciones.....45

Figura 9. Determinación de los niveles de expresión de FGFR1, FGFR4 y N-Cadherina.....56

Figura 10. Efecto del tratamiento con AZD4547 en 16 modelos de PDX CPNM (11 ADC y 5 ESC) con elevados niveles de expresión de FGFR1/4 y niveles variables de N-Cadherina.....59

Figura 11. Caracterización de los niveles de expresión proteica de FGFR1 y N-Cadherina en la colección de PDX.....61

Figura 12. Caracterización de los niveles de expresión de ARN mensajero de *FGFR1*, *FGFR4* y *CDH2* (N-Cadherina) en la colección de PDX.....64

Figura 13. Caracterización genómica en genes de relevancia clínica de los 16 modelos PDX.....67

Figura 14. Estudio de eficacia de la respuesta de los 16 modelos PDX al inhibidor AZD4547 y su relación con la expresión de N-Cadherina y su estado mutacional de *KRAS*.....68

Figura 15. Caracterización transcriptómica de los 16 modelos PDX tratados con el inhibidor de FGFR según su tipo de respuesta.....70

Figura 16. Análisis diferencial de expresión génica entre los PDX “Respondedores” y “Discordantes”.....71

Figura 17. Expresión génica diferencial entre los PDX “Respondedores” y “Discordantes”.....72

Figura 18. Genes cuya sobreexpresión está relacionada con la resistencia a los inhibidores de FGFR.....75

Figura 19. Análisis *in silico* de la respuesta a diferentes fármacos en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón con mutación en *KRAS*.....77

Figura 20. Efecto del estado mutacional de *KRAS* en la sensibilidad al tratamiento con AZD4547 en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.....78

Figura 21. Determinación de los niveles de expresión de FGFR1, FGFR4 y N-Cadherina en líneas de adenocarcinoma de pulmón.....80

Figura 22. Ensayos de citotoxicidad en las líneas de adenocarcinoma seleccionadas con el inhibidor AZD4547.....82

Figura 23. Caracterización molecular de las líneas celulares isogénicas de las mutaciones de <i>KRAS</i> .....	83
Figura 24. Caracterización del crecimiento de las líneas celulares isogénicas con diferentes mutaciones de <i>KRAS</i> .....	84
Figura 25. Sensibilidad al inhibidor AZD4547 de las líneas celulares isogénicas <i>KRAS</i> mutantes.....	85
Figura 26. Evaluación de la eficacia de la combinación de los inhibidores de FGFR y MEK en las líneas celulares isogénicas.....	87
Figura 27. Caracterización molecular del efecto de la terapia combinada con inhibidores de FGFR y MEK en las líneas celulares isogénicas.....	89
Figura 28. Evaluación de la sensibilidad al inhibidor AZD4547 en la plataforma de PDXDOs según su estado mutacional de <i>KRAS</i> .....	91
Figura 29. Evaluación de las combinaciones de AZD4547 y de trametinib en los PDXDOs <i>KRAS wt</i> y <i>KRAS mut</i> .....	93
Figura 30. Evaluación de las combinaciones de AZD4547 y trametinib en la plataforma de PDXDOs.....	94
Figura 31. Evaluación de las combinaciones de AZD4547 y de sotorasib en la plataforma de PDXDOs.....	96
Figura 32. Modelo del papel de N-Cadherina y <i>KRAS</i> en la inhibición FGFR, y mecanismos propuestos de resistencia a dicha inhibición.....	114

# V. ÍNDICE DE TABLAS



Tabla 1. Lista de agentes selectivos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento del CPNM.....9

Tabla 2. Alteraciones genómicas comunes encontradas en el cáncer de pulmón.....18

Tabla 3. Principales ensayos clínicos con cáncer de pulmón que presentan alteraciones en los FGFRs.....22

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para determinar la expresión proteica de las proteínas de interés.....33

Tabla 5. Sondas TaqMan utilizadas para la determinación de la expresión de ARNm de los genes de interés.....34

Tabla 6. Inhibidores químicos utilizados en los tratamientos *in vitro* e *in vivo*.....34

Tabla 7. Protocolo de temperaturas de retrotranscripción del ARN.....36

Tabla 8. Protocolo de termociclación de la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real.....37

Tabla 9. Panel de líneas celulares de pulmón comerciales utilizadas en esta tesis.....40

Tabla 10. Densidades de siembra y formato de placa utilizado para cada ensayo.....44

Tabla 11. Características clínicas más relevantes de los 32 pacientes de los que derivan los PDX utilizados en la presente tesis doctoral.....47

Tabla 12. Características histológicas y de expresión proteica de los 16 modelos PDX seleccionados para la evaluación de su respuesta a la inhibición de FGFR *in vivo*.....57

Tabla 13. Determinación de los niveles de expresión de FGFR1 y N-Cadherina en la colección de PDX mediante IHQ.....62

Tabla 14. Clasificación de los modelos PDX tratados con AZD4547 según la expresión de FGFR1 y N-Cadherina evaluadas por tinción IHQ.....63

Tabla 15. Clasificación de los modelos PDX tratados con AZD4547 según la expresión de *FGFR1*, *FGFR4* y *CDH2* (N-Cadherina) evaluadas por qPCR.....65

Tabla 16. Grupos funcionales de genes cuya sobreexpresión se relaciona con la resistencia a los inhibidores de FGFR.....74



# VI. ABREVIATURAS



2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones
4-OHT	4-hidroxitamoxifeno
ABC	Del inglés <i>ATP-binding cassette</i>
ADC	Adenocarcinoma
ADC	Anticuerpo conjugado a fármacos
ADCC	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AKT	Kinasa de proteínas B
ALK	Kinasa de linfoma anaplásico
APPL2	Proteína adaptadora, fosfotirosina que interactúa con el dominio PH y la cremallera de leucina 2
ARL14	Factor de ribosilación de ADP como GTPasa 14
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNseq	Secuenciación del ARN
ATP	Adenosina trifosfato
AXL	Receptor de tirosina-proteína kinasa UFO
BAG4	BAG cochaperona 4
B2M	Beta-2-Microglobulina
BD	Becton Dickinson
BIM	Mediador de la muerte celular que interacciona con BCL-2
BRAF	Homólogo B del oncogén viral de sarcoma murino <i>v-Raf</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
CAF	Del inglés <i>cancer-associated fibroblasts</i> (fibroblasto asociado a tumor)
CBL	Linfoma de linaje B de Casitas
CCK	Colecistoquinina
CDKN2A	Proteína inhibidora de la kinasa dependiente de ciclina 2A
CCL	Carcinoma de célula grande
CI	Índice de combinación

## VI. Abreviaturas

CIT	Serina/treonina kinasa que interactúa con Citron Rho
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CPM	Cáncer de pulmón microcítico
CPNM	Cáncer de pulmón no microcítico
CRK	Molécula adaptadora crk
CRKL	Proteína similar a CRK
CSF1	Factor estimulante de colonias de macrófagos
CSF2RA	Subunidad alfa del receptor del factor estimulante de colonias 2
CST	<i>Cell Signaling Technology</i>
C-terminal	Extremo carboxi terminal de la proteína
Cx	Cirugía
DDR	Respuesta y reparación del daño del ADN.
DMEM	Medio modificado fosfato de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EML4	Proteína asociada a microtúbulo de equinodermo 4
EMT	Transición epitelio-mesénquima
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERBB2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)
ERK1/2	Kinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2
ESC	Carcinoma escamoso/epidermoide
FAR2	Acil-CoA reductasa grasa 2
FDA	Del inglés <i>food and drug administration</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
FGFRi	Inhibidores de FGFR
FLT3	Tirosina kinasa 3 similar a FMS
FRS2	Sustrato de unión a FGFR 2
GAB1	Proteína de unión asociada a GRB2 1

GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GAPs	Proteínas activadoras de GTPasas
GDSC	Del inglés <i>genomics of drug sensitivity in cancer</i>
GEMM	Modelo murino genéticamente modificado
GRB2	Proteína unida a receptor de factor de crecimiento 2
GSEA	Del inglés <i>gene set enrichment analysis</i>
GTP	Guanosina trifosfato
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
H12O	Hospital 12 de Octubre
HA-tag	Etiqueta con hemaglutinina
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HRAS	Homólogo del oncogén RAS viral ( <i>v-ras</i> ) del neuroblastoma
HRP	Peroxidasa del rábano
IBIS	Instituto de Investigación Biomédica de Sevilla
Ig	Inmunoglobulina
IC50	Concentración para la inhibición del 50 % del crecimiento
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
IL17RA	Receptor A de la interleucina 17
IL6	Interleuquina-6
JAK	Del inglés <i>janus kinase</i>
KEAP1	Proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch
KRAS	Homólogo al oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten
KRASG12Ci	Inhibidores de KRAS G12C
LKB1	Kinasa hepática B1 (STK11)
LTK	Tirosina quinasa del receptor de leucocitos
MAP2K1	Proteína quinasa activada por mitógenos 1
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MDSC	Del inglés <i>myeloid-derived supresor cell</i> (célula mioide supresora)
MEF	Fibroblasto embrionario murino
MEK	MAPK quinasa de ERK

## VI. Abreviaturas

MEKi	Inhibidores de MEK
MET	Receptor del factor de crecimiento hepático
mTOR	Diana en mamíferos de la rapamicina
MUSK	Receptor tirosina kinasa asociado al músculo
mut	Mutación
MYC	Homólogo del oncogén viral de mielociomatosis aviar <i>V-Myc</i>
NF1	Neurofibromina 1
NF-κB	Factor nuclear κB
NGFR	Receptor del factor de crecimiento nervioso
NOS1	Óxido nítrico sintasa 1
NOTCH1	Del inglés <i>Notch homolog 1</i>
NRAS	Homólogo del oncogén RAS viral ( <i>v-ras</i> ) del neuroblastoma
ns	No significativo
NTRK	Tirosina kinasa neurotrófica
PBS	Tampón fosfato salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Receptor de muerte programada
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada
PDGFR	Receptores del factor de crecimiento derivados de plaquetas
PKD1	Kinasa piruvato deshidrogenasa 1
PDX	Xenoinjerto derivado de paciente
PDXDO	Organoides derivados de PDX
PFA	Paraformaldehído
PHLD1B	Del inglés <i>pleckstrin homology like domain family b member 1</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3 kinasa
PI3KCA	Subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol-4,3-bifosfato 3-kinasa
PLCγ	Fosfolipasa C gamma
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTPN11	Proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 11
PVDF	Fluoruro de polivilideno
ROR	Receptor huérfano relacionado

Qx	Quimioterapia
RAS	Oncogén homólogo a virus de sarcoma de rata
RBPM5	Proteína de unión a ARN, factor de procesamiento de ARNm
RET	Oncogén reorganizado durante la transfección
RIT1	Proteína de unión al GTP parecida a RAS
ROS1	Protooncogén tirosina proteína kinasa 1
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio del instituto Rosell Park Memorial
RTK	Receptor tirosina kinasa
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RYK	Receptor similar a la tirosina kinasa
Rx	Radioterapia
S6	Proteína ribosomal S6
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SH2	Del inglés <i>src homology 2</i>
SHIP2	Inositol 5-fosfatasa que contienen dominios SH2
SMARCA4	Del inglés <i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4</i>
SOS	Del inglés <i>son of sevenless</i>
STAT	Del inglés <i>signal transducer and activator of transcription</i> (transductor de señales y activador de la transcripción)
STK11	Serina/Treonina kinasa 11
TAC	Tomografía Axial Computerizada
TACC3	Del inglés <i>transforming acidic coiled-coil containing protein 3</i>
TAM	Del inglés <i>tumor-associated macrophage</i> (macrófago asociado a tumor)
TBS	Del inglés <i>tris-buffered saline</i> , solución salina tamponada con Tris
TBST	TBS-Tween 20
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TIE	Tirosina kinasa con dominios similares a inmunoglobulina y EGF
TKD	Dominio tirosina kinasa
TKI	Inhibidor de tirosina kinasa

## VI. Abreviaturas

TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TNM	Tumor, nódulo, metástasis
TP53	Proteína tumoral 53
TPM	Transcriptos por millón
TRKA	Kinasa A relacionada con la tropomiosina
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
WB	Del inglés <i>Western Blot</i>
WES	Del inglés <i>whole exome sequencing</i> (secuenciación completa del exoma)
WNT	Del inglés <i>Wingless-Type family gene</i>
wt	Del inglés <i>wild type</i> (salvaje)
WTS	Del inglés <i>whole transcriptome sequencing</i> (Secuenciación completa del transcriptoma)

# INTRODUCCIÓN



# 1. CÁNCER DE PULMÓN

## 1.1 Incidencia y mortalidad.

El cáncer de pulmón es el segundo tumor más frecuente, representando su incidencia el 11,4 % del número total de nuevos casos anuales en todo el mundo. Al mismo tiempo, es el tumor más mortal a nivel mundial, siendo responsable del 18 % de todas las muertes relacionadas con el cáncer, lo que supone casi 1,8 millones de muertes anuales (Figura 1)<sup>1</sup>.

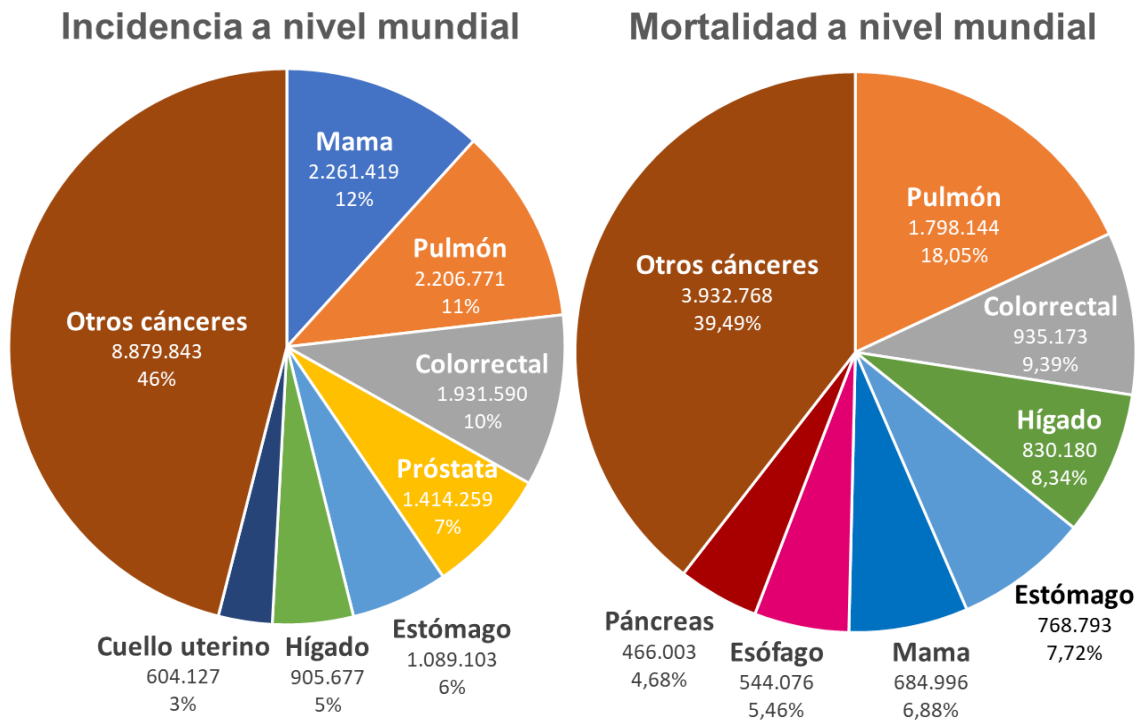


Figura 1. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más prevalentes a nivel mundial. Datos obtenidos de GLOBOCAN 2020.

Se estima que las cifras de incidencia del cáncer de pulmón en España alcancen los 31.282 casos en el año 2023<sup>2</sup>, lo que le sitúa como el tercer tipo de tumor con mayor incidencia (segundo en varones y cuarto en mujeres). Además, se prevé un aumento de esta incidencia en los próximos años, llegando hasta 34.311 nuevos casos esperados para 2025 y más de 40.000 casos nuevos en 2035<sup>3</sup>. Según datos del Instituto Nacional de Estadística, en el año 2021 se contabilizaron 22.413 defunciones por tumores malignos de la tráquea, de los bronquios y del pulmón, lo que le sitúa como el tumor con mayor mortalidad en España<sup>4</sup>.

A pesar de las mejoras sustanciales de supervivencia conseguidas en los últimos años para la mayoría de los tipos de cánceres, en el cáncer de pulmón han sido de escasa cuantía<sup>5</sup>. Así, en España, del año 2000 a 2014 la supervivencia neta a los 5 años apenas aumentó de un 10,8 % a un 13,5 %<sup>6</sup>. Esto es debido principalmente a que la mayoría de los pacientes son diagnosticados en estadios avanzados, donde las tasas de supervivencia son bajas y la eficacia

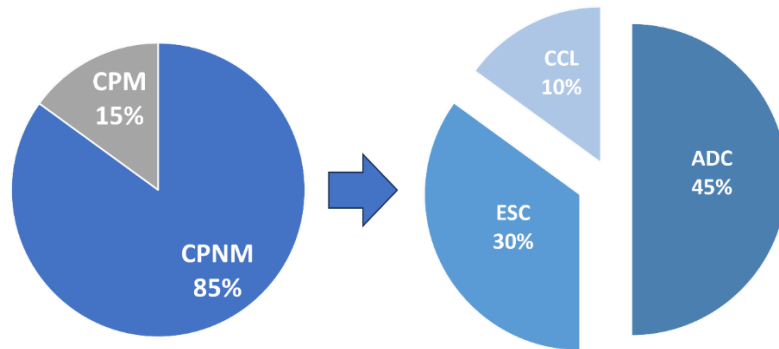
de los tratamientos disponibles limitada. El 44-57 % de los casos de cáncer de pulmón se diagnostican en estadios avanzados (estadio IV), y sólo el 5 % de los pacientes sobreviven a cinco años; sin embargo, cuando se detecta precozmente (estadio I), entre el 60-80 % de los pacientes sobreviven este periodo<sup>7,8</sup>. En general, en España, la supervivencia neta a cinco años del diagnóstico es del 12,7 % en hombres y del 17,6 % en mujeres<sup>2</sup>. Estos datos nos sugieren tres estrategias esenciales para disminuir el sufrimiento y mortalidad por cáncer de pulmón. En primer lugar, impactar en su incidencia a la baja, mediante el descenso del tabaquismo, factor responsable de aproximadamente el 85 % de los casos en nuestro medio<sup>9</sup>. En segundo término, será preciso la implantación de programas de diagnóstico precoz, una vez que los programas de cribado con TACs de baja irradiación periódicos han mostrado utilidad en pacientes de alto riesgo<sup>10</sup>. Finalmente, es deseable el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas eficaces, particularmente de acción sistémica.

El tabaco es el factor de riesgo más importante en el desarrollo del cáncer de pulmón. El humo del tabaco contiene más de 4000 sustancias químicas, incluidos al menos 69 carcinógenos. El 15 % de los fumadores desarrollan cáncer de pulmón<sup>11</sup>. Se estima que el riesgo relativo de padecer cáncer de pulmón es aproximadamente 20 veces mayor que el de una persona que nunca ha fumado, estando relacionada la magnitud del riesgo con la intensidad del tabaquismo (calculada según el número de cigarrillos fumados por día y el número de años fumando)<sup>12</sup>. Además, el hábito tabáquico es factor etiológico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), que está a su vez directamente asociada con el desarrollo de neoplasias pulmonares<sup>13</sup>. Aparte del tabaco y otros factores de riesgo relacionados (fumadores pasivos, cigarrillos electrónicos, cannabis u otros usos del tabaco), la dieta, los carcinógenos ambientales, la exposición a carcinógenos en el ámbito laboral, y ciertas enfermedades infecciosas respiratorias, pueden favorecer también la aparición de tumores pulmonares<sup>14</sup>. Entre los carcinógenos relacionados con el ámbito laboral destacan los asbestos, habitualmente utilizados en la construcción<sup>15</sup>, o el radón, presente en muchos terrenos<sup>16</sup>. Las neumonías causadas por infecciones con *Streptococcus pneumoniae*<sup>17</sup> o *Chlamydia pneumoniae*<sup>18</sup> se han relacionado también con la aparición de cánceres pulmonares.

### 1.2 Subtipos histológicos.

El cáncer de pulmón incluye dos grandes categorías histológicas, el de células pequeñas o microcítico (CPM) y el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), que representan un 10-15 % y un 85-90 % de los cánceres de pulmón, respectivamente. El CPNM puede ser a su vez clasificado

en adenocarcinoma, carcinoma escamoso y carcinoma de células grandes, representando cada uno el 45 %, 30 % y 10 % de los pacientes de CPNM, respectivamente<sup>14,19</sup> (Figura 2).



**Figura 2. Clasificación histológica del cáncer de pulmón.** CPM (Cáncer de Pulmón Microcítico); CPNM (Cáncer de Pulmón No Microcítico); ADC (Adenocarcinoma); CCL (Carcinoma de Célula Grande); ESC (Carcinoma Epidermoide).

### 1.3 Biología molecular del cáncer de pulmón.

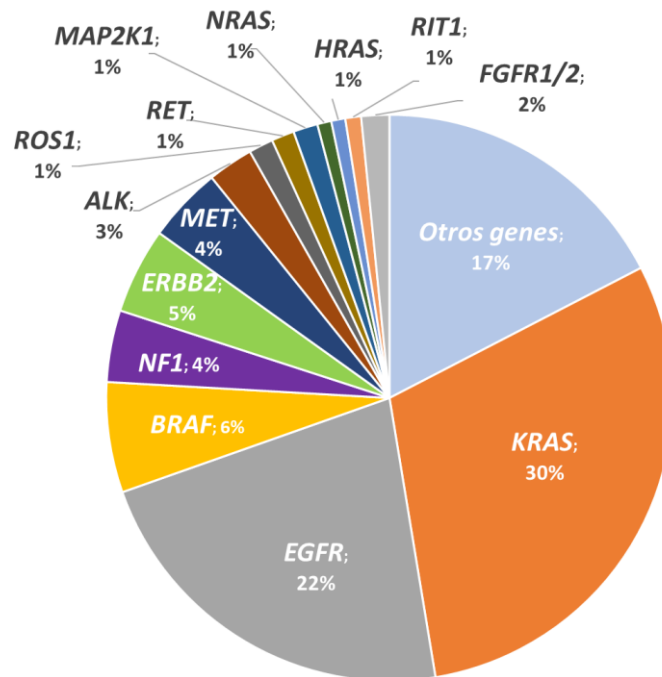
Desde el punto de vista molecular, el cáncer de pulmón es una enfermedad altamente heterogénea<sup>20</sup>. En los últimas tres décadas se ha avanzado enormemente en la identificación de las alteraciones moleculares subyacentes al desarrollo de este tipo de neoplasias, merced en gran medida a la disponibilidad de tecnologías de secuenciación y al análisis de datos masivos<sup>21</sup>. Así, la caracterización genómica de amplias cohortes de pacientes ha permitido establecer una optimización en la clasificación molecular de estos tumores<sup>22</sup>. Es importante destacar que las alteraciones genómicas predominantes difieren en los subtipos de adenocarcinoma y carcinoma escamoso de cáncer de pulmón<sup>23,24</sup>.

Las alteraciones genéticas más frecuentes en el adenocarcinoma<sup>25</sup> incluyen mutaciones en el gen supresor tumoral *TP53* (46 % de los casos)<sup>26,27</sup>, el gen homólogo al oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten (*KRAS*, 25-30 % de los casos)<sup>28</sup>, el gen de la serin/treonin kinasa 11 (*STK11*, 25 % de los casos)<sup>29</sup>, y el gen para la proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch (*KEAP1*, 20-30 % de los casos)<sup>30</sup>. En la Figura 3 se representan las alteraciones en genes con importancia en la clínica, bien porque son susceptibles de ser tratadas con terapias dirigidas o bien porque son utilizadas como biomarcadores, caben destacar:

- Las alteraciones en el gen ***KRAS*** (25-30 % de los casos), previamente mencionadas, comprometen su actividad GTPasa, llevando a una acumulación de *KRAS* en el estado activo unido a GTP y, por lo tanto, a una señalización aumentada en diversas vías intracelulares relevantes (*MAPK*, *PI3K*, etc.) que conducen a la tumorigénesis<sup>31</sup>, y mayor supervivencia y proliferación celular<sup>27</sup>.

- Las mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (**EGFR**, 15-22 % de los casos en nuestro medio) sobreactivan las vías de señalización de PI3K/AKT, RAS/MAPK y JAK/STAT, y son generalmente excluyentes con las mutaciones del gen **KRAS**<sup>32</sup>.
- La alteración más común del gen kinasa de linfoma anaplásico (**ALK**, 3-5 % de los casos<sup>33</sup>) es una translocación inversa del gen de la proteína asociada a microtúbulos de tipo equinodermo 4 (**EML4**) con **ALK**, lo que resulta en el oncogén de fusión **EML4-ALK**<sup>34</sup>. Las translocaciones de **ALK** son casi siempre mutuamente exclusivas con las mutaciones de **EGFR** y **KRAS**<sup>35</sup>.
- También son relevantes las mutaciones en oncogenes como el homólogo B del oncogén viral de sarcoma murino *v-Raf* (**BRAF**), el gen para el receptor de crecimiento epidérmico humano 2 (**ERBB2/HER2**), el receptor del factor de crecimiento hepático (**MET**), o las traslocaciones del proto-oncogén tirosina proteína kinasa 1 (**ROS1**) y de **RET**. Las frecuencia de estas alteraciones son de un 2 %, 1-2 %, 1-3 %, 1 y 1 % de los casos, respectivamente<sup>36</sup>.
- Las alteraciones en los genes de los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (**FGFR1/2**, 2 % de los casos) se producen con una menor prevalencia que en el subtipo escamoso, aunque pudieran tener relevancia clínica<sup>36</sup>.

### Alteraciones genómicas en ADC

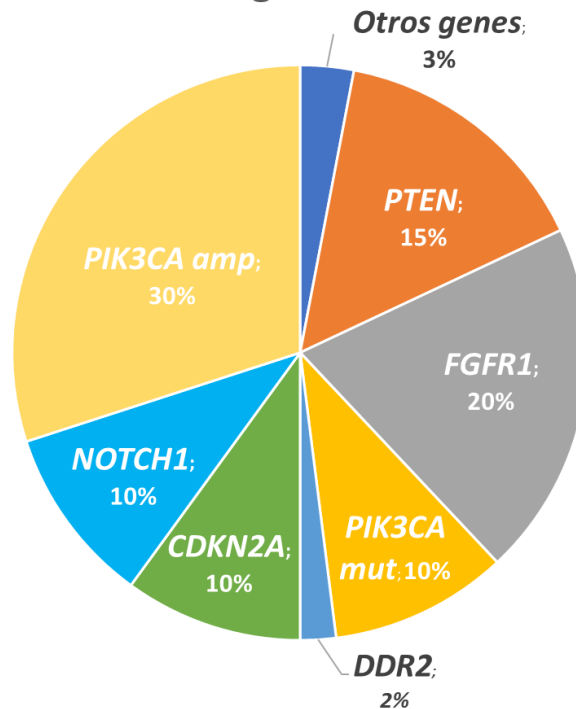


**Figura 3. Frecuencia de las alteraciones más relevantes en la práctica clínica descritas en adenocarcinoma de pulmón<sup>36</sup>.** *KRAS* (homólogo al oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten); *EGFR* (receptor del factor de crecimiento epidérmico); *BRAF* (homólogo B del oncogén viral de sarcoma murino *v-Raf*); *NF1* (neurofibromina 1); *ERBB2/HER2* (receptor de crecimiento epidérmico humano 2); *MET* (factor de transcripción epitelio-mesénquima) *ALK* (quinasa de linfoma anaplásico); *ROS1* (proto-oncogén tirosina proteína quinasa 1); *RET* (oncogén reorganizado durante la transfección); *MAP2K1* (proteína quinasa activada por mitógenos 1); *NRAS* (homólogo del oncogén RAS viral [*v-ras*] del neuroblastoma); *HRAS* (homólogo del oncogén RAS viral [*v-ras*] del neuroblastoma); *RIT1* (proteína de unión al GTP parecida a RAS); *FGFR* (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos).

Las alteraciones genéticas más frecuentes en el carcinoma escamoso<sup>24</sup> incluyen también las mutaciones en el gen supresor tumoral *TP53* (80 % de los pacientes)<sup>37</sup>, las mutaciones en el gen inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A (*CDKN2A*; 10 % de los casos)<sup>38</sup>, las mutaciones en el gen proteína homóloga 1 de locus de corte neurogénico (*NOTCH1*; 10 % de los casos)<sup>39</sup>, o las mutaciones inactivadoras en el gen supresor tumoral homólogo de fosfatasa y TENSina (*PTEN*; 15 % de los pacientes)<sup>40</sup>. En la Figura 4 también se representan las alteraciones genómicas con mayor relevancia clínica en el carcinoma escamoso, cabe destacar:

- Las alteraciones en el gen de la subunidad alfa catalítica de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (***PI3KCA***) que se encuentran en un 10 % (mutación) y en un 30 % (amplificación) de los pacientes<sup>41</sup>.
- Las amplificaciones del gen ***FGFR1*** que aparecen en un 4-20 % de los carcinomas escamosos de pulmón<sup>42</sup>. El FGFR es una tirosina quinasa de la superficie celular que está implicada en la regulación de la proliferación, la diferenciación, la migración celular y la supervivencia<sup>43</sup>. La expresión alterada de los ligandos FGF o la familia de FGFR reduce la sensibilidad a los inhibidores de EGFR de las células de CPNM de tipo mesenquimal<sup>44</sup>.

## Alteraciones genómicas en ESC



**Figura 4. Frecuencia de las alteraciones más relevantes en la práctica clínica descritas en carcinoma escamoso de pulmón<sup>45</sup>.** *PI3KCA* (subunidad alfa catalítica de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa); *FGFR1* (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1); *PTEN* (homólogo de fosfatasa y TENSina); *CDKN2A* (inhibidor de kinasa dependiente de ciclin<sup>a</sup> 2A); *NOTCH1* (proteína homóloga 1 de locus de corte neurogénico); *DDR2* (receptor de dominio de discoidina 2).

#### 1.4 Tratamiento actual.

El diagnóstico temprano es crucial para el éxito del tratamiento, ya que el estadio tumoral influye en las opciones terapéuticas. Los pacientes en estadios tempranos (I, II o III) se benefician de la cirugía<sup>46</sup>, que suele complementarse con terapias adyuvantes o neoadyuvantes sistémicas como quimioterapia y/o inmunoterapia. Los tipos de agentes quimioterapéuticos utilizados se basan en la histología tumoral<sup>47</sup>. Los pacientes en estadios avanzados de la enfermedad (IV) se ven beneficiados por el uso de agentes selectivos en el caso que el tumor presente adicción oncogénica a alteraciones genéticas susceptibles de inhibición (Tabla 1). En ausencia de tal alteración, la inmunoterapia es la base actual del tratamiento; aquellos pacientes con un porcentaje alto de expresión de PD-L1 ( $\geq 50$  % de las células tumorales) se beneficiarían de los inhibidores de PD-1/PD-L1 en monoterapia, mientras que en aquellos pacientes con bajos porcentajes ( $< 50$  %) se emplean en combinación con quimioterapia.

Tabla 1. Lista de agentes selectivos aprobados por la *Food and Drug Administration (FDA)* para el tratamiento del CPNM.

Nombre del fármaco	Diana terapéutica	Año de aprobación	Línea de tratamiento
Sotorasib (Lumakras)	KRAS	2021	CPNM metastático. 2ª línea
Adagrasib (Krazati)	KRAS	2022	CPNM metastático. 1ª línea en combinación con pembrolizumab
Gefitinib (Iressa)	EGFR	2003	CPNM metastático. 1ª línea
Bevacizumab (Avastin)	EGFR	2004	CPNM estadio precoz sin opción a Cx. CPNM metastático: 1ª línea en combinación con Qt
Erlotinib hydrochloride (Tarceva)	EGFR	2004	CPNM metastático. 1ª línea o 2ª línea tras Qt
Afatinib dimaleate (Gilotrif)	EGFR	2013	CPNM metastático. 1ª línea o 2ª línea tras Qt
Necitumumab (Portrazza)	EGFR	2015	CPNM escamoso metastático. 1ª línea con Qt
Dacomitinib (Vizimpro)	EGFR	2018	CPNM metastático. 1ª línea
Osimertinib mesylate (Tagrisso)	EGFR	2018	CPNM estadio temprano: terapia adyuvante tras Cx. CPNM metastático: 1ª línea
Amivantamab-vmjw (Rybrevant)	EGFR	2021	CPNM metastático. 2ª línea tras Qt (EGFR)
Tremelimumab-actl (Imjudo)	EGFR/ALK	2022	CPNM metastático. 1ª línea en combinación con durvalumab o Qt
Crizotinib (Xalkori)	ALK/ROS1	2011	CPNM metastático. 1ª línea
Ceritinib (Zykadia)	ALK	2014	CPNM metastático. 1ª línea
Alectinib (Alecensa)	ALK	2015	CPNM metastático. 1ª línea
Brigatinib (Alunbrig)	ALK	2017	CPNM metastático. 1ª línea
Lorlatinib (Lorbrena)	ALK	2021	CPNM metastático. 1ª línea
Dabrafenib mesylate (Tafinlar)	BRAF	2013	CPNM metastático. 1ª línea en combinación con trametinib
Trametinib dimethyl sulfoxide (Mekinist)	BRAF	2013	CPNM metastático. 1ª línea en combinación con dabrafenib
Encorafenib (Braftovi)	BRAF	2023	CPNM metastático. 1ª línea con binimetinib
Capmatinib hydrochloride (Tabrecta)	MET	2022	CPNM metastático. 1ª línea
Tepotinib hydrochloride (Tepmetko)	MET	2021	CPNM metastático. 1ª línea
Entrectinib (Rozlytrek)	ROS1	2019	CPNM metastático. 2ª línea tras progresión con crizotinib
Pralsetinib (Gavreto)	RET	2020	CPNM metastático. 1ª línea
Selpercatinib (Retevmo)	RET	2020	CPNM metastático. 1ª línea
Ramucirumab (Cyramza)	VEGFR-2	2020	CPNM metastático. 1ª línea en combinación con erlotinib. 2ª línea con docetaxel tras Qt. 2ª línea en mutaciones EGFR o ALK
Fam-trastuzumab deruxtecan-nxki (Enhertu)	HER2	2022	CPNM estadio precoz: 2ª línea sin opción Cx. CPNM metastático: 1ª línea
Ipilimumab (Yervoy)	PD-L1	2011	CPNM metastático. 1ª línea en combinación con nivolumab
Nivolumab (Opdivo)	PD-1	2014	CPNM estadio temprano: pre-cirugía combinación con Qt. CPNM metastático 1ª línea con ipilimumab o Qt

<b>Pembrolizumab (Keytruda)</b>	PD-1	2014	CPNM estadios tempranos en terapia adyuvante. CPNM estadio III sin opción de Cx, Qt o Rx. CPNM metastático: 1ª línea solo o con Qt
<b>Atezolizumab (Tecentriq)</b>	PD-L1	2016	CPNM estadio temprano: 2ª línea. CPNM metastático: 1ª línea solo o en combinación con bevacizumab o Qt
<b>Cemiplimab-rwlc (Libtayo)</b>	PD-1	2018	CPNM de estadio precoz sin opción de Cx, Qt o Rx: 2ª línea. CPNM metastático: 1ª línea.
<b>Durvalumab (Imfinzi)</b>	PD-L1	2022	CPNM de estadio precoz sin opción de Cx, Qt o Rx: 2ª línea como agente único. CPNM metastático sin mutaciones en <i>EGFR</i> ni <i>ALK</i> : 1ª línea en combinación con tremelimumab

Datos de noviembre 2023, obtenidos de fda.gov. Abreviaturas: CPNM (Cáncer de Pulmón No Microcítico), Cx (Cirugía), Qt (Quimioterapia), Rx (Radioterapia).

Los tumores con mutaciones en genes como *EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *MET*, *ROS*, *RET*, *HER2* y *KRAS* pueden beneficiarse de terapias dirigidas específicas en primera línea (en monoterapia o en combinación con otro tratamiento) y/o posteriormente (Tabla 1), cabe destacar:

- Los inhibidores de EGFR de primera y segunda generación son más eficaces que la quimioterapia en términos de supervivencia libre de progresión y calidad de vida, y presenta un perfil de seguridad más favorable<sup>48,49</sup>. Ante el desarrollo de nuevas mutaciones de resistencia, como la mutación *EGFR T790M*<sup>48</sup>, se han desarrollado inhibidores de tercera generación (osimertinib), aprobados para su uso en primera<sup>49</sup> o en segunda línea<sup>50</sup>.
- Las fusiones de *ALK* también se abordan con terapias dirigidas como crizotinib<sup>51</sup>, ceritinib<sup>52</sup>, alectinib<sup>53,54</sup> o el lorlatinib<sup>55</sup> (primera, segunda y tercera generación, respectivamente). El crizotinib también se utiliza en pacientes con alteraciones en *ROS1*<sup>56</sup> y *MET*<sup>57</sup>.
- La mutación *BRAF V600E* se trata con inhibidores específicos como el dafratenib<sup>57</sup>, que para una mayor eficacia se combina con el inhibidor de MEK trametinib<sup>58</sup>.
- También existen terapias dirigidas específicas para las mutaciones en *MET* (crizotinib)<sup>59</sup> o *HER2* (trastuzumab)<sup>60</sup>, así como para las fusiones en *RET* (pralsetinib)<sup>61</sup>.
- Los inhibidores covalentes alostéricos de la mutación *KRAS G12C*, como el inhibidor sotorasib<sup>334</sup>, han mostrado eficacia en ensayos clínicos. Si bien la aparición temprana de resistencias<sup>62</sup> sigue siendo problemática, por lo que se

están probando combinaciones con otros inhibidores y enfoques alternativos para mejorar los resultados<sup>63</sup>.

A pesar de todos estos avances en el desarrollo de una medicina de precisión, un porcentaje muy relevante de los CPNM no presentan alteraciones conductoras accionables terapéuticamente<sup>64</sup> y, por tanto, no pueden ser susceptibles de una terapia dirigida. Además, la aparición de resistencias adquiridas a estos tratamientos dirigidos es la norma. La inmunoterapia pretende inhibir mecanismos de evasión inmune del tumor, y se ha convertido en una estrategia prometedora en estos contextos. Los inhibidores de PD-1/PD-L1 han demostrado un beneficio en pacientes proporcional a la expresión de PD-L1<sup>65</sup> en el tumor. En este sentido es relevante señalar que se están investigando biomarcadores alternativos con el fin de optimizar la identificación de pacientes candidatos a la inmunoterapia.

En conclusión, el tratamiento del CPNM ha avanzado significativamente con terapias dirigidas e inmunoterapia, pero aún se necesitan enfoques más precisos y personalizados. La detección temprana y la identificación de biomarcadores predictivos de respuesta son esenciales para mejorar la supervivencia y superar las resistencias a los tratamientos en el cáncer de pulmón. La investigación continua en medicina de precisión y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas prometen un futuro más esperanzador para los pacientes con CPNM.

## **2. RECEPTORES TIROSINA KINASA (RTKs) COMO DIANAS TERAPÉUTICAS EN EL CÁNCER DE PULMÓN**

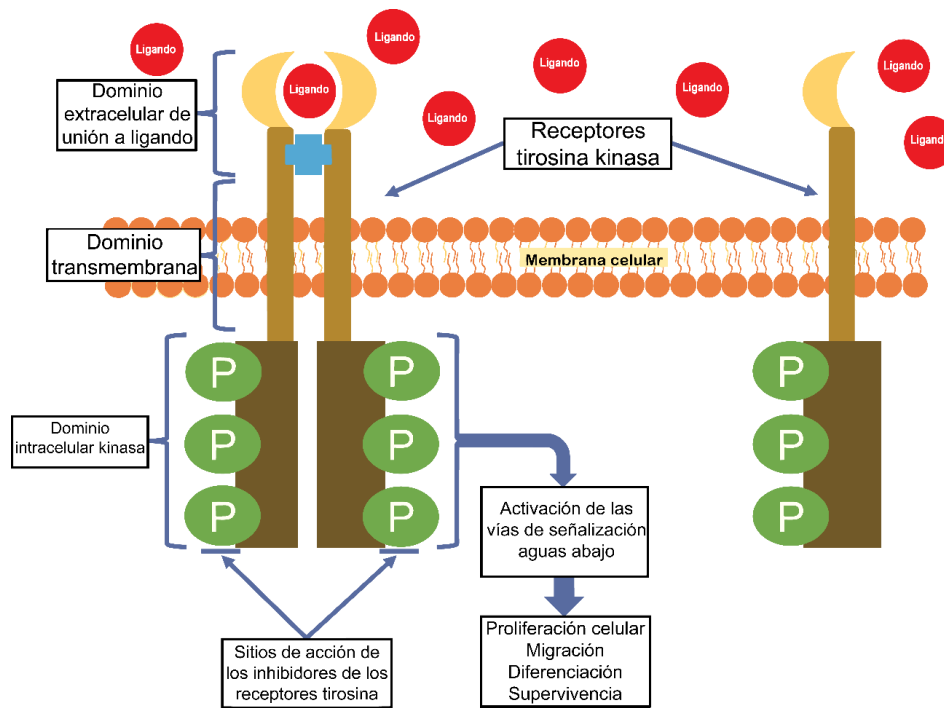
La mayoría de terapias personalizadas aprobadas por las agencias sanitarias se dirigen a diversos receptores tirosina kinasa cuya implicación en la oncogénesis y progresión tumoral ha sido ampliamente demostrada<sup>66</sup>. En el contexto específico del cáncer de pulmón, estas alteraciones genéticas se presentan con una incidencia elevada especialmente en el adenocarcinoma<sup>24</sup>.

Los receptores tirosina kinasa (RTKs) son glicoproteínas de membrana que actúan como receptores de señales químicas extracelulares, procesando y transmitiendo información al interior de la célula<sup>67</sup>. De esta manera, juegan un papel crucial en la regulación de múltiples procesos celulares. Su disfunción en la regulación de estas señales puede tener consecuencias patológicas relevantes, incluyendo la tumorigenesis<sup>66</sup>.

### **2.1 Estructura de los RTKs.**

La estructura de la mayoría de los RTKs es similar y consta de diferentes dominios (Figura 5). En primer lugar, incluye un dominio extracelular de unión del ligando, que varía entre las

diferentes subfamilias de receptores debido a los distintos motivos y patrones de unión específicos para cada ligando. A continuación, encontramos un único dominio transmembrana y una región yuxtamembrana. Además, hay un dominio citosólico tirosin kinasa (TKD) y una cola flexible C-terminal<sup>67</sup>. Los dominios extracelulares del RTK permiten una unión específica del ligando, lo que evita la activación irregular de las señales y aumenta la precisión de la señalización.



**Figura 5. Características estructurales generales y mecanismo de activación de un RTK.** Los RTKs son glicoproteínas transmembrana formadas por un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembrana, y un dominio quinaso intracelular. Se activan por la unión de su ligando y transducen la señal extracelular al citoplasma por medio de la autofosforilación de los residuos de tirosina de los receptores y la fosforilación de los residuos de tirosina en las proteínas presentes en la señalización aguas abajo. Adaptada de Tian y colaboradores<sup>68</sup>.

Cuando se produce la unión del ligando, las regiones extracelulares dimerizan a través de múltiples interacciones electrostáticas<sup>69</sup>. Esto genera una transautofosforilación de residuos de tirosina específicos del dominio TK, lo que estabiliza la forma activa del receptor<sup>70</sup>. Las tirosinas fosforiladas actúan como puntos de reclutamiento para proteínas con dominios SH2 o PTB<sup>71</sup>, lo que facilita la transducción de señales a través de diferentes vías de señalización y modula la función celular<sup>72</sup>. Las diferentes características estructurales de los RTKs definen las diferentes familias de receptores: EGFR, receptor de Insulina, PDGFR, VEGFR, FGFR, CCK, NGFR, HGFR, EPHR, AXL, TIE, RYK, DDR, RET, ROS, LTK, ROR, MUSK y LMR<sup>73,74</sup>.

## 2.2 RTKs y cáncer.

Los RTKs desempeñan un papel crucial en el cáncer, encontrándose alteraciones de diverso tipo en aproximadamente el 30 % de los genes que los codifican en esta enfermedad<sup>74</sup>. Estas modificaciones incluyen sobreexpresión, amplificación génica, reordenamientos o mutación de los RTK o sus ligandos, lo que conduce a la activación de las vías de señalización protumorigénicas. La sobreexpresión del RTK es común en muchos cánceres y puede deberse a la amplificación génica, polisomía, transcripción alterada y aberraciones epigenómicas, promoviendo así la oncogénesis y la resistencia a las terapias<sup>75</sup>. Las mutaciones de los RTKs también tienen un papel relevante en la oncogénesis. Existen mutaciones activadoras que generan una activación constante y oncogénica<sup>85</sup>, mutaciones que suprimen las interacciones autoinhibitorias<sup>76</sup>, y mutaciones que interfieren con la regulación a la baja del RTK<sup>59</sup>. Otras modificaciones importantes que implican a los RTKs en el cáncer son las fusiones oncogénicas de los RTKs, que resultan en una actividad kinasa constitutiva independiente del ligando<sup>67</sup>, y la desregulación de sus ligandos, que pueden conferir resistencia a fármacos<sup>77</sup>. El conocimiento sobre estas alteraciones proporciona oportunidades para desarrollar terapias dirigidas y estrategias terapéuticas innovadoras para abordar esta compleja enfermedad.

Las características estructurales que distinguen a los RTKs hacen que constituyan un grupo de dianas terapéuticas a las que dirigir selectivamente terapias. Los inhibidores de RTKs han mostrado resultados iniciales relevantes en cánceres con alteraciones en diferentes receptores, pero su efectividad se ve limitada por los efectos inespecíficos, la toxicidad y la aparición de resistencias<sup>78</sup>. Por tanto, existe una necesidad de encontrar nuevas opciones terapéuticas más efectivas, menos tóxicas y que evadan o retrasen la aparición de mecanismos de resistencia para aumentar el beneficio terapéutico de los pacientes.

De entre todos los RTKs accionables, destacamos algunos como el EGFR, RET, ROS, NTRK, MET, ALK, HER2 o el FGFR, por la disponibilidad de varios agentes específicos en clínica para el tratamiento de pacientes con alteraciones en estos receptores. Ejemplos como la mutación *L858R* o las deleciones de exón 19 de *EGFR*<sup>79</sup> son tratables con inhibidores como el erlotinib, gefitinib u osimertinib<sup>80</sup>. Otro ejemplo son las fusiones oncogénicas del gen *ALK*, presentes en el CPNM (*EML4-ALK*, 4 % de los casos)<sup>81</sup>, que se pueden inhibir con agentes específicos como el alectinib o lorlatinib<sup>82</sup>. Parece de especial interés, la familia de receptores FGFR debido a su potencial en las diferentes histologías y su complejidad (diversos receptores, ligandos y cofactores). Esto requiere una comprensión exhaustiva de su biología para desarrollar estrategias terapéuticas efectivas<sup>83</sup>.

### 2.3 Receptores FGFR en cáncer.

#### 2.3.1 Características de los FGFR.

Los FGFRs son una familia de receptores que presentan siete isoformas diferentes, y desempeñan un papel crítico en el desarrollo, la homeostasis tisular y diversas patologías humanas<sup>84</sup>, incluidos varios tipos de cáncer<sup>85</sup>. La señalización de los FGFRs es específica del contexto, es decir, dependiendo de los diferentes ligandos y receptores presentes en cada tipo tumoral, pueden ejercer un papel protumorigénico o supresor tumoral<sup>86</sup>.

El FGFR fue descrito por primera vez como un receptor con un dominio extracelular que contenía tres dominios tipo inmunoglobulina con una región ácida, un único dominio transmembrana, un largo dominio de yuxtamembrana y un dominio intracelular con dos dominios tirosina kinasa<sup>87</sup>. Este receptor ahora es conocido como FGFR1. El FGFR2 fue identificado por tener una actividad tirosina kinasa similar a la del FGFR1<sup>88</sup>. Los RTKs codificados por los genes *FGFR3* y *FGFR4* poseen estructuras altamente conservadas del FGFR1 y el FGFR2<sup>89,90</sup>. Dentro de la familia FGFR, el FGFR5, también conocido como “*FGFR like 1*” (FGFRL1), a diferencia de los otros miembros de la familia, carece del dominio tirosina kinasa, lo que tradicionalmente lo ha considerado como un regulador negativo de los FGFRs<sup>91</sup>. Sin embargo, estudios recientes han revelado que el FGFR5 puede actuar como un correceptor que potencia la señalización del FGFR1<sup>92</sup>.

#### 2.3.2 Señalización de los FGFR.

Cuando los FGFs se unen a sus receptores, estos últimos forman homodímeros asimétricos, y sus dominios kinasa se autofosforilan en residuos de tirosina específicos<sup>93</sup>. Esto permite la unión de adaptadores de señalización y activa diferentes vías de señalización (Figura 6). El FGFR1 presenta hasta siete residuos de tirosina fosforilados, que constituyen sitios de unión para diversas proteínas adaptadoras. La mayoría de los residuos de autofosforilación se encuentran conservados entre los diferentes FGFRs, a excepción del receptor FGFR4<sup>94</sup>.

La autofosforilación de los residuos tirosina permite la unión de la proteína adaptadora FRS2, quien es esencial para activar la señalización RAS-MAPK<sup>94,95,96</sup>. Otras proteínas como GRB2 pueden unirse a FRS2 fosforilada y, a su vez, unirse a SOS, un factor de intercambio de nucleótidos guanina. El complejo RTK-GRB2-SOS activa RAS al promover la retirada de GDP y su sustitución por GTP, desencadenando así la cascada de señalización RAS-MAPK. En ella, la proteína RAS activada fosforila las proteínas RAF, MEK1 y MEK2, y finalmente activa ERK (p42/p44). La proteína ERK fosforilada se transloca al núcleo, donde activa factores de

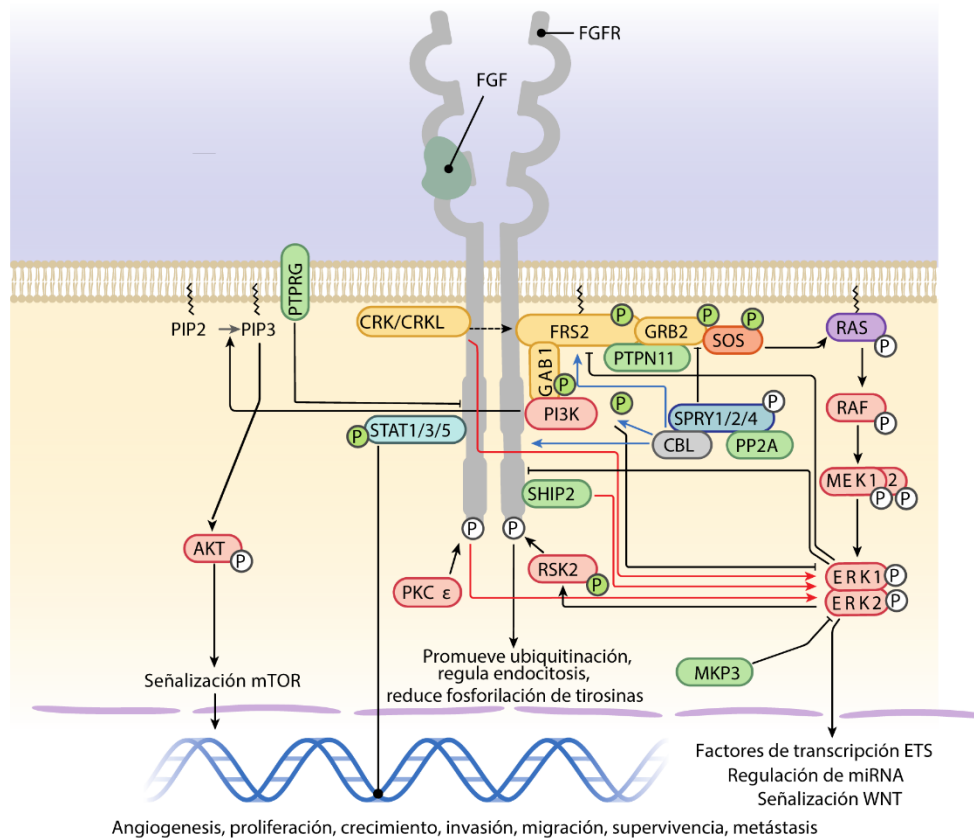
transcripción que regulan genes involucrados en la proliferación celular, la apoptosis, la diferenciación, la migración y la angiogénesis<sup>97,98</sup>

Por otro lado, la fosfolipasa C gamma (PLC $\gamma$ ) también se une por el dominio SH2 a los residuos tirosina fosforilados, y se activa<sup>99</sup>. Otras proteínas adaptadoras que interactúan por medio de dominios SH2 con el FGFR son CRK y CRKL<sup>100</sup>. Estas proteínas pueden interactuar con el complejo FRS2-GRB2-PTPN11<sup>101</sup>, formando un complejo que regula la activación eficiente de las kinasas ERK1/2 de la vía RAS-MAPK<sup>102</sup> (Figura 6). Por último, la señal de ERK1/2 puede ser regulada por SHIP2, otra proteína adaptadora que se une a FGFR. SHIP2 interacciona con el FGFR para generar una señalización sostenida de ERK1/2<sup>103</sup>.

Además de la señalización de MAPK, el FGFR activa la señalización PI3K-AKT: la proteína GAB1 se une al FRS2 fosforilado, lo que conlleva su fosforilación y el reclutamiento de PI3K, activando así la vía PI3K-AKT<sup>104</sup>. Esta señalización está implicada en la angiogénesis mediada por FGF<sup>105</sup> y regula negativamente la señalización de ERK1/2<sup>106</sup>.

Por otro lado, la activación de FGFR1-4 también activa otras rutas de señalización oncogénicas, como la ruta de las STATS (Figura 6)<sup>107,108</sup>. La activación de STAT3 depende de su interacción con el FGFR<sup>109</sup> y, una vez activadas, las STATS se translocan al núcleo, donde promueven la expresión de genes relacionados con la proliferación, supervivencia, invasión e inmunosupresión<sup>110</sup>.

Además, existen mecanismos de regulación positiva y negativa de la señalización FGFR. Por ejemplo, la proteína PKC $\epsilon$  amplifica la señalización FGFR-RAS-MAPK y FGFR-PI3K-AKT<sup>111</sup>. Por otro lado, los mecanismos de retroalimentación negativa mediados por microARNs<sup>112</sup>, MKP3<sup>113</sup>, SPRY<sup>114</sup> y SEF, evitan una señalización de FGFR desregulada. La endocitosis de los receptores FGFR también contribuye a la regulación negativa, y la E3 ubiquitin ligasa CBL juega un papel crucial en este proceso (Figura 6)<sup>115</sup>.



**Figura 6. Componentes de la vía de señalización de FGFR.** En amarillo, proteínas adaptadoras; en morado, GTPasas; en rojo, quinasas; en verde, fosfatasas; en naranja, factor intercambiador de GTP; en azul claro; factor transcripcional; en azul oscuro, regulador negativo; en gris, E3 ubiquitin ligasa. La flecha negra indica activación mientras que la llave negra indica inhibición; la flecha roja indica retroalimentación positiva; la flecha azul indica ubiquitinación. Adaptada de Ferguson y colaboradores<sup>116</sup>.

### 2.3.3 Papel de los FGFRs en el cáncer.

La señalización alterada de los FGFRs ocurre en diferentes subtipos tumorales, estando implicada tanto en la iniciación como en la progresión del tumor. El 61 % de las alteraciones en FGFR1-4 (que suponen el 7 % de las alteraciones en todos los cánceres) son amplificaciones, suponiendo las amplificaciones de FGFR1 un 41 % de todas las alteraciones genómicas de los FGFRs<sup>117</sup>.

#### - FGFR1:

Las amplificaciones del gen *FGFR1* (8p11) son las alteraciones más comúnmente presentes en el carcinoma escamoso<sup>118</sup>. Están asociadas con carcinomas de etapas tardías<sup>119</sup>, pero no necesariamente con una peor prognosis<sup>120</sup>. La amplificación de *FGFR1* se ha visto hasta en un 10 % de los cánceres de mama<sup>121</sup>, estando asociadas con un peor pronóstico<sup>122</sup>, resistencia a la terapia endocrina<sup>123</sup>, y peores tasas de supervivencia a los 5 años. Otros tumores que se asocian con amplificación de *FGFR1* incluyen diferentes tipos de tumores digestivos<sup>124,125</sup>, el adenocarcinoma pancreático<sup>126</sup>, o el cáncer ovárico

y urotelial<sup>117</sup>. En el cáncer colorrectal, se ha visto que la sobreexpresión de FGFR1 actúa como biomarcador predictivo en modelos preclínicos, indicando sensibilidad a la inhibición selectiva de FGFR<sup>127</sup>. Hallazgos similares se han observado en el caso del mesotelioma pleural maligno<sup>128</sup>.

- FGFR2 y FGFR3:

Las amplificaciones del gen *FGFR2* son las segundas más comunes de los FGFR1-4 en el cáncer<sup>117</sup>, teniendo importancia en el cáncer de mama<sup>129</sup> y en el cáncer gástrico<sup>130</sup>. En cambio, las amplificaciones de *FGFR3* son menos comunes y casi exclusivas del cáncer urotelial/vejiga<sup>131</sup>. Las mutaciones de los *FGFR* son considerablemente menos comunes que las amplificaciones pero, en el caso de *FGFR2/3* tienen una mayor incidencia que en el *FGFR1/4*<sup>117</sup>. Otras alteraciones comunes en la familia de FGFR son las proteínas de fusión. Las proteínas de fusión más comunes de la familia FGFR son las que incluyen los genes *FGFR2* y *FGFR3*<sup>117</sup>, mientras que las de *FGFR1* y *FGFR4* son menos frecuentes<sup>132</sup>. Principalmente, las fusiones de *FGFR2* se encuentran en el colangiocarcinoma<sup>133</sup> mientras que las fusiones de *FGFR3* tienen una incidencia en tumores uroteliales<sup>134</sup>, y en el cáncer de cérvix<sup>135</sup>.

- FGFR4:

La amplificación del gen *FGFR4* está principalmente asociada con el cáncer de mama<sup>136</sup> y con los tumores adrenocorticales<sup>137</sup>, aunque su sobreexpresión sin amplificación se produce con mayor frecuencia<sup>138</sup>. Otra neoplasia donde la sobreexpresión de FGFR4 tiene importancia es el carcinoma hepatocelular, estando relacionada con la carcinogénesis hepática y cuya inhibición resulta eficaz en modelos preclínicos<sup>139</sup>.

Entre las alteraciones del gen *FGFR4* destaca la mutación *G388R*, asociada con una expresión incrementada del gen. Esta mutación tiene relevancia pronóstica en diferentes tipos tumorales, como el de pulmón, próstata, cabeza y cuello, mama y colón. La variante *G388R* se relaciona con una susceptibilidad al cáncer incrementada, y con una reducida supervivencia general<sup>140</sup>. Se ha descrito que esta mutación cambia la función de la proteína<sup>141</sup>, causando una sobre activación de la vía de STAT3 y la inducción de la transición epitelio-mesénquima<sup>142,143</sup>.

La señalización aberrante de los FGFRs no sólo depende de las alteraciones moleculares que ocurren directamente en estos genes, sino que también pueden darse otras alteraciones que impidan que los diferentes bucles de inhibición de la señalización se lleven a cabo. Por ejemplo,

se han descrito mutaciones en CBL, la proteína que dirige al FGFR a una degradación por ubiquitinación, que provocan la acumulación de RTKs en la leucemia mieloide aguda<sup>144</sup>.

2.3.4 *FGFR1* y *FGFR4* en el cáncer de pulmón.

Las alteraciones de *FGFR* (amplificaciones génicas, mutaciones y reordenamientos) están presentes en aproximadamente un 13 % de los cánceres de pulmón<sup>117</sup>. En la siguiente tabla (Tabla 2) se resumen las alteraciones genómicas de los FGFR más comunes en el cáncer de pulmón<sup>145</sup>:

Tabla 2. Alteraciones genómicas comunes encontradas en el cáncer de pulmón<sup>145</sup>.

Gen	Alteración	Histología	Incidencia ( %)
<b>FGFR1</b>	Amplificación	CPNM escamoso	4-20 % <sup>117</sup>
		CPM	7 % <sup>146</sup>
	Translocaciones; <i>BAG4-FGFR1</i>	CPNM escamoso	Rara <sup>147</sup>
<b>FGFR2</b>	Mutaciones somáticas; <i>W290C, S320C, K660E/N</i>	CPNM escamoso	3 % <sup>117</sup>
	Translocaciones <i>FGFR2-SHTN1, FGFR2-CIT</i>	CPNM adenocarcinoma	Rara <sup>147</sup>
<b>FGFR3</b>	Mutaciones somáticas; <i>R248C, S249C</i>	CPNM escamoso	3 % <sup>117</sup>
	Translocaciones; <i>FGFR3-TACC3</i>	CPNM escamoso	0,1-1,1 % <sup>147</sup>
<b>FGFR4</b>	Mutaciones somáticas; <i>G2041A</i>	CPNM adenocarcinoma	2 % <sup>148</sup>

Abreviaturas: CPNM (Cáncer de Pulmón No Microcítico).

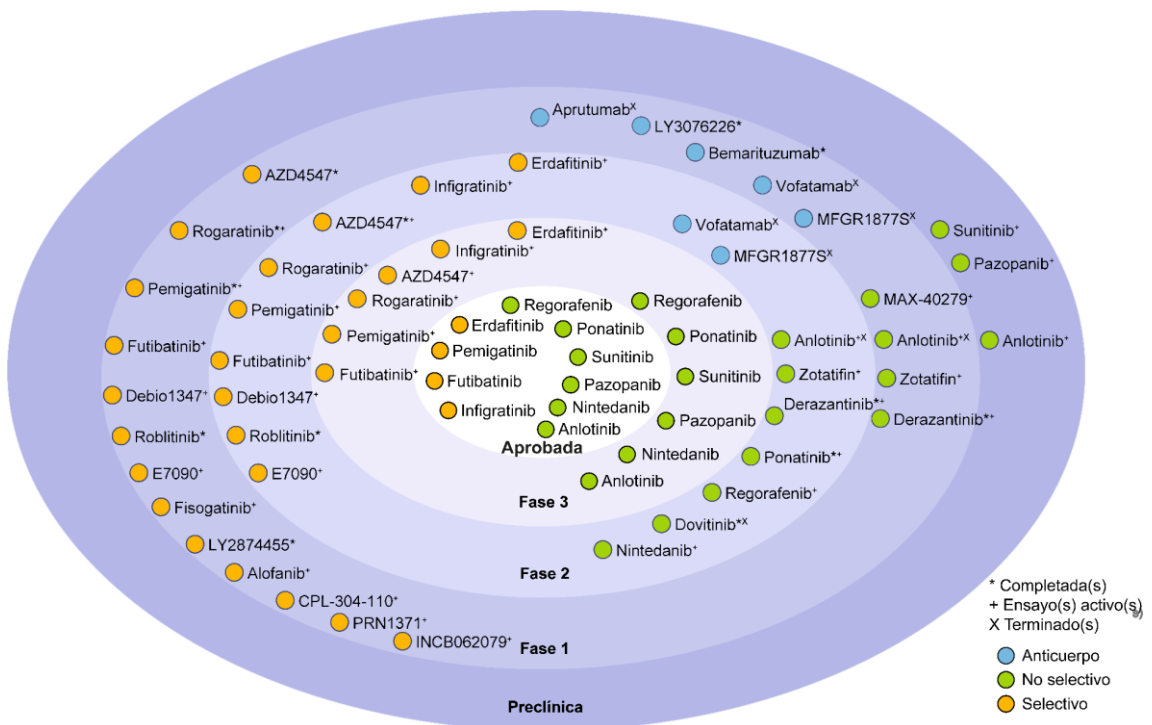
Entre las alteraciones de *FGFR* encontradas en el cáncer de pulmón, la amplificación de *FGFR1* es la más común en el CPNM<sup>117</sup>, siendo el subtipo escamoso el que muestra la mayor frecuencia (hasta en un 20 % de los casos<sup>149</sup>), mientras que el adenocarcinoma de pulmón muestra solo un un 4 % de casos<sup>117</sup>. La amplificación de *FGFR1* también se ha descrito en el 7 % de los CPM<sup>146</sup>. Datos preclínicos con líneas celulares de carcinoma escamoso de pulmón con *FGFR1* amplificado mostraron que dicha amplificación provocaba la sobreexpresión de la proteína y sensibiliza a los inhibidores de FGFR, señalando a *FGFR1* como una diana terapéutica de utilidad en el CPNM<sup>118,150</sup>. Sin embargo, estudios posteriores han rebatido que la amplificación génica se traduzca en una sobreexpresión del receptor<sup>151</sup>. También se han identificado fusiones génicas de *FGFR1* relacionadas con el hábito tabáquico y con una menor diferenciación tumoral, en algunos casos aislados de CPNM, sobre todo en carcinomas escamosos de pulmón<sup>152</sup>. La principal fusión es la *BAG4-FGFR1*, aunque todavía no se han descrito estudios funcionales relativos al mecanismo de acción de esta fusión.

En cuanto al gen *FGFR4*, se ha descrito que la alta expresión proteica de *FGFR4* se correlaciona con un mayor tamaño tumoral y una peor supervivencia<sup>153</sup>. Las principales alteraciones de este gen son las mutaciones puntuales<sup>148</sup>, destacando las variantes *G388R* y *G681K*<sup>154</sup>. La presencia de la variante *G388R* se ha relacionado en algunos estudios con una

mayor afectación ganglionar y un peor pronóstico en pacientes con adenocarcinoma o carcinoma escamoso de pulmón<sup>143</sup>.

2.3.5 FGFRs como dianas terapéuticas.

Debido el amplio espectro de las alteraciones genómicas de la familia *FGFR* observadas en múltiples tipos tumorales, se han desarrollado numerosas terapias dirigidas contra estos receptores que actualmente están siendo evaluadas en estudios preclínicos y clínicos (Figura 7)<sup>155</sup>. El panorama actual de los inhibidores FGFR incluye pequeñas moléculas inhibidoras tirosin kinasa (TKIs) del receptor (no selectivas y selectivas), anticuerpos monoclonales y secuestradores de ligando que se representan y explican a continuación (Figura 7).



**Figura 7. Panorama clínico actual de los inhibidores de FGFR.** Inhibidores de FGFR en ensayos preclínicos y en ensayos clínicos de Fase 1, Fase 2 y Fase 3. Esta figura no incluye los ensayos que valoran la combinación de los inhibidores de FGFR con otras estrategias terapéuticas. Adaptada de Krook y colaboradores<sup>156</sup>. Actualizada a noviembre de 2023.

- TKIs no selectivos:

Los TKIs no selectivos son compuestos que se unen al dominio de unión al ATP en el RTK, sin mostrar especificidad por una kinasa en particular. Por tanto, también afectan a otros RTKs, resultando en una actividad moderada contra la familia de FGFR<sup>157</sup>.

Los intentos iniciales de inhibir a los FGFR se hicieron utilizando inhibidores multi-kinasas, como el ponatinib (aprobado para el tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica<sup>158</sup>), el dovitinib y el nintedanib (aprobado para el tratamiento de la Fibrosis

Pulmonar Idiopática<sup>159,160</sup>). Aunque no fueron diseñados específicamente para los FGFR, estos inhibidores son capaces de unirse de manera reversible y competitiva a los FGFR1-4, interfiriendo con la unión del ATP. Otros inhibidores no selectivos que se han ido aprobando para su uso en diferentes neoplasias son el regorafenib (cáncer colorrectal<sup>161</sup>, tumores gastrointestinales<sup>162</sup> y hepatocarcinomas<sup>163</sup>), el pazopanib (cánceres renales y sarcomas de tejidos blandos)<sup>164</sup>, el anlotinib (en pacientes de CPNM<sup>165</sup>) o el sunitinib (tumores gastrointestinales, renales y algunos cánceres de páncreas)<sup>166-168</sup>. Sin embargo, la toxicidad ha sido un desafío significativo para su uso clínico, como ocurre con el dovitinib<sup>169</sup>. La mayoría de las toxicidades relacionadas con el uso de inhibidores FGFR no selectivos se atribuyen a la homología del dominio de unión del ATP a lo largo del kinoma humano<sup>170</sup>.

A pesar de esto, varios TKIs no selectivos están siendo evaluados actualmente en ensayos clínicos para tumores con mutaciones en FGFR, incluyendo el derazantinib, el zotatifin, y el MAX-40279<sup>169-174</sup> (Figura 7).

- TKIs selectivos:

La primera generación de inhibidores de kinasas selectivos para FGFR (pan-inhibidores de FGFR) incluía a los inhibidores AZD4547, erdafitinib, Debio1347, infigratinib, LY2874455, E7090, pemigatinib, CPL-304-110 y rogratinib (BAY1163877) (Figura 7). El erdafitinib ha sido aprobado para su uso en pacientes con tumores de vejiga<sup>175</sup>, mientras que el infigratinib y el pemigatinib han sido aprobados en el colangiocarcinoma metastático<sup>176,177</sup>. Algunos de estos pan-inhibidores muestran dificultades para unirse competitivamente al FGFR4 debido a las diferencias estructurales con los FGFR1-3, a excepción del LY287445 y el erdafitinib<sup>178,179</sup>. Además, el alofanib es un inhibidor selectivo de FGFR2 pero, en este caso, utiliza un mecanismo alostérico para bloquear la señalización FGFR<sup>180</sup>.

Últimamente, el desarrollo de inhibidores de FGFR se ha enfocado en aumentar la especificidad y optimizar las cinéticas de unión de los fármacos. Se están investigando inhibidores irreversibles que forman una unión covalente, lo que prolonga la inhibición. Un ejemplo es el futibatnib, un inhibidor pan-FGFR aprobado para las metástasis intrahepáticas del colangiocarcinoma<sup>181</sup>, que forma una unión covalente con una cadena lateral de cisteína dentro del bucle de unión del fosfato en el FGFR<sup>182</sup>. Otros inhibidores covalentes en desarrollo son fisogatinib (BLU-554), roblitinib (FGF401), INCB062079 y PRN1371, principalmente dirigidos contra FGFR4<sup>156</sup>.

- Anticuerpos monoclonales y anticuerpos conjugados con fármacos:

Los anticuerpos monoclonales y los anticuerpos conjugados con fármacos (ADC) son inhibidores selectivos que actúan sobre el FGFR a través de diversos mecanismos, incluida la interrupción de la unión del ligando y la dimerización del receptor. Por ejemplo, para el receptor FGFR2 se han desarrollado anticuerpos como el GP369<sup>183</sup> o ADC como el BAY1187982<sup>184</sup>. El bemarituzumab (FPA144) es el anticuerpo monoclonal dirigido a FGFR2 más prometedor en desarrollo, diseñado para mejorar la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC)<sup>185</sup>. También se están evaluando terapias de anticuerpos dirigidas a FGFR3, como el anticuerpo MFGR1877S, que inhibe la unión del ligando y la dimerización del receptor<sup>186,187</sup>, o el ADC LY3076226, el cual ha demostrado respuestas completas en estudios *in vivo* de vejiga y pulmón con la fusión FGFR3-TACC3<sup>188</sup>. Otro anticuerpo en desarrollo es el vofatamab (B-701), que ha mostrado ser bien tolerado y beneficio en combinación con docetaxel o pembrolizumab en carcinoma urotelial con mutaciones o fusiones en FGFR3<sup>189</sup>.

- Secuestradores de ligando:

Otra estrategia para inhibir la señalización oncogénica de la vía de FGFR es mediante el uso de "secuestradores" o "trampas" de sus ligandos FGFs, que interrumpen la unión a sus receptores afines. Estos secuestradores son receptores solubles que conservan el dominio extracelular del FGFR, pero carecen de los dominios transmembrana y citoplasmático. Un ejemplo es el FP-1039/GSK3052230, un receptor soluble que consta de la región extracelular del FGFR1 unida al fragmento FC de la IgG1 humana. Esta molécula ha demostrado ser efectiva en estudios preclínicos con células de cáncer endometrial con *FGFR2* mutado y células de cáncer de pulmón con *FGFR1* amplificado<sup>190</sup>.

A continuación, se resumen en una tabla los principales ensayos clínicos de los diferentes inhibidores de FGFR en monoterapia o en combinación con otros agentes, finalizados o en curso, en pacientes con cáncer de pulmón y alteraciones en los FGFRs. No existen aún ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales, anticuerpos conjugados ni secuestradores de ligando.

Tabla 3. Principales ensayos clínicos con cáncer de pulmón que presentan alteraciones en los FGFRs.

Inhibidor (Fabricante)	Diana terapéutica	Identificador del Ensayo Clínico	Fase de estudio
<i>Inhibidores selectivos</i>			
<b>AZD4547 (AstraZeneca)</b>	FGFR1-3	NCT00979134*, NCT02965378*, NCT01824901*, NCT01795768, NCT02154490*, NCT02664935, NCT02117167, NCT02465060	II/III
<b>Infigratinib (QED Therapeutics)</b>	FGFR1-3	NCT01004224*	I/II
<b>Erdafinitib (Janssen Pharmaceuticals)</b>	FGFR1-4	NCT03827850, NCT04083976, NCT02699606	II
<b>Rogaratinib (Bayer)</b>	FGFR1-4	NCT01976741*, NCT03762122*, NCT04125693*, NCT04125693*, NCT03762122*	II
<b>CPL304110 (Celon Pharma)</b>	FGFR1-3	NCT04149691	I
<b>Futibatinib (Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.)</b>	FGFR1-4	NCT04965818	I/II
<b>Pemigatinib (Incyte)</b>	FGFR1-3	NCT05253807, NCT05287386, NCT05210946, NCT02393248*, NCT05004974	II
<i>Inhibidores no selectivos</i>			
<b>Ponatinib (ARIAD, Pharmaceuticals)</b>	FGFR, PDGFR, VEGFR, ABL, SRC, KIT	NCT01761747*, NCT01935336*, NCT04591431	II/III
<b>Dovitinib (Allarity Therapeutic)</b>	FGFR1-3; VEGFR1-3; PDGFRβ, FLT3, KIT, RET, TRKA, CSF1	NCT01861197, NCT01676714*, NCT01831726*, NCT01515969*	II
<b>Pazopanib (Novartis)</b>	FGFR1-3, VEGFR1-3, PDGFR, KIT	Estudio informe caso	
<b>Nintedanib (Boehringer Ingelheim)</b>	FGFR1-4; VEGFR1-3; PDGFRα-β	NCT01948141*, NCT02299141, NCT04147728	II
<b>Lucitanib (HaiHe Biopharma)</b>	FGFR1; VEGFR1-3	NCT01283945*, NCT02109016*	I/II
<b>Anlotinib (Advenchen Laboratories)</b>	FGFR; VEGFR; PDGFR; c-Kit	NCT03728374, NCT03755869, NCT03706287, NCT03726736, NCT04012619, NCT03778853, NCT04619563, NCT03735264, NCT04619537, NCT03750916, NCT03703596, NCT04670107*, NCT03624309, NCT03654027, NCT05001971, NCT05460481, NCT03799601, NCT04073537, NCT04073550, NCT03672136, NCT04028778, NCT05718167	IV
<b>TT-00420 (TransThera Sciences)</b>	JAK; FGFR; VEGFR	NCT04742959, NCT05253053	I/II
<b>XL999 (Exelisis)</b>	FGFR; VEGFR; PDGFR; FLT-3; Src	NCT00491699*, NCT00277329*	II

Se accedió en noviembre de 2023. Los ensayos clínicos terminados aparecen señalados con un asterisco (\*).

En definitiva, hasta 10 inhibidores de FGFR (selectivos y no selectivos) están actualmente aprobados para el tratamiento oncológico de diferentes neoplasias: vejiga, colangiocarcinoma, leucemia mieloide crónica, renal, CPNM, etc<sup>158-168,175-177,181</sup>; pero en el CPNM solo se ha conseguido la aprobación del anlotinib, por la FDA China<sup>165</sup>. Entre los tumores con alteraciones

en *FGFR*, en aquellos con amplificaciones, los TKIs parecen menos efectivos. Las causas probablemente se deban a que la amplificación del *FGFR* no está siempre relacionada con una expresión elevada del receptor en algunos cánceres<sup>151</sup>. Por ello, hasta ahora, la efectividad de estos inhibidores ha sido mayormente descrita en aquellas neoplasias en las que las principales alteraciones de los genes *FGFR* son las mutaciones o los reordenamientos genómicos, como ocurre con los genes *FGFR2* y *FGFR3* en el colangiocarcinoma y los tumores uroteliales<sup>168,175,177</sup>.

### 3. BIOMARCADORES PREDICTIVOS

Los biomarcadores predictivos nos permiten identificar a los pacientes que tienen más posibilidades de beneficiarse de un tratamiento concreto, evitando el uso de terapias ineficaces y con efectos secundarios innecesarios<sup>191</sup>. Identificar y validar nuevos biomarcadores predictivos para diferentes terapias dirigidas es de suma importancia para optimizar la oncología de precisión.

#### 3.1 Biomarcadores predictivos de respuesta a las terapias dirigidas para el cáncer de pulmón.

En general, la existencia de alteraciones genómicas activadoras en oncogenes conductores (mutaciones, traslocaciones y amplificaciones) sirven de biomarcadores predictivos para las terapias dirigidas con agentes selectivos frente a esos genes, ya que su terapia dirigida tendrá mejores resultados que la quimioterapia convencional<sup>192</sup>. Ejemplos de estos genes son *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *MET*, *RET*, *NTRK1*, *KRAS*, *HER2*, *NRG1* o *FGFR1*. Además de las alteraciones iniciadoras de estos genes, en ocasiones puede haber otras alteraciones en el mismo u otro gen, en el contexto del tratamiento, que nos informan del mecanismo de resistencia adquirido y nos guían en el tratamiento subsecuente. Destacamos casos específicos como los casos de resistencia a TKIs de EGFR debidos a la aparición de la mutación *T790M* en el exón 20 (50 % de los mismos)<sup>193</sup>. La presencia de esta mutación actúa como biomarcador predictivo, indicando la resistencia a los inhibidores de EGFR de primera y segunda generación, y la idoneidad de uso de inhibidores de tercera generación como el osimertinib<sup>194</sup>. También se han descrito varios mecanismos de resistencia a los TKIs de *MET*<sup>195</sup>, los cuales podrían actuar como biomarcadores predictivos de la falta de respuesta a sus inhibidores.

Ocasionalmente, las alteraciones de base en otros genes tienen relevancia predictiva. Destacamos como ejemplos: las comutaciones de *LKB1* y *KEAP1*<sup>196</sup>, mutaciones en *MEK*, amplificaciones de *MET* o fusiones oncogénicas (*EML4-ALK*, *CCDC176-RET*) que confieren resistencia a los inhibidores de KRAS G12C<sup>197</sup>, o las mutaciones de *P53* en la resistencia a los inhibidores de EGFR<sup>198</sup>.

Respecto a *FGFR1*, su amplificación ha sido el criterio típico de selección de pacientes para el beneficio del uso de fármacos dirigidos contra este receptor tirosina kinasa<sup>43</sup>. Sin embargo, los ensayos clínicos con inhibidores de FGFR han mostrado beneficios moderados, consiguiéndose solo respuestas parciales y una tasa global de respuesta entre el 5-10 %<sup>157</sup>. Las bajas tasas de respuesta y la frecuencia variable de la presencia de esta amplificación (5-10 % frente al 20 % descrito en estudios previos<sup>149</sup>) ha planteado dudas sobre la adecuación de la amplificación de *FGFR1* como biomarcador predictivo de esta terapia<sup>157</sup>. Por tanto, es crucial identificar nuevos biomarcadores predictivos para optimizar la selección de los pacientes que puedan beneficiarse de esta terapia. Se han sugerido ciertos posibles biomarcadores predictivos de la terapia anti-FGFR, como la sobreexpresión de MYC (indica una mayor sensibilidad)<sup>199</sup> o la amplificación de *NRAS* (indica una mayor resistencia)<sup>200</sup>. Además, en un estudio previo de nuestro laboratorio, se ha identificado a la N-Cadherina como uno de estos potenciales nuevos biomarcadores<sup>201</sup>.

### 3.2 La N-Cadherina como biomarcador predictivo a la terapia dirigida a FGFR.

La N-Cadherina es una proteína de adhesión celular, que desempeña un papel crucial en la transición epitelio-mesénquimal, la migración y la invasión celular<sup>202</sup>. En determinados tipos de cáncer, como los de mama, próstata, pulmón, hígado y vejiga<sup>203-207</sup>, se ha observado una expresión anómala de esta proteína, relacionada con un fenotipo más agresivo y una peor supervivencia<sup>201,208,209</sup>. Asimismo, se ha demostrado la presencia de N-Cadherina soluble en el suero de pacientes con tumores, correlacionándose con el volumen tumoral y el grado histológico<sup>210</sup>, lo que sugiere que pueda tener relevancia en la progresión tumoral<sup>211</sup>.

La N-Cadherina promueve la migración celular a través de la hiperactivación de ERK<sup>212</sup>, por medio de una interacción sinérgica con el FGFR<sup>213</sup>. También puede modular la migración celular a través de la regulación de la adhesión celular interaccionando con ciertas GTPasas<sup>214</sup>. Estudios adicionales sobre su relación con FGFR y otras vías pueden ofrecer nuevas perspectivas para comprender mejor su papel en la progresión tumoral y abrir oportunidades para el desarrollo de terapias dirigidas contra esta proteína.

Además, se ha vinculado la expresión anómala de N-Cadherina con la promoción de metástasis a través de la regulación al alza de la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9)<sup>215</sup> y de otros genes promotores de metástasis<sup>216</sup>. La N-Cadherina parece regular la expresión de MMP-9 a través de las vías de señalización de FGFR/MEK/ERK y Wnt/ $\beta$ -catenina<sup>217</sup>. Se ha confirmado que la expresión de N-Cadherina facilita la metástasis a distancia de las células tumorales<sup>218-221</sup>, y se ha asociado la variación de su expresión con las metástasis cerebrales en el cáncer de

pulmón<sup>222</sup>. Debido a ello, la N-Cadherina también se postula como un importante indicador de la metástasis del cáncer.

Por otro lado, se cree que la N-Cadherina podría tener relevancia como biomarcador predictivo de respuesta ya que se ha vinculado una variación de su expresión proteica con la resistencia a los inhibidores de EGFR<sup>223</sup> y a los inhibidores de FGFR<sup>201</sup>. Se ha demostrado que la expresión proteica de la N-Cadherina, pudiera ser relevante en el papel oncogénico de FGFR1 y FGFR4 en el CPNM. En un trabajo previo de nuestro grupo, observamos que la N-Cadherina se colocaliza y coinmunoprecipita junto con el FGFR1/4 en líneas celulares de cáncer de pulmón. Además, hallamos una activación de estos receptores, y consecuente activación de su señalización, solamente en presencia de la N-Cadherina, independientemente de la histología. Estos datos nos sugirieron un papel para FGFR1 y FGFR4 en los tumores de pulmón mediado por el contexto molecular que depende de la expresión de N-Cadherina. Con base en la evidencia anterior, se planteó la hipótesis de que la expresión de N-Cadherina podría predecir la eficacia de la terapia anti-FGFR en tumores que sobreexpresan FGFR1 y/o FGFR4. Describimos que el tratamiento tanto *in vitro* como *in vivo* con inhibidores selectivos de FGFR tiene una alta eficacia, pero solo en el contexto de alta expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina<sup>201</sup>. Por otro lado, aunque la coexpresión de altos niveles de FGFR1/4 y N-Cadherina a nivel proteico parecía predecir una alta eficacia de los inhibidores de FGFR, para determinar esto nos basamos en el *Western Blot*, una técnica que no se utiliza de forma rutinaria en el contexto clínico. Era entonces necesario más trabajo para determinar inmunohistoquímicamente la expresión de estas proteínas y establecer niveles de expresión límite que predigan la eficacia del tratamiento.

En resumen, la amplificación de *FGFR1* se ha utilizado como criterio de selección de pacientes para la terapia con inhibidores de FGFR<sup>157</sup>, aunque estudios recientes sugieren que la amplificación del *FGFR1* no está necesariamente relacionada con una expresión elevada del receptor<sup>151,201</sup>. Además, los inhibidores de FGFR han mostrado bajas tasas globales de respuesta (5-10 %)<sup>157</sup>, lo que indica la necesidad de identificar otros biomarcadores predictivos de respuesta. Con respecto a ello, un estudio previo de nuestro laboratorio propone a la N-Cadherina como potencial biomarcador predictivo de respuesta para seleccionar a los pacientes con alteraciones en FGFR1/4 para su tratamiento con inhibidores de FGFRs<sup>201</sup>.



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Hasta el momento, la inhibición de FGFR en pacientes con CPNM avanzado ha mostrado escasa efectividad, evidenciando tasas de respuesta de solo el 5-10 %. Es preciso, por tanto, identificar y validar preclínicamente biomarcadores predictivos que permitan identificar correctamente a los potenciales beneficiarios de esta terapia. En este sentido, proponemos que la expresión de N-Cadherina, en presencia de una alta expresión de FGFR1/4, pudiera servir de predictor de respuesta a los inhibidores de FGFR. Y que la búsqueda de otros biomarcadores predictivos complementarios podría ayudar a seleccionar mejor a los mejores candidatos para responder a la terapia anti-FGFR.

Así, los objetivos específicos de la tesis doctoral son los siguientes:

1. Validación del papel de N-Cadherina como biomarcador predictivo de respuesta a la terapia dirigida frente a FGFR en el CPNM.
2. Búsqueda y validación de otros biomarcadores predictivos complementarios que definan la sensibilidad a los inhibidores de FGFR.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. REACTIVOS BIOLÓGICOS

### 1.1 Anticuerpos.

En el desarrollo de la presente tesis, se utilizaron los siguientes anticuerpos (Tabla 4):

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para determinar la expresión proteica de las proteínas de interés.

Proteína diana	Tipo	Peso molecular	Ref.	Casa Comercial	Técnica	Dilución
<b>FGFR1</b>	Conejo/ Monoclonal	150 kDa	9740	CST	WB	1:1000
					IHQ	1:200
<b>pFGFR1 (Tyr653/654)</b>	Conejo/ Policlonal	150 kDa	06-1433	Millipore	WB	1:1000
<b>FGFR4</b>	Conejo/ Policlonal	100 kDa	8562	CST	WB	1:1000
<b>FGFR4</b>	Conejo/ Monoclonal	100 kDa	MA5-42915	Thermo Fisher	WB	1:1000
<b>FGFR4</b>	Conejo/ Policlonal		HPA027369	Sigma	IHQ	1:100
<b>N-Cadherina</b>	Conejo/ Monoclonal	140 kDa	13116	CST	WB	1:1000
<b>N-Cadherina</b>	Ratón/ Monoclonal		ab18203	ABCAM	IHQ	1:100
<b>Akt</b>	Conejo/ Policlonal	60 kDa	9272	CST	WB	1:1000
<b>pAKT (Ser473)</b>	Conejo/ Policlonal	60 kDa	9271	CST	WB	1:1000
<b>p42/p44 (ERK1/2)</b>	Conejo/ Policlonal	42-44 kDa	9102	CST	WB	1:1000
<b>p-p42/p44 (ERK1/2) (Thr202/Tyr 204)</b>	Conejo/ Policlonal	42-44 kDa	9101	CST	WB	1:1000
<b>S6</b>	Conejo/ Monoclonal	32 kDa	2217	CST	WB	1:1000
<b>pS6 (Ser235/236)</b>	Conejo/ Monoclonal	32 kDa	4858	CST	WB	1:1000
<b>MEK1/2</b>	Conejo/ Policlonal	45 kDa	9122	CST	WB	1:1000
<b>pMEK1/2 (Ser217/221)</b>	Conejo/ Policlonal	45 kDa	9121	CST	WB	1:1000
<b>Vinculina</b>	Ratón/ Monoclonal	124 kDa	9131	Sigma	WB	1:1000
<b>BIM</b>	Ratón/ Monoclonal	23 kDa	2933	CST	WB	1:1000
<b>B-Actina</b>	Ratón/ Monoclonal	42 kDa	A5316	Sigma	WB	1:5000
<b>α-Tubulina</b>	Ratón/ Monoclonal	55 kDa	T9026	Sigma	WB	1:5000

Secundario						
<b>Anti-conejo- HRP</b>	Cabra/ Policlonal		7074	CST	WB	1:5000
<b>Anti-ratón- HRP</b>	Caballo/ Policlonal		7076	CST	WB	1:5000

Abreviaturas: Ref. (Referencia); CST (*Cell Signaling Technology*); WB (*Western Blot*); IHQ (inmunohistoquímica); HRP (peroxidasa de rábano).

## 1.2 Sondas de qPCR a tiempo real.

Las siguientes sondas *TaqMan* (*Life Technologies*) fueron utilizadas para los ensayos de qRT-PCR (Tabla 5).

Tabla 5. Sondas *TaqMan* utilizadas para la determinación de la expresión de ARNm de los genes de interés.

Gen diana	Referencia	Casa Comercial
<b>FGFR1</b>	Hs00917379_m1	Life technologies
<b>FGFR4</b>	Hs01106908_m1	Life technologies
<b>CDH2 (N-Cadherina)</b>	Hs00983056_m1	Life technologies
<b>B2M</b>	Hs99999907_m1	Life technologies
<b>GAPDH</b>	Hs99999905_m1	Life technologies

## 1.3 Fármacos.

Los diferentes fármacos utilizados para los ensayos *in vitro* e *in vivo*, así como su forma de uso se resumen en la siguiente tabla (Tabla 6).

Tabla 6. Inhibidores químicos utilizados en los tratamientos *in vitro* e *in vivo*.

Fármaco	Casa Comercial	Tipo de terapia	Mecanismo	Conc. <i>in vitro</i>	Esquema terapéutico <i>in vivo</i>	Vía de ad. <i>in vivo</i>
<b>AZD4547</b>	AstraZeneca	Terapia dirigida	Inhibidor de FGFR	[600-1 $\mu$ M]	7,5mg/kg- 5días/semana -28días	Oral
<b>Trametinib</b>	Novartis	Terapia dirigida	Inhibidor de MEK	[50-1 nM]	NP	NP
<b>Sotorasib</b>	Amgen	Terapia dirigida	Inhibidor de KRAS-G12C	[1-0,1 $\mu$ M]	NP	NP

Abreviaturas: Conc. (concentración); ad. (administración); FGFR (Receptor del factor de crecimiento fibroblastoide); KRAS (Virus del Sarcoma de la rata Kirsten); NP (No Procede).

## 2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 2.1 Análisis genómicos.

#### 2.1.1 Extracción de ADN.

Se realizó la extracción de ADN de las muestras tumorales de los modelos xenografts derivados de pacientes (PDX, por sus siglas en inglés) con el protocolo del kit de QIAGEN

(#51306). Las muestras tumorales se disgregaron con el equipo TissueLyser durante 5 minutos a 50Hz en solución de lisis del kit de QIAGEN junto con la proteínasa K y se incubaron a 56 °C en agitación 24 horas. Este kit purifica el ADN por columnas a través de intercambio aniónico, sin el uso de fenol ni cloroformo, que permiten la unión del ADN mientras proteínas y otros metabolitos pasan a través de la columna sin adherirse. Tras varios lavados, el ADN se diluyó usando el tampón correspondiente (buffer TE o agua DEPC).

La concentración de ADN extraído se determinó en el equipo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Las muestras utilizadas para la secuenciación del exoma fueron cuantificadas con el fluorímetro Qubit 4 (Invitrogen) con el Kit *Qubit™ dsDNA HS Assay* (#Q32854, Invitrogen).

### *2.1.2 Secuenciación completa del exoma (WES).*

Las muestras de ADN extraídas como se indica en el apartado 2.1.1 de los PDX fueron secuenciadas mediante secuenciación de exoma completo (WES) usando el protocolo *SureSelect XT Human All Exon V6* (Agilent). Se analizó la calidad de las muestras con el equipo Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific), siendo necesario 1 µg de ADN. El ADN se envió a la compañía MacroGen quién realizó la secuenciación en una plataforma NovaSeq 6000 (Illumina) con recorridos de 150 pb por pares.

## **2.2 Análisis de la expresión génica a nivel de ARN mensajero (ARNm).**

### *2.2.1 Extracción de ARN.*

Se realizó la extracción de ARN de líneas celulares y de tumores de modelos PDX (siguiendo el protocolo *RNeasy Mini Kit* (Qiagen)). Las muestras tumorales de PDX fueron previamente disgregadas con el equipo TissueLyser en la solución de extracción del kit durante 5 minutos a 50 Hz. El kit *RNeasy* utiliza una membrana de sílice para la purificación del ARN. La concentración de ARN se determinó por medición de la absorbancia con el equipo NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). Para su conservación, el ARN se almacenó a -80 °C.

### *2.2.2 Secuenciación completa del transcriptoma (WTS).*

Con las muestras de ARN extraídas de las muestras tumorales de los PDX, como se indica en el apartado 2.2.1, se analizó el transcriptoma completo siguiendo el protocolo *Agilent SureSelect v6* (Illumina). Tras la extracción se analizó la pureza del ARN con el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent), siendo necesario 1 µg de ARN de alta calidad, con un valor de Número de Integridad del ARN (RIN) mayor o igual a 7. El ARN se envió a la compañía MacroGen quién realizó

la secuenciación siguiendo el protocolo *TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit Library* (Illumina).

### 2.2.3 Transcriptasa reversa.

Partiendo del ARN extraído de la muestra de interés, se realizó el protocolo de transcripción inversa o retrotranscripción para obtener el ADN complementario (ADNc). Para ello, se utilizó el kit de retrotranscripción *TaqMan Reverse Transcription* (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se utilizó 1 µg de ARN en 10 µL de agua libre de nucleasas con 10 µL de mezcla madre o *master mix*, en un volumen final de 20 µL, siguiendo el protocolo de retrotranscripción especificado por el fabricante (Tabla 7). La reacción se llevó a cabo en el termociclador S1000 Thermal Cycler (BioRad). La concentración de ADNc resultante se midió con el equipo NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific) y se prepararon alícuotas de 25 ng/mL, que se usaron para hacer PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

**Tabla 7. Protocolo de temperaturas de retrotranscripción del ARN.**

Temperatura	Tiempo	Función
25 °C	10 minutos	Apareamiento de los cebadores
37 °C	120 minutos	Retrotranscripción
85 °C	5 minutos	Inactivación de la enzima

### 2.2.4 PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

Para la determinación de la expresión de ARNm se realizó qRT-PCR en el equipo CFX (BioRad), utilizando siempre 3 réplicas técnicas, según el protocolo indicado por el fabricante de la *master mix* Taqman para qPCR (Thermo Fisher Scientific). El volumen final de cada reacción fue de 10 µL, que contenían 5 µL de la *master mix*, 2.5 µL de la sonda Taqman del gen en estudio (Tabla 5) y 2.5 µL de muestra de ADNc a una concentración de 25 ng/µL. Además, para cada sonda se llevó un control negativo (sin muestra de ADNc), para descartar contaminaciones. Se siguió un protocolo de termociclación de 40 ciclos (Tabla 8).

La cuantificación relativa de la expresión de ARNm se determinó a partir de los valores Ct obtenidos en la reacción, definiendo Ct como el número del ciclo en el que se detecta señal de amplificación del gen diana por encima de un umbral predeterminado, que permite discernir entre una señal de amplificación real y ruido. Para cada muestra se calculó la media de tres replicados técnicos para cada gen, y este valor medio de Ct se normalizó con el Ct de los genes endógenos *GAPDH* o *B2M* (en líneas celulares o muestras tumorales, respectivamente), obteniéndose el valor  $\Delta Ct$ . Los niveles de expresión se representaron utilizando el valor  $2^{-\Delta Ct}$ .

Tabla 8. Protocolo de termociclación de la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real.

Temperatura	Tiempo	Repeticiones	Función
95 °C	10 minutos	1x	Activación de la enzima
95 °C	15 segundos	40x	Desnaturalización del ADN
60 °C	1 minuto		Apareamiento con los cebadores y extensión del ADN

### 2.3 Análisis de la expresión a nivel proteico.

#### 2.3.1 Extracción de proteínas.

Para la obtención de muestras proteicas de líneas celulares, se partió de un cultivo celular de entorno al 80 % de confluencia en placa de 6 pocillos o de 10 cm, dependiendo del experimento. A continuación, y siempre trabajando en frío, se realizaron 2 lavados con PBS y se llevó a cabo la extracción del contenido celular añadiendo 200-500  $\mu$ L del buffer de lisis RIPA (#R0278, Sigma-Aldrich), complementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (cComplete Mini sin EDTA, #4693159001, Roche) y un cóctel de inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP EASYpack, #4906837001, Roche), siguiendo las concentraciones indicadas por el fabricante. La recogida de la muestra se llevó a cabo mediante rascado de la placa, en frío, y se agitó con vórtex cada 10 minutos, durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm, durante 15 minutos, a 4 °C, para eliminar los restos de membrana celular. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo y se conservaron a -80 °C.

En el caso de las muestras de tumores de los modelos PDX, se utilizó el equipo TissueLyser (Qiagen). Se recogieron trozos de 3-5 mm<sup>3</sup> procedentes de los tumores crecidos de cada modelo PDX, a los que se añadieron unos 500  $\mu$ L de buffer de lisis RIPA, descrito en el párrafo anterior, se disgregó mecánicamente con el TissueLyser durante 5 minutos a 50 Hz, y se continuó con el procesamiento descrito para las líneas celulares. Las muestras se conservaron a -80 °C.

#### 2.3.2 Cuantificación proteica.

La cantidad de proteína total obtenida en cada muestra se cuantificó con el método de Bradford (Bio-Rad), añadiendo 1  $\mu$ L del extracto proteico en 200  $\mu$ L del reactivo Bradford 1X (#5000205, Bio-Rad). Se midió la absorbancia a 595 nm con el equipo *Victor Multilabel Plate Reader* (PerkinElmer). Se utilizó BSA para generar una curva estándar a partir de la cual extrapolamos la concentración de nuestras muestras.

### 2.3.3 Western Blot (WB).

Se prepararon alícuotas de 25-100 µg de proteína total, según la proteína a analizar, y se añadió el volumen correspondiente de buffer de carga Laemmli 5X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 10 %, SDS 1 %, 2-mercaptoetanol 5 %, azul de bromofenol 0,0025 % [Sigma-Aldrich]). Las muestras se desnaturalizaron incubándolas a 95 °C durante 5 minutos.

Las muestras desnaturalizadas se cargaron en los geles de poliacrilamida-SDS junto con una muestra de marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein Dual Color*, #1610374, Bio-Rad) como patrón de peso molecular de proteínas. El gel separador se preparó a una concentración de poliacrilamida de entre 7,5-15 % de concentración a partir de acrilamida:bisacrilamida 37, 5:1 40 % (#1610148, Bio-Rad), dependiendo del tamaño de las proteínas a detectar. El gel concentrador de las muestras se preparó a una concentración del 4 % de poliacrilamida. La electroforesis se realizó con el sistema *Mini-Protean Tetra Cell* (Bio-Rad) a 100 V utilizando como tampón de electroforesis 1X Tris HCl 0,13 M, glicina 0,95 M, SDS 0,5 % (#1610772, Bio-Rad).

Las proteínas separadas en los geles por peso molecular se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivilideno (PVDF) (#10600021, GE Healthcare) previamente activada con metanol utilizando el equipo *Mini Trans-Blot Cell* (BioRad). La transferencia se realizó a un voltaje constante de 100 V durante 90 minutos en frío en tampón de transferencia TrisHCl 0,025 M, glicina 0,2 M (#1610771, Bio-Rad) al 20 % de metanol (Merck Millipore). Las membranas se bloquearon durante 1 hora en agitación con la solución de bloqueo (solución salina tamponada con Tris [TBS], 0,1 % de Tween20 [#P7949, Sigma-Aldrich], 5 % BSA) y se incubaron con la dilución correspondiente del anticuerpo primario en la solución de bloqueo en agitación a 4 °C durante una noche. Los anticuerpos y las diluciones utilizadas se detallan en la Tabla 4. Tras el periodo de incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con TBS al 0,1 % de Tween20, y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa a una dilución 1:5.000 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección, después de realizar los lavados de nuevo con TBS-Tween, se realizó con una reacción quimioluminiscente con el reactivo ECL (#170-5061, Bio-Rad) detectada por el equipo ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) usando diferentes tiempos de exposición dependiendo del anticuerpo. Las bandas de proteína se cuantificaron con el software ImageLab 5.0 (Bio-Rad). Se determinó el volumen de las bandas de la proteína de interés y se normalizó con el volumen de la banda control de la misma membrana ( $\beta$ -Actina o  $\alpha$ -Tubulina, dependiendo del ensayo).

#### 2.3.4 Inmunohistoquímica (IHQ).

Las inmunohistoquímicas de tumores de PDX fueron realizadas por la unidad de histopatología del CNIO. Las muestras fueron fijadas en formalina neutra al 10 % (formaldehído al 4 % en solución), embebidas en parafina y cortadas a 3  $\mu\text{m}$  en el microtomo. Se montaron en el portaobjetos superfrost®plus y se secaron durante la noche.

Para las tinciones inmunohistoquímicas, se usó una plataforma automática (Ventana Discovery XT, Roche o Austistainer Link, Dako), usando los reactivos propios del fabricante. Los portaobjetos se desparafinaron en xileno y se rehidrataron mediante una serie de etanol graduado hasta el agua. Posteriormente se hizo la recuperación antigénica con el tampón de selección y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (indicados en la Tabla 4) utilizando un sistema basado en un multímero para la detección, OmniMap-HRP o Novolink polymer frente a conejo, y un puente anti-ratón en el caso de que los anticuerpos primarios fueran obtenidos de ratón (para evitar la tinción inespecífica del componente murino). Para el revelado cromogénico se utilizó ChromoMap diaminobenzidina (DAB), incluida en el kit para el multímero unido a peroxidasa. Además, se realizó la contra tinción con hematoxilina de los núcleos durante 5 minutos. Por último, todos los portaobjetos fueron deshidratados, aclarados y montados con un medio de montaje permanente para su evaluación en el microscopio. En cada tinción se incluyeron secciones de control positivo para el anticuerpo primario. Las imágenes se tomaron con un microscopio de campo claro (Leica Biosystems). Las valoraciones y cuantificaciones fueron realizadas por el patólogo (Dr. José Luis Solorzano).

### 3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

#### 3.1 Líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón humanas comerciales.

Se utilizó un panel de líneas celulares que contenía treinta y una líneas de adenocarcinoma, cuyas características moleculares más relevantes se recogen en la siguiente tabla, así como el medio de cultivo en el que se crecieron (Tabla 9).

Tabla 9. Panel de líneas celulares de pulmón comerciales utilizadas en esta tesis.

Línea celular	Alteración de interés	Medio de cultivo
A549	<i>KRAS G12S; TP53 wt</i>	RPMI 1640
Calu3	<i>TP53 mut</i>	DMEM
H23	<i>KRAS G12S; TP53 wt</i>	RPMI 1640
H358	<i>KRAS G12C; TP53 del</i>	RPMI 1640
H522	<i>TP53 mut</i>	RPMI 1640
H322M	<i>TP53 mut</i>	RPMI 1640
H1355	<i>KRAS G13C; TP53 mut</i>	RPMI 1640
H1373	<i>KRAS G12C; TP53 mut</i>	RPMI 1640
H1437	<i>TP53 mut</i>	RPMI 1640
H1568	Fusión <i>EML4-ALK; TP53 mut</i>	RPMI 1640
H1573	<i>KRAS G12A; TP53 mut</i>	RPMI 1640
H1650	<i>EGFR E746-E750 del; TP53 mut</i>	RPMI 1640
H1781	<i>PTEN; TP53 mut</i>	RPMI 1640
H1944	<i>KRAS G12A; TP53 wt</i>	RPMI 1640
H1792	<i>KRAS G12C; TP53 mut</i>	RPMI 1640
H1975	<i>EGFR L858R/T790M; TP53 mut</i>	RPMI 1640
H2009	<i>KRAS G12A; TP53 mut</i>	RPMI 1640
H2030	<i>KRAS G12C; TP53 mut</i>	RPMI 1640
H2087	<i>NRAS, TP53 mut, ATM</i>	RPMI 1640
H2122	<i>KRAS G12C; TP53 mut</i>	RPMI 1640
H2126	<i>TP53 mut, SMARCA4</i>	DMEM F12 suplementado siguiendo las indicaciones de la ATCC
H2228	Translocación <i>EML4-ALK v3; TP53 mut</i>	RPMI 1640
H2279	<i>EGFR E746-E750 del; TP53 wt</i>	RPMI 1640
H3122	Translocación <i>EML4-ALK v1; TP53 wt</i>	RPMI 1640
HCC44	<i>KRAS G12C; TP53 mut</i>	RPMI 1640
LXF289	<i>TP53 mut</i>	F10
HCC4006	<i>EGFR E746-E750 del; TP53 wt</i>	RPMI 1640
PC9	<i>EGFR E746-E750 del; TP53 wt</i>	RPMI 1640
SW1573	<i>KRAS G12C; TP53 wt</i>	RPMI 1640
HCC827	<i>EGFR E746-E750 del; TP53 mut</i>	RPMI 1640
H3255	<i>EGFR L858R; TP53 mut</i>	RPMI 1640

Se utilizó la base de datos COSMIC para obtener la información relacionada con las alteraciones de interés de cada línea celular, así como sus principales alteraciones oncogénicas. Abreviaturas: *wt* (*wild type*, gen en su forma nativa); *mut* (mutación); *del* (delección); RPMI (medio Roswell Park Memorial Institute); DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).

Las líneas celulares comerciales se cultivaron siguiendo las indicaciones de la ATCC, suplementando todos los medios con una solución antibiótica/antimicótica 1X (Sigma-Aldrich) y 10 % de suero fetal bovino (SFB).

### 3.2 Líneas celulares murinas isogénicas.

Se utilizó un panel de líneas celulares murinas isogénicas que contaban con el mismo contexto genético pero que expresaban diferentes mutaciones clínicamente relevantes del gen *KRAS* (MEFs *KRAS WT*, MEFs *KRAS G12A*, MEFs *KRAS G12C*, MEFs *KRAS G12D*, MEFs *KRAS G12R*,

MEFs *KRAS G12S*, MEFs *KRAS G12V*, MEFs *KRAS G13D* y MEFs *KRAS Q61H*). Estas líneas han sido realizadas partiendo de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs, por sus siglas en inglés) generados y cedidos por el laboratorio de Chiara Ambrogio<sup>224</sup>. Estos MEFs provienen de ratones con el siguiente contexto genético: delección homocigota de los genes *NRas* y *HRas*, además de la inserción de elementos *lox* en los extremos del gen *KRAS* que permiten su silenciamiento posterior con la recombinasa CRE<sup>225</sup>.

De forma resumida, las construcciones retrovirales *KRAS<sup>MUT</sup>* se crearon mediante mutagénesis puntual a partir del plásmido pBABE *KRAS<sup>WT</sup>* marcado con la hemaglutinina del influenza humano (HA) (proporcionado por Channing Der, plásmido Addgene #75282). Los retrovirus se generaron mediante cotransfección de plásmidos pBABE junto con plásmidos pAmpho en células 293T utilizando el reactivo de transfección FuGENE HD (Promega). Los retrovirus se transdujeron en los *HRas<sup>-/-</sup>*; *NRas<sup>-/-</sup>*; *KRAS<sup>lox/lox</sup>* MEFs<sup>225</sup> seguido de una selección con puromicina (1 mg/mL). A continuación, las células seleccionadas se cultivaron en presencia de 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT; Sigma, 600 nmol/L) durante al menos 10 días para lograr la eliminación completa de los alelos *KRAS* endógenos. Los modelos isogénicos fueron mantenidos en medio DMEM con una rutina de pases de 1:10. Las células no se cultivaron durante más de 3 meses después de la descongelación de las existencias congeladas.

### 3.3 Mantenimiento de las líneas celulares.

Las líneas celulares humanas y murinas se cultivaron en placas de 10 cm y se subcultivaron cada 2-3 días mediante tratamiento con tripsina (Sigma-Aldrich). La manipulación de las líneas celulares se realizó en cabina de flujo laminar de tipo II-Bio-II-A (nivel de bioseguridad 2) (TelStar) y su cultivo en incubadores *Aire US Autoflow Walter-Jacketed* (Thermo Fisher Scientific), al 95 % de humedad relativa y al 5 % de CO<sub>2</sub>. Para asegurar la ausencia de contaminación por micoplasmas, se pasaron controles regulares internos y de nuestro centro de investigación, mediante el uso del kit MycoAlert (Lonza).

### 3.4 Conservación de las líneas celulares.

Partiendo de células cultivadas en placa de 10 cm, a una confluencia del 70-80 %, el cultivo se tripsinizó, se recogió en tubos de 15 mL con 5 mL de medio de cultivo y, tras su centrifugación a 200 g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 mL de SFB, con 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). Cada mililitro de esta suspensión se añadió a un criovial para su congelación gradual en contenedores

con isopropanol a -80 °C. Posteriormente, las células se conservaron a -80 °C a medio plazo y en contenedores con nitrógeno líquido a largo plazo.

Para descongelar una línea celular criopreservada, el criotubo se sumergió en un baño de agua a 37 °C hasta su descongelación. Seguidamente, la suspensión celular se añadió a 5 mL de medio de cultivo y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y se añadió medio de cultivo fresco para resuspender el *pellet* obtenido y añadirlo a la placa de cultivo de 10 cm, con un volumen final de 10 mL.

### 3.5 Ensayos *in vitro*.

#### 3.5.1 Ensayos con líneas celulares.

En estos ensayos, cada experimento se repitió un mínimo de tres veces independientes.

##### - Viabilidad celular a tiempo real:

Para realizar este experimento utilizamos un equipo de análisis de viabilidad celular en tiempo real, el IncuCyte (Sartorius). Las diferentes líneas celulares isogénicas con las diferentes mutaciones de *KRAS* se sembraron en placas de 96 pocillos (#3596, CULTEK) a una densidad de 500 células por pocillo (en los estudios al 10 % de SFB) o 3000 células por pocillo (en los estudios al 0,5 % de SFB). De cada modelo se sembraron cinco pocillos por condición (Control, 10 µM AZD4547, 25 nM trametinib, Combinación de 10 µM AZD4547 con 25 nM trametinib). Las células se incubaron en el *IncuCyte Zoom* (Sartorius) y se obtuvieron imágenes cada 2 horas durante 60 a 96 horas, con tres campos fotografiados por pocillo con un aumento de 10x. Esta variabilidad se debe a que, aunque las células se sembraron siempre a la misma densidad, cada línea celular alcanzó la fase *plateau* de crecimiento a tiempos diversos, momento en el que paramos el experimento. Los datos se analizaron utilizando el software *IncuCyte Confluence* versión 1.5, que nos permitió cuantificar la cobertura del área de la superficie celular como valores de confluencia en términos de porcentajes. Se representa la variación del porcentaje de confluencia cada 2 horas de los 9 modelos isogénicos utilizados, en las cuatro condiciones de estudio.

##### - Determinación de la inhibición del crecimiento de líneas celulares producida por fármacos dirigidos en monoterapia (IC50)

Para determinar la sensibilidad a el tratamiento con AZD4547, se empleó el ensayo de citotoxicidad con determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50), o

concentración que produce un 50 % de inhibición del crecimiento con respecto al control no tratado. Este ensayo se realizó tanto en cultivos en dos dimensiones (2D) como en tres dimensiones (3D), mediante la generación de esferoides. Para realizar el ensayo en 2D, se sembraron en placas de 96 pocillos (#655087, Greiner) tres filas de 12 columnas con cada línea celular en ensayo a una densidad determinada (Tabla 10). Para el cultivo en 3D se sembraron las líneas celulares en placas de 96 pocillos de baja adherencia (#3474, CULTEK) en la densidad indicada (Tabla 10) y se utilizó el medio completo (Medio Básico suplementado con 2 % SFB, 3 ng/mL factor de crecimiento epidermoide (EGF) (#PMG8041, Life Technologies), 5 µg/mL insulina humana (#I3536, Sigma), 1 µg/mL hidrocortisona (#H0888, Sigma), 1x B27 (#17504-044, Life technologies)).

Tras 24 horas de la siembra en 2D o 3D, se añadieron concentraciones decrecientes de fármaco en las 11 primeras columnas, dejando la última sin tratar. Este rango de concentraciones se decidió en primer lugar buscando en la bibliografía los valores de IC50 de líneas celulares similares para el fármaco en estudio, y se fue ajustando en función de la sensibilidad de la línea. En los ensayos en 2D, tras 96 horas de exposición al fármaco, las células se fijaron 15 minutos con glutaraldehído 0,5 % (en PBS) y se tiñeron 15 minutos con cristal violeta (1 % en agua destilada). Posteriormente las placas se lavaron y se dejaron secar. A continuación, el cristal violeta se disolvió en una solución de ácido acético al 20 % y la absorbancia (595 nM) se midió en un equipo detector *Victor Multilabel Plate Reader* (PerkinElmer). En el caso de los cultivos 3D, tras 96 horas de exposición al fármaco se añadió 100 µL de *Cell Titer Glo* (#G7571, Promega) preparado según indicaciones del fabricante. Las placas se incubaron en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos para posteriormente realizar la lectura de luminiscencia con el espectrofotómetro *Victor Multilabel Plate Reader* (PerkinElmer). Posteriormente en ambos tipos de cultivo, se calculó la concentración que inhibía el 50 % del crecimiento mediante el software de análisis bioestadístico *GraphPad Prism*.

**Tabla 10. Densidades de siembra y formato de placa utilizado para cada ensayo.**

Línea celular	Densidad (células/pocillo)	Ensayo realizado (IC50)	Línea celular	Densidad (células/pocillo)	Ensayo realizado (IC50)
<b>H1792</b>	750	2D	<b>HCC44</b>	750	2D
	1000	3D		1000	3D
<b>H23</b>	1500	2D	<b>H2087</b>	7000	2D
	1500	3D		7000	3D
<b>H1975</b>	1500	2D	<b>LXF289</b>	1500	2D
	1500	3D		1500	3D
<b>A549</b>	750	2D	<b>H522</b>	4500	2D
	1000	3D		5000	3D
<b>H1355</b>	2000	2D	<b>H2279</b>	3000	2D
	7000	3D		5000	3D
<b>SW1573</b>	2000	2D	<b>H2030</b>	750	2D
	2000	3D		1000	3D
<b>H1650</b>	1500	2D			
	1500	3D			

### 3.5.2 Ensayos con modelos PDXDOs.

#### - Establecimiento de PDXDOs

Los tumores PDX fueron extraídos de los ratones cuando alcanzaron un volumen mayor de 800 mm<sup>3</sup>. El tumor se troceó con el bisturí en trozos de aproximadamente 3 mm<sup>3</sup> y fueron digeridos enzimáticamente con colagenasa (1,2 mg/mL, #C9891, Sigma) en medio Básico (Advanced DMEM/F12 [#12634010, Gibco], 1x HEPES [#15630106, Gibco], 1x Glutamina [#G8541, Sigma]) a 37 °C durante 60 minutos. Tras la incubación, los trozos de tumor digeridos se filtraron utilizando filtros de 70 µm, y se centrifugaron las células disgregadas a 1.500 rpm durante 5 minutos. Tras dos lavados con medio Básico, se contaron las células y se resuspendieron en Matrigel (libre de rojo fenol y con factores de crecimiento reducidos, #12634010, Gibco). Las cúpulas de matrigel se sembraron en placas de 96 pocillos (#655087, Greiner).

Las cúpulas se dejaron solidificar a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> en el incubador durante 10 minutos y se añadió medio completo hasta cubrir las cúpulas: Medio Básico suplementado con 2 % SFB, 3 ng/mL factor de crecimiento epidermoide (EGF) (#PMG8041, Life Technologies), 5 µg/mL insulina humana (#I3536, Sigma), 1 µg/mL hidrocortisona (#H0888, Sigma), 1x B27 (#17504-044, Life technologies).

#### - Ensayos de eficacia en matrices para explorar tratamientos combinatorios

Para determinar la posible sinergia de diferentes tratamientos combinatorios, testamos la sensibilidad de los PDXDOs a diferentes fármacos en monoterapia y en combinación.

Para ello, se sembraron placas de 96 pocillos negras con fondo transparente (#154446, Corning) con 5000 células por pocillo embebidas en 36  $\mu$ L de matrigel y se incubaron a 37  $^{\circ}$ C con 5 %  $\text{CO}_2$ . Al día siguiente de la siembra (Día 1), se añadieron los fármacos en monoterapia y en combinación a diferentes concentraciones (Tabla 6 y Figura 8) y se trataron las células durante 7 días, renovando el medio con fármaco a los 4 días. Tras 7 días de tratamiento, se añadieron 100  $\mu$ L de *Cell Titer Glo* (#G7571, Promega) preparado según indicaciones del fabricante. Las placas se incubaron en movimiento, a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos para posteriormente realizar la lectura de luminiscencia con el espectrofotómetro *Victor Multilabel Plate Reader* (PerkinElmer). Los datos se analizaron y se representaron gráficamente con el software bioestadístico GraphPad Prism 8.0. Para calcular la sinergia de la combinación de los fármacos se utilizó el software SynergyFinder<sup>226</sup>. Este software calcula un índice combinatorio (CI) basándose en el modelo de aditividad de Loewe para el cálculo de la puntuación de sinergia<sup>227</sup>. A continuación, se representa de forma visual la composición de las matrices que utilizamos para testar los diferentes tratamientos combinatorios:

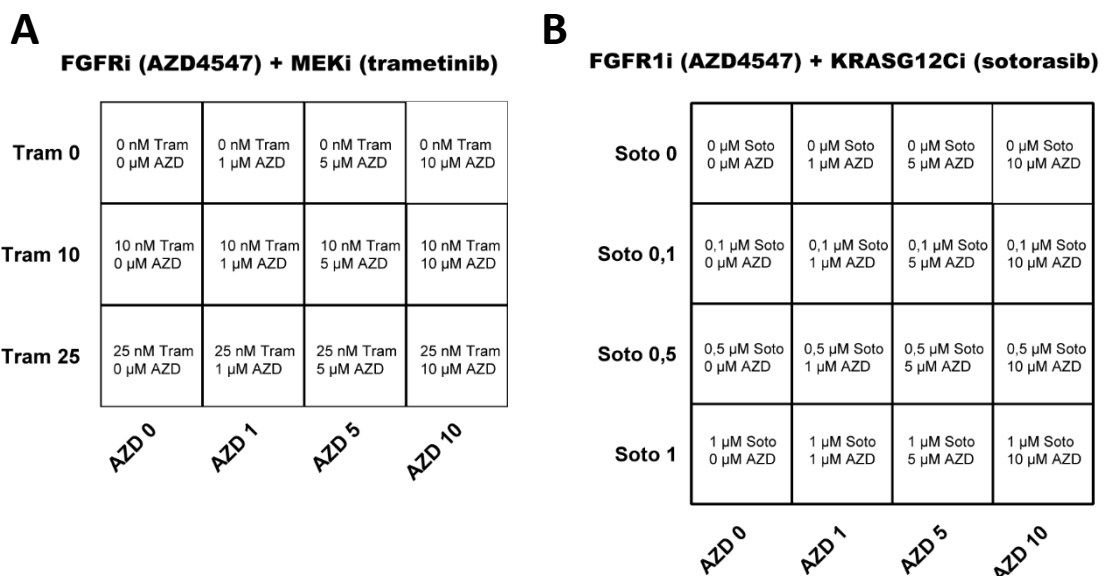


Figura 8. Esquemas de tratamiento de las matrices utilizadas para testar las diferentes combinaciones. (A) Combinación de AZD4547 y Trametinib. (B) Combinación de AZD4547 y sotorasib. Abreviaturas: FGFRi (inhibidor de FGFR); MEKi (inhibidor de MEK); KRASG12Ci (inhibidor de KRASG12C).

#### 4. TÉCNICAS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

##### 4.1 Modelos de Xenoinjertos de tumores Derivados de Pacientes (PDX).

En nuestro laboratorio hemos establecido una colección de 54 modelos PDX de cáncer de pulmón no microcítico, de los cuales seleccionamos 32 para este estudio (Tabla 11). Para establecer los modelos PDX, los tumores extraídos quirúrgicamente de pacientes con cáncer de

pulmón no microcítico fueron troceados e implantados cubiertos de matrigel (BD) en el flanco de ratones desnudos inmunodeprimidos de 5-6 semanas de edad, bajo anestesia por inhalación de isoflurano y bajo analgesia por buprenorfina. Para realizar el implante, se realizó un pequeño corte en el flanco del ratón y se introdujo un fragmento tumoral de unos 100-150 mm<sup>3</sup> de volumen.

El tamaño de los tumores generados por los xenoinjertos se midió semanalmente, utilizando un calibre de medición. Se tomó medida de la longitud más corta y de la más larga de cada tumor y el volumen tumoral se calculó con la fórmula:

$$0,5 \times (\text{dimensión más larga}) \times (\text{dimensión más corta})^2$$

Una vez los tumores alcanzaron un volumen de 800 mm<sup>3</sup> se sacrificó al animal que los portaba, y se trocearon. Algunos de los fragmentos tumorales fueron implantados en más ratones para expandir el modelo, y otros fueron criopreservados para implantar después en un mayor número de ratones y realizar los tratamientos que permitirán realizar los experimentos de evaluación terapéutica. Además, algunos fragmentos fueron fijados con formaldehído y conservados en parafina, o congelados para su posterior caracterización genómica (WES) (apartado 2.1.2), transcriptómica (WTS) (apartado 2.2.2) y proteómica (WB e IHQ) (apartados 2.3.3 y 2.3.4, respectivamente). La caracterización proteómica permitió la selección de los modelos con alta expresión de FGFR1/4 y diferentes niveles de expresión de N-Cadherina. De acuerdo con ello, se seleccionaron 16 modelos para nuestro estudio (marcados en negrita en la Tabla 11).

Los procedimientos realizados con animales fueron aprobados por el Comité de Protección Animal de la Comunidad autónoma de Madrid (PROEX 084/15; 134/16; 208/17; 313/19 y 366.4/21).

Tabla 11. Características clínicas más relevantes de los 32 pacientes de los que derivan los PDX utilizados en la presente tesis doctoral.

Modelo PDX	Subtipo	Estadio	TNM
TP1	Carcinoma escamoso	IIA	T2a N1 M0
<b>TP3</b>	Carcinoma escamoso	IA	T2a N0 M0
<b>TP13</b>	Carcinoma escamoso	IIA	T1b N1 M0
TP24	Carcinoma escamoso	IIB	T2a N1 M0
TP34	Carcinoma escamoso	IIIA	T4a N0 M0
<b>TP40</b>	Adenocarcinoma	IIIA	T2a N2 M0
<b>TP43</b>	Adenocarcinoma	IV	-
TP52	Carcinoma escamoso	IIIA	T3 N1 M0
TP53	Carcinoma escamoso	IB	T2a N0 M0
<b>TP57</b>	Adenocarcinoma	IB	T2a N0 M0
<b>TP60</b>	Adenocarcinoma	IIIA	T3 N1 M0
TP63	Adenocarcinoma	IIIA	T3 N0 M0
TP64	Carcinoma escamoso	IIB	T3 N0 M0
TP65	Carcinoma escamoso	IIIA	T3 N1 M0
TP67	Carcinoma escamoso	IA	T1b N0 M0
TP70	Adenocarcinoma	IB	T2a N0 M0
<b>TP79</b>	Adenocarcinoma	IIB	T2b N1 M0
<b>TP80</b>	Adenocarcinoma	IV	T3 N0 M0
TP90	Carcinoma escamoso	IB	T2a N0 M0
<b>TP91</b>	Adenocarcinoma	IIIA	T1b N2 V1
<b>TP96</b>	Carcinoma escamoso	IB	T2a N0 M0
<b>TP103</b>	Adenocarcinoma	IIA	T2a N1 M0
TP106	Carcinoma escamoso	IIB	T3 N0 M0
<b>TP107</b>	Carcinoma escamoso	IB	T2a N0 M0
TP109	Carcinoma escamoso	IB	T2a N0
TP111	Carcinoma escamoso	IIIA	T3 N1 M0
<b>TP114</b>	Carcinoma escamoso	IIB	T3 N0 M0
TP118	Adenocarcinoma	IIA	T1b N1
<b>TP126</b>	Adenocarcinoma	IB	T2a N0
<b>TP134</b>	Adenocarcinoma	IB	-
<b>TP143</b>	Adenocarcinoma	IIIA	T4 N1 M0
TP181	Adenocarcinoma	IIB	T2b N1 M0

Se destacan en negrita los modelos PDX que posteriormente se trataron con AZD4547.

#### 4.2 Estudios de eficacia de inhibidores de FGFR en modelos PDX.

Se realizaron tratamientos *in vivo* con el inhibidor de FGFR mencionado en el apartado 1.3, AZD4547, para comprobar su efecto sobre el crecimiento de los PDX. Para esto, se implantó el modelo de interés en 12 ratones, 6 ratones por grupo de tratamiento a realizar, y se siguió el crecimiento de los tumores generados, realizando dos mediciones por semana según se mencionó en el apartado 4.1. Al alcanzar éstos un volumen de 200 mm<sup>3</sup>, los ratones se distribuyeron en los diferentes grupos de tratamiento, presentando cada grupo una media de tamaño tumoral y desviación estándar similar en cada grupo, y dejando un grupo control tratado

con el vehículo, como referencia. Tras el establecimiento de los grupos, se comenzaron los tratamientos que fueron de 3-5 semanas de duración.

La concentración de fármaco AZD4547 utilizada fue de 7,5 mg/kg/día administrado de lunes a viernes por vía oral. El vehículo del inhibidor AZD4547 utilizado fue hidroxipropilmetilcelulosa al 0,1 %. Al final del tratamiento, se realizó la necropsia completa de estos ratones en busca de tejidos que pudieran estar alterados, y se recogió una muestra de éstos en caso de estarlo, que fue fijada en formalina y conservada en parafina para su posterior análisis. Las muestras tumorales fueron troceadas y un fragmento fue fijado en formalina e incluido en parafina para su conservación. El resto de la muestra tumoral se trocó y se congeló a -80 °C, posteriormente se procedió a la extracción de ARN o proteína.

El crecimiento de los tumores se muestra mediante gráficas de crecimiento tumoral frente al tiempo, donde se relativiza cada medida del volumen tumoral a la inicial justo antes de comenzar el tratamiento, y se representa la media y el error medio para cada grupo de tratamiento. El error medio se calculó con la fórmula: desviación estándar/ $\sqrt{n}$ , donde n es el número de tumores en cada grupo. La variación de volumen tumoral se representa mediante gráficos de barras, que muestran el incremento (o decrecimiento), expresado en porcentaje, del volumen de cada tumor con respecto al volumen inicial, en cada grupo de tratamiento.

Los procedimientos realizados con animales fueron aprobados por el Comité de Protección Animal de la Comunidad Autónoma de Madrid (PROEX 134/16; 208/17 y 366.4/21).

## 5. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Los análisis bioinformáticos de toda la información obtenida de la secuenciación del exoma y el ARNseq de las muestras de los PDX, fueron realizados por los bioinformáticos del laboratorio (David Gómez y José Gracia). Los análisis bioinformáticos del repositorio de *Genomics of Drug Sensitivity in Cancer* (GDSC, por sus siglas en inglés) fueron realizados por Haiyun Wang, Profesora de la Universidad de Tongji, Shanghai, China. Utilizamos el software online DAVID (<https://david.ncicrf.gov/tools.jsp>) para la anotación y clasificación funcional de los genes estudiados en el análisis de nuevos potenciales biomarcadores<sup>228,229</sup>.

### 5.1 Análisis de exomas.

Los datos de secuenciación de ADN se filtraron usando Fastp y se clasificaron en lecturas humanas y de ratón mediante Xengsort y la base de datos GENCODE. Las lecturas humanas se alinearon con el genoma GRCh38 del NCBI utilizando BWA-MEM<sup>230</sup>. Se realizaron llamadas de variantes con Mutect, VarDict<sup>231</sup> y FreeBayes<sup>232</sup> para detectar variantes somáticas pequeñas.

Las variantes se anotaron con ANNOVAR<sup>233</sup> y bases de datos como gnomAD<sup>234</sup>, CSVS<sup>235</sup> y bases de datos propias de pacientes no relacionadas con cáncer. También se utilizaron bases de datos de variación somática en tumores, como COSMIC<sup>236</sup>, MSK-IMPACT<sup>237</sup>, *Catalog of Validated Oncogenic Mutations*<sup>238</sup> y *Cancer Gene Census*<sup>239</sup>. Las variantes candidatas se verificaron manualmente con IGV.

Para estimar las variaciones en el número de copias, se utilizó CNVkit<sup>240</sup> y se obtuvieron gráficos con las variantes de los genes. Algunos de estos genes son *AKT1*, *EGFR*, *KRAS* o *TP53*, entre otros.

## 5.2 Análisis del transcriptoma.

Los datos crudos de la secuenciación de ARN fueron posteriormente filtrados usando la herramienta Fastp. Las lecturas se clasificaron en lecturas humanas y de ratón usando el programa Xengsort utilizando los genomas humano y murino disponibles en la base de datos pública GENCODE.

Se utilizó la herramienta Salmon<sup>241</sup> para cuantificar la expresión de los transcritos utilizando las lecturas únicamente clasificadas como humanas. La abundancia de cada gen fue cuantificada para obtener un valor de transcritos por millón (TPM) y cuentas en crudo (*raw counts*) a través de Tximport<sup>242</sup>.

Para extrapolar la expresión génica de cada muestra de PDX a las principales vías de señalización activadas en cáncer, ejecutamos el algoritmo PROGEny<sup>243</sup>, que transforma la abundancia de expresión de cada gen en un valor numérico asociado a cada ruta de cáncer, para luego visualizarse con Pheatmap<sup>244</sup>.

## 5.3 Análisis del repositorio GDSC.

Obtuvimos datos de respuesta al fármaco (versión del 25 de febrero de 2020) del sitio web de GDSC y datos de mutación y expresión génica (versión de octubre 2022) de *Cell Model Passports*.

En nuestro análisis se incluyeron los inhibidores de FGFR AZD4547, ponatinib, foretinib, FGFR\_3831, PD173074 del conjunto de datos GDSC1 y foretinib, PD173074 y AZD4547 del conjunto de datos GDSC2. Se usó la prueba *t de Student* para determinar si la respuesta al fármaco (valor IC50) era significativamente diferente entre las líneas celulares mutantes y de tipo salvaje de *KRAS* en el cáncer de pulmón. Se utilizó la corrección de Benjamini y Hochberg en pruebas de hipótesis múltiples para el control de falsos positivos. El valor de  $p < 0,05$  se consideró

estadísticamente significativo. Se realizó el mismo proceso de análisis en todos los fármacos en GDSC como fondo. Se utilizaron gráficos de volcán para mostrar las diferencias en los valores de IC50 de todos los fármacos entre las líneas celulares mutantes y de tipo salvaje de *KRAS*. Se usó la prueba exacta de Fisher para determinar si las inhibiciones de FGFR dirigidas a la señalización de FGFR estaban enriquecidas en fármacos sensibles o resistentes.

Para examinar los efectos del estado mutacional de *KRAS*, se usó la prueba *t de Student* para determinar la diferencia de los valores de IC50 en las inhibiciones de FGFR entre los grupos mutantes y de tipo salvaje de *KRAS*. Todos los análisis y gráficos se realizaron utilizando el software R.

Para encontrar potenciales dianas terapéuticas para superar la resistencia a los inhibidores de FGFR, primero seleccionamos líneas celulares de cáncer de pulmón con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 (la mediana de expresión como el punto de corte). Y luego se analizaron las asociaciones entre la expresión génica y la respuesta farmacológica a los inhibidores de FGFR, respectivamente, en células con alta o baja expresión de N-Cadherina (la mediana como punto de corte). Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (*r*) para medir la correlación entre la respuesta al fármaco (valor IC50) y la expresión génica. El valor *r* positivo significa que las altas expresiones de un gen se corresponden con los valores elevados de IC50. Los genes con  $r > 0$  y valor de  $p < 0,05$  se incluyeron en los resultados. Se usó la prueba *t de Student* para determinar si la respuesta al fármaco (valor IC50) era significativamente diferente entre las líneas celulares con mutaciones genéticas y las que tienen la forma nativa del gen. La estadística *t* positiva significa que las mutaciones de un gen se corresponden con los valores aumentados de IC50. Los genes con  $t > 0$  y valor de  $p < 0,05$  se incluyeron en los resultados. Se utilizó la corrección de Benjamini-Hochberg para controlar los falsos positivos.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los paquetes de software estadístico SPSS (IBM) o GraphPad Prism. Para comprobar que los grupos de datos se ajustaban a la normalidad, se empleó la prueba de Saphiro-Wilk. Los valores *p* obtenidos de las pruebas estadísticas que se detallan se consideraron estadísticamente significativos cuando su valor estaba por debajo de 0.05 (\* [ $p < 0.05$ ], \*\* [ $p < 0.01$ ], \*\*\*[ $p < 0.001$ ]). Toda la información sobre las pruebas estadísticas realizadas, los valores “*n*” y los valores *p* por experimento se pueden encontrar en las leyendas de las figuras, las figuras y los resultados.

Para los experimentos *in vitro*, las comparaciones entre las diferentes condiciones se realizaron con la prueba *T* no pareada para las muestras que mostraban normalidad y la prueba

ANOVA para las muestras con distribución normal, pero con varianzas diferentes. Se realizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney o la de Krustal-Wallis para muestras que no se ajustaban a una distribución normal. Para los experimentos *in vivo*, se analizaron las diferencias en el crecimiento de los tumores de las diferentes ramas de tratamiento de cada ensayo usando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.



# RESULTADOS

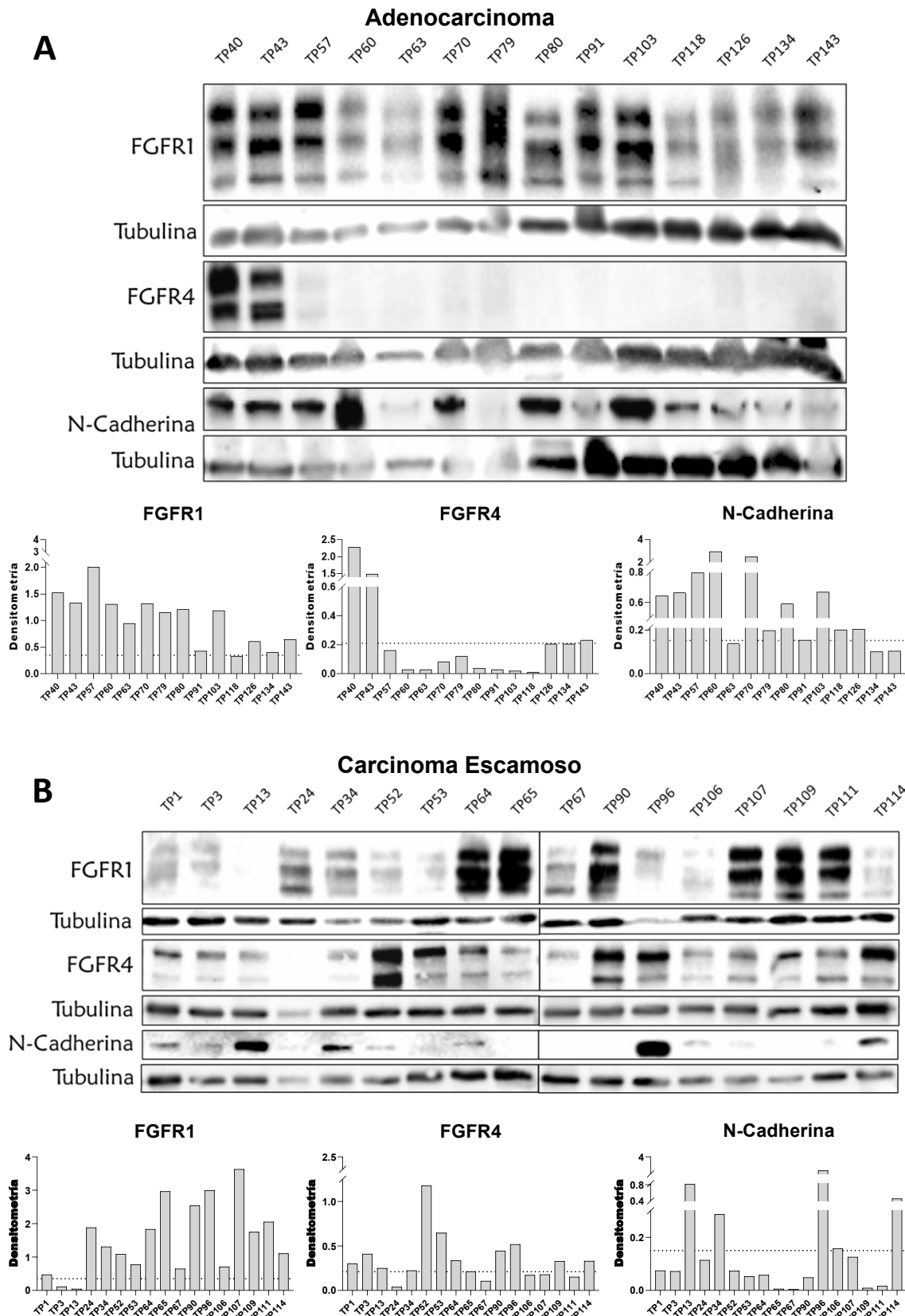


## 1. VALIDACIÓN DEL PAPEL DE N-CADHERINA COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE RESPUESTA A LA TERAPIA DIRIGIDA A FGFR

Datos previos de nuestro laboratorio demostraron que la alta expresión de FGFR1/4 no era suficiente para prever la efectividad de la terapia anti-FGFR en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de pulmón, sino que se requería la determinación complementaria de la expresión de N-Cadherina para seleccionar que modelos respondían a esta estrategia terapéutica<sup>201</sup>. Nuestro primer objetivo fue validar el papel de la N-Cadherina como biomarcador predictivo de respuesta a la terapia anti-FGFR en una cohorte más amplia de modelos PDX de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM).

### 1.1 Caracterización de los niveles de expresión de FGFR y N-Cadherina en una colección de modelos PDX.

En primer lugar, se llevó a cabo la caracterización de los niveles de expresión de FGFR y N-Cadherina de una colección propia de modelos PDX de CPNM, y se seleccionaron aquellos que presentaban una sobreexpresión de FGFR1 y/o FGFR4, así como un rápido crecimiento, para ser tratados con el inhibidor anti-FGFR, AZD4547. Para ello, se determinó la expresión proteica de FGFR1, FGFR4 y N-Cadherina mediante la técnica de *Western Blot* (WB) en 31 modelos PDX (14 de adenocarcinoma (ADC) y 17 de carcinoma escamoso (ESC) de pulmón) (Figura 9). A partir de la cuantificación de la expresión proteica, se establecieron puntos de corte para cada una de las tres proteínas, con el fin de poder clasificar a los modelos según la expresión de cada biomarcador. Para establecer el punto de corte de FGFR1 y FGFR4 utilizamos los percentiles de expresión. Seleccionamos aquellos modelos que presentaban mayor expresión de estos dos receptores, por lo que, viendo la valoración del WB (Figura 9), utilizamos el percentil 10 y percentil 50, respectivamente, para descartar los PDX con baja expresión. En el caso de la N-Cadherina, clasificamos los modelos caracterizados en modelos con alta o baja expresión de esta proteína, a partir de un *z score* = 0, coincidente con la mediana.



**Figura 9. Determinación de los niveles de expresión de FGFR1, FGFR4 y N-Cadherina.** Determinación de la expresión proteica por WB de estos biomarcadores en 31 modelos de nuestra colección de modelos PDX: 14 adenocarcinomas (A) y 17 carcinomas escamosos (B). En ambas histologías se representa la imagen resultante del revelado de las tres proteínas y su control de carga, así como las gráficas que muestran el valor de densitometría de cada uno de los biomarcadores. El cálculo de densitometría se realizó a partir del valor de la cuantificación de la banda de cada proteína relativizada con respecto a la cuantificación de las bandas del control de carga (tubulina). La línea punteada representa el punto de corte seleccionado para cada uno de los biomarcadores estudiados.

Así, seleccionamos 16 modelos (11 modelos de adenocarcinoma y cinco modelos de carcinoma escamoso) de rápido crecimiento con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4, y valores variables de N-Cadherina para realizar el tratamiento *in vivo* con el inhibidor de FGFR. Por ello, modelos con alta expresión de FGFR1/4 pero con un crecimiento lento, como el TP63 o el TP70, no fueron seleccionados. La histología y los niveles de expresión de cada uno de los tres biomarcadores de los 16 modelos seleccionados se describen en la Tabla 12.

**Tabla 12. Características histológicas y de expresión proteica de los 16 modelos PDX seleccionados para la evaluación de su respuesta a la inhibición de FGFR *in vivo*.**

PDX	Histología	FGFR1	FGFR4	N-Cadherina
TP3	ESC	Baja	Alta	Baja
TP13	ESC	Baja	Alta	Alta
TP40	ADC	Alta	Alta	Alta
TP43	ADC	Alta	Alta	Alta
TP57	ADC	Alta	Baja	Alta
TP60	ADC	Alta	Baja	Alta
TP79	ADC	Alta	Baja	Alta
TP80	ADC	Alta	Baja	Alta
TP91	ADC	Alta	Baja	Alta
TP96	ESC	Alta	Alta	Alta
TP103	ADC	Alta	Baja	Alta
TP107	ESC	Alta	Baja	Baja
TP114	ESC	Alta	Alta	Alta
TP126	ADC	Alta	Baja	Alta
TP134	ADC	Alta	Baja	Baja
TP143	ADC	Alta	Alta	Baja

Clasificación de los modelos PDX en función de la expresión de cada uno de los biomarcadores determinados. Clasificamos los modelos según su alta o baja expresión utilizando los siguientes puntos de corte para FGFR1: percentil 10 de expresión (valor de la densitometría = 0,35), para FGFR4: percentil 50 de expresión (valor de la densitometría = 0,21), y para N-Cadherina: *z score* 0 (valor de la densitometría = 0,15). ADC: adenocarcinoma; ESC: carcinoma escamoso.

## 1.2 Evaluación de la respuesta a la inhibición de FGFR en una colección de modelos PDX.

El paso siguiente fue evaluar en estos 16 modelos PDX seleccionados el posible papel de la N-Cadherina como biomarcador predictivo de respuesta a la terapia inhibitoria de FGFR. Para ello, se trató un grupo de 6 ratones de cada uno de los modelos PDX seleccionados con el inhibidor de FGFR AZD4547 (7,5 mg/kg/día; 5 días a la semana durante 5 semanas), y se determinó la sensibilidad al tratamiento comparando el crecimiento de los tumores de los ratones tratados con el de los tumores de los ratones del grupo control (tratado con vehículo) (Figura 10). Escogimos al inhibidor AZD4547 para la terapia anti-FGFR, aunque no esté aún aprobado por la FDA, por la necesidad de usar un inhibidor selectivo de FGFR, cuya tolerancia y bajos efectos secundarios han sido previamente demostrados<sup>245,246</sup>. Además, el AZD4547 se

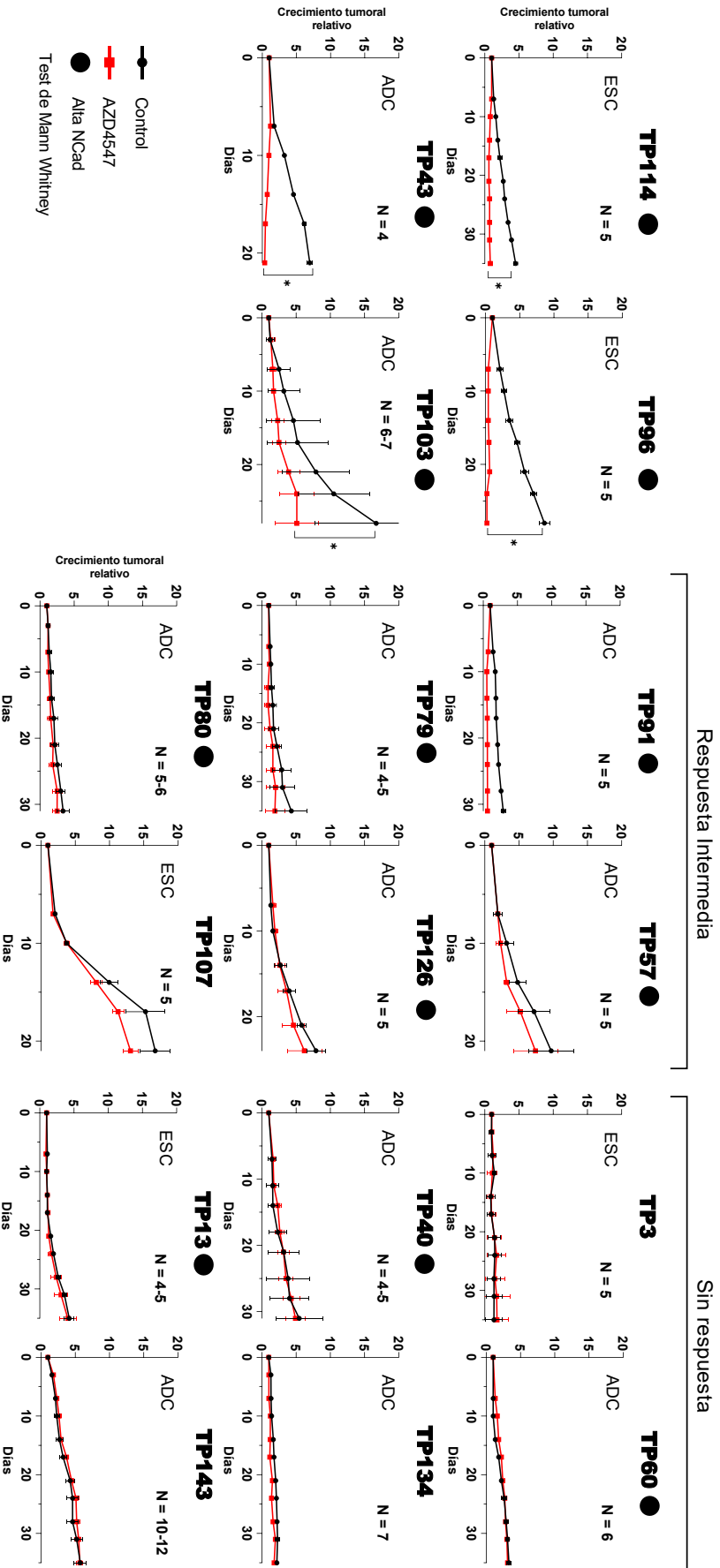
había utilizado con anterioridad en los ensayos *in vivo* del trabajo realizado en nuestro laboratorio que propuso a la N-Cadherina como biomarcador predictivo<sup>201</sup>. En ese estudio se realizó el tratamiento de cuatro modelos PDX y nuestro objetivo es realizar el mismo tratamiento en un número más amplio de modelos.

Tras realizar el tratamiento, se establecieron dos grupos de modelos PDX según la sensibilidad que habían presentado al mismo, distinguiendo entre “Respondedores” y “No Respondedores”. El grupo de PDX “Respondedores”, es decir, aquellos en los que el tratamiento produjo una reducción estadísticamente significativa del crecimiento, incluyó dos modelos de adenocarcinoma (TP43 y TP103) y dos modelos de carcinoma escamoso (TP96 y TP114). Estos cuatro modelos se caracterizaban por mostrar alta expresión de FGFR1 y de N-Cadherina, apoyando nuestra hipótesis de que la expresión de N-Cadherina es necesaria para que haya respuesta a la terapia anti-FGFR.

El grupo de modelos “No Respondedores” contenía 9 modelos de adenocarcinoma (TP40, TP57, TP60, TP79, TP80, TP91, TP126, TP134 y TP143) y tres modelos de carcinoma escamoso (TP3, TP13 y TP107). Entre ellos, los modelos TP57, TP79, TP80, TP91 y TP126 mostraron una ligera respuesta al tratamiento, aunque no estadísticamente significativa, mientras que el resto de los modelos no mostraron ninguna sensibilidad al tratamiento. Al contrario que en los PDX “Respondedores”, la expresión del biomarcador N-Cadherina fue variable en los modelos clasificados como “No Respondedores”. En cuatro modelos (TP3, TP107, TP134 y TP143) los niveles de expresión de N-Cadherina eran bajos, sin embargo, en los otros ocho modelos (TP13, TP40, TP57, TP60, TP79, TP80, TP91 y TP126) los niveles de expresión eran elevados. Por tanto, en esta colección de modelos PDX, la expresión de N-Cadherina no parece predecir por sí sola la respuesta al tratamiento con AZD4547. De modo que, se requiere una investigación adicional con el objetivo de identificar otros posibles biomarcadores que puedan estar implicados en la respuesta al tratamiento con el inhibidor de FGFR.

Respondedores

No Respondedores



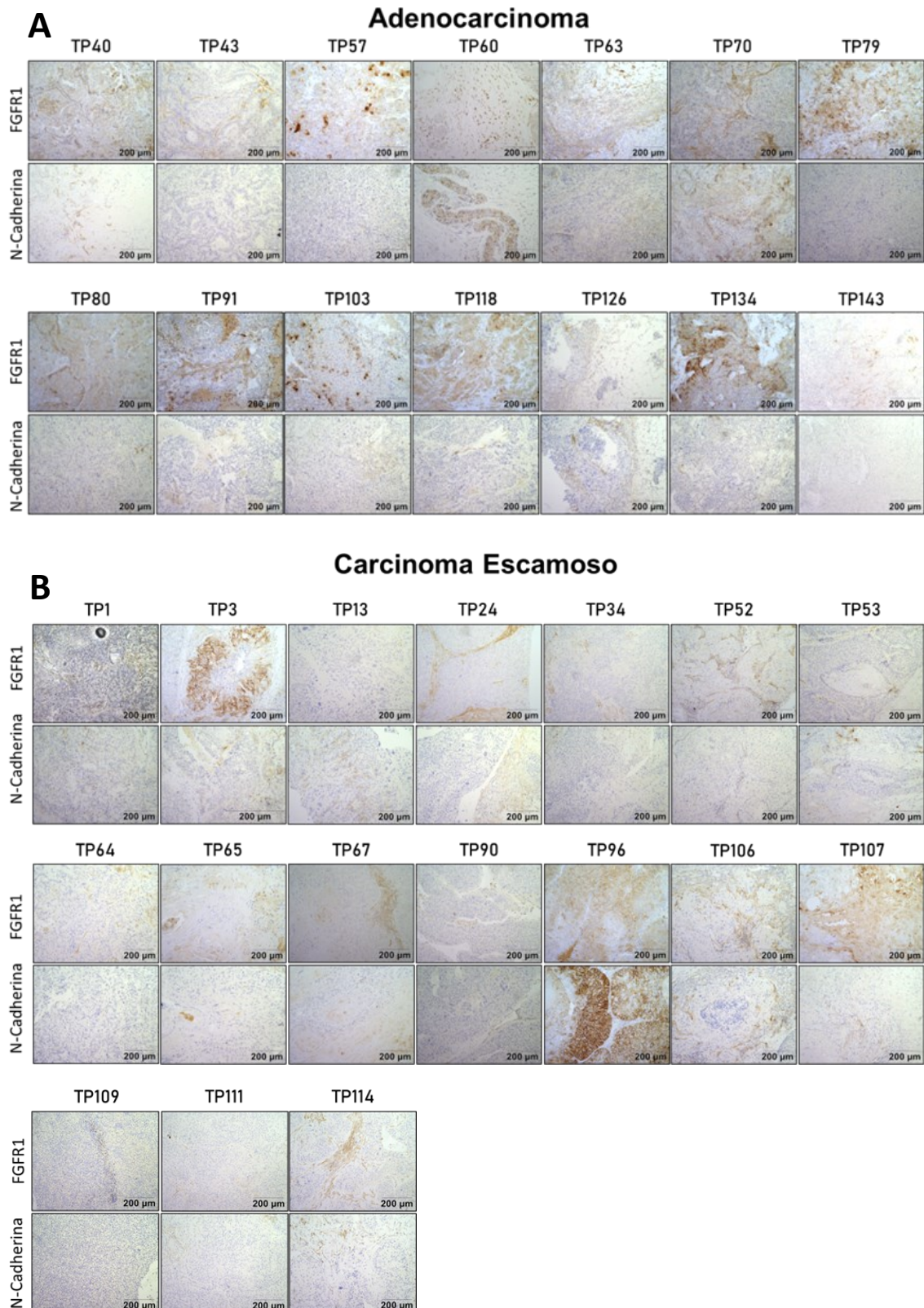
**Figura 10. Efecto del tratamiento con AZD4547 en 16 modelos de PDX CPNM (11 ADC y 5 ESC) con elevados niveles de expresión de FGFR1/4 y niveles variables de N-Cadherina.** Efecto del tratamiento con el inhibidor AZD4547, representado mediante el crecimiento tumoral relativo. La línea de color negro refleja el crecimiento tumoral relativo de la rama Control, mientras que la línea de color rojo el de la rama tratada con AZD4547. Los modelos con alta expresión de N-Cadherina se señalan con el círculo de color negro. Los modelos se clasificaron en “Respondedores” y “No Respondedores” en función de su respuesta al tratamiento. ADC = Adenocarcinoma, ESC = Carcinoma epidermoide, N = Número de ratones por grupo de tratamiento. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001). Se realizó la prueba de Mann Whitney como prueba estadística.

### 1.3 Evaluación de otras tecnologías para la determinación de la expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina.

Debido a que el WB no es un método habitual de aplicación clínica para cuantificar la expresión proteica en biopsias de pacientes, quisimos estudiar si era factible y tenía capacidad predictiva la determinación de la expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina mediante inmunohistoquímica (IHQ) y PCR cuantitativa (qPCR).

#### *1.3.1 Caracterización de la expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina de los modelos PDX mediante tinción IHQ.*

Para realizar la caracterización de la expresión de las proteínas de interés por tinciones de inmunohistoquímica, obtuvimos bloques de parafina de los mismos tumores de los 31 modelos PDX de los que se extrajeron las proteínas para la caracterización mencionada en la sección 1.1. Se llevó a cabo la tinción utilizando anticuerpos dirigidos frente a FGFR1 y N-Cadherina, tras la oportuna puesta a punto técnica (Tabla 13 y Figura 11). Sin embargo, encontramos dificultades no subsanables empleando varios anticuerpos anti-FGFR4 comerciales para poner a punto esta tinción sobre las muestras de nuestros PDX.



**Figura 11. Caracterización de los niveles de expresión proteica de FGFR1 y N-Cadherina en la colección de PDX.** Imágenes de las tinciones de los anticuerpos FGFR1 y N-Cadherina en los modelos de adenocarcinoma (A) y de carcinoma escamoso (B) en pase 2. Se utilizó el objetivo de aumento 20x.

Las muestras fueron valoradas y cuantificadas por un patólogo. Después se calculó el *h-score*, resultante de la multiplicación del porcentaje de células positivas para la tinción (0-100) y

el nivel de intensidad de la propia tinción (1-3), el cual utilizamos como punto de corte para clasificar a los modelos PDX. En ambos biomarcadores, consideramos los valores positivos de *h score* como indicadores de la expresión de FGFR1 y N-Cadherina (Tabla 13 y Tabla 14).

Tabla 13. Determinación de los niveles de expresión de FGFR1 y N-Cadherina en la colección de PDX mediante IHQ.

**A**

Muestras	FGFR1			N-Cadherina		
	% células tumorales positivas	Intensidad	<i>h score</i>	% células tumorales positivas	Intensidad	<i>h score</i>
TP40	70 %	1,5	105	1 %	1	1
TP43	0 %	0	0	0 %	0	0
TP57	90 %	2,5	225	2 %	1	2
TP60	30 %	1,5	45	90 %	3	270
TP63	60 %	1	60	0 %	0	0
TP70	40 %	1	40	60 %	1,5	90
TP79	90 %	2,5	225	0 %	0	0
TP80	80 %	1,5	120	0 %	0	0
TP91	80 %	2,5	200	0 %	0	0
TP103	60 %	2,5	150	0 %	0	0
TP118	90 %	3	270	0 %	0	0
TP126	0 %	0	0	0 %	0	0
TP134	70 %	1,5	105	0 %	0	0
TP143	10 %	1	10	0 %	0	0

**B**

Muestras	FGFR1			N-Cadherina		
	% células tumorales positivas	Intensidad	<i>h score</i>	% células tumorales positivas	Intensidad	<i>h score</i>
TP1	0 %	0	0	5 %	1,5	7,5
TP3	40 %	2,5	100	5 %	1	5
TP13	0 %	0	0	3 %	1	3
TP24	0 %	0	0	1 %	1	1
TP34	0 %	0	0	0 %	0	0
TP52	15 %	1	15	0 %	0	0
TP53	2 %	1	2	1 %	1	1
TP64	0 %	0	0	0 %	0	0
TP65	20 %	1	20	0 %	0	0
TP67	40 %	1	40	3 %	1	3
TP90	3 %	1	3	2 %	1	2
TP96	90 %	1,5	135	95 %	2,5	237,5
TP106	0 %	0	0	6 %	2	12
TP107	60 %	2,5	150	1 %	1	1
TP109	0 %	0	0	0 %	0	0
TP111	10 %	1	10	0 %	0	0
TP114	0 %	0	0	0 %	0	0

Se representa la valoración por IHQ de los niveles de expresión proteica de estos dos biomarcadores en la colección de PDX por medio del *h-score*: ADC (A) y ESC (B). El *h-score* o índice *h*, es fruto de la multiplicación del porcentaje de células positivas para la tinción y el nivel de intensidad de la propia tinción en los mismos 31 modelos de nuestra colección de modelos PDX. Se establece una escala de dos colores donde el color rojo se corresponde a los valores de negativos de *h score*, y el color verde se corresponde con los valores positivos de *h score*.

A continuación, estudiamos la correlación entre la expresión proteica por WB y por IHQ en cada modelo PDX para cada uno de los biomarcadores. Encontramos un mayor porcentaje de coincidencias para FGFR1 (19 de los 31 modelos; un 61 %) que para la N-Cadherina (15 de los 31 modelos; un 48 %) entre las técnicas WB e IHQ.

Ambos porcentajes de concordancia fueron demasiado bajos para considerar que las dos técnicas clasifican a los modelos PDX de forma similar. Tres de los 16 (19 %) modelos PDX (TP114, TP43 y TP126) que presentaban alta expresión de FGFR1 por WB, no mostraron expresión por IHQ (Tabla 14). A pesar de ello, dos de esos tres modelos (TP114 y TP43) si enxihieron respuesta al inhibidor de FGFR, lo que indica que el WB clasifica de forma más adecuada a los modelos. Por otro lado, con esta clasificación, tres de los cuatro modelos que respondieron al tratamiento (75 %), fueron catalogados como PDX sin expresión de N-Cadherina, lo que no concordaría con nuestros datos previos *in vitro* e *in vivo*<sup>201</sup>. Solo uno de los modelos PDX que respondieron al tratamiento fue clasificado por IHQ como un PDX con expresión de FGFR1 y N-Cadherina (TP96).

**Tabla 14. Clasificación de los modelos PDX tratados con AZD4547 según la expresión de FGFR1 y N-Cadherina evaluadas por tinción IHQ.**

PDX	Respuesta al tratamiento	FGFR1	N-Cadherina
TP103	Responde	Presencia	Ausencia
TP114	Responde	Ausencia	Ausencia
TP43	Responde	Ausencia	Ausencia
TP96	Responde	Presencia	Presencia
TP107	No Responde	Presencia	Presencia
TP57	No Responde	Presencia	Presencia
TP126	No Responde	Ausencia	Ausencia
TP79	No Responde	Presencia	Ausencia
TP80	No Responde	Presencia	Ausencia
TP91	No Responde	Presencia	Ausencia
TP134	No Responde	Presencia	Ausencia
TP40	No Responde	Presencia	Presencia
TP60	No Responde	Presencia	Presencia
TP143	No Responde	Presencia	Ausencia
TP3	No Responde	Presencia	Presencia
TP13	No Responde	Ausencia	Presencia

Clasificación de los modelos PDX tratados con AZD4547 en función de la expresión de cada uno de los biomarcadores determinado mediante tinción IHQ y utilizando como punto de corte de FGFR1 y N-Cadherina el *h-score* positivo.

El bajo porcentaje de coincidencias entre ambas técnicas y la baja relación con la respuesta esperada al tratamiento indicaron que la IHQ no clasificaba a los modelos PDX de la misma forma que el WB, ni permitía la predicción de la respuesta a la terapia anti-FGFR.

1.3.2 Caracterización de la expresión de *FGFR1/4* y *N-Cadherina* de los modelos PDX mediante qPCR.

Para llevar a cabo la caracterización de la expresión de los biomarcadores de interés mediante PCR cuantitativa (qPCR), se extrajo ARN de los 31 modelos PDX del mismo tumor en el que se extrajeron las proteínas para la caracterización mencionada en la sección 1.1 y se realizaron cuantificaciones de expresión por qPCR de los genes *FGFR1*, *FGFR4* y *CDH2* (N-Cadherina).

Posteriormente, para clasificar a los modelos según su expresión de los tres biomarcadores, utilizamos los mismos puntos de corte de expresión establecidos para la técnica del WB: percentil 10 (*FGFR1*), percentil 50 (*FGFR4*) y *z score* = 0 (*N-Cadherina*). Estos puntos de corte nos permitieron identificar los modelos que presentaban alta expresión de *FGFR1*, *FGFR4*, y *N-Cadherina* (Figura 12).

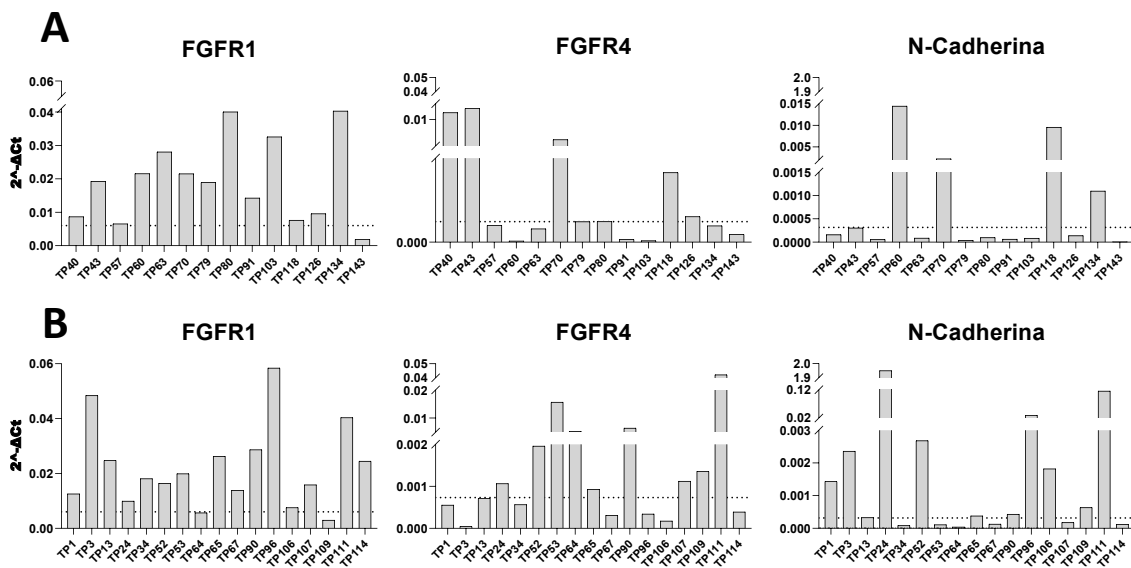


Figura 12. Caracterización de los niveles de expresión de ARN mensajero de *FGFR1*, *FGFR4* y *CDH2* (N-Cadherina) en la colección de PDX. Se determinaron los niveles de expresión de estos biomarcadores en 14 modelos de ADC (A) y en 17 modelos de ESC (B). La expresión se determinó con el método delta Ct. El método delta Ct calcula la variación de la expresión ( $\Delta Ct$ ) del gen de interés restando su valor Ct con el del gen utilizado como control de carga. La línea punteada indica el punto de corte establecido para cada biomarcador: *FGFR1*: percentil 10 (valor  $2^{\Delta Ct}$  0,006), *FGFR4* (percentil 50; valor  $2^{\Delta Ct}$  0,0072), y *N-Cadherina* (*z score* = 0; valor  $2^{\Delta Ct}$  0,003).

Las coincidencias observadas entre ambas técnicas fueron superiores para *FGFR1* (concordancia en 25/31 modelos PDX, 81 %), siendo menores en el caso de *FGFR4* (concordancia en 16/31, 52 %) y *N-Cadherina* (concordancia en 13/31, 42 %).

Además, relacionamos la clasificación de los modelos según la expresión de estos tres genes evaluada por la qPCR con la respuesta observada al tratamiento con el inhibidor AZD4547 (Tabla 15). Observamos que uno de los 16 modelos PDX seleccionados (TP143) habría sido catalogado como PDX con baja expresión de FGFR1 y no habría sido seleccionado para ser tratado con el inhibidor de FGFR. Por otro lado, dos de los cuatro modelos que respondieron al tratamiento, fueron catalogados como PDX con baja expresión de N-Cadherina, no validando nuestra hipótesis respecto al marcador propuesto.

**Tabla 15. Clasificación de los modelos PDX tratados con AZD4547 según la expresión de FGFR1, FGFR4 y CDH2 (N-Cadherina) evaluadas por qPCR.**

PDX	Respuesta al tratamiento	FGFR1	FGFR4	N-Cadherina
TP103	Responde	Alta	Baja	Baja
TP114	Responde	Alta	Baja	Baja
TP43	Responde	Alta	Alta	Alta
TP96	Responde	Alta	Baja	Alta
TP107	No Responde	Alta	Alta	Baja
TP57	No Responde	Alta	Baja	Baja
TP126	No Responde	Alta	Alta	Baja
TP79	No Responde	Alta	Alta	Baja
TP80	No Responde	Alta	Alta	Baja
TP91	No Responde	Alta	Baja	Baja
TP134	No Responde	Alta	Baja	Alta
TP40	No Responde	Alta	Alta	Baja
TP60	No Responde	Alta	Baja	Alta
TP143	No Responde	Baja	Baja	Baja
TP3	No Responde	Alta	Baja	Alta
TP13	No Responde	Alta	Baja	Alta

Clasificación de los modelos PDX tratados con AZD4547 en función de la expresión de cada uno de los biomarcadores determinado por qPCR y utilizando como punto de corte para FGFR1 el percentil 10 de expresión (valor  $2^{\Delta Ct}$  0,006), para FGFR4 el percentil 50 de expresión (valor  $2^{\Delta Ct}$  0,0072) y para N-Cadherina el *z score* 0 (valor  $2^{\Delta Ct}$  0,003).

En resumen, aunque la IHQ y la qPCR sean dos técnicas de mayor aplicación en el ámbito clínico, en el caso de nuestros biomarcadores, hemos comprobado que no clasifican a los modelos PDX de igual forma que lo hace el WB. Adicionalmente, la técnica del WB es la que predice mejor la respuesta al inhibidor de FGFR, ya que fue la única técnica que clasificó a los cuatro modelos que respondieron al tratamiento como modelos con una alta expresión de FGFR1 y N-Cadherina. Estos resultados, junto a los problemas técnicos encontrados a la hora de realizar la tinción de IHQ (no poner a punto la tinción para el FGFR4), reforzaron que el WB siga siendo la mejor técnica para la selección de los modelos PDX que puedan responder a la terapia frente a FGFR.

## 2. IDENTIFICACIÓN DE OTROS POSIBLES PREDICTORES GENÓMICOS Y TRANSCRIPTÓMICOS QUE DEFINAN LA SENSIBILIDAD A INHIBIDORES DE FGFR

En el apartado anterior observamos que, como esperábamos, los modelos que respondieron al tratamiento con inhibidores de FGFR fueron clasificados como modelos con alta expresión de N-Cadherina mediante nuestra técnica de referencia (el WB). Sin embargo, encontramos también modelos que, aunque clasificados también como PDX con alta expresión de N-Cadherina, no respondieron al tratamiento. Este hallazgo nos indicaba que podrían existir otros biomarcadores complementarios que pudieran contribuir también a predecir la sensibilidad a los inhibidores de FGFR. Dado que contábamos con una caracterización de nuestra plataforma de PDX a nivel genómico y transcriptómico, empleamos estos datos para identificar alteraciones moleculares que pudieran servir como posibles biomarcadores complementarios ayudando a predecir la respuesta a la terapia anti-FGFR.

### 2.1 Identificación de alteraciones genómicas que puedan predecir la respuesta al tratamiento con inhibidores de FGFR en nuestra colección de PDX.

Utilizamos la caracterización genómica de nuestra colección de PDX en fase 2, con la intención de identificar alteraciones moleculares que pudieran ayudar a definir mejor los grupos de “Respondedores” (TP43, TP96, TP103 y TP114) y “No Respondedores” (TP3, TP13, TP40, TP57, TP60, TP79, TP80, TP91, TP107, TP126, TP134 y TP143). En el oncoplot (Figura 13), se muestran las alteraciones genómicas más frecuentemente encontradas en nuestros 16 modelos PDX.

Observamos que ninguno de los cuatro modelos del grupo de PDX “Respondedores” mostraba ninguna alteración en los genes *KRAS*, *PKD1*, *RB1*, *PDGFRA*, *NF1* y *MGA*, mientras que varios de los modelos clasificados como “No Respondedores” mostraban mutaciones en estos genes. Especialmente llamativo fue el caso del oncogén *KRAS*, ya que 7 de los 12 modelos que no respondieron al tratamiento (TP57, TP60, TP79, TP80, TP91, TP126 y TP143) albergaban mutaciones en este gen. En concreto, el TP60, TP79, TP80, TP91 y TP126 tenían la mutación *KRAS G12C*, el TP143 presentaba la mutación *KRAS G12D* y el TP57 portaba la mutación *KRAS G12A* (Figura 13). El resto de los genes con alteraciones genómicas no mostraron un patrón diferencial claro entre el grupo “Respondedor” y “No Respondedor”.

Respecto a las alteraciones en el gen *KRAS*, cabe destacar que cinco (TP57, TP60, TP79, TP80 y TP126) de los siete modelos “No Respondedores” con mutación en *KRAS*, fueron clasificados como PDX con una alta expresión de N-Cadherina. Esta observación nos llevó a

plantear la hipótesis de si la presencia de la mutación en *KRAS* pudiera estar relacionada con la resistencia a la terapia anti-FGFR.

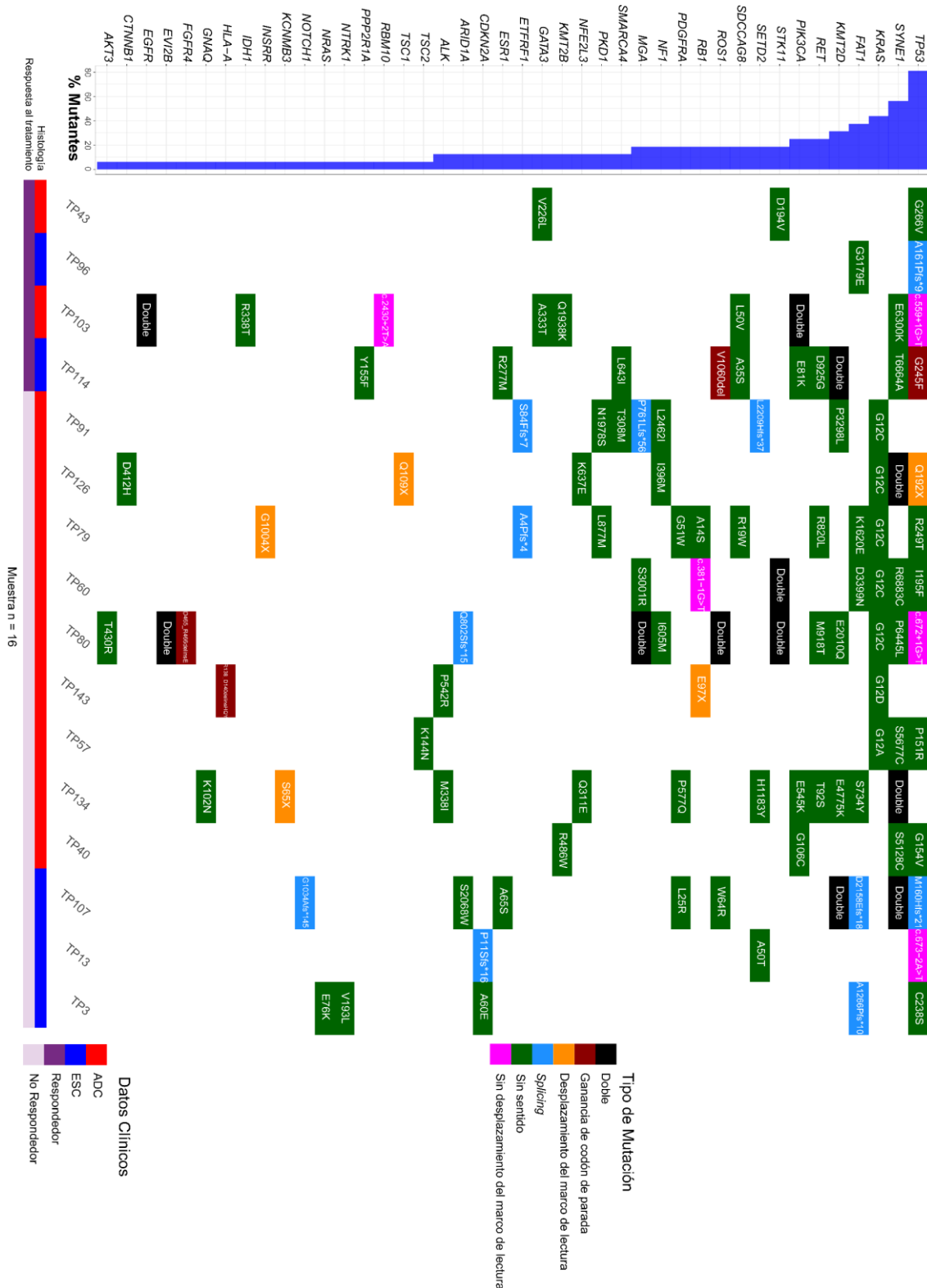


Figura 13. Caracterización genómica en genes de relevancia clínica de los 16 modelos PDX. Se realizó la secuenciación del exoma completo de los 16 modelos PDX que fueron seleccionados para el tratamiento con el inhibidor de FGFR AZD4547. En el panel superior se puede observar la recurrencia de las mutaciones para cada uno de estos genes. Las mutaciones se muestran en el centro, en una gama de colores que viene explicada en la leyenda. En la parte inferior de la imagen encontramos la anotación histológica de cada PDX, así como el estudio de eficacia que los clasifica en “Respondedores” y “No Respondedores”.

Al representar en conjunto los datos de expresión de N-Cadherina determinados por WB (apartado 1.1), la respuesta al tratamiento con el inhibidor de FGFR (apartado 1.2) y el estado mutacional del gen *KRAS* (apartado 2.1) (Figura 14), se puede ver que todos los modelos que respondieron al tratamiento presentaban el gen *KRAS* sin mutaciones (*KRAS wt*) y altos niveles de expresión de N-Cadherina. Estos resultados sugieren que la expresión de N-Cadherina puede actuar como biomarcador predictivo de respuesta a los inhibidores de FGFR, pero solo en un contexto en el que el gen *KRAS* no se encuentre mutado.

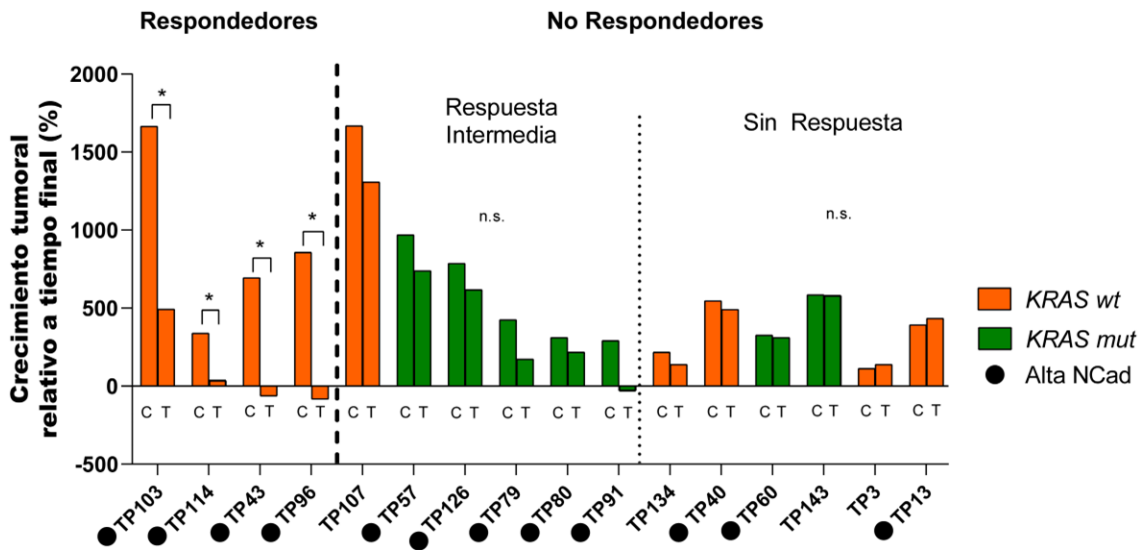


Figura 14. Estudio de eficacia de la respuesta de los 16 modelos PDX al inhibidor AZD4547 y su relación con la expresión de N-Cadherina y su estado mutacional de *KRAS*. Se representa el crecimiento tumoral relativo a tiempo final de los 16 modelos PDX con alta expresión de FGFR1/4 que fueron seleccionados para el tratamiento con el AZD4547. El grafico muestra la variación tumoral relativa de cada modelo PDX entre el Control (C) y el tratamiento con AZD4547 (T). Los PDX con altos niveles de expresión de N-Cadherina están marcados con un círculo negro. Los PDX con mutaciones en el gen *KRAS* se muestran en color verde, mientras que aquellos que tienen el gen en su forma nativa se muestran en naranja. La significancia estadística se determinó mediante el test de Mann-Whitney (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , n.s.: no significativo).

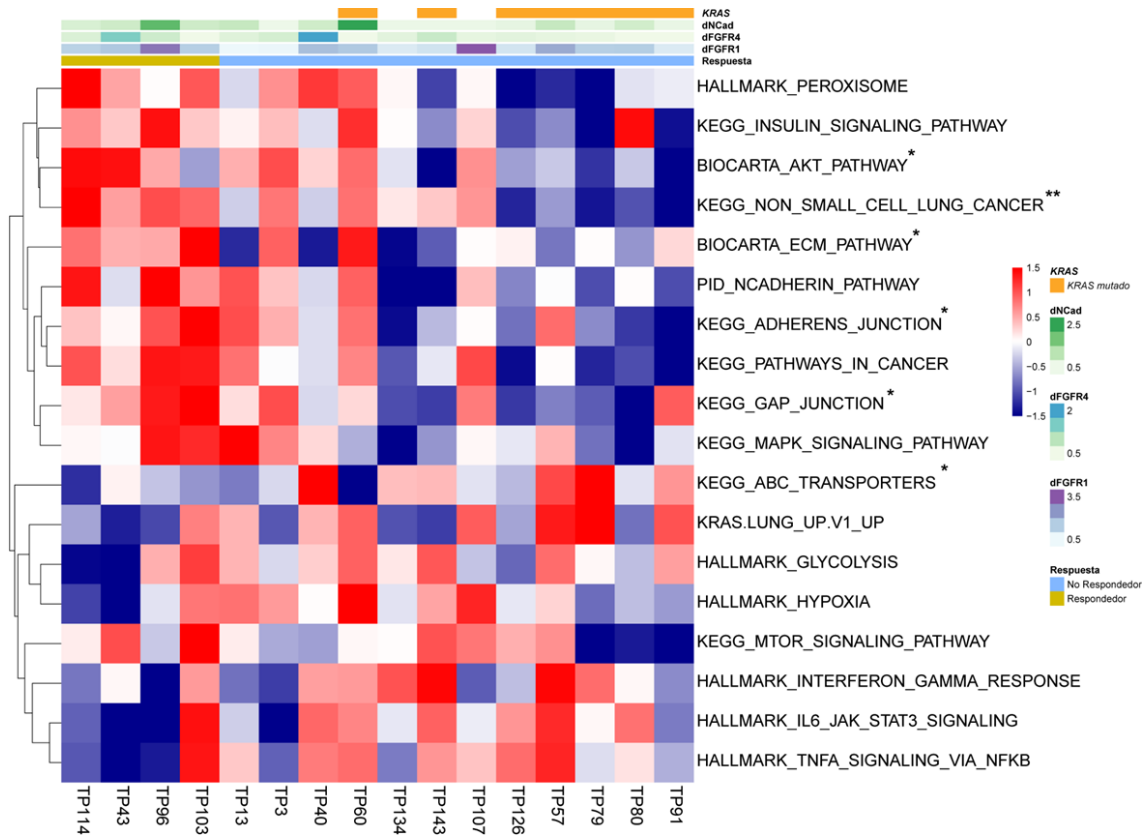
## 2.2 Identificación de diferencias en el perfil transcripcional de los modelos PDX según su respuesta al tratamiento con inhibidores de FGFR.

Utilizamos la caracterización transcriptómica de nuestra colección de PDX en pase 2, para identificar alteraciones transcriptómicas comunes que pudieran definir los grupos de modelos “Respondedores” y “No Respondedores”. En el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) representado en el mapa de calor (Figura 15), se comparó la expresión diferencial génica entre los grupos de “Respondedores” y “No Respondedores”. Posteriormente, estos genes fueron clasificados en diferentes vías de señalización en las que están implicados. La selección de vías que se muestra se hizo basándose en una búsqueda previa en la literatura acerca de vías de señalización relacionadas con la resistencia intrínseca a la

inhibición de FGFR, con la señalización FGFR, con la oncogénesis y progresión tumoral en general o con la señalización *bypass* al bloqueo de la señalización de los RTKs.

El resultado de la expresión diferencial viene dado por un valor numérico en cada vía de señalización. Calculando el promedio de este valor numérico en cada grupo de estudio, observamos que, en comparación con los “No Respondedores”, los modelos “Respondedores” mostraban una sobreactivación de vías de señalización relacionadas con la señalización de FGFR, como Akt (\*p = 0,03). También se encontró una mayor expresión de genes involucrados en vías de señalización relacionadas con el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) (\*\*p = 0,006), de genes relacionados con la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) (\*p = 0,03), con las uniones adherentes (\*p = 0,05) y con las uniones GAP (\*p = 0,01). Por otro lado, los modelos “No Respondedores”, en contraste con los modelos “Respondedores”, presentaron una sobreactivación de vías de señalización relacionadas con la resistencia intrínseca a los inhibidores de FGFR, como los transportadores ABC (\*p = 0,04).

Estudiamos la expresión diferencial en la señalización KRAS y en la señalización regulada por N-Cadherina porque, aunque la diferencia entre los dos grupos de estudio no era estadísticamente significativa, los datos preliminares nos sugirieron profundizar en el análisis de estas señalizaciones. Destacamos, en los modelos “Respondedores”, una tendencia en la sobreactivación de la señalización de N-Cadherina, lo que podría apoyar su papel como biomarcador predictivo de respuesta (Figura 15). De igual forma, se observó una tendencia de una mayor expresión de genes relacionados con la vía de señalización de KRAS en los modelos “No Respondedores”, lo cual concuerda con los hallazgos de la caracterización genómica que indican que la activación de esta vía se asocia a la resistencia a la terapia anti-FGFR (Figura 15).

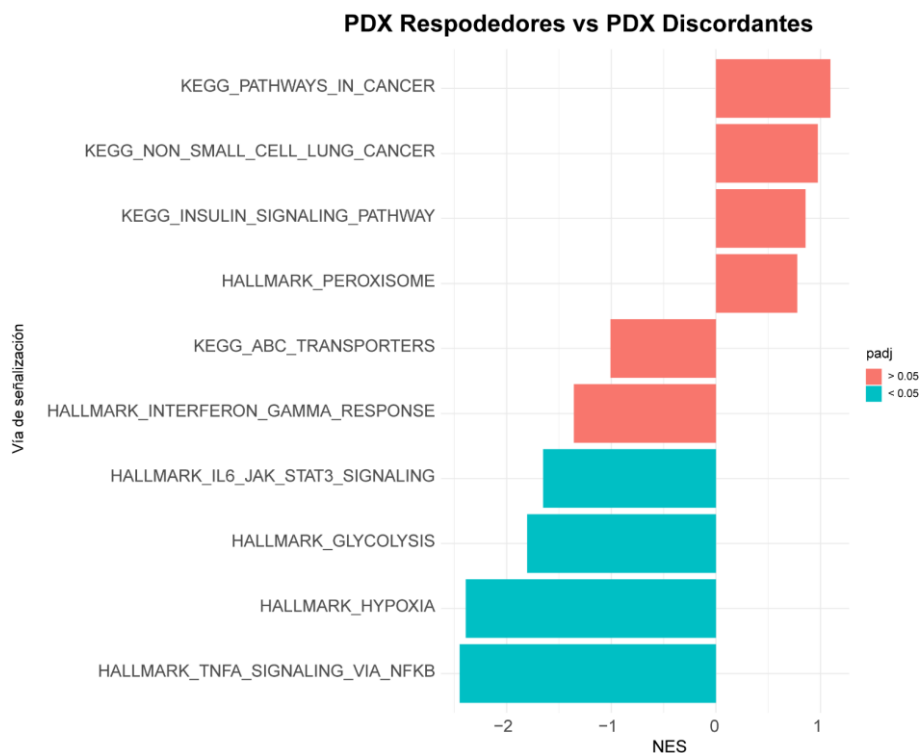


**Figura 15. Caracterización transcriptómica de los 16 modelos PDX tratados con el inhibidor de FGFR según su tipo de respuesta.** Se muestra un mapa de calor supervisado con las puntuaciones de enriquecimiento normalizadas (NES) de los análisis de enriquecimiento de conjunto de genes de una sola muestra (ssGSEA) para cada grupo de genes (*gene sets*). El análisis de enriquecimiento de genes (GSEA) se realizó para comparar la expresión diferencial entre el grupo de “Respondedores” y el grupo de “No Respondedores”. El análisis estadístico utilizado es la prueba t de student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). En el panel descriptivo superior se presenta el nivel de expresión de los biomarcadores FGFR1/4 y N-Cadherina en cada modelo PDX, calculado mediante densitometría del WB. Además, se incluyen datos adicionales como el estado mutacional de *KRAS* y la respuesta al tratamiento anti-FGFR de cada modelo PDX.

Estos resultados, junto con los hallazgos anteriores de la existencia de mutaciones del gen *KRAS* únicamente en el grupo de modelos “No Respondedores” y el hecho de que todos los modelos “Respondedores” expresen altos niveles de N-Cadherina, parecen respaldar que el estado mutacional del gen *KRAS* y la alta expresión de N-Cadherina podrían actuar en conjunto como biomarcadores predictivos de la respuesta al tratamiento con inhibidores de FGFR.

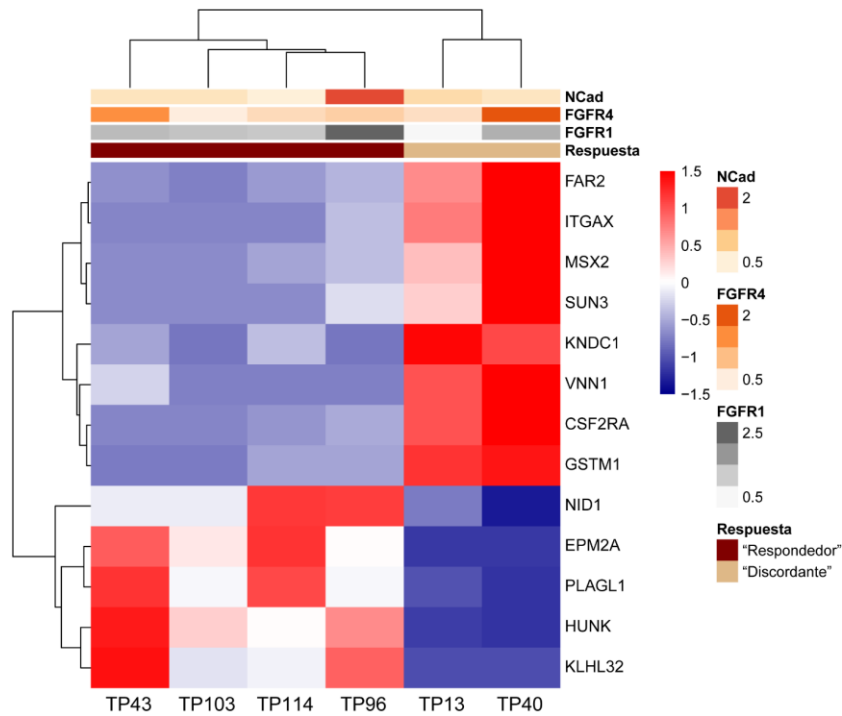
Sin embargo, la suma de estos dos biomarcadores no explica la ausencia de respuesta de todos los modelos. Mientras que la mutación en *KRAS* podría explicar la ausencia de respuesta de 5 de los 7 modelos que no respondieron al tratamiento aun teniendo alta expresión de N-Cadherina (TP57, TP60, TP79, TP80 y TP126), no teníamos justificación de la ausencia de respuesta de los dos modelos sin mutación en *KRAS* y alta expresión de N-Cadherina (TP13 y TP40), que presentaban un comportamiento discordante en comparación con el resto de modelos PDX similares.

A continuación, realizamos un análisis diferencial de expresión génica entre los cuatro modelos clasificados como “Respondedores” (TP103, TP114, TP43 y TP96) y estos dos modelos “Discordantes” (TP13 y TP40). El objetivo era identificar genes diferencialmente expresados entre ambos grupos que nos pudieran ayudar a entender el comportamiento de estos dos modelos “Discordantes”, por lo que utilizamos la misma selección de vías que antes. Como se puede observar en la Figura 16, los modelos “Discordantes” mostraron una mayor expresión estadísticamente significativa de genes agrupados en vías relacionadas con un cambio en el metabolismo tumoral (Glucólisis) y adaptación a un ambiente sin oxígeno (Hipoxia), además de la creación de un microambiente inflamatorio (IL6-JAK-STAT3 y TNF via NF-κB).



**Figura 16. Análisis diferencial de expresión génica entre los PDX “Respondedores” y “Discordantes”.** Se muestran los análisis de FGSEA para los conjuntos de genes seleccionados comparando los cuatro modelos PDX que respondieron al tratamiento (TP103, TP43, TP114 y TP96) frente a los dos modelos que no respondieron aun siendo clasificados como modelos con alta expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina y que no presentan mutación en KRAS (TP13 y TP40). Se muestran en azul los conjuntos de genes en los que las muestras de los modelos respondedores están enriquecidas o tienen su expresión disminuida, de forma significativa.

En la Figura 17 se representan los genes diferencialmente expresados entre los modelos “Respondedores” y los modelos “Discordantes”, sin ser agrupados por vías de señalización. En este análisis nos centramos solo en aquellos genes que mostraban una mayor o menor expresión en ambos modelos “Discordantes” en referencia a los cuatro modelos “Respondedores”, y su posible relación con la respuesta o no a la inhibición de FGFR.



**Figura 17. Expresión génica diferencial entre los PDX “Respondedores” y “Discordantes”.** Se muestra un mapa de calor supervisado con las puntuaciones de enriquecimiento normalizadas (NES) de los análisis de enriquecimiento de genes. El análisis de enriquecimiento de genes se realizó para comparar la expresión diferencial entre el grupo de “Respondedores” y el grupo “Discordante”. En el panel descriptivo superior se presenta para cada modelo PDX, la respuesta al tratamiento y el nivel de expresión de los biomarcadores FGFR1/4 y N-Cadherina, calculado mediante densitometría del WB.

Encontramos cinco genes sobreexpresados en el grupo “Respondedores” al compararlo con el grupo “Discordantes” (*NID1*, *EPM2A*, *PLAGL1*, *HUNK*, *KLHL32*) y ocho genes con una mayor expresión en el grupo “Discordantes” con respecto al grupo “Respondedores” (*KNDC1*, *VNN1*, *CSF2RA*, *GSTM1*, *FAR2*, *ITGAX*, *MSX2*, *SUN3*). Utilizamos la herramienta bioinformática DAVID para realizar la anotación funcional de este grupo de genes. Los hallazgos se produjeron principalmente en el grupo de genes que están sobreexpresados en los modelos discordantes frente a los que responden al tratamiento. Entre estos genes, encontramos que los genes *CSF2RA*, *ITGAX* y *VNN1* están relacionados con la señalización del sistema inmune y la creación de un ambiente inmunosupresor<sup>247,248</sup>. Los genes *FAR2* y *GSTM1* están involucrados en la reprogramación del metabolismo lipídico<sup>249,250</sup>. Como hemos visto, la funcionalidad de estos cinco genes (*CSF2RA*, *ITGAX*, *VNN1*, *FAR2* y *GSTM1*) ha sido previamente descrita en la resistencia a los inhibidores de los RTK por lo que podría estar asociada con una potencial resistencia a los inhibidores de FGFR.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la N-Cadherina parece actuar como un biomarcador predictivo de respuesta al inhibidor de FGFR sólo en un contexto en el que el gen *KRAS* no este mutado. Es decir, cuando *KRAS* está mutado, la alta expresión de N-Cadherina no predice la respuesta al inhibidor de FGFR. Además, en un contexto de *KRAS wt*, la expresión de

N-Cadherina no siempre predice la sensibilidad a la terapia anti-FGFR (lo hace en un 66,7 % de los casos), ya que encontramos dos modelos PDX (33,3 %) con alta expresión de N-Cadherina y *KRAS wt* que no responden a la terapia, los que denominamos modelos “Discordantes”. En el estudio de estos dos modelos sugerimos que esa resistencia podría ser explicada por la sobreexpresión de genes relacionados con la señalización IL6-JAK-STAT3, el metabolismo lipídico y de la glucosa, la hipoxia, con la señalización TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B, o con la creación de un ambiente inmunosupresor. Sin embargo, como nuestro estudio fue realizado en solo dos modelos PDX “Discordantes”, sería necesario un análisis a gran escala para dar mayor robustez a estos hallazgos.

### 2.3 Identificación mediante herramientas *in silico* de posibles nuevos biomarcadores predictivos de respuesta a la terapia anti-FGFR.

Realizamos un análisis a gran escala para ampliar la búsqueda de posibles biomarcadores predictivos de respuesta a la terapia anti-FGFR. Desarrollamos un estudio *in silico* utilizando información de un gran número de líneas comerciales de cáncer de pulmón de bases de datos públicas. Primero, utilizando los datos de expresión a nivel de ARNm de FGFR1/4 y N-Cadherina, seleccionamos solo aquellas que presentaban una alta expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina (tomando como punto de corte la mediana). En estas líneas seleccionadas (n = 67), identificamos los genes cuya sobreexpresión estuviera relacionada con una mayor resistencia al tratamiento con inhibidores de FGFR. Para establecer esta relación, se obtuvo el dato de sensibilidad de estas líneas a diferentes inhibidores de FGFR del repositorio GDSC, y el dato de expresión de genes del repositorio *Cell Model Passports*. Para asociar un aumento de expresión de un gen con la resistencia a un inhibidor (aumento de la IC50), se realizó una correlación de Pearson y se tomaron los valores positivos del coeficiente “R” y p valor < 0,05 como hallazgos significativos.

Los genes seleccionados fueron estudiados de dos maneras diferentes. Por un lado, analizamos con el software DAVID una lista de 670 genes cuya sobreexpresión se relaciona con la resistencia a los inhibidores AZD4547, PD173074 y foretinib (R > 0; p valor < 0,05) con el fin de encontrar grupos funcionales de genes o vías de señalización que podrían estar relacionadas con la resistencia a estos inhibidores. Esta herramienta, clasifica los genes en grupos funcionales, por lo que nos fijamos en aquellos que englobaban a tres o más genes diferencialmente expresados. El resultado fueron diez grupos funcionales (41 genes) cuya mayor expresión en las líneas celulares (con alta expresión de N-Cadherina) podría estar relacionada con una resistencia a los inhibidores de FGFR. De esta manera, encontramos la sobreexpresión de genes relacionados con la degradación de las uniones GAP de la membrana celular, con el cambio del metabolismo de la

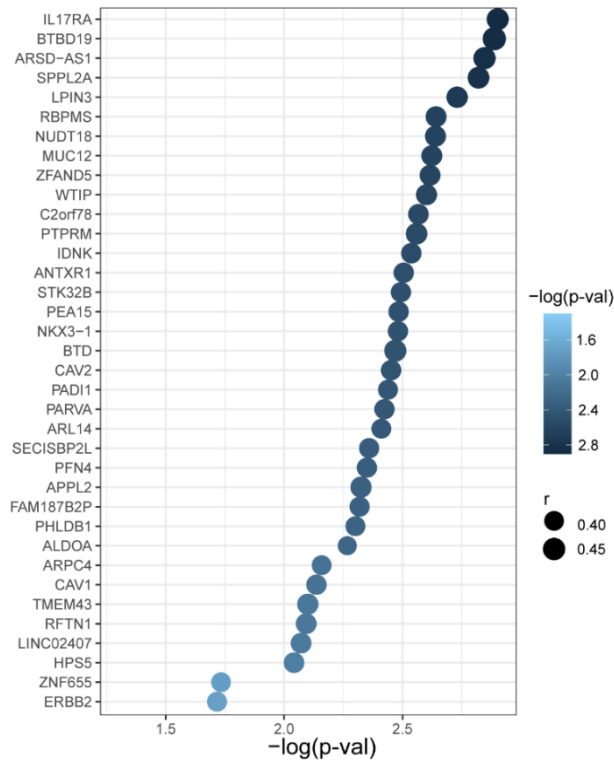
glucosa, con la regulación del citoesqueleto de actina que se relacionan con otros procesos diferentes (como la fagocitosis ante infecciones bacterianas), con la activación de los linfocitos B y el complemento, con otras neoplasias (como la Leucemia Mieloide Crónica o el cáncer colorrectal), con la respuesta al daño al ADN y de sus vías de reparación, con la activación de la cascada MAPK, con la regulación del olfato, y con procesos generales (como la transcripción) (Tabla 16). De forma similar a lo visto previamente en los modelos PDX, las uniones GAP, el metabolismo de la glucosa y la señalización MAPK podrían estar vinculadas con la resistencia a la terapia anti-FGFR.

Tabla 16. Grupos funcionales de genes cuya sobreexpresión se relaciona con la resistencia a los inhibidores de FGFR.

Nombre del grupo funcional	Genes involucrados
Degradación de uniones GAP	<i>DAB2, ACTG1, CLTC</i>
Metabolismo de la glucosa	<i>ALDOA, HKDC1, PFKP, PGK1</i>
Regulación de las dinámicas de la actina para el desarrollo de la fagocitosis. En ocasiones mediada por receptores y, en ocasiones, como respuesta a una infección bacteriana	<i>ARPC4, ARPC2, ATG1</i>
Activación de los linfocitos B y del complemento	<i>IGHV3-15, IGHA2, IGHG4, IGHV3-16</i>
Leucemia Mieloide Crónica y cáncer colorrectal	<i>TGFB1, DDB2, CDKN1A</i>
Respuesta al daño del ADN y vía p53	<i>CDKN1A, DDB2, FAS</i>
Vías de reparación del ADN	<i>XPC, POLH, DDB2</i>
Señalización MAPK	<i>ACTG1, ITGB3, SHOC2, PEA15, CSF2RA, PSMB2, ERBB2</i>
Señalización olfativa	<i>OR5B12, OR51B4, OR51M1, OR51B6</i>
Expresión génica (transcripción)	<i>CDKN1A, ERBB2, ZNF860, FAS, GLI2, ZNF486, NUA1, WWTR1, PIP4K2A, DDB2, ZNF655, CAV1, HDAC11, NR1H4, PINK1</i>

Se indican los genes agrupados por cada grupo funcional diferente.

Por otro lado, escogimos el 5 % de los genes con el valor R más elevado (n = 37) de la lista de 670 genes y los analizamos individualmente, buscando en la literatura evidencias de su implicación en la resistencia a inhibidores de RTKs. Estos genes se representan en la Figura 18, donde el tamaño del nodo refleja su valor R asociado y el color refleja el p valor. De entre los genes representados, destacamos genes asociados a una peor prognosis en el CPNM (*ARL14*<sup>251</sup>) o en otras neoplasias (*ARPC4*<sup>252,253</sup>), además de aquellos genes implicados en la resistencia a los inhibidores de RTKs en general (*PHLD1B*<sup>254</sup> o *APPL2*<sup>255</sup>), en particular de EGFR (*IL17RA*<sup>256</sup>), o de FGFR (*RBPM5*<sup>257,258</sup>, *CAV1*<sup>259,260</sup> o *ERBB2*<sup>261</sup>).



**Figura 18. Genes cuya sobreexpresión está relacionada con la resistencia a los inhibidores de FGFR.** Se representa el 5 % de los genes cuya sobreexpresión ( $R > 0$ ;  $p$  valor  $< 0,05$ ) se relaciona con una resistencia a distintos inhibidores RTK. El tamaño del nodo indica el valor de  $R$ , mientras que el color indica el  $p$  valor. Los tonos más oscuros indican una mayor significancia estadística.

En resumen, al igual que en los modelos PDX, el análisis a gran escala para identificar posibles nuevos biomarcadores predictivos de la respuesta a los inhibidores de FGFR nos indicó una posible relación, con la resistencia a los inhibidores de FGFR, de la degradación de las uniones GAP, del metabolismo de la glucosa y de la señalización MAPK. También hemos hallado una potencial implicación de los linfocitos B y el sistema del complemento en dicha resistencia, así como del daño al ADN y la señalización de reparación que se desencadena. Por último, hemos observado una posible relación entre una serie de genes descritos en la resistencia a otros RTK, con la resistencia a los inhibidores de FGFR, que merecería la pena estudiar en profundidad (Figura 18).

Un estudio más pormenorizado, incluyendo su validación *in vivo* y estudios funcionales, de los genes destacados aquí, junto a los previamente analizados en los modelos PDX, nos permitiría proponer otros biomarcadores predictivos de resistencia/sensibilidad a la terapia anti-FGFR.

### 3. IMPLICACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DE *KRAS* EN LA RESPUESTA A LOS INHIBIDORES DE FGFR

Los resultados que hemos obtenido en el apartado anterior han subrayado la importancia de considerar el estado mutacional de *KRAS* como un factor relevante para tener en cuenta a la hora de predecir la respuesta a los inhibidores de FGFR, particularmente en los modelos PDX que presentan alta expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina, pero no responden al tratamiento. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue estudiar la implicación de la presencia de la mutación de *KRAS* en la respuesta a los inhibidores de FGFR.

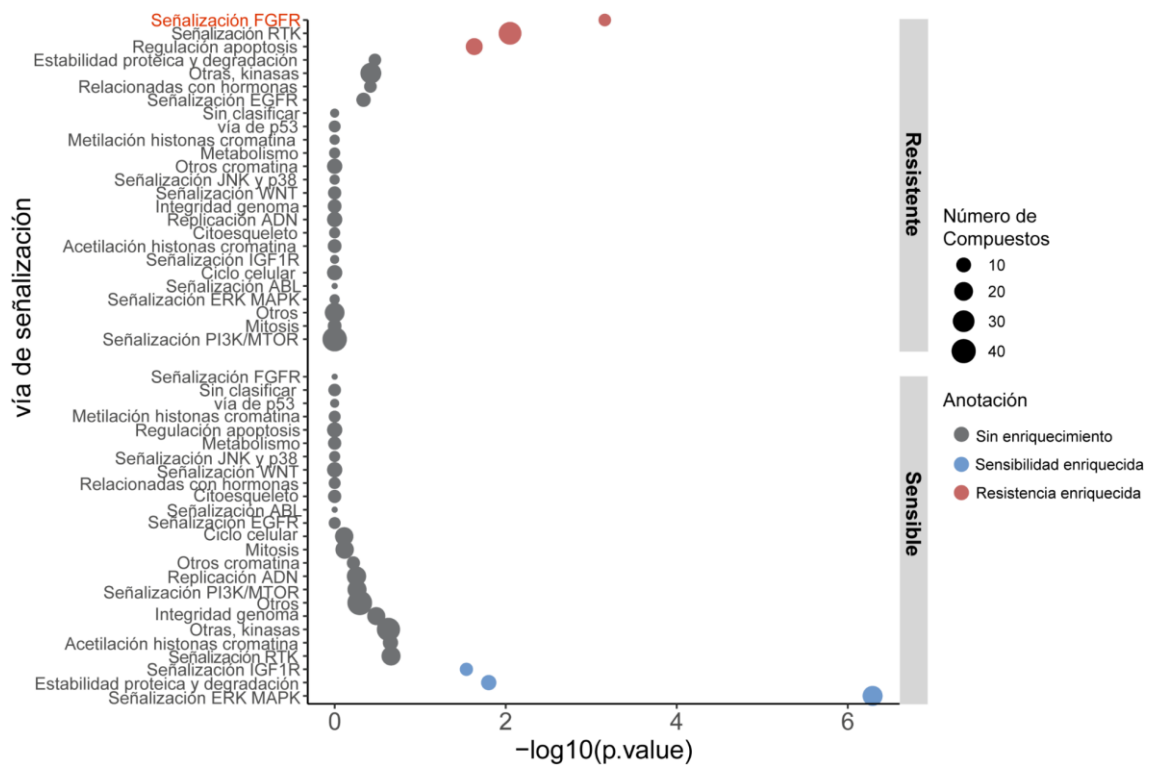
#### 3.1 Estudio *in silico* del papel del estado mutacional de *KRAS* como biomarcador predictivo de la respuesta a los inhibidores de FGFR.

Debido a la limitación en el número de PDX *KRAS* mutados que teníamos disponibles ( $n = 7$ ), decidimos evaluar la implicación del estado mutacional de *KRAS* en la respuesta a diferentes fármacos dirigidos en una amplia colección de líneas celulares utilizando el repositorio *Genomics of Drug Sensitivity in Cancer* (GDSC). Este repositorio, gestionado por el Instituto Sanger, recopila datos de líneas celulares tumorales comerciales y proporciona información sobre su sensibilidad a diversos fármacos, incluyendo algunos inhibidores de FGFR.

Para este estudio, utilizamos los datos del valor de IC50 de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón ( $n = 116$ ) para diferentes fármacos ( $n = 624$ ), y los datos de expresión de FGFR1 y FGFR4, y del estado mutacional de *KRAS* disponibles en el repositorio *Cell Model Passports*. Con esta información, en líneas celulares con alta expresión de FGFR1/4 (usando la mediana como punto de corte), analizamos la sensibilidad o resistencia enriquecida de los diferentes fármacos (clasificados por las vías de señalización que inhiben) según su estado mutacional de *KRAS*. Entendiendo por sensibilidad o resistencia enriquecida como una mayor sensibilidad/resistencia a un inhibidor de las células *KRAS mut* con respecto a la sensibilidad/resistencia que muestran al resto de inhibidores. El cálculo de esta sensibilidad/resistencia enriquecida se explica a continuación. Para cada fármaco se compararon los valores de su IC50 entre los grupos de células *KRAS wt* y *KRAS mut*. Posteriormente, se utilizó la prueba *t de student* para determinar si la presencia de mutaciones en el *gen KRAS* estaría correlacionada con una diferencia significativa en los valores de IC50. Un valor *t* positivo relacionaría a la mutación de *KRAS* con la resistencia al inhibidor (si la IC50 es superior que en las *wt*) o con la sensibilidad al inhibidor (si la IC50 es inferior). Supongamos que había “N” inhibidores de una familia de inhibidores (por ejemplo, los inhibidores de FGFR [FGFRi]) en el conjunto de datos de GDSC. Nuestro análisis identificó que en “n” inhibidores de FGFR se

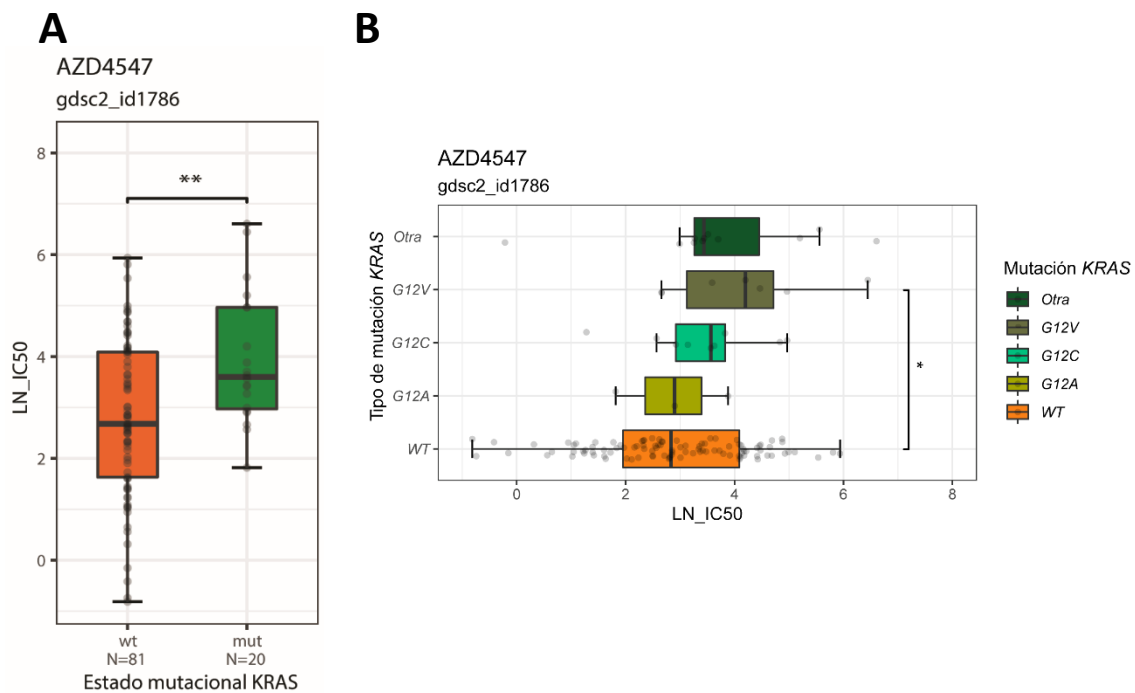
observó una resistencia al fármaco, en las células con mutaciones en *KRAS*. Supongamos que había “M” inhibidores en el conjunto de datos de GDSC y que nuestro análisis identificó que en “m” inhibidores se observa una resistencia al fármaco. Por lo que a continuación, quisimos saber si la fracción “n/N” de los FGFRi, que inhiben la señalización de FGFR, es significativamente más alta que la fracción de todos los fármacos. Para ello se utilizó la prueba exacta de Fisher, comparando si la fracción “n/N” era significativamente mayor que “m/M”. En caso afirmativo, se podría afirmar la existencia de un enriquecimiento de la resistencia a los FGFRi dirigidos contra la señalización FGFR. El valor p indica si este enriquecimiento es significativo o no. De la misma manera, se analizaron todos los tipos de fármacos y se generó la Figura 19.

Como hemos calculado para cada fármaco, la sensibilidad o resistencia que muestran las células de adenocarcinoma *KRAS mut* con respecto a las células *KRAS wt*, en la Figura 19 representamos el resultado de las células *KRAS mut*. Observamos que las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón con mutación en *KRAS* mostraban mayor sensibilidad a los inhibidores de la señalización IGF1R, los inhibidores de la estabilidad y degradación de proteínas, y a los inhibidores de la señalización ERK-MAPK (parte inferior de la figura). Sin embargo, estas líneas presentaban mayor resistencia a los inhibidores de la apoptosis, de señalización de los receptores tirosina quinasa (RTK), y de la señalización FGFR, siendo esta última la más pronunciada.



**Figura 19. Análisis *in silico* de la respuesta a diferentes fármacos en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón con mutación en *KRAS*.** Estudio del enriquecimiento de sensibilidad o resistencia a fármacos dirigidos a diferentes dianas terapéuticas de GDSC1 y 2 ( $\text{fdr} < 0,05$ ) en las líneas celulares de adenocarcinoma *KRAS mut*, determinado mediante la prueba hipergeométrica con la corrección de Benjamini-Hochberg. Se usó la prueba exacta de Fisher para determinar si las inhibiciones de FGFR dirigidas a la señalización de FGFR estaban enriquecidas en la sensibilidad o resistencia a los fármacos. La sensibilidad enriquecida a los fármacos en las dianas terapéuticas se muestra en azul, la resistencia enriquecida en rojo. El número de fármacos en cada grupo está indicado por el tamaño del punto. Se muestran todas las dianas terapéuticas testadas. Todos los test estadísticos se llevaron a cabo usando el test *t de student* y el p valor  $< 0.05$  fue seleccionado como estadísticamente significativo ( $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ , n.s.: no significativo).

A continuación, analizamos específicamente la resistencia al inhibidor de FGFR AZD4547 en el mismo panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón del repositorio GDSC. En primer lugar, comparamos la IC50 del inhibidor AZD4547 en las líneas de adenocarcinoma con el gen *KRAS wt* versus las líneas con el gen *KRAS* en su forma mutada (*mut*). Como se muestra en la Figura 20A, las líneas con mutación en *KRAS* presentan una mayor resistencia al inhibidor AZD4547, como indica su valor medio de IC50 significativamente mayor en comparación con el valor medio de IC50 de las líneas con *KRAS wt*. En segundo lugar, estudiamos la implicación de cada una de las mutaciones de *KRAS* clínicamente más relevantes en la resistencia al fármaco. Para ello, dividimos las líneas *KRAS mut* en distintos subgrupos, en función de la mutación puntual de *KRAS* que albergasen. Al igual que previamente hicimos con la totalidad de las líneas *KRAS mut*, calculamos la IC50 media para cada subgrupo, y la comparamos con la IC50 de las líneas *KRAS wt*. Como se puede ver en la Figura 20B, observamos que la IC50 del inhibidor AZD4547 era significativamente mayor en la mayoría de las líneas con diferentes mutaciones *KRAS*, aunque solo las líneas que presentan la mutación *KRAS G12V* mostraban diferencias estadísticamente significativas en comparación con las *wt*.

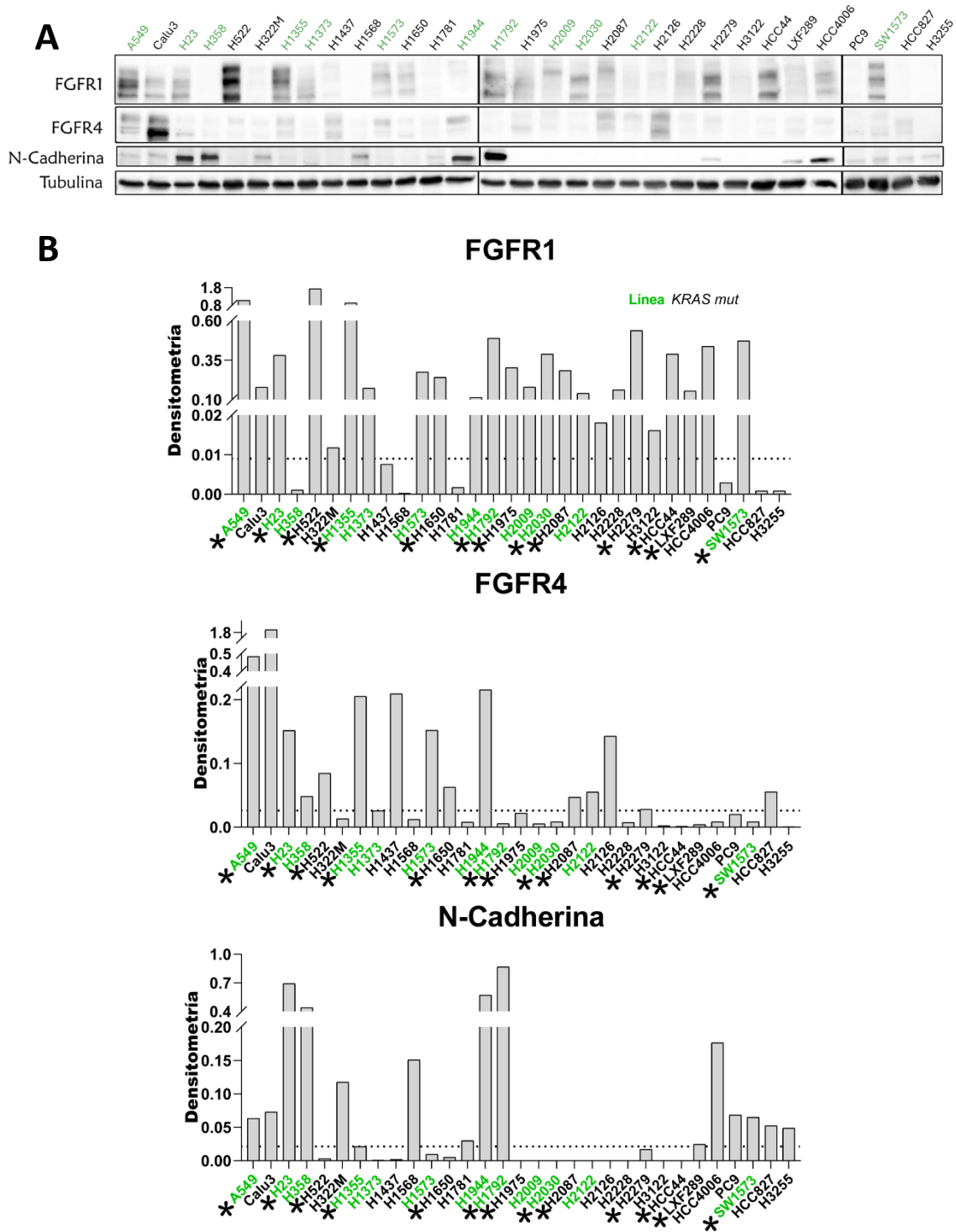


**Figura 20. Efecto del estado mutacional de *KRAS* en la sensibilidad al tratamiento con AZD4547 en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.** (A) Diagrama de cajas y bigotes en el que se representa el logaritmo neperiano (LN) de la IC50 al fármaco AZD4547 de las líneas de adenocarcinoma. Cada punto negro es un valor individual de IC50 de una línea celular de adenocarcinoma. En la caja naranja se engloban las líneas con el gen *KRAS* en su forma nativa, mientras que en la caja verde se engloban las líneas con el gen *KRAS* mutado. (B). En este diagrama de cajas y bigotes se desglosan las líneas celulares por su mutación en el gen *KRAS*, representadas en cajas y bigotes con colores en la gama del verde. En color naranja se clasifican las líneas celulares *KRAS wt*, en color oliva las líneas *KRAS G12A*, en color verde turquesa las líneas *KRAS G12C*, en caqui las líneas *KRAS G12V* y en verde oscuro cualquier otra mutación de *KRAS* con menor frecuencia en este repositorio. Todos los test estadísticos se llevaron a cabo usando el test *t de student* y el p valor < 0.05 fue seleccionado como estadísticamente significativo (\*\*p < 0.001, \*p < 0.01, \*p < 0.05, n.s.: no significativo).

### 3.2 Estudio de sensibilidad a los inhibidores de FGFR en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón según su expresión de N-Cadherina y su estado mutacional de *KRAS*.

#### 3.2.1 Caracterización de la expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.

En base a los hallazgos obtenidos en el análisis del repositorio GDSC, quisimos confirmar estos resultados utilizando una colección de 31 líneas celulares comerciales de adenocarcinoma de pulmón (Tabla 9). Para ello, caracterizamos y cuantificamos los niveles de expresión de FGFR1, FGFR4 y N-Cadherina mediante *Western Blot* (Figura 21). De entre todas las líneas caracterizadas, seleccionamos 13 líneas con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4, niveles variables de expresión de N-Cadherina y diferente estado mutacional de *KRAS* (utilizando la información proporcionada por la casa comercial). Esta selección se realizó con el objetivo de tener un número parecido de líneas celulares en cada subgrupo de estudio. Por ello, las 13 líneas se dividieron en cuatro grupos: dos líneas celulares con alta expresión de N-Cadherina y *KRAS wt* (H2279 y LXF289), cuatro líneas celulares con baja expresión de N-Cadherina y *KRAS wt* (H522, H1650, H1975 y H2087), cuatro líneas celulares con alta expresión de N-Cadherina y *KRAS mut* (A549, H23, H1792 y SW1573), y tres líneas celulares con baja expresión de N-Cadherina y *KRAS mut* (H1355, H2030 y HCC44).



**Figura 21. Determinación de los niveles de expresión de FGFR1, FGFR4 y N-Cadherina en líneas de adenocarcinoma de pulmón.** Se valoraron por WB los niveles de expresión de estos biomarcadores en 31 líneas celulares comerciales de adenocarcinoma de pulmón (Tabla 9). Se representa la imagen resultante del revelado de la técnica (A) así como la cuantificación de las bandas por densitometría (B). La línea punteada es el punto de corte establecido para determinar la presencia de expresión de FGFR1 y FGFR4 (percentil 10 y percentil 50, respectivamente) y la alta o baja expresión de N-Cadherina ( $z$  score = 0). Las líneas celulares con mutación en el gen *KRAS* se muestran con el nombre en verde. Se marcan con un asterisco (\*) las 13 líneas seleccionadas para los estudios de sensibilidad posteriores.

### 3.2.2 Estudio de sensibilidad al tratamiento con AZD4547 del panel de 13 líneas de adenocarcinoma de pulmón con alta expresión de FGFR1/4.

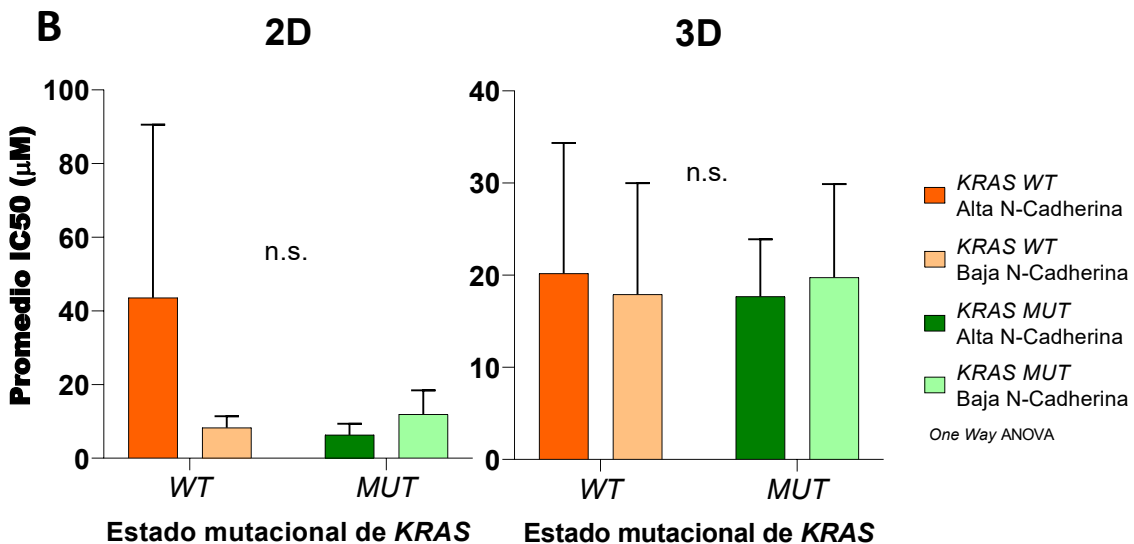
En este estudio, se realizaron ensayos de citotoxicidad en las 13 líneas celulares seleccionadas previamente por su alta expresión de FGFR1/4 y con niveles variables de expresión de N-Cadherina y diferentes estatus de *KRAS*. En estos ensayos testamos la sensibilidad al inhibidor AZD4547 para compararla entre los 4 grupos de líneas establecidos previamente según su contexto molecular y que se encuentran representados en la Figura 22.

Se llevaron a cabo ensayos de determinación del valor de IC50 en cultivos 2D de estas 13 líneas celulares. Los resultados obtenidos muestran una gran variabilidad en los valores de IC50 entre líneas celulares clasificadas en el mismo subgrupo según su contexto molecular (Figura 22A). Las medias de los valores de IC50 por grupo no muestran diferencias significativas entre los distintos subgrupos de estudio: IC50 *KRAS wt* Alta N-Cadherina (8  $\mu$ M), IC50 *KRAS wt* Baja N-Cadherina (43  $\mu$ M), IC50 *KRAS mut* Alta N-Cadherina (12  $\mu$ M) e IC50 *KRAS mut* Baja N-Cadherina (6  $\mu$ M) (Figura 22B). En resumen, en estos ensayos *in vitro* la expresión de N-Cadherina no predice la respuesta a los inhibidores de FGFR en ninguno de los contextos estudiados.

Dado que existe evidencia científica que muestra que los efectos de los fármacos varían según la disposición espacial de los cultivos celulares (en dos o tres dimensiones)<sup>262</sup>, realizamos ensayos de determinación de IC50 en esferoides para comparar si la sensibilidad de nuestras líneas al inhibidor AZD4547 era similar en 2D y en 3D. Como se muestra en la Figura 22B, tampoco se observan diferencias significativas entre los distintos subgrupos moleculares establecidos: IC50 *KRAS wt* Alta N-Cadherina (18  $\mu$ M), IC50 *KRAS wt* Baja N-Cadherina (20  $\mu$ M), IC50 *KRAS mut* Alta N-Cadherina (20  $\mu$ M) e IC50 *KRAS mut* Baja N-Cadherina (18  $\mu$ M). Las diferencias observadas entre las IC50 del cultivo bidimensional y el tridimensional tampoco fueron homogéneas ni significativas (Figura 22B).

**A**

Estado KRAS	Expresión N-Cadherina	AZD4547	2D		3D	
		Línea celular	Media	SD	Media	SD
KRAS wt	Alta	H2279	76,79	25,21	30,20	0,85
		LXF289	10,31	3,17	10,16	3,67
	Baja	H522	4,58	0,92	12,38	1,62
		H1650	11,32	1,57	35,80	3,55
		H1975	6,86	1,05	8,67	5,32
		H2087	10,38	2,62	15,01	2,49
KRAS mut	Alta	A549	10,33	2,40	10,01	2,88
		H23	4,53	1,24	15,80	5,69
		H1792	3,47	1,31	24,42	4,14
		SW1573	6,86	1,51	20,52	0,97
	Baja	H1355	9,61	5,49	29,93	0,91
		H2030	6,91	3,60	9,66	0,85
		HCC44	19,24	3,25	19,63	3,11



**Figura 22.** Ensayos de citotoxicidad en las líneas de adenocarcinoma seleccionadas con el inhibidor AZD4547. (A) Tabla con las IC50 (µM) promedio determinadas para cada línea celular en cada sistema de cultivo utilizado (bidimensional y tridimensional). Cada experimento de determinación de IC50 está apoyado por un triplicado biológico (se representa también la desviación, SD). La escala colorimétrica gradúa las IC50 de la presente cohorte de líneas celulares desde las más elevadas/resistentes (color rojo) hasta las más bajas/sensibles (color verde) dentro de las 13 líneas de estudio. (B) Imágenes representativas del promedio de IC50 en cada uno de los cuatro subgrupos de estudio. La prueba estadística utilizada fue el ANOVA de una vía (n.s. = no significativo; p valor > 0.05).

### 3.3 Estudio de la implicación de diferentes mutaciones en KRAS en la resistencia a la terapia anti-FGFR utilizando diferentes modelos *in vitro*.

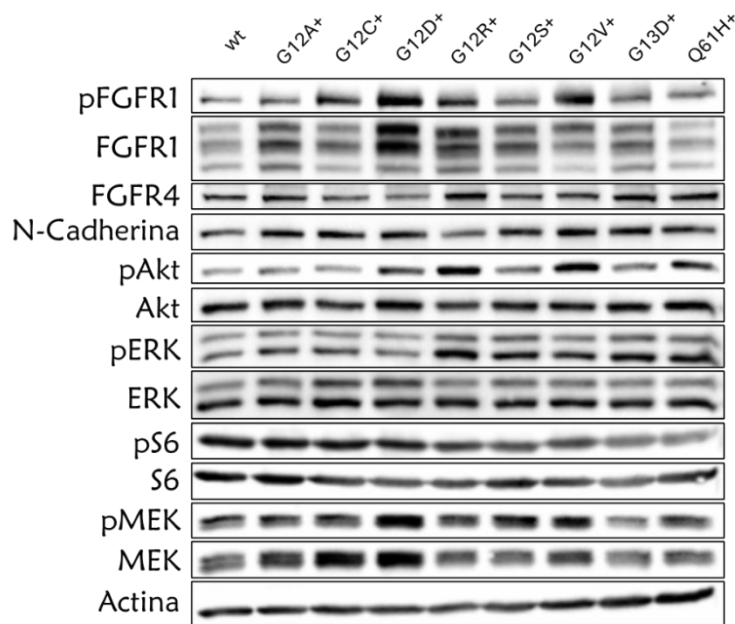
#### 3.3.1 Caracterización de líneas celulares isogénicas con diferentes mutaciones de KRAS.

Debido a la discordancia observada entre nuestros resultados con nuestros 16 modelos PDX *in vivo* y con nuestra cohorte de 13 líneas celulares *in vitro*, optamos por utilizar modelos genéticamente más homogéneos para estudiar el papel específico de la mutación del gen KRAS de forma aislada. Para ello, utilizamos líneas celulares isogénicas (cedidas por el laboratorio de

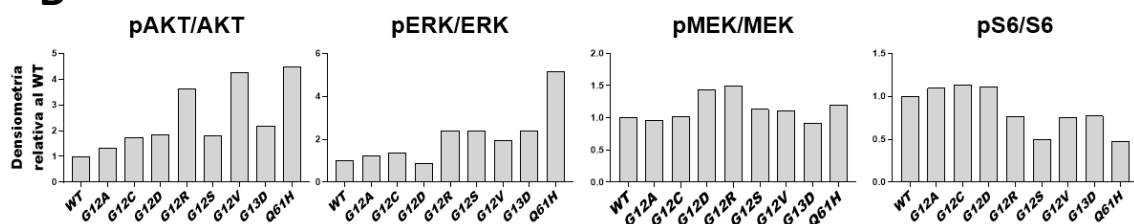
Chiara Ambrogio) generadas a partir de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) derivados de un modelo murino genéticamente modificado para *Ras* (con delección constitutiva de *HRas* y *NRas* y condicional de *KRAS* mediante secuencias génicas *lox*). Estos MEFs fueron infectados con virus que portaban el gen humano *KRAS* en su forma nativa o con ocho mutaciones diferentes clínicamente relevantes (apartado 3.2 de Materiales y Métodos).

En primer lugar, se realizó una caracterización de todas las líneas para verificar la expresión de FGFR1, FGFR4 y N-Cadherina y la activación de la vía de *KRAS*. Mediante *Western Blot* (Figura 23), observamos que tanto las líneas celulares control *wt* como las que contenían cada una de las ocho mutaciones de *KRAS*, presentaban altos niveles de expresión de FGFR1, FGFR4 y N-Cadherina. Además, comprobamos que las líneas con mutaciones de *KRAS* presentaban un ligero aumento en la activación de la vía de señalización de *KRAS*, como demuestra el aumento de expresión de las formas fosforiladas de Akt y/o ERK y/o MEK en comparación con el modelo *KRAS wt*. El aumento de activación de Akt fue superior (al menos el doble de aumento) en las líneas *KRAS G12R*, *KRAS G12V*, *KRAS G13D* y *KRAS Q61H*, mientras que la activación de ERK fue más notoria en las líneas *KRAS G12R*, *KRAS G12S*, *KRAS G13D* y *KRAS Q61H*, y la activación de MEK en las líneas *G12D* y *G12R* (Figura 23).

**A**

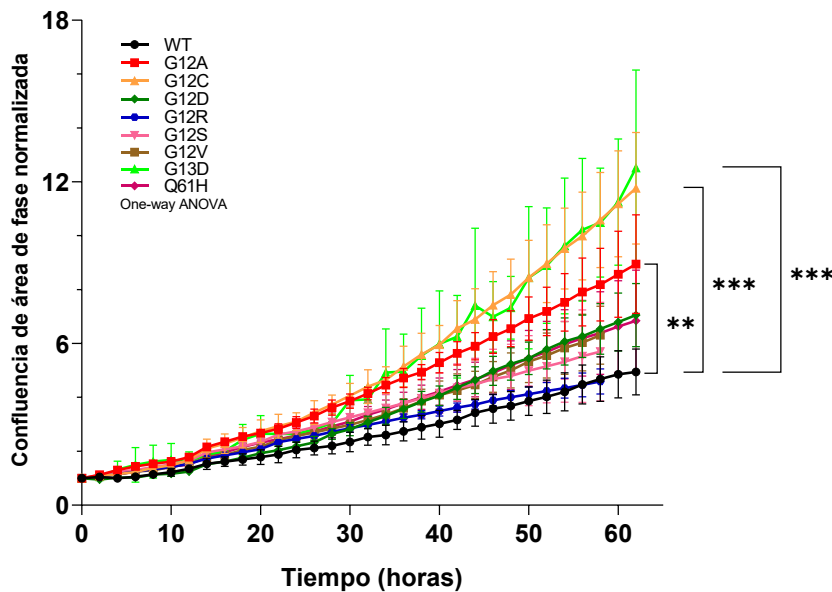


**B**



**Figura 23. Caracterización molecular de las líneas celulares isogénicas de las mutaciones de KRAS.** (A) Se representa una caracterización de expresión proteica de los biomarcadores FGFR1, pFGFR1, FGFR4, N-Cadherina y de la señalización de las vías de FGFR1 y KRAS. (B) Se representa la relación de la densitometría de las formas fosforiladas de Akt, ERK, MEK y S6 con su forma total, de forma relativa al wt. Todos los resultados son representativos de una réplica de un triplicado biológico.

Adicionalmente, estudiamos la tasa de proliferación de cada una de las líneas isogénicas y observamos que todas las líneas mutantes de *KRAS* mostraban una ventaja proliferativa en comparación con el control *KRAS wt*. Especialmente las líneas con las mutaciones *KRAS G12A*, *KRAS G12C* y *KRAS G13D* cuyas diferencias de crecimiento en comparación con el control *KRAS wt* fueron estadísticamente significativas (\* $p = 0,02$ , \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\* $p < 0,001$ , respectivamente) (Figura 24).



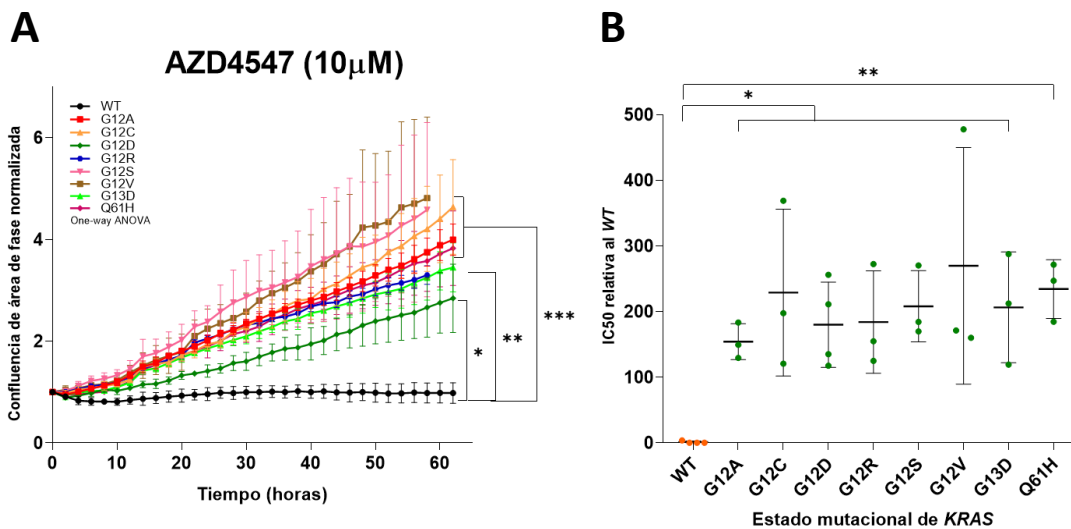
**Figura 24. Caracterización del crecimiento de las líneas celulares isogénicas con diferentes mutaciones de KRAS.** Cada línea de color representa un modelo isogénico diferente (ver leyenda). Se ha utilizado la prueba estadística ANOVA de una vía (n.s. = no significativo; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ). Todos los resultados son representativos de una réplica de un triplicado biológico.

En resumen, mediante la caracterización de las líneas celulares isogénicas concluimos que la alta expresión de nuestras moléculas dianas FGFR1/4 junto con la del biomarcador N-Cadherina, y la ventaja proliferativa observada en los mutantes de *KRAS*, respaldan la idoneidad de estas líneas para ser utilizadas para investigar la implicación de las mutaciones específicas de *KRAS* en la respuesta a los inhibidores de FGFR.

### 3.3.2 Estudio de la sensibilidad de las líneas celulares isogénicas a la terapia anti-FGFR.

A continuación, estudiamos la sensibilidad al inhibidor AZD4547 de las líneas celulares isogénicas mediante dos tipos de ensayos, curvas de crecimiento bajo tratamiento con el inhibidor de FGFR y determinación del valor de IC50. Como se puede observar en las curvas de crecimiento (Figura 25A), todas las líneas con las diferentes mutaciones en *KRAS* mostraron un crecimiento significativamente mayor, bajo tratamiento con AZD4547, en comparación con la

línea *KRAS wt*, siendo las dos líneas que mejor crecían las que portaban las mutaciones *G12V* y *G12S*. Mediante los ensayos de IC50 del inhibidor AZD4547 en cada una de estas líneas, advertimos que todas las líneas mutantes presentaron una IC50 entre 85 y 150 veces superior a la detectada en la línea *KRAS wt*, siendo las líneas con mayor IC50 las que portan las mutaciones *G12V* y *G12C* (Figura 25B). Estos resultados sugieren que las diferentes mutaciones de *KRAS* confieren cierta resistencia al inhibidor de FGFR (en mayor o menor medida) y respaldan la necesidad de investigar más a fondo la relación entre cada mutación específica de *KRAS* y la respuesta a los inhibidores de FGFR, así como de explorar los mecanismos subyacentes a esta resistencia.



**Figura 25. Sensibilidad al inhibidor AZD4547 de las líneas celulares isogénicas *KRAS* mutantes.** (A) Curvas de crecimiento de las células *KRAS wt* y las células *KRAS mut* bajo tratamiento con 10  $\mu$ M de AZD4547, monitorizado por mediciones de IncuCyte. Se tomaron medidas cada 2 horas durante 60 horas. Se ha utilizado la prueba estadística ANOVA de una vía (n.s. = no significativo; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ). Todos los resultados son representativos de una réplica de un triplicado biológico. (B) Evaluación de la citotoxicidad relativa (IC50) del inhibidor AZD4547 con respecto a la observada en las células *KRAS wt*. Se ha utilizado la prueba estadística Kruskal-Wallis (n.s. = no significativo; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ).

### 3.4 Evaluación de la eficacia de la combinación de los inhibidores de la vía de FGFR y *KRAS* en el tratamiento de líneas celulares.

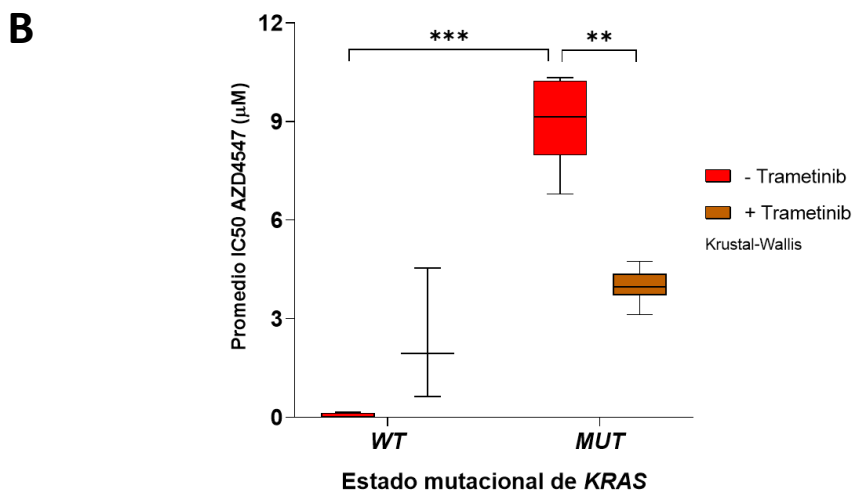
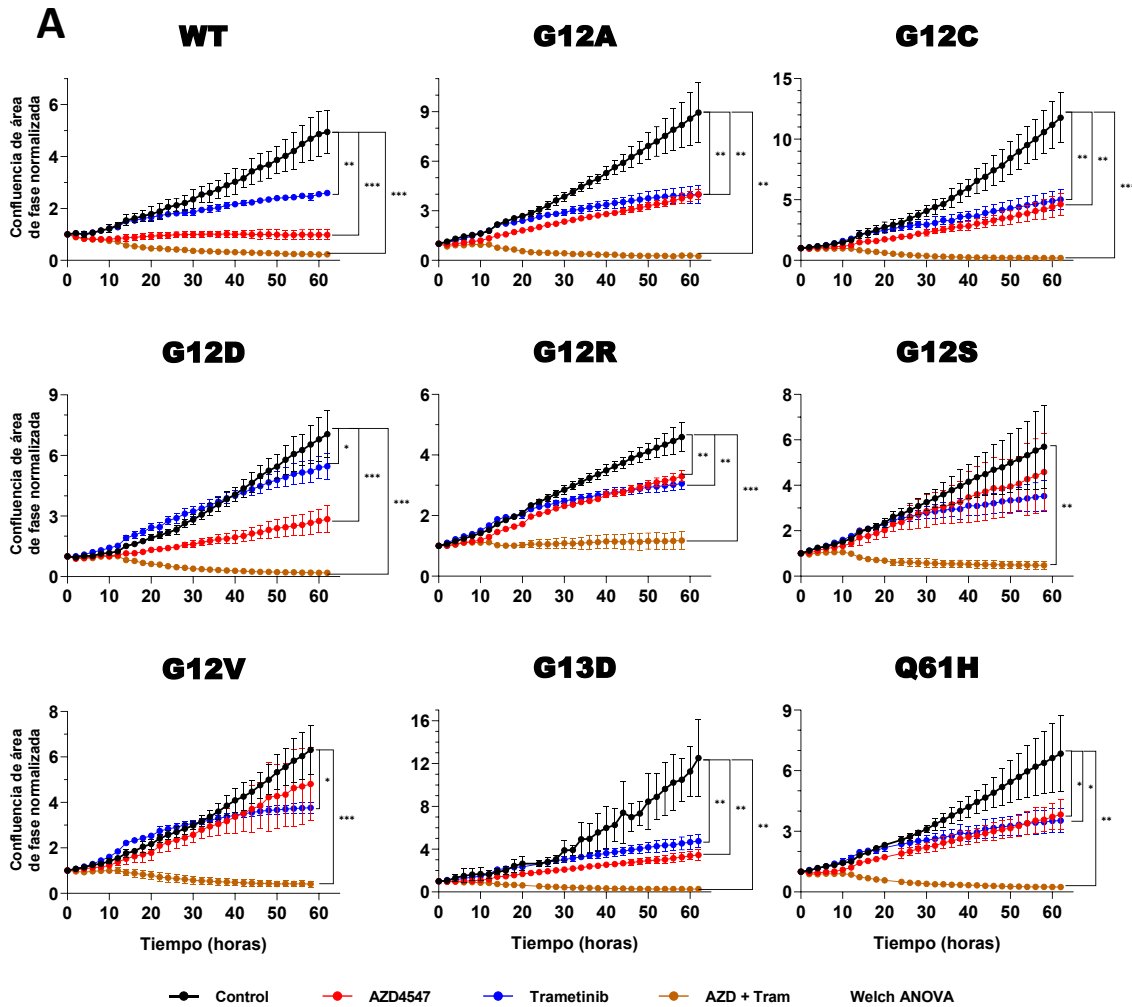
Nuestros resultados anteriores indicaron que las mutaciones en el gen *KRAS* parecían conferir cierta resistencia al inhibidor de FGFR AZD4547 en las líneas celulares isogénicas. Por ello, planteamos testar la inhibición conjunta de la vía de señalización de FGFR y *KRAS* mediante una terapia combinada utilizando los inhibidores AZD4547 y trametinib, un inhibidor de MEK, que es un inhibidor pan-*KRAS* indirecto que nos permite inhibir la señalización aberrante de *KRAS* en las ocho líneas con las ocho mutaciones diferentes. Este inhibidor está ampliamente probado *in vitro* e *in vivo*<sup>263,264</sup>, y está aprobado su uso por la FDA en combinación con el dabrafenib para los pacientes de CPNM con mutaciones en *BRAF*<sup>58</sup>. Utilizando la tecnología IncuCyte, evaluamos el efecto del inhibidor AZD4547 y el inhibidor trametinib en monoterapia y en combinación, en

el crecimiento de cada una de las nueve líneas celulares isogénicas (una línea *KRAS wt* y ocho líneas con distintas mutaciones de *KRAS*).

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento en monoterapia con AZD4547 redujo el crecimiento en todas las líneas, pero especialmente en las células *KRAS wt* donde se observó una tasa de crecimiento cinco veces menor en comparación con el control de las células sin tratar. En la mitad de las líneas celulares isogénicas (*G12R*, *G12S*, *G12V* y *Q61H*) se observa una mínima reducción del crecimiento en comparación con el control, mientras que en las líneas con las mutaciones *G12A*, *G12C* y *G12D* el crecimiento disminuye a la mitad, y en las *G13D* decrece cuatro veces. Por otro lado, como se esperaba, el trametinib redujo el crecimiento en la mayoría de las líneas celulares con mutaciones en *KRAS* (reducción en más de la mitad con respecto al Control) en comparación con las células *wt*, excepto en el modelo *KRAS G12D* cuyo crecimiento apenas disminuyó en comparación con las células Control (Figura 26A).

Por otro lado, la terapia combinada mostró un efecto muy potente en la reducción del crecimiento en todos los modelos, como muestran las curvas regresivas. En la mayoría de estos modelos se observó un decrecimiento del crecimiento de entre 30 y 60 veces, a excepción de los modelos *G12R*, *G12S* y *G12V*, donde esa reducción fue algo inferior, de 4, 12 y 15 veces, respectivamente. Sin embargo, estos tres modelos se caracterizaron por tener un efecto casi inapreciable con AZD4547 en monoterapia por lo que el efecto de la terapia combinada, aunque no tan exacerbado como en el resto de los modelos, fue también relevante (Figura 26A).

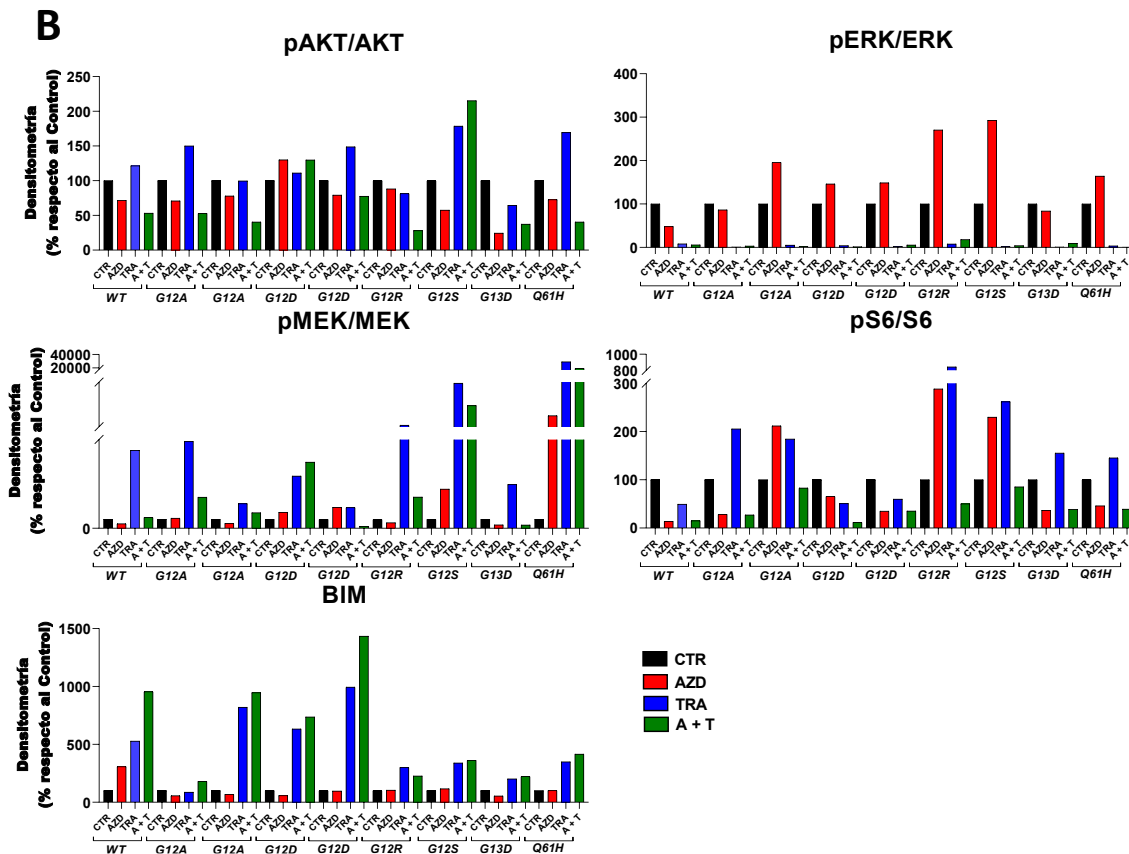
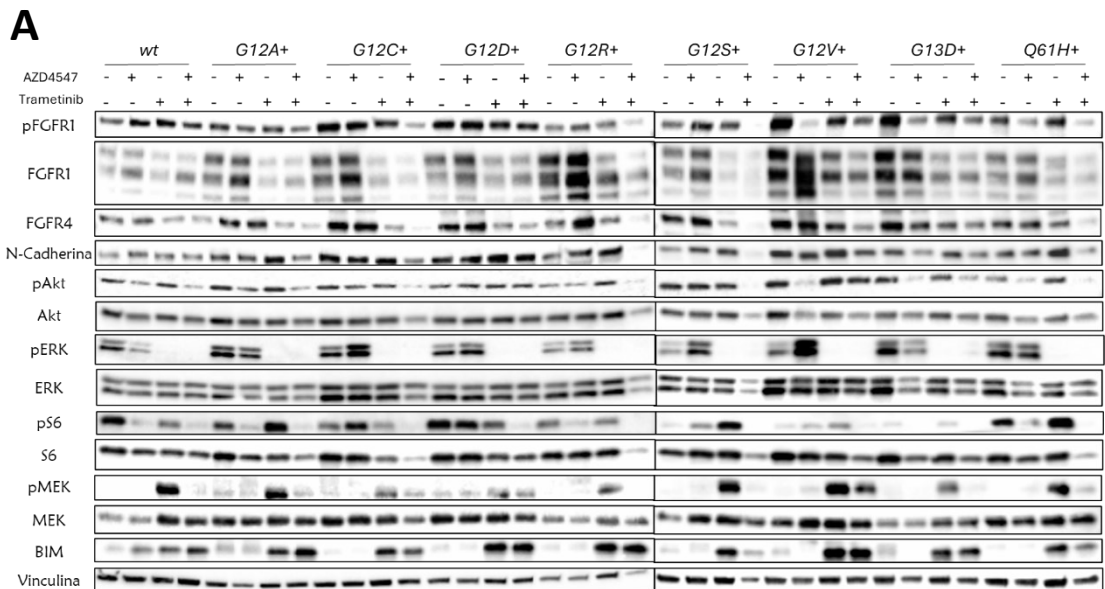
Estos resultados sugieren que la terapia combinada, utilizando los inhibidores de FGFR y MEK, podría ser una estrategia terapéutica efectiva para evadir la resistencia a la inhibición de FGFR asociada a la presencia de las mutaciones en *KRAS*.



**Figura 26. Evaluación de la eficacia de la combinación de los inhibidores de FGFR y MEK en las líneas celulares isogénicas.** (A) Se representan las curvas de crecimiento de las líneas isogénicas sin ningún tratamiento (Control, línea negra), al tratamiento en monoterapia con el inhibidor de FGFR (10  $\mu\text{M}$  AZD4547, línea roja), al tratamiento en monoterapia con el inhibidor de MEK (25 nM trametinib, línea azul) y al tratamiento combinatorio (10  $\mu\text{M}$  AZD4547 + 25nM trametinib, línea marrón). Este ensayo fue monitorizado por mediciones de IncuCyte donde se tomaron medidas cada 2 horas. Se ha utilizado la prueba estadística Welch ANOVA de una vía (n.s. = no significativo; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ). (B) Gráfico representativo de los modelos isogénicos tratados exclusivamente con AZD4547 (caja color rojo) o con la combinación de AZD4547 y trametinib (caja color marrón). La inversión de la resistencia es estadísticamente significativa (\* $p = 0,025$ , prueba de Kruskal-Wallis). Todos los resultados son representativos de una réplica de un triplicado biológico.

Asimismo, determinamos el valor de IC50 del inhibidor AZD4547 en monoterapia y en combinación con una dosis fija de trametinib en todas las líneas celulares isogénicas. Como observamos en la Figura 26B, la IC50 de AZD4547 en monoterapia es significativamente más elevada en las líneas con mutaciones en *KRAS* en comparación con las células *KRAS wt*. Por otro lado, en las líneas con mutación en *KRAS*, advertimos que el tratamiento con trametinib redujo significativamente el valor de IC50 del inhibidor AZD4547 en comparación con el valor de IC50 en monoterapia. Este resultado indicó que la combinación de AZD4547 y trametinib parecía restaurar la sensibilidad a la inhibición de FGFR.

Por último, comprobamos a nivel molecular mediante WB los efectos de los tratamientos en monoterapia y combinación de las líneas celulares isogénicas (Figura 27). Observamos que el tratamiento con AZD4547 en monoterapia reduce ligeramente la fosforilación de Akt en las células *KRAS wt*, *G12A*, *G12V* y *G13D*, la fosforilación de ERK en las células *KRAS wt* y *G13D*, y la fosforilación de S6 en las células *KRAS wt*, *G12A*, *G12R*, *G13D* y *Q61H*. Siendo siempre la reducción mayor la que ocurre en las células *KRAS wt*. Además, destaca el aumento en los niveles del marcador de apoptosis BIM con el tratamiento en monoterapia de AZD4547 en las células *KRAS wt* pero no en las *KRAS mut*. Este aumento en los niveles de BIM va en consonancia con el efecto funcional visto anteriormente, donde la monoterapia con AZD4547 mostraba más eficacia en la línea *KRAS wt*. Por otro lado, el tratamiento con trametinib resultó en una reactivación de la vía de señalización MEK como ya está descrito<sup>265,266</sup>, efecto que se ve revertido con el tratamiento en combinación en todas las líneas. Además, la terapia combinada con AZD4547 y trametinib disminuyó también la fosforilación de ERK, Akt, y S6 en todas las líneas, indicando que esta combinación bloquea la señalización conjunta de *KRAS* y FGFR de forma efectiva.



**Figura 27. Caracterización molecular del efecto de la terapia combinada con inhibidores de FGFR y MEK en las líneas celulares isogénicas.** (A) Se muestra una imagen representativa del tratamiento en monoterapia con AZD4547 (10  $\mu$ M), con trametinib (25 nM) y la terapia combinada de ambos. Se representa una caracterización de expresión proteica de los biomarcadores FGFR1, pFGFR1, FGFR4 y N-Cadherina, y de la señalización de FGFR1 y KRAS. (B) Se representa la relación de la densitometría de las formas fosforiladas de Akt, ERK, MEK y S6 con su forma total, de forma relativa al wt. También se representa la relación de la densitometría de BIM con respecto al wt. Todos los resultados son representativos de una réplica de un triplicado biológico.

Estos hallazgos respaldaban la idea de que, en un contexto con mutación en *KRAS*, la terapia combinada utilizando inhibidores de FGFR y MEK podría ser una estrategia efectiva para abordar la resistencia a los inhibidores de FGFR.

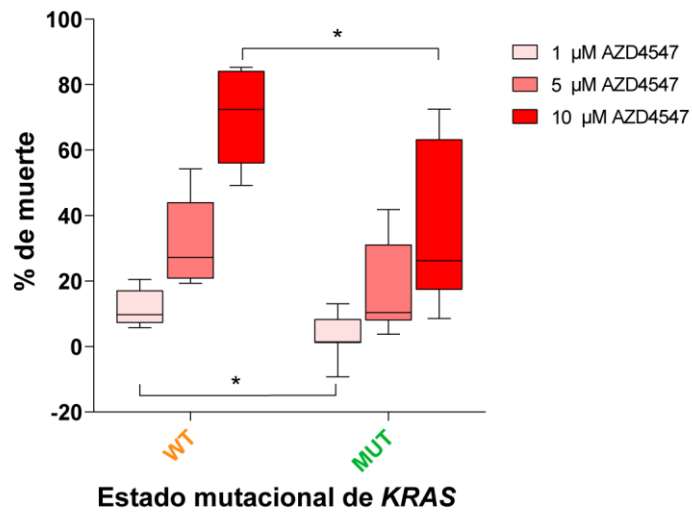
### 3.5 Evaluación de la eficacia de la combinación de los inhibidores de la vía de FGFR y *KRAS* en el tratamiento de modelos PDXDOs.

#### 3.5.1 Estudio de la sensibilidad de los modelos PDXDOs a la terapia anti-FGFR.

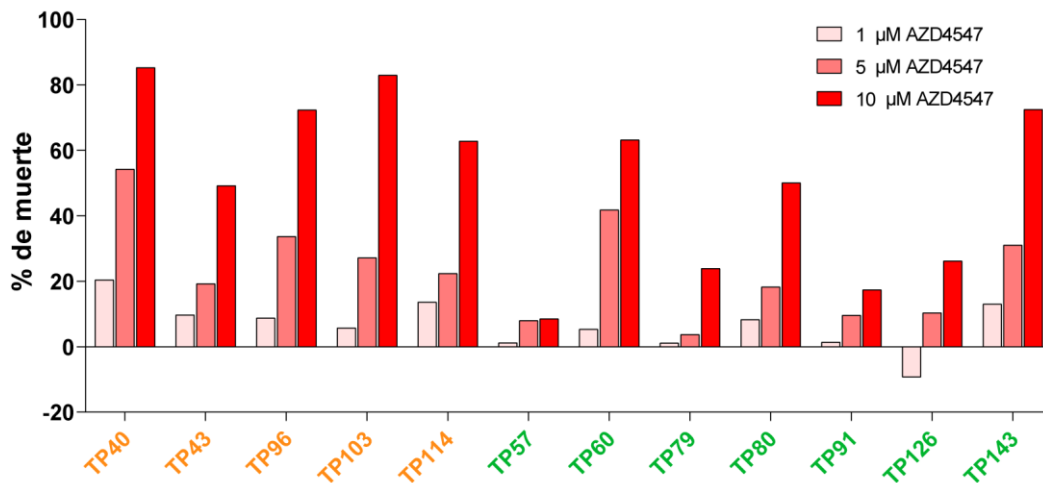
Con el fin de superar la limitación de utilizar modelos murinos, decidimos utilizar modelos preclínicos derivados de pacientes que reproducen mejor la complejidad de los tumores humanos. Utilizamos nuestra plataforma de organoides derivados de modelos PDX (PDXDOs) (sección 3.5 de Materiales y Métodos), en la que previamente habíamos confirmado que mantenían las características morfológicas y moleculares de los modelos PDX de los que provienen y, por tanto, de los tumores de los pacientes de los que derivan. Por ello, constituyen una herramienta muy adecuada para evaluar nuestra hipótesis *in vitro*.

En este estudio, empleamos un panel de 12 PDXDOs derivados de los 16 PDX que se utilizaron previamente en los tratamientos *in vivo* (sección 1.3): cinco modelos con el gen *KRAS* en su forma nativa (TP40, TP43, TP96, TP103 y TP114) y siete modelos con mutaciones en *KRAS* (TP57, TP60, TP79, TP80, TP91, TP126 y TP143). En primer lugar, determinamos la sensibilidad de los 12 modelos al inhibidor de FGFR, AZD4547. Para ello calculamos el porcentaje de muerte producido con 3 dosis diferentes de fármaco (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) y calculamos el porcentaje medio de muerte en el subgrupo de modelos PDXDO *wt* y mutados (Figura 28A). Con el tratamiento de AZD4547, observamos que el porcentaje promedio de muerte celular en los modelos con mutaciones en *KRAS* fue menor para las tres dosis, siendo significativamente inferior al observado en los PDXDOs con el gen *KRAS wt* para la dosis más baja (3 vs 11 %, respectivamente; \* $p = 0,04$ ) y para la dosis más elevada (37 vs 71 %, respectivamente; \* $p = 0,02$ ). Estos resultados respaldan, en un modelo derivado de paciente y, por tanto, que predice mejor la respuesta clínica, que las mutaciones en el gen *KRAS* pueden conferir cierta resistencia al tratamiento con los inhibidores de FGFR.

A



B



**Figura 28. Evaluación de la sensibilidad al inhibidor AZD4547 en la plataforma de PDXDOs según su estado mutacional de KRAS.** (A) Diagrama de cajas y bigotes con el porcentaje de muerte observado al tratamiento con AZD4547 en los PDXDOs con *KRAS wt* o *KRAS mut*. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de Mann-Whitney (\* $p < 0,05$ ). (B) Porcentaje de muerte observado al tratamiento con AZD4547 en cada uno de los modelos PDXDOs. Se colorean en naranja los modelos *KRAS wt* y en verde los modelos *KRAS mut*.

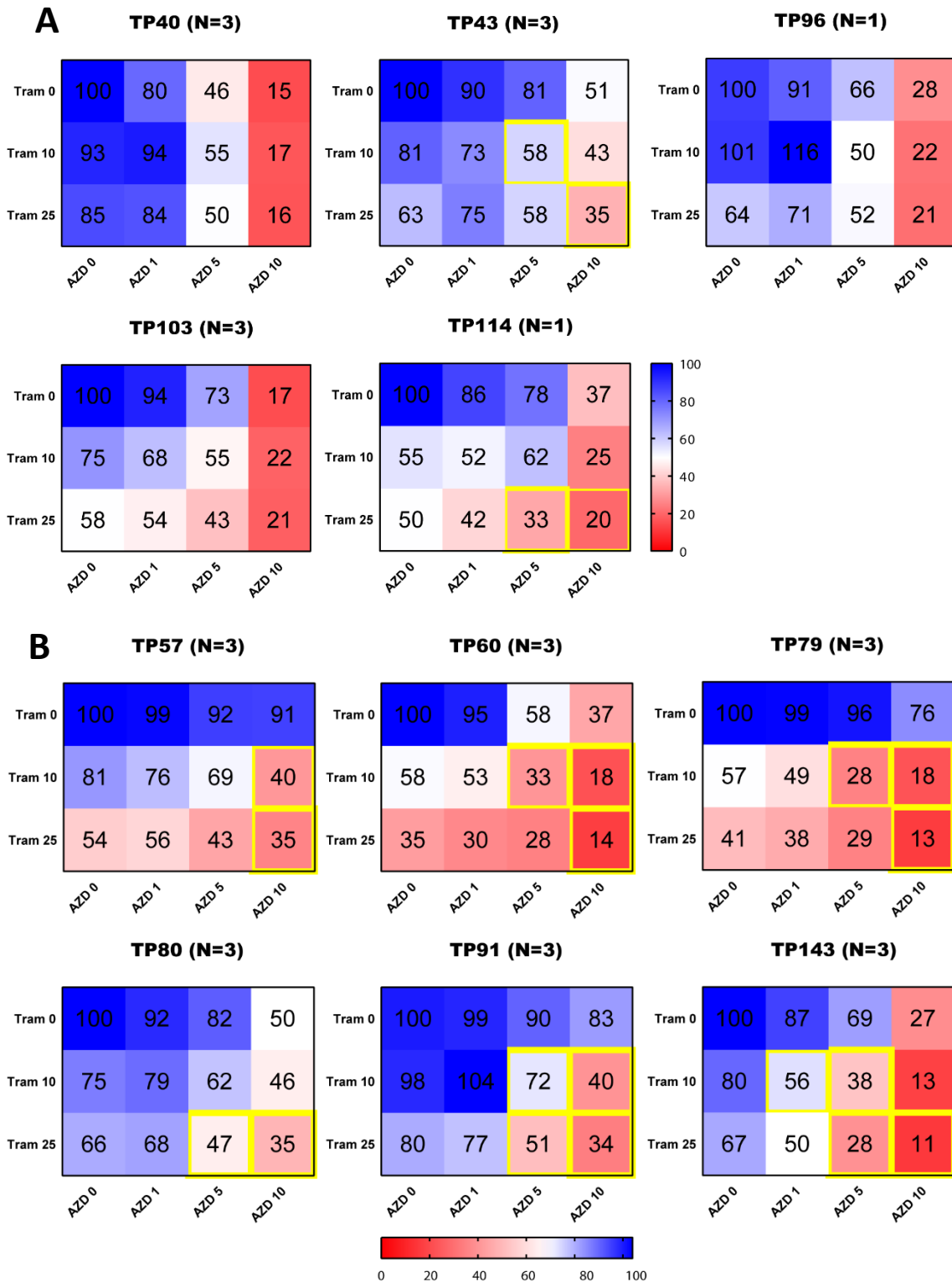
Al analizar el efecto del inhibidor AZD4547 en cada PDXDO *KRAS wt* de forma individual (TP40, TP43, TP96, TP103 y TP114), observamos pequeñas diferencias entre ellos. Sin embargo, en todos los casos la dosis más alta produce más del 50 % de muerte celular (rango del 49-85 %). Asimismo, aunque todos los modelos *KRAS mut* (TP57, TP60, TP79, TP80, TP91, TP126 y TP143) mostraron una menor sensibilidad a la monoterapia con AZD4547 que los modelos *KRAS wt* (Figura 28), también se apreciaron diferencias individuales entre ellos. En todos los modelos, salvo el TP60 (*KRAS G12C*) y el TP143 (*KRAS G12D*), la eficacia de la mayor dosis del inhibidor AZD4547 fue escasa, ya que el porcentaje de mortalidad fue menor del 50 %.

### 3.5.2 Evaluación de la respuesta a la terapia combinada (Inhibidor FGFR + Inhibidor de MEK) en los modelos PDXDOs.

Una vez que observamos que los modelos con mutaciones en *KRAS* eran significativamente menos sensibles al tratamiento con AZD4547, como ocurría con las líneas isogénicas, evaluamos el efecto de la terapia combinada de inhibidores de FGFR y MEK en nuestro panel de modelos PDXDOs, mediante la utilización de combinaciones de diferentes concentraciones de ambos fármacos. Para ello, consideramos los valores resultantes de las combinaciones: AZD4547 (0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) y trametinib (0 nM, 10 nM y 25 nM). En las matrices (Figura 29), se resaltaron en color amarillo las combinaciones de concentraciones de fármacos que cumplían dos condiciones, mostrar una reducción de la viabilidad celular de al menos 15 puntos con respecto a ambas monoterapias, y un índice combinatorio (CI) sinérgico. Para calcular el CI en cada punto de la matriz, se utilizaron los datos de todos los puntos de esta y el software *SynergyFinder*. Este software utiliza el modelo de aditividad de Loewe para calcular el CI. Un valor inferior a 1 indica sinergia, un valor superior indica antagonismo y el valor 0 indica efecto aditivo<sup>267</sup>.

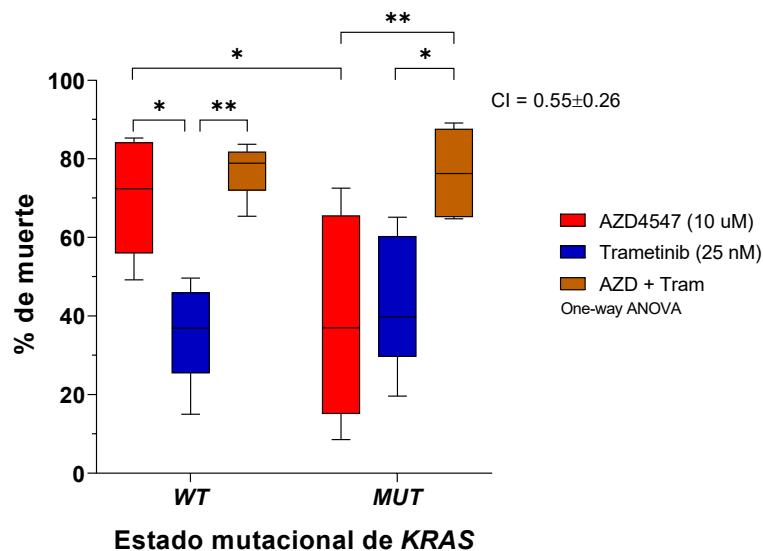
Fijándonos primero en el efecto del trametinib en monoterapia, observamos que presentaba un menor efecto en los modelos *KRAS wt* que en los modelos mutados, siendo especialmente notable en la concentración 25 nM de trametinib (64 % viabilidad en *KRAS wt* vs 49 % viabilidad en *KRAS mut*) (Figura 29 y Figura 30). También advertimos diferencias individuales en la sensibilidad de los modelos. Dos de los cinco modelos *KRAS wt* mostraron una mayor sensibilidad al trametinib, el TP103 y el TP114. Por otro lado, aunque los modelos *KRAS mut* presentaban una mayor sensibilidad, en los modelos TP80, TP91 y TP143 no se redujo la viabilidad por debajo del 65 % en la dosis 25 nM de trametinib (Figura 29B).

Al analizar las matrices de los PDXDOs con el gen *KRAS wt* (TP40, TP43, TP96, TP103 y TP114), se observó que la combinación fue ligeramente sinérgica en dos de los cinco modelos (TP43 y TP114), en solo dos puntos de sinergia por modelo (Figura 29A). En las matrices de los PDXDOs *KRAS mut* (TP57, TP60, TP79, TP80, TP91 y TP143), se apreció un patrón totalmente diferente al de los modelos *KRAS wt*. En este caso, se advirtió un efecto sinérgico de la combinación de estos fármacos en los seis modelos mutados en muchas de las combinaciones, a diferencia de los PDXDOs *KRAS wt*, como se puede notar por el gran número de cuadrados resaltados en amarillo (de 2-4 por modelo; Figura 29B).



**Figura 29. Evaluación de las combinaciones de AZD4547 y de trametinib en los PDXDOs *KRAS wt* y *KRAS mut*.** Ensayos de eficacia en matrices de combinaciones de dos fármacos en los modelos *KRAS wt* (A) y *KRAS mut* (B). Se representan los mapas de calor de la combinación del inhibidor de FGFR, AZD4547, a cuatro concentraciones distintas (0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) con el inhibidor de MEK, trametinib, también a tres concentraciones distintas (0 nM, 10 nM y 25 nM). Se representa el porcentaje de viabilidad celular en cada condición normalizado con el control (sin tratamiento) de cada modelo (100 % viabilidad). La leyenda muestra un gradiente desde el color azul (mayor viabilidad) hasta el color rojo (menor viabilidad). Las condiciones donde el efecto el índice combinatorio es sinérgico se representan con un resaltado en color amarillo. Efecto aditivo (CI = 0), Sinergia (CI < 1), y Antagonismo (CI > 1). Se muestran las matrices con el promedio del triplicado biológico para cada modelo PDXDO. El CI se ha calculado por medio del método de aditividad de Loewe.

En resumen, observamos que, mientras que la terapia combinada no aumentó significativamente el porcentaje de muerte producida por AZD4547 en los modelos *KRAS wt* en comparación con la monoterapia (71 % de muerte en monoterapia vs. 77 % de muerte en combinación;  $p = 0,98$ ), en los modelos *KRAS mut* si se observó un aumento significativo del porcentaje de muerte (37 % de muerte en monoterapia vs. 80 % de muerte en combinación;  $**p = 0,0071$ ). Este dato, junto con el cálculo de CI ( $CI = 0,55$ ), indica que la combinación de inhibidores de FGFR y MEK es sinérgica (Figura 30). Además, el incremento de mortalidad celular al aplicar la terapia combinada también fue significativo en comparación con la monoterapia con trametinib en los modelos con mutaciones en *KRAS* (50 % de muerte en monoterapia de trametinib vs. 80 % de muerte en combinación;  $*p=0,017$ ) (Figura 30). Estos resultados parecían indicar que la resistencia al inhibidor AZD4547 observada en los PDXDOs *KRAS mut* podría superarse con una terapia combinada de AZD4547 con trametinib.



**Figura 30. Evaluación de las combinaciones de AZD4547 y trametinib en la plataforma de PDXDOs.** Ensayos de eficacia en matrices de combinaciones de dos fármacos. El gráfico muestra la eficacia de las monoterapias (en rojo la de AZD4547 y en azul la de trametinib) y de la terapia combinada (en marrón) en inhibir la viabilidad de los modelos *KRAS wt* y los modelos *KRAS mut*. El análisis estadístico realizado fue la prueba ANOVA de una vía (ns = no significativo,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ). CI = índice combinatorio. Efecto aditivo (CI = 0), Sinergia (CI < 1), y Antagonismo (CI > 1).

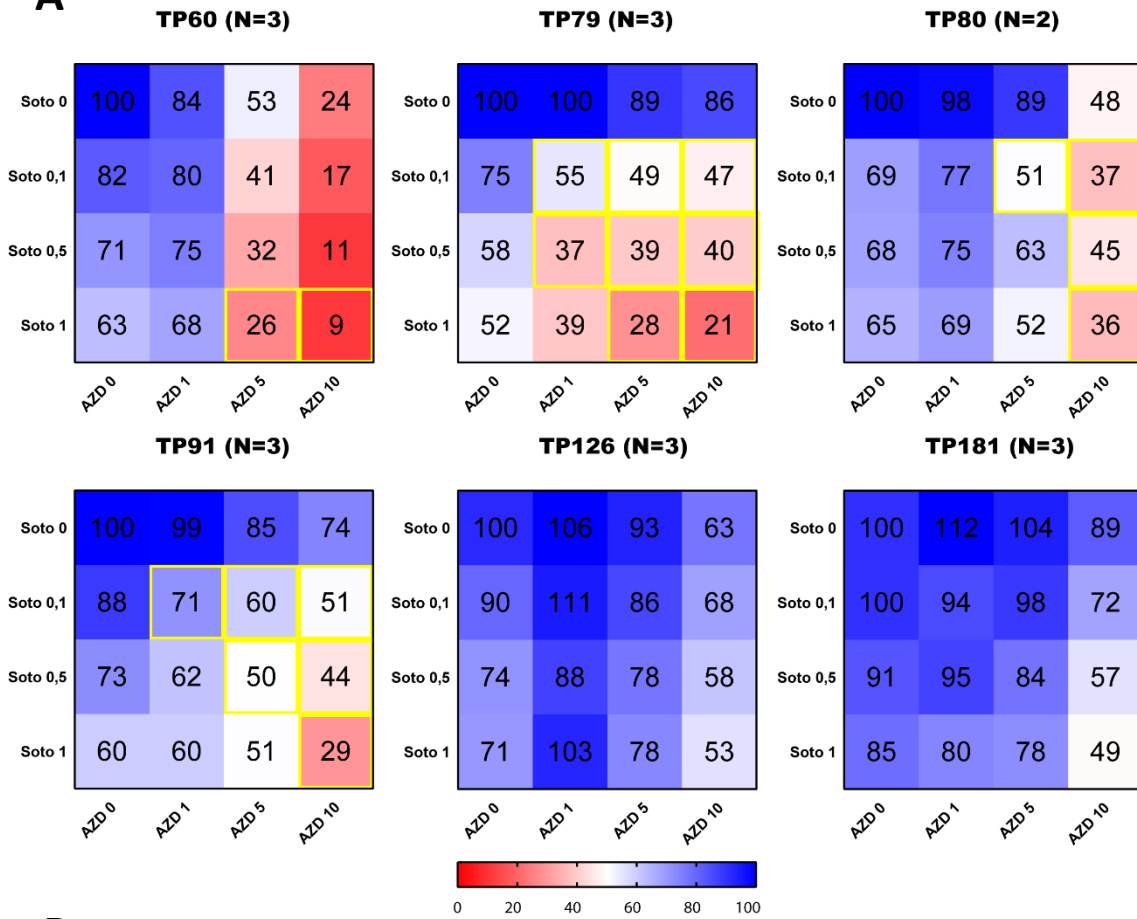
### 3.5.3 Evaluación de la respuesta a la terapia combinada (Inhibidor FGFR + Inhibidor de *KRAS G12C*) en los modelos PDXDOs.

Nuestros resultados sugieren que el tratamiento combinatorio de inhibidores de FGFR y MEK podría ser una potencial estrategia terapéutica eficaz en los tumores *KRAS mutados*. Sin embargo, los inhibidores de MEK no se utilizan demasiado en clínica por su toxicidad. Por eso decidimos probar en nuestros modelos PDXDOs la combinación de inhibidores de FGFR con inhibidores de *KRAS G12C*, que han demostrado ser fármacos seguros y eficaces y ya han sido aprobados por la FDA y la EMA para el tratamiento de este subgrupo de pacientes.

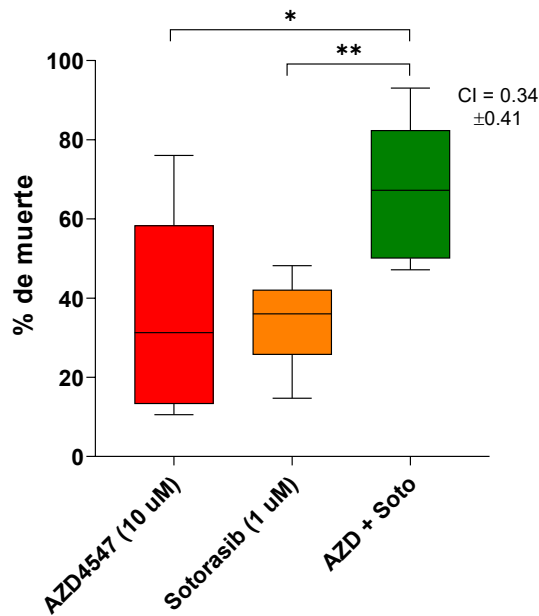
Para ello, seleccionamos los modelos PDXDOs que presentasen mutaciones *KRAS G12C* y realizamos los mismos experimentos de matrices de tratamiento de combinaciones de fármacos que previamente habíamos realizado, con los inhibidores AZD4547 y sotorasib (Figura 31). Se utilizaron cuatro concentraciones diferentes de cada inhibidor: AZD4547 (0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) y sotorasib (0  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M). El tratamiento de sotorasib en monoterapia mostró más eficacia que el de AZD4547, aunque observamos que hay modelos más sensibles que otros, siendo el modelo TP79 el más sensible y los modelos TP126 y TP181 los más resistentes. A pesar de ello, apreciamos que la combinación de ambos fármacos si es eficaz en todos los modelos excepto el TP126 y el TP181, ya que advertimos varios puntos de combinación sinérgica (Figura 31A). Además, es importante destacar que en todos los modelos se apercibió una reducción significativa de la viabilidad celular en la combinación (condición de 10  $\mu$ M AZD4547 y 1  $\mu$ M sotorasib) en comparación con la monoterapia con AZD4547 (condición de 10  $\mu$ M AZD4547 y 0  $\mu$ M sotorasib) (Figura 31).

En la Figura 31B se representa el resumen del efecto de cada monoterapia (36 % de muerte por AZD4547 y 34 % por sotorasib) como de la combinación (67 % de muerte) en la totalidad de los modelos *KRAS G12C*. Estos resultados nos indicaron que la monoterapia con el inhibidor de FGFR AZD4547 tuvo un ligero efecto en la reducción de viabilidad en modelos *KRAS G12C* (36 % de muerte). Por otro lado, se observó que estos mismos modelos tampoco mostraban una elevada reducción de la viabilidad con la monoterapia de sotorasib (34 % de muerte). Sin embargo, la terapia combinada de ambos inhibidores sí que generó un aumento significativo de la mortalidad celular tanto en comparación con la monoterapia de AZD4547 (36 % vs 67 %; \*\*p = 0,003) como en la comparación con la monoterapia de sotorasib (34 % vs 67 %; \*p= 0,04). Además, este efecto de la terapia combinada se produce de manera sinérgica (CI = 0,34). Este resultado parecía indicar que la resistencia a AZD4547 observada en los PDXDOs *KRAS G12C* podría superarse con una terapia combinada de AZD4547 con sotorasib.

**A**



**B**



**Figura 31. Evaluación de las combinaciones de AZD4547 y de sotorasib en la plataforma de PDXDOs.** Ensayos de eficacia en matrices de combinaciones de dos fármacos en los modelos *KRAS G12C*. (A) Se representan los mapas de calor de la combinación del inhibidor de FGFR, AZD4547, a cuatro concentraciones distintas (0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) con el inhibidor de *KRAS G12C*, sotorasib, también a cuatro concentraciones distintas (0  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M). Se representa el porcentaje de viabilidad celular en cada condición normalizado con el control (sin tratamiento) de cada modelo (100 % viabilidad). La leyenda muestra un gradiente desde el color azul (mayor viabilidad) hasta el color rojo (menor viabilidad). Las condiciones donde el efecto de la combinación es sinérgico se representan con un resaltado en color amarillo. Se muestran las matrices con el promedio del triplicado biológico para cada modelo PDXDO *KRAS G12C*. (B) El gráfico muestra la eficacia de las monoterapias (en rojo la de AZD4547 y en naranja la de sotorasib) y de la terapia combinada (en verde) en inhibir la viabilidad de los modelos *KRAS G12C*. El análisis estadístico realizado fue la prueba Welch ANOVA de una vía (ns = no significativo, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). CI = índice combinatorio. Efecto aditivo (CI = 0), Sinergia (CI < 1), y Antagonismo (CI > 1). El CI se ha calculado por medio del método de aditividad de Loewe.



# DISCUSIÓN



La pobre respuesta observada en la clínica a los inhibidores de FGFR<sup>157</sup> en pacientes con carcinomas de pulmón avanzado, con y sin amplificación de FGFR, justifica la búsqueda de biomarcadores predictivos de respuesta en este contexto. Por tal razón, en trabajos previos del grupo estudiamos el papel oncogénico de FGFR en el cáncer de pulmón y su potencial como diana terapéutica, estudio que nos llevó a proponer a la N-Cadherina como un potencial biomarcador predictivo de respuesta a los inhibidores de FGFR, ya que demostramos que la terapia anti-FGFR era más efectiva en un contexto en el que la expresión de N-Cadherina era alta<sup>201</sup>. Con estos antecedentes, tratamos de validar en este proyecto de Tesis Doctoral, el papel predictivo de la expresión de N-Cadherina en la respuesta a la terapia anti-FGFR en una cohorte más amplia de modelos PDX, así como identificar otros biomarcadores que pudieran optimizar la predicción del beneficio terapéutico con estos inhibidores.

En nuestra colección de 16 modelos PDX con alta expresión de FGFR, se observó una tasa de respuesta a AZD4547 del 25 % de los modelos (Figura 10), lo que supone una tasa superior a las tasas del 5-10 % descritas teniendo en cuenta únicamente la amplificación del FGFR<sup>157,151</sup>. Estos 16 modelos no mostraban amplificaciones en el gen *FGFR1*, pero sí una alta expresión de las proteínas de FGFR1 y/o FGFR4, medida por WB. Los cuatro modelos de esta cohorte que respondieron al tratamiento (TP114, TP96, TP43 y TP103, un 25 %) fueron clasificados como PDX con alta expresión de N-Cadherina (valorada por WB), lo que propone a la N-Cadherina como otro biomarcador para tener en consideración en la selección de los tumores. Observamos que el valor predictivo, al tener en cuenta la expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina, es superior al resultante de tener presente aisladamente la alta expresión de FGFR1/4. De hecho, la tasa de respuesta de los modelos con alta expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina es de un 33 %, superior al 25 % apreciado cuando la selección se basa únicamente en la expresión de FGFR1/4. El hecho que los únicos cuatro PDX que respondieron al tratamiento sean modelos clasificados como PDX con alta expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina es algo consistente con nuestra hipótesis inicial debido a que asocia la expresión de la N-Cadherina con mejores tasas de respuesta a la terapia anti-FGFR<sup>201</sup>. Sin embargo, los modelos que no respondieron al tratamiento presentaban niveles variables de N-Cadherina e incluso algunos de ellos expresaban altos niveles (Figura 10). Este hecho nos llevó a investigar la posible implicación de otros genes que puedan justificar por qué algunos modelos PDX (TP57, TP60, TP79, TP40, TP80 y TP13) no respondieron al tratamiento a pesar de tener altos niveles de FGFR1/4 y N-Cadherina.

Pero antes de profundizar en eso, y debido a que la técnica del WB presenta dificultades para su aplicación en la práctica clínica<sup>268,269</sup>, evaluamos la posibilidad de emplear otras técnicas más ajustables al entorno clínico, como la IHQ y la qPCR. Determinamos mediante estas dos

técnicas los niveles de expresión de estos biomarcadores en los PDX, y los correlacionamos con la evolución postratamiento. En la caracterización de la expresión proteica por IHQ, observamos que en el 61 % de los modelos PDX (19 de los 31 modelos), los niveles de FGFR1 se clasificaban de la misma manera que en el WB. En el caso de la N-Cadherina, el número de coincidencias fue inferior: 15 de 31 modelos PDX (un 48 %). La presencia de un porcentaje tan reducido de coincidencias podría ser debido a varias razones. Una de ellas fue la utilización en la IHQ de un punto de corte que nos clasificaba a los modelos PDX en ausencia o presencia de expresión (en vez de baja o alta expresión), por lo que estaríamos considerando de la misma forma a aquellos PDX con baja y alta expresión, lo que nos podría estar dando diferencias con el WB. Un ejemplo de esta potencial causa son los siete modelos clasificados por la IHQ como PDX con presencia de N-Cadherina, pero con bajos niveles de expresión, por lo que un cambio del punto de corte podría aumentar las coincidencias en el biomarcador N-Cadherina en estos siete modelos (sumando un total de 22 de 31 modelos, un 71 %). Otra razón se debería a la diferente forma de medir la expresión proteica de ambas técnicas y a la reactividad de especies de los anticuerpos utilizados (es decir, si son exclusivos contra humano o si comparten reactividad humana y murina). La IHQ es una técnica que nos permite cuantificar la expresión y discriminar en función de su localización: la parte tumoral humana de la parte estromal murina (algo que hemos estudiado por separado). En cambio, en el WB se mide la expresión proteica en una muestra lisada y disgregada del PDX, que tiene tanto en cuenta el estroma como el tumor. En nuestro caso, los anticuerpos no tenían reactividad exclusiva contra epítomos humanos por lo que no es posible cuantificar mediante el WB la expresión de las proteínas de la parte tumoral de forma aislada a la parte estromal, tal y como hicimos en la IHQ, aunque sabemos que en nuestros PDX el componente estromal representa solo un 5-15 % del tumor<sup>270</sup>. Además, el WB se caracteriza por ser una técnica con una gran sensibilidad<sup>271</sup>, por lo que podría estar detectando expresiones de FGFR1 y N-Cadherina que la técnica IHQ no es capaz. Valoramos la relación de cada una de las clasificaciones con la respuesta observada al tratamiento.

Respecto a la sensibilidad observada al tratamiento según la valoración de la IHQ, de los cuatro modelos que respondieron a AZD4547, sólo dos (TP96 y TP103) presentaron altos niveles de expresión de FGFR1, mientras que solo uno de ellos, el TP96, mostró niveles elevados de N-Cadherina (Tabla 14). Es llamativo apreciar que, en estos modelos, sí se observó una expresión de ambas proteínas en el estroma murino. Advertimos que el TP43 y el TP114 tenían altos niveles de expresión de FGFR1 en el estroma y que el TP43, TP103 y TP114 tenían altos niveles de N-Cadherina en el estroma (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que mediante la

técnica de WB podemos predecir de una mejor manera la respuesta al tratamiento en comparación a la IHQ.

Por otro lado, la qPCR permite medir la expresión a nivel de ARNm y es una técnica ampliamente utilizada en la clínica para medir la expresión de biomarcadores<sup>272</sup>. Al comparar la clasificación de los modelos PDX por qPCR y WB, en la qPCR encontramos un mayor porcentaje de coincidencias para el biomarcador FGFR1 que entre IHQ-WB (25 de los 31 modelos, un 81 %). Sin embargo, el porcentaje de coincidencias siguió estando en torno al 50 %, en los casos de FGFR4 (16 de 31 modelos, un 52 %) y N-Cadherina (13 de 31 modelos, un 42 %). Estas diferencias entre la qPCR y el WB, se podrían justificar porque la expresión de ARNm y proteínas no siempre puede correlacionar por diferentes modificaciones postranscripcionales<sup>273</sup>. Además, aunque el 100 % de los modelos que respondieron al tratamiento fueron clasificados como PDX con alta expresión de FGFR1 por esta técnica, tan solo el 50 % fueron catalogados como PDX con alta expresión de N-Cadherina (TP43 y TP96) (Tabla 15). Por consiguiente, no consideramos tampoco a la qPCR como una técnica cuya categorización de los modelos PDX se acomode con los resultados esperados según nuestra hipótesis.

En definitiva, ninguna de las dos técnicas logró clasificar los modelos PDX de la misma forma que el WB. La tasa de respuesta observada en la clasificación del WB es del 33 %, mientras que la observada en la clasificación de la IHQ es del 17 %. La tasa de respuesta observada en la clasificación por la qPCR es también del 33 %, al igual que el WB, pero esta técnica ha encuadrado a dos modelos “Respondedores” como PDX con baja expresión de N-Cadherina (TP103 y TP114). Por ello, concluimos que sólo la técnica del WB nos relacionó la expresión de FGFR1 y N-Cadherina con la respuesta al tratamiento. Aun así, la relación era solo del 33 %, ya que el 67 % de los modelos PDX que expresaban altos niveles de FGFR1/4 y N-Cadherina según el WB no respondieron al tratamiento con AZD4547. Estos hallazgos enfatizaron la necesidad de buscar nuevos biomarcadores que pudieran ayudar a predecir de manera más precisa la respuesta a la terapia anti-FGFR y, para ello, realizamos estudios genómicos y transcriptómicos.

Tras el análisis genómico, hallamos alteraciones en los genes *KRAS*, *PKD1*, *RB1*, *PDGFRA*, *NF1* y *MGA*, únicamente en los modelos que no respondieron al tratamiento con AZD4547. Las alteraciones de estos genes se han relacionado con un mayor poder invasivo (*PKD1*<sup>274</sup>), la resistencia a inhibidores de otros RTK como el EGFR (*RB1*<sup>275</sup>, *NF1*<sup>276</sup>, *MGA*<sup>277</sup>) e incluso la resistencia a los inhibidores de FGFR (*PDGFRA*<sup>278</sup>); aunque su incidencia se encontró en una pequeña parte de los “No Respondedores” (el *PKD1* en dos modelos y el *RB1*, *NF1*, *MGA* y *PDGFRA* en tres modelos, de un total de 12 modelos sin respuesta). Un hallazgo importante fue

que el 58 % de los modelos que no respondieron a AZD4547 (TP57, TP60, TP79, TP80, TP91, TP126, TP143) albergaban una mutación en el gen *KRAS* (Figura 14), independientemente de sus niveles de expresión de N-Cadherina. Las mutaciones del gen *KRAS* son las principales aberraciones oncogénicas conductoras en el CPNM, y su incidencia se restringe prácticamente a la histología adenocarcinoma<sup>279</sup>. En literatura previa, se ha documentado la implicación de las mutaciones de *KRAS* en la resistencia a ciertos inhibidores tirosina kinasa<sup>280</sup>. Esto incluye la resistencia a los inhibidores de KIT/PDGFR en tumores gastrointestinales<sup>281</sup>, la resistencia al osimertinib en pacientes de CPNM que presentan la mutación *EGFR T790M*<sup>282</sup>, así como la resistencia a la inhibición de BRAF-MEK en el CPNM<sup>283</sup>. Al evaluar los modelos PDX según su histología, observamos que, de nueve modelos de adenocarcinoma “No Respondedores”, siete de ellos exhibían alguna mutación en el gen *KRAS*. La mutación predominante fue la *G12C*, presente en cinco de los modelos (TP60, TP79, TP80, TP91 y TP126). Además, observamos un modelo con mutación *KRAS G12A* (TP57) y un modelo con la mutación *KRAS G12D* (TP143), lo que indicaba que cualquier mutación en el gen de *KRAS* podría afectar a la sensibilidad a los inhibidores de FGFR. Cabe destacar que nuestros modelos PDX reflejan una incidencia de mutación en *KRAS* superior a lo descrito en los pacientes de adenocarcinoma de pulmón (50 % vs 25-30 % descrito)<sup>270</sup>. En la colección de modelos estudiada en este análisis genómico, como hemos preseleccionado a los modelos con alta expresión de FGFR1/4, el porcentaje de incidencia de la mutación en *KRAS* está sobredimensionado tanto de las mutaciones de *KRAS* (77 % observado vs 25-30 % descrito) como de la mutación *G12C* en particular (71 % observado vs 40 % descrito)<sup>284</sup>. Este hecho podría justificarse porque está descrito que los tumores con mutación en *KRAS* tienen una tasa de éxito más elevada en el proceso de implantación para generar un modelo PDX<sup>285,286</sup>. Los otros dos modelos PDX de adenocarcinoma, que no mostraron mutaciones en el gen *KRAS* y que no respondieron tampoco al tratamiento, fueron los modelos TP134 y TP40. El TP134 fue clasificado como un PDX con baja expresión de N-Cadherina, lo que justifica su falta de respuesta. Sin embargo, el TP40 si fue clasificado como un PDX con alta expresión de N-Cadherina, sin embargo, analizando el número de copias, encontramos que presentaba una amplificación en el gen *KRAS* (dato no mostrado), lo que podría justificar su no respuesta, ya que las amplificaciones de este gen también han sido asociadas con la resistencia a los inhibidores de otros RTK<sup>287</sup>.

El análisis del transcriptoma indicó que los PDX “Respondedores”, caracterizados por expresar altos niveles de FGFR1/4 y N-Cadherina, mostraron un perfil transcripcional similar, con la excepción del modelo TP103, que es el único modelo de los cuatro que presenta una mutación en el gen *EGFR*, la cual podría ser responsable de algunas de estas diferencias transcripcionales,

aunque no parecen afectar a la respuesta al tratamiento con AZD4547. En general, observamos que los modelos “Respondedores” tenían una mayor adicción oncogénica a la señalización FGFR, como vemos por la regulación al alza de las dos vías de señalización principales de la vía de FGFR<sup>288</sup>: la cascada de las MAPK y el eje PI3K-AKT-MTOR<sup>289</sup> (Figura 15). Asimismo, apercibimos en este grupo una mayor activación de la señalización relacionada con las uniones GAP y las uniones adherentes, ambas de gran importancia en la estructura y funcionalidad de la ECM<sup>290,291</sup>, y de las interacciones de la ECM con diferentes receptores<sup>116</sup> (Figura 15). Estos hallazgos fueron refrendados por un análisis *in silico*, donde encontramos una sobreexpresión de genes relacionados con la degradación de las uniones GAP (como *DAB2*<sup>292</sup>) en líneas celulares que no respondían a los inhibidores de FGFR (Tabla 16). Se sabe que estas uniones tienen importancia en la señalización FGFR ya que se ha descrito que la mediación de las uniones GAP, así como de la ECM, en la señalización FGFR1 es llevada a cabo mediante la regulación de las vías de señalización PI3K y MAPK<sup>293,294</sup>. Esto explicaría su posible contribución en la respuesta a los inhibidores de FGFR. Otro integrante de la ECM, la N-Cadherina, ha sido referida como una de las principales proteínas responsables de mantener las uniones adherentes<sup>295</sup>, lo que la relacionaría de forma indirecta con la señalización FGFR. Este conocimiento, sumado a la información previa existente sobre la interrelación directa N-Cadherina-FGFR como principal interacción de este receptor con la ECM<sup>296</sup>, sugiere un papel importante de la N-Cadherina como regulador de la señalización de FGFR. Consistentemente, observamos una tendencia de una mayor activación de la señalización relacionada con la N-Cadherina en aquellos modelos clasificados como “Respondedores” con respecto a los que no respondieron al tratamiento (Figura 15). Esta tendencia, aunque no es significativa, se apoya en que estos modelos “Respondedores” sí sabemos que muestran alta expresión de N-Cadherina a nivel proteico. Por ello, en conjunto, estos resultados apoyaron nuestra hipótesis inicial sobre el potencial oncogénico de la coexpresión de altos niveles de FGFR1/4 y N-Cadherina, y la consiguiente mayor respuesta advertida a los inhibidores de FGFR en este contexto molecular<sup>201</sup>. Teniendo en cuenta la activación de la señalización FGFR mediada por la ECM (uniones GAP, uniones adherentes y N-Cadherina) descrita en la literatura, proponemos que la respuesta a la terapia anti-FGFR podría venir definida por una sobreactivación de la señalización FGFR en la que se necesitaría no solo de la expresión del receptor sino también de la participación de interacciones y moléculas de la ECM, entre las que destacamos la N-Cadherina. Sin embargo, se necesitan más estudios de validación de estos hallazgos y caracterización funcional de la hipótesis.

Por otro lado, en los modelos “No Respondedores” hemos identificado una expresión elevada de genes relacionados con la resistencia a fármacos, como los transportadores ABC

(Figura 15). Estos transportadores están implicados en la resistencia intrínseca a los inhibidores de FGFR<sup>297,298</sup>. En los modelos “No Respondedores” también encontramos una tendencia no significativa de una expresión elevada de genes relacionados con la señalización KRAS. Este hallazgo, apoyado por las mutaciones del gen *KRAS* que observamos en el grupo “No Respondedores” en el análisis genómico, parece relacionar la señalización KRAS aberrante con la resistencia a AZD4547. Las señalizaciones oncogénicas *by-pass* han sido descritas como un mecanismo de resistencia a los RTKi<sup>280</sup>. En el análisis *in silico*, de líneas celulares con alta expresión de N-Cadherina que no responden a los FGFRi, encontramos la sobreexpresión de otros genes relacionados con señalizaciones *by-pass* como *ERBB2* o *ARL14* (Tabla 16 y Figura 18), descritas en la literatura en las resistencias a los inhibidores de FGFR<sup>251,261</sup>. La señalización KRAS aberrante ha sido definida por ser una señalización oncogénica *by-pass* implicada en la resistencia a TKIs en neuroblastoma<sup>299</sup>. Sin embargo, nuestros resultados establecerían de forma novedosa esta señalización como relacionada con la resistencia a FGFRi en CPNM.

Con los datos expuestos hasta este momento, concluimos que los modelos PDX con mutaciones o sobreactivación de la señalización KRAS no respondieron a la terapia anti-FGFR aun teniendo alta expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina. Por ello, proponemos a *KRAS* como un biomarcador predictivo, necesario de una validación posterior. Es importante señalar que en un contexto *KRAS wt*, la expresión de N-Cadherina parece predecir bastante bien la respuesta a la inhibición FGFR (una tasa de respuesta del 67 %), salvo en dos de los seis modelos, los modelos TP13 y TP40. Estos dos modelos, denominados como modelos “Discordantes”, necesitan de una investigación más profunda para el entendimiento de su resistencia al tratamiento.

Al centrarnos en estudiar a nivel transcriptómico los genes diferencialmente expresados en los modelos “Discordantes” con respecto a los modelos que responden al tratamiento (todos ellos con alta expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina en un contexto *KRAS wt*), encontramos una sobreexpresión de genes vinculados con la hipoxia y con la señalización IL6-JAK-STAT3 (por ejemplo, el *CSF2RA*) (Figura 16 y Figura 17). La hipoxia<sup>300</sup> y la señalización JAK-STAT3 han sido relacionadas con la degradación de la ECM y la inducción del fenotipo EMT<sup>301</sup>. De hecho, el eje JAK-STAT se ha descrito en la resistencia a AZD4547 en modelos preclínicos de CPNM<sup>302</sup>. Estos hallazgos han llevado a considerar la señalización JAK-STAT como una posible diana terapéutica para superar las resistencias a los TKIs<sup>303,304</sup>. En conjunto, el ambiente hipóxico, la señalización STAT3 y el fenotipo EMT, han sido vinculados con la remodelación del microambiente tumoral (TME) y la creación de un ambiente inmunosuprimido como desencadenante de la resistencia a los inhibidores<sup>280</sup>. Igualmente se ha descrito que la señalización del IFN- $\gamma$  aumenta la expresión de PD-L1 en las células tumorales, favoreciendo este ambiente inmunosuprimido<sup>305</sup>. Con

respecto a ello, en nuestros modelos “Discordantes” hemos notificado una mayor expresión de genes involucrados en la señalización del IFN- $\gamma$  (por ejemplo, *NOS1*) (Figura 16 y Figura 17). Al realizar nuestro trabajo con ratones inmunodeprimidos, estos hallazgos relacionados con el sistema inmune deberían confirmarse en otros modelos murinos inmunocompetentes.

De manera similar, tanto en los modelos “Discordantes” (Figura 16) como en el análisis *in silico* con líneas celulares (aquellas con alta expresión de FGFR1 y N-Cadherina, que mostraban resistencia a los FGFRi, Figura 18) observamos una mayor expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa (como *PGK1*<sup>306</sup>). Hallazgos recientes sugieren un papel de la reprogramación metabólica tumoral en la inducción de la resistencia a los TKIs<sup>280</sup>, que se consigue con una adaptación energética de las células tumorales<sup>307</sup>. Además, también se apreció en estos modelos una sobreexpresión de genes asociados con la reprogramación del metabolismo lipídico, como *FAR2* (Figura 17), lo que podría afectar a la composición lipídica de las membranas celulares, a la señalización intracelular y a la sensibilidad al estrés oxidativo, lo cual podría conducir a la resistencia a los TKI<sup>308,309</sup>. Por último, notificamos una mayor expresión de genes, como el *IRF8* (Figura 17), en los modelos “Discordantes”. Están vinculados con la señalización TNF $\alpha$  via NF- $\kappa$ B (Figura 18), implicada en la supresión de la necroptosis inducida por la terapia con TKIs<sup>310</sup>.

En resumen, estos hallazgos nos ayudarían a entender por qué algunos tumores *KRAS wt* y con alta expresión de N-Cadherina pueden no mostrar respuesta a la terapia anti-FGFR. Todos estos mecanismos están estrechamente relacionados con la resistencia a los TKIs<sup>280</sup>, por lo que también podrían estar asociados con la resistencia a los inhibidores de FGFR, al igual que los transportadores ABC y la señalización *KRAS by-pass*, mencionados anteriormente (Figura 15). Sin embargo, es necesaria una validación de todos estos mecanismos y biomarcadores propuestos en la implicación de cada uno en la resistencia a los FGFRi.

En definitiva, de nuestro estudio de identificación de otros biomarcadores predictivos, el estado mutacional del gen *KRAS* parece ser el que más impacto tiene, ya que su alteración ha sido hallada en un alto porcentaje de los modelos “No Respondedores” en los estudios genómicos y transcriptómicos de los PDX. Este hecho junto a la implicación descrita de las mutaciones en *KRAS* en la resistencia a diferentes TKIs<sup>280-283</sup>, nos condujo a querer validar el estado mutacional del gen *KRAS* como biomarcador predictivo de respuesta a la terapia anti-FGFR. Este estudio lo realizamos a través de varios abordajes, comenzando por un estudio *in silico* con líneas de adenocarcinoma de pulmón. Observamos que las líneas celulares con *KRAS* mutado presentaban una resistencia enriquecida frente a diferentes inhibidores tirosina kinasa

y, en especial, a los que inhiben la señalización FGFR (Figura 19). Estudios previos han documentado la presencia de mutaciones en el gen *KRAS* que estarían implicadas en la resistencia a la inhibición de la señalización RTK, concretamente en la resistencia al osimertinib (terapia dirigida anti-EGFR) en pacientes de CPNM<sup>282</sup>. Sin embargo, existen pocos trabajos publicados sobre el estudio de resistencias a la inhibición FGFR. Hasta ahora, algunos estudios han sugerido que la activación de otros RTKs, como ALK o MET, podrían estar relacionadas con la resistencia a la terapia anti-FGFR<sup>311</sup>. También existen estudios que asocian las amplificaciones de *NRAS*<sup>200,312</sup> o la reactivación de la señalización MAPK<sup>313</sup> con la resistencia a los inhibidores de FGFR en líneas celulares. Sin embargo, ninguno de estos estudios refleja a las mutaciones *KRAS* como potencial mecanismo de resistencia. Nuestros datos obtenidos del estudio específico del inhibidor AZD4547 *in silico*, apuntan a una posible vinculación de las mutaciones del gen *KRAS* en su resistencia en las líneas de adenocarcinoma de pulmón. Además, en este estudio *in silico*, de entre todas las mutaciones clínicamente relevantes, la mutación *KRAS G12V* parecía ser la más potente en la generación de resistencia a este inhibidor de FGFR (Figura 20), aunque nosotros tenemos modelos PDX con diferentes mutaciones y todas confieren resistencia a los inhibidores de FGFR.

Posteriormente, al objeto de validar la implicación del estado mutacional de *KRAS in vitro*, utilizamos una selección de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. No observamos diferencias de sensibilidad a los inhibidores de FGFR en ninguno de los contextos moleculares establecidos (Alta N-Cadherina *KRAS wt*; Baja N-Cadherina *KRAS wt*; Alta N-Cadherina *KRAS mut*; Baja N-Cadherina *KRAS mut*) sino una gran variabilidad de respuestas entre líneas, incluso dentro de los mismos grupos de estudio (Figura 22). La fluctuación de respuestas la relacionamos con la variabilidad inherente entre las líneas celulares. Dada la excesiva diversidad molecular en un número limitado de líneas celulares con prácticamente un elemento en común (mutación de *KRAS*), es imposible discernir cuales son los responsables de las diferencias de respuesta a un tratamiento concreto<sup>314</sup>.

El uso de un sistema de líneas celulares isogénicas, donde la única variable es la presencia de la mutación del gen en estudio, ayuda también a reducir esa fluctuación y ya ha sido utilizado previamente para estudiar la señalización de Ras<sup>225</sup>. En este trabajo, utilizamos MEFs isogénicos, cada uno portando una de las ocho mutaciones con más relevancia clínica del gen *KRAS* humano<sup>264</sup>. Confirmamos una sobreactivación de la señalización de la vía de *KRAS* confiriéndoles una ventaja proliferativa frente a las células *KRAS wt* (Figura 23 y Figura 24)<sup>264</sup>. Además, validamos la implicación de cada una de las mutaciones de *KRAS* en la resistencia a AZD4547 debido a que observamos una menor sensibilidad de las líneas mutadas a la terapia

anti-FGFR en comparación con la línea *KRAS wt*. Interesantemente, al igual que en el análisis *in silico* previo (Figura 20B), observamos que todas las mutaciones confieren resistencia al tratamiento con AZD4547, con un mayor grado de resistencia asociado a la comutación *G12V* (Figura 25). Este resultado es consistente con hallazgos previos que las mutaciones *KRAS G12V* (junto con las *G12C*) son las de mayor impacto negativo sobre la supervivencia libre de enfermedad en los pacientes de CPNM sin tratamiento dirigido a *KRAS*<sup>315</sup>. Del mismo modo, se ha descrito la participación de estas mutaciones (además de las *G12D*) en la resistencia a los inhibidores de *ALK* en pacientes de CPNM<sup>316</sup>. En la literatura especializada sobre la contribución de las mutaciones en *KRAS* a la resistencia a la inhibición de EGFR, se enfatiza la significativa implicación de la mutación *G12V*<sup>317</sup>. Se ha observado que esta resistencia pudiera ser mitigada mediante la implementación de una estrategia terapéutica combinada, destacando la eficacia de la combinación con trametinib<sup>318</sup>.

A partir de estos datos, exploramos la eficacia de las terapias combinadas de AZD4547 con diferentes inhibidores de la vía *KRAS*, como posible estrategia terapéutica que podría superar o evadir la resistencia que confieren las mutaciones de *KRAS* a la inhibición de FGFR. Primero, elegimos un inhibidor de MEK (trametinib), que actuaba sobre la señalización *KRAS* aberrante en las ocho líneas isogénicas independientemente de la mutación *KRAS* que presentaran. El fármaco ya había sido previamente testado en combinación con otros inhibidores de quinasas<sup>318</sup> y aprobado por la FDA para el tratamiento de CPNM con mutaciones en *BRAF*<sup>58</sup>. Además, su combinación con inhibidores de FGFR ya ha sido testada en un estudio que propuso a la señalización FGFR1 como un mecanismo de resistencia a la inhibición de *KRAS*<sup>263</sup>. En este estudio, se apreció que la combinación del trametinib con el FGFRi ponatinib era capaz de abolir la resistencia adquirida al trametinib en modelos preclínicos de cáncer de colon y pulmón con mutaciones en *KRAS*. En nuestras líneas isogénicas, la combinación de AZD4547 con trametinib, mostró una reducción significativa en el crecimiento en todas las líneas en comparación con el tratamiento con AZD4547 en monoterapia, siendo el efecto más pronunciado en la línea con la mutación *G12C* (Figura 26A). Este dato se asemeja al descrito en líneas celulares de pulmón con diferentes mutaciones en *KRAS*, donde se observó que las líneas *KRAS G12C* mostraban un mayor efecto de la terapia combinada de trametinib + FGFRi (en comparación con la monoterapia del FGFRi) que en las líneas *KRAS G12S*<sup>263</sup>. Este dato apoya el uso primario de un régimen en combinación de AZD4547 con un inhibidor específico de *KRAS G12C* como previamente se ha probado en el sentido inverso, es decir, para superar las resistencias a los *KRAS G12C*<sup>319</sup>. Por otro lado, la sensibilidad al inhibidor AZD4547 aumentó significativamente en todas las líneas que

tenían mutaciones *KRAS* cuando se añadió trametinib de manera conjunta al tratamiento con AZD4547 (Figura 26B), destacando así el efecto sinérgico de la terapia combinada.

Los resultados observados en las líneas isogénicas fueron validados a nivel molecular (Figura 27). El tratamiento con AZD4547 en monoterapia redujo más la activación de ERK, Akt y S6 en las líneas *KRAS wt* que en las líneas con el gen *KRAS* mutado (salvo en las *G13D*), confirmando así la resistencia parcial de las líneas mutadas. El tratamiento con trametinib en monoterapia produjo una sobreactivación de MEK en todas las líneas, como está descrito debido al bucle de retroalimentación que se activa para solventar la desactivación total de ERK causada por la inhibición producida por el trametinib<sup>265,266</sup>. El tratamiento combinatorio de AZD4547 y trametinib disminuyó la señalización *KRAS* ya que encontramos en todas las líneas una menor fosforilación de proteínas a diferentes niveles (ERK, Akt y S6) en comparación con el control sin tratar y en comparación con la monoterapia con AZD4547 (salvo Akt en las *G12S* y *G13D*). Este resultado está en concordancia con lo descrito en la combinación de ponatinib y trametinib en líneas celulares de cáncer de pulmón y páncreas<sup>263</sup>. A diferencia de en las líneas con *KRAS mut*, el tratamiento con AZD4547 tuvo un efecto proapoptótico en las células *wt*, evidenciado por el incremento de los niveles de expresión de BIM. Con la terapia combinada, los niveles de BIM aparecen disminuidos en varias líneas isogénicas (*G12C*, *G12S* y *Q61H*). Este hecho podría deberse a la gran eficacia que tiene el trametinib en inducir apoptosis en estas líneas isogénicas<sup>264</sup>, exacerbado por la terapia combinada, por lo que al no recogerse el sobrenadante con las células muertas, es probable que perdiésemos la sección donde estaría la máxima expresión de este marcador apoptótico. La terapia combinada demostró una notable eficacia en la reducción de la viabilidad celular como muestran las curvas de crecimiento (Figura 26A), lo que sugiere la consideración de evaluar marcadores de apoptosis mediante citometría de flujo que permiten estudios más complejos<sup>320,321</sup>.

Para estudiar el efecto de los fármacos de estudio y con el fin de superar la limitación de utilizar líneas celulares murinas, decidimos utilizar modelos preclínicos derivados de pacientes que reproducen mejor la complejidad de los tumores humanos. Por ello, empleamos un modelo más cercano a la clínica como es nuestra colección de modelos organoides derivados de PDX (PDXDOs). Esta colección supone una herramienta de utilidad para el cribado de fármacos antes de su transferencia a un modelo más complejo *in vivo*<sup>322,323</sup>. Los PDXDOs mantienen similares características moleculares e histológicas de los PDX de los que derivan, y por tanto, de los pacientes de los que provienen<sup>270</sup>. En estos ensayos, los PDXDOs *KRAS wt* (TP40, TP43, TP96, TP103 y TP114) mostraron una mayor sensibilidad, que los PDXDOs *KRAS mut* (TP57, TP60, TP79, TP80, TP91 y TP143), a las tres diferentes dosis (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) del tratamiento con AZD4547 en

monoterapia, especialmente en la dosis superior, lo que respalda la idea de que las mutaciones en el gen *KRAS* pueden conferir cierta resistencia al tratamiento con los inhibidores de FGFR en unos modelos más cercanos al escenario real en la clínica (Figura 28). Aunque los modelos *KRAS wt* fueron en promedio más sensibles a AZD4547 que los *KRAS mut*, encontramos pequeñas diferencias entre ellos: los modelos TP40, TP103 y TP114 mostraron una mayor sensibilidad al inhibidor AZD4547 que el resto de los *KRAS wt*. Esta diferencia podría ser explicada porque estos modelos albergaban comutaciones en el gen *PIK3CA*, las cuales se han asociado con una mejor respuesta al tratamiento con AZD4547 en pacientes de diferentes neoplasias<sup>324</sup>. De igual manera, los PDXDOs *KRAS mut* tampoco mostraron la misma resistencia al tratamiento con AZD4547 en monoterapia, habiendo diferencias individuales entre ellos. Los modelos TP143, TP60 y TP80 mostraron una mayor sensibilidad al tratamiento con AZD4547 que el resto de los modelos *KRAS mut*. El TP143 fue el único con una mutación *KRAS G12D* y, al igual que las células isogénicas *KRAS G12D* (Figura 26A), mostró una mayor sensibilidad a la monoterapia de AZD4547 (1, 5 y 10  $\mu$ M) que a la monoterapia con trametinib (10 y 25 nM), algo disonante con el resto de las mutaciones *KRAS*. Los PDXDOs TP60 y TP80, tenían comutaciones en el gen *STK11*, bastantes comunes en concurrencia con las mutaciones de *KRAS*<sup>24,36,148,325</sup>, las cuales se han relacionado con una regulación positiva de la expresión y señalización de FGFR1 en modelos preclínicos<sup>326</sup>, lo que podría explicar su respuesta intermedia al tratamiento con AZD4547.

Nuestra colección de modelos PDXDOs también supone una herramienta muy adecuada para evaluar la eficacia de terapias combinadas<sup>322</sup>. Se plantearon combinaciones con diferentes concentraciones de los inhibidores AZD4547 (1, 5 y 10  $\mu$ M) y trametinib (10 y 25 nM). Estas combinaciones tuvieron un efecto en la reducción de la viabilidad celular diferente en los modelos *KRAS wt* comparado con los modelos *KRAS mut*. En todos los PDXDOs *KRAS mut* se observó un marcado efecto sinérgico de la combinación de ambos inhibidores. De entre todas las posibles combinaciones de concentraciones testadas, evaluamos de forma aislada la combinación que previamente utilizamos en las líneas murinas isogénicas: 10  $\mu$ M AZD4547 y 25 nM trametinib (Figura 26). Al igual que en las líneas, esta combinación reprodujo el mismo efecto de una mayor sensibilidad al tratamiento con AZD4547 en los modelos PDXDOs *KRAS mut*, de una forma sinérgica (Figura 29 y Figura 30). Estos resultados demostraron que la terapia combinada FGFRi + MEKi también tenía eficacia en unos modelos más cercanos a la clínica, verificando no solo lo advertido en las líneas isogénicas sino también lo previamente descrito en líneas celulares comerciales de cáncer de pulmón y cáncer de páncreas<sup>263</sup>.

Estos hallazgos subrayan la importancia de la señalización *KRAS* como mecanismo *bypass* de resistencia a la terapia anti-FGFR<sup>280</sup>. Además, se ha mostrado que la terapia combinada

que inhibe el receptor FGFR y la señalización KRAS es más efectiva que los tratamientos en monoterapia. Existen estudios similares, pero a la inversa, que proponen la combinación de trametinib con FGFRi para solventar la activación de la señalización FGFR como mecanismo de resistencia a la inhibición de la señalización KRAS en modelos preclínicos *KRAS mut*<sup>263</sup>. Este conocimiento secunda que la selección de los modelos PDX con mutaciones en *KRAS* y alta expresión de FGFR1 podría beneficiarse de la combinación de AZD4547 con trametinib en un tratamiento *in vivo*. No obstante, aunque no se hayan reportado importantes toxicidades con el uso de terapias combinadas con trametinib en ratones<sup>263,327</sup>, el panorama en los ensayos clínicos con pacientes es diferente. En general, las combinaciones con inhibidores de MEK en pacientes se toleran mal, como se ha podido observar en varios estudios de fase II en pacientes con CPNM, donde se ha descrito que tanto la monoterapia<sup>328</sup> con inhibidores de MEK (entre los que se encuentra el inhibidor trametinib) como la combinación (trametinib + docetaxel)<sup>329</sup> tuvo peores resultados y más toxicidades en comparación con la quimioterapia por sí sola. Ensayos clínicos realizados con combinaciones de inhibidores de MEK con inhibidores de RTK (EGFR TKIs) mostraron resultados muy prometedores en cuanto al aumento de la supervivencia libre de progresión y la supervivencia general. Sin embargo, se asociaron con muchos efectos adversos de grado 3 o superior a la terapia combinada tanto del selumetinib<sup>330,331</sup> como de trametinib<sup>332</sup>. De igual forma, existe un ensayo clínico con la combinación de trametinib con un FGFRi (ponatinib) en pacientes de CPNM que ha sido interrumpido por los efectos adversos observados<sup>333</sup>.

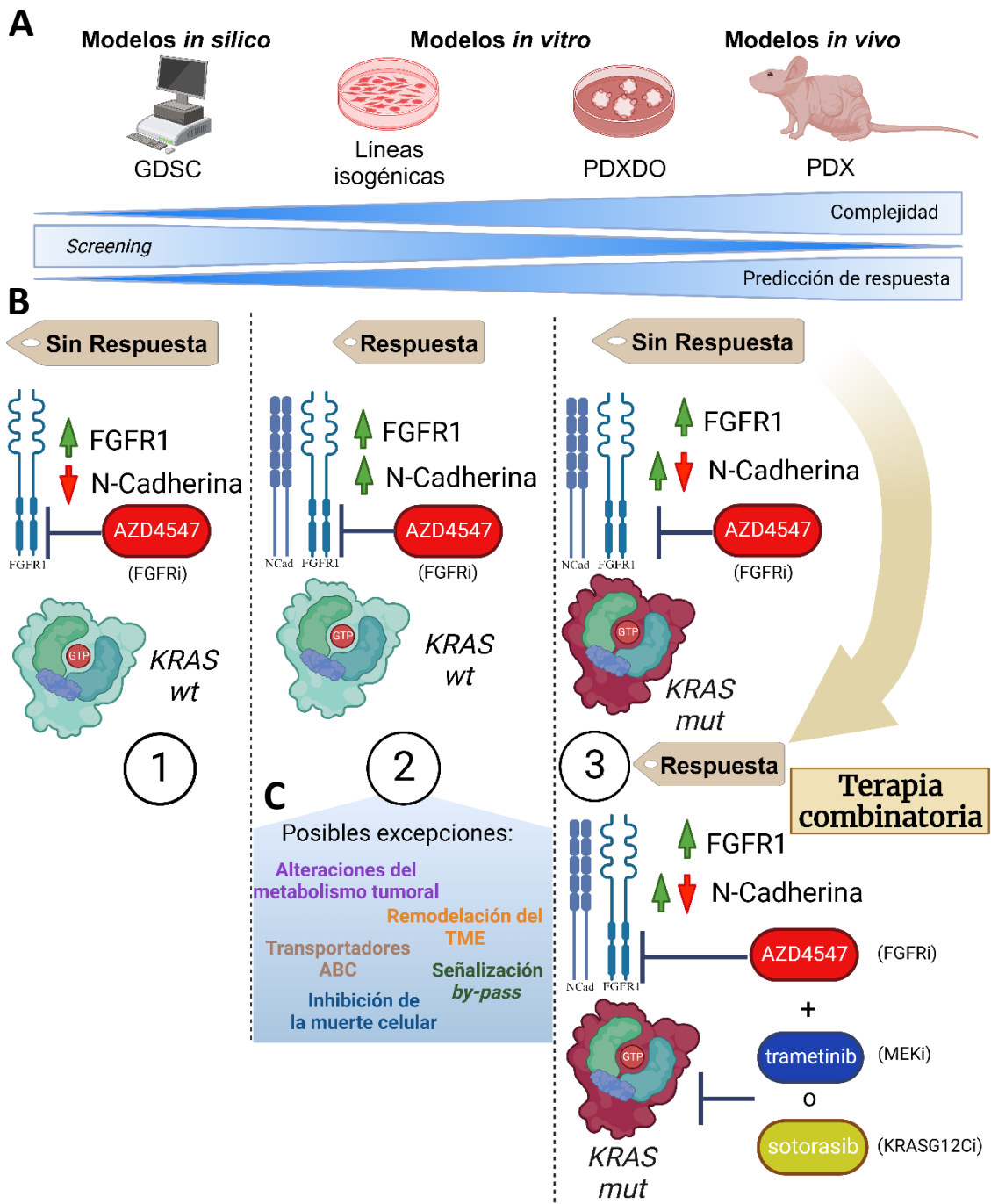
Debido a las toxicidades descritas de las combinaciones con trametinib, decidimos testar también los inhibidores específicos de la mutación *KRAS G12C*, los cuáles han sido recientemente aprobados por la FDA<sup>334,335</sup>. A diferencia de los inhibidores de MEK, cuales inhiben a MEK en las células sanas y en las células tumorales<sup>336</sup>, tanto el inhibidor sotorasib<sup>337</sup> como el inhibidor adagrasib<sup>338</sup> se unen covalentemente a la proteína resultante de la mutación puntual en el gen *KRAS (KRAS G12C)* de las células tumorales, por lo que se toleran mejor<sup>339</sup>. Además, existe literatura previa en la que se han obtenido resultados prometedores de la combinación de sotorasib con FGFRi en modelos preclínicos de CPNM para solventar la resistencia a la terapia anti-KRASG12C, que demuestran el efecto sinérgico de esta combinación<sup>340,341</sup>. Por todo ello, testamos en nuestros modelos PDXDOs *KRAS G12C* (TP60, TP79, TP80, TP91, TP126 y TP181) diferentes combinaciones de tres concentraciones crecientes de sotorasib (0.1, 0.5 y 1  $\mu$ M) y de AZD4547 (1, 5 y 10  $\mu$ M), observando un patrón en la reducción de la viabilidad celular similar al de la combinación con trametinib (Figura 29B y Figura 31A). La monoterapia de sotorasib mostró una ligera menor eficacia en la reducción de la viabilidad celular de los PDXDOs *KRAS G12C* en

comparación con la monoterapia de trametinib (Figura 29B y Figura 31A). Este efecto ha sido reportado previamente en otros estudios con sotorasib en PDXDOs de CPNM<sup>342</sup>, y puede deberse a que en estos modelos se consigue una mayor eficacia antitumoral de sotorasib en estrategias combinadas. Por ejemplo, se ha documentado que la combinación de sotorasib con los inhibidores de mTOR y de IGF1R ha evidenciado una mejora significativa en su eficacia, con respecto a la monoterapia. Estos hallazgos se han constatado tanto en ensayos *in vitro* utilizando líneas celulares de pulmón, como en investigaciones *in vivo* realizadas en modelos murinos, en ambos casos con presencia de la mutación *KRAS G12C*<sup>343</sup>. En nuestros modelos PDXDOs *KRAS G12C* observamos que la combinación de sotorasib con AZD4547 redujo significativamente la viabilidad celular en comparación con las monoterapias, mostrando un efecto sinérgico en varios modelos (Figura 31).

En conclusión, a la luz de los resultados obtenidos, se propone un modelo de respuesta a la inhibición de FGFR dependiente del contexto genético de *KRAS* y de la expresión proteica de N-Cadherina. Los datos obtenidos nos sugieren la valoración de tres contextos moleculares diferentes a la hora de predecir la respuesta a los inhibidores de FGFR. En un primer lugar estaría el contexto de aquellos tumores con alta expresión de FGFR1/4 y baja expresión de N-Cadherina, y *KRAS wt*, el cual nos indicaría una falta de respuesta a la terapia anti-FGFR, como previamente hemos descrito<sup>201</sup> y como comprobamos con los tratamientos de nuestra cohorte de modelos PDX (Figura 32A y Figura 32B). En un segundo lugar encontraríamos aquellos tumores con un contexto de alta expresión de FGFR1/4 y de N-Cadherina, y *KRAS wt*. Estos tumores han mostrado una respuesta a los FGFRi tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>201</sup>, y en la presente tesis lo hemos validado en una colección de PDX más amplia (Figura 32A y Figura 32B). En este contexto, no todos los modelos responden (lo hace el 67 %), por lo que en este estudio proponemos algunos mecanismos de resistencia que podrían explicar estos casos. Estos mecanismos estarían relacionados con las alteraciones del metabolismo tumoral (glucólisis y metabolismo lipídico), la remodelación del microambiente tumoral (hipoxia, señalización JAK-STAT), la inhibición de la muerte celular (señalización TNF $\alpha$ /NF- $\kappa$ B) y con la expulsión del fármaco de las células tumorales (transportadores ABC) (Figura 32A y Figura 32C), y han sido descritos en la resistencia a los inhibidores RTK<sup>280</sup>. Por último, existiría un tercer contexto que englobaría aquellos tumores con alta expresión de FGFR1/4 y valores de expresión variable de N-Cadherina, y que muestran mutaciones en el gen *KRAS*. Este contexto sería novedoso porque, aunque se ha descrito a la señalización RAS-MAPK como mecanismo *by-pass* de resistencia a los FGFR1-TKIs<sup>313</sup>, no existe literatura previa sobre la implicación de las mutaciones *KRAS* en esta resistencia. Nuestros resultados *in silico* e *in vitro* señalan al estado mutacional y la señalización *KRAS* como un

mecanismo *by-pass* de resistencia a la inhibición de FGFR y, por tanto, como un biomarcador predictivo para tener en cuenta. Los tumores de este tercer contexto, por tanto, no responderían a la terapia anti-FGFR por sí sola, pero sí podrían beneficiarse de una terapia combinada de inhibidores de FGFR con inhibidores directos o indirectos de *KRAS* (Figura 32A y Figura 32B).

Esta categorización de los tumores en tres diferentes contextos, según su respuesta a los inhibidores de FGFR, nos ayudaría a establecer diferentes opciones terapéuticas de las que se puedan beneficiar cada uno de los pacientes.



**Figura 32. Modelo del papel de N-Cadherina y KRAS en la inhibición FGFR, y mecanismos propuestos de resistencia a dicha inhibición.** (A) Estrategias utilizadas para el estudio de la implicación de KRAS en la resistencia a la terapia anti-FGFR. (B) Se proponen tres escenarios diferentes en la respuesta a los FGFRi. (B1) Los tumores con alta expresión de FGFR1 y baja expresión de N-Cadherina, no respondieron a la terapia anti-FGFR. (B2) Los tumores con la coexpresión de altos niveles de FGFR1 y N-Cadherina respondieron a los FGFRi. (B3) Las mutaciones en el gen KRAS actuaron como mecanismo de resistencia, incluso en un contexto de alta expresión de N-Cadherina. La terapia combinada con MEKi o KRASi mostró un efecto sinérgico en solventar la resistencia. (C) Algunos tumores KRAS wt con coexpresión de altos niveles de FGFR1 y N-Cadherina, no respondieron al tratamiento por lo que se propusieron otros mecanismos de resistencia a la terapia anti-FGFR que necesitan de una validación futura.

El futuro trabajo relacionado con la presente tesis recaería en el estudio en profundidad del mecanismo por el que FGFR es oncogénico en presencia de N-Cadherina y supresor en su ausencia. Asimismo, es necesario el estudio del mecanismo molecular subyacente a la resistencia observada al tratamiento con AZD4547 en monoterapia, así como a la superación de dicha resistencia con la terapia combinada (tanto con trametinib como con sotorasib). Es elemental también la extrapolación de estos estudios de combinaciones a ensayos *in vivo* donde podamos validar los efectos de la combinación FGFRi + KRASi en modelos PDX. Por último, aunque existe evidencia obtenida a nivel clínico que apoya el papel de la N-Cadherina como biomarcador pronóstico, ya que se ha relacionado su coexpresión con altos niveles FGFR1/4 con una peor supervivencia en pacientes de CPNM<sup>201</sup>, aún no existen datos disponibles de ensayos clínicos donde se pueda validar el valor de la expresión de N-Cadherina y del estado mutacional de KRAS como biomarcadores predictivos a la terapia anti-FGFR.

En definitiva, nuestros datos aportan una visión más amplia del papel de la N-Cadherina en la inhibición de FGFR y plantean a la señalización aberrante de la vía de KRAS como otro potencial biomarcador para tener en cuenta. De acuerdo con esto, se propone una forma de estratificar mejor a los pacientes en función de su contexto molecular, de forma que pueda seleccionarse el tratamiento más adecuado. Se recomienda la realización de nuevos ensayos clínicos que puedan encontrar el subgrupo de pacientes que se beneficie de la terapia anti-FGFR, algo que todavía no se ha realizado. Por otro lado, hemos demostrado que la terapia combinada de FGFRi y KRASi es sinérgica en los tumores que expresan altos niveles de FGFR1 y albergan mutaciones en el gen KRAS, la cual podría ser eficaz en este contexto, incluso retrasando la aparición de resistencias que se han visto que ocurren en la clínica<sup>62,197,344</sup>.



# CONCLUSIONES



1. El *Western Blot* (WB) es una técnica con la que se consigue clasificar a los modelos PDX, en función de la expresión de FGFR1 y N-Cadherina. Únicamente los modelos PDX con alta expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina responden a la terapia anti-FGFR, aunque esta únicamente se confirma en un tercio de los casos. Estos datos demandan la identificación de biomarcadores predictivos complementarios.
2. La determinación de la expresión de los biomarcadores de estudio (FGFR1/4, N-Cadherina) por las técnicas IHQ y la qPCR muestran un nivel de concordancia sub-óptimo con el WB. En consecuencia, el valor predictivo de los marcadores disminuye con estas tecnologías respecto al WB.
3. Las mutaciones del gen *KRAS* podrían actuar como biomarcadores predictivos de respuesta a los inhibidores de FGFR. La presencia de estas mutaciones se asocia con la resistencia a estos fármacos *in vitro* (en líneas celulares isogénicas y PDXDOs) e *in vivo* (PDX), incluso en tumores con alta expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina. La tasa de respuesta de la terapia anti-FGFR en nuestros modelos PDX con alta expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina, y *KRAS* en estado silvestre, es del 66,7 %.
4. Un 33,3 % de nuestros modelos PDX *KRAS wt* con alta expresión de FGFR1/4 y N-Cadherina, no respondieron a la terapia anti-FGFR. Nuestro estudio transcriptómico propone la implicación de algunas alteraciones en el metabolismo tumoral, el microambiente tumoral inmunosupresor, la inhibición de la muerte celular y los transportadores de fármacos. El estudio en profundidad de estos procesos podría revelar la existencia de nuevos biomarcadores complementarios predictivos de respuesta a la terapia anti-FGFR, como *PGK1*, *ERBB2* o *CSF2RA*, entre otros.
5. La combinación del inhibidor de FGFR (AZD4547) con el inhibidor de MEK (trametinib) demostró ser más eficaz que los fármacos en monoterapia, en nuestras líneas isogénicas y en nuestros modelos PDXDOs con mutaciones en *KRAS*. La combinación del inhibidor de FGFR (AZD4547) con el inhibidor específico de *KRAS G12C* (sotorasib) demostró también ser más eficaz que los fármacos en monoterapia, en nuestros modelos PDXDOs con la mutación *KRAS G12C*.



# CONCLUSIONS



1. The Western Blot (WB) is a technique used to classify PDX models based on the expression of FGFR1 and N-Cadherin. Only PDX models with high expression of FGFR1/4 and N-Cadherin respond to anti-FGFR therapy, although this is confirmed in only one-third of cases. These data demand the identification of complementary predictive biomarkers.
2. The determination of the expression of the study biomarkers (FGFR1/4, N-Cadherin) by IHC and qPCR techniques shows a sub-optimal level of concordance with WB. Consequently, the predictive value of the markers decreases with these technologies compared to WB.
3. *KRAS* gene mutations could act as predictive biomarkers for the response to FGFR inhibitors. The presence of these mutations is associated with resistance to these drugs *in vitro* (in isogenic cell lines and PDXDOs) and *in vivo* (PDX), even in tumors with high FGFR1/4 and N-Cadherin expression. The response rate to anti-FGFR therapy in our PDX models with high FGFR1/4 and N-Cadherin expression, and *wild-type KRAS*, is 66.7 %.
4. A 33.3 % of our *KRAS wild-type* PDX models with high FGFR1/4 and N-Cadherin expression did not respond to anti-FGFR therapy. Our transcriptomic study suggests the involvement of some alterations in tumor metabolism, the immunosuppressive tumor microenvironment, inhibition of cell death, and drug transporters. In-depth study of these processes could reveal the existence of new complementary predictive biomarkers for the response to anti-FGFR therapy, such as *PGK1*, *ERBB2*, or *CSF2RA*, among others.
5. The combination of the FGFR inhibitor (AZD4547) with the MEK inhibitor (trametinib) proved to be more effective than monotherapy in our isogenic cell lines and in our PDXDO models with mutations in *KRAS*. The combination of the FGFR inhibitor (AZD4547) with the specific *KRAS G12C* inhibitor (sotorasib) also proved to be more effective than monotherapy in our PDXDOs models with the *KRAS G12C* mutation.



# BIBLIOGRAFÍA



1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
2. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) & Red Española de registros de Cáncer (REDECAN). *Las cifras del cáncer en España 2023. Fundación SEOM* (2023).
3. AECC. Esperanza de vida y supervivencia del cáncer de pulmón. <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-pulmon/evolucion-cancer-pulmon>.
4. INE. Defunciones según la Causa de Muerte. *Notas de prensa* **2021**, 19 (2021).
5. Arbour, K. C. & Riely, G. J. Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA* **322**, 764–774 (2019).
6. Allemani, C. *et al.* Global surveillance of trends in cancer survival 2000-2013;14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 3 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* **391**, 1023–1075 (2018).
7. Goldstraw, P. *et al.* The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **11**, 39–51 (2016).
8. American Lung Association. State of Lung Cancer. (2022).
9. Warren, G. W. & Cummings, K. M. Tobacco and lung cancer: risks, trends, and outcomes in patients with cancer. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. book. Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet.* 359–364 (2013) doi:10.14694/EdBook\_AM.2013.33.359.
10. Adams, S. J. *et al.* Lung cancer screening. *Lancet (London, England)* **401**, 390–408 (2023).
11. Society, A. C. *Cancer facts & figures 2015.* (American Cancer Society, 2015).
12. Alberg, A. J., Brock, M. V, Ford, J. G., Samet, J. M. & Spivack, S. D. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* **143**, e1S-e29S (2013).
13. Turner, M. C., Chen, Y., Krewski, D., Calle, E. E. & Thun, M. J. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 285–290 (2007).
14. Schabath, M. B. & Cote, M. L. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.* **28**, 1563 LP – 1579 (2019).
15. Albin, M., Magnani, C., Krstev, S., Rapiti, E. & Shefer, I. Asbestos and cancer: An overview of current trends in Europe. *Environ. Health Perspect.* **107**, 289–298 (1999).
16. Garzillo, C., Pugliese, M., Loffredo, F. & Quarto, M. Indoor radon exposure and lung cancer risk: a meta-analysis of case-control studies. *Transl Cancer Res* **6**, S934–S943 (2017).
17. Brenner, D. R., McLaughlin, J. R. & Hung, R. J. Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **6**, e17479 (2011).
18. Littman, A. J., Jackson, L. A. & Vaughan, T. L. Chlamydia pneumoniae and lung cancer: epidemiologic evidence. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomarkers* **14**, 773–778 (2005).

19. AECC. Cáncer de pulmón. <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-pulmon> (2023).
20. Heist, R. S. & Engelman, J. A. SnapShot: non-small cell lung cancer. *Cancer Cell* **21**, 448.e2 (2012).
21. Cooper, W. A., Lam, D. C. L., O'Toole, S. A. & Minna, J. D. Molecular biology of lung cancer. *J. Thorac. Dis. Vol 5, Suppl. 5 (October 2013) J. Thorac. Dis. (Lung cancer)* (2013).
22. Herbst, R. S., Morgensztern, D. & Boshoff, C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* **553**, 446–454 (2018).
23. Govindan, R. *et al.* Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell* **150**, 1121–1134 (2012).
24. Campbell, J. D. *et al.* Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat. Genet.* **48**, 607–616 (2016).
25. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* **511**, 543–550 (2014).
26. Gu, J. *et al.* TP53 mutation is associated with a poor clinical outcome for non-small cell lung cancer: Evidence from a meta-analysis. *Mol. Clin. Oncol.* **5**, 705–713 (2016).
27. Šutić, M. *et al.* Diagnostic, Predictive, and Prognostic Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Management. *J. Pers. Med.* **11**, (2021).
28. Karachaliou, N. *et al.* KRAS mutations in lung cancer. *Clin. Lung Cancer* **14**, 205–214 (2013).
29. Shackelford, D. B. *et al.* LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin. *Cancer Cell* **23**, 143–158 (2013).
30. Romero, R. *et al.* Keap1 mutation renders lung adenocarcinomas dependent on Slc33a1. *Nat. Cancer* **1**, 589–602 (2020).
31. Santarpia, L., Lippman, S. M. & El-Naggar, A. K. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **16**, 103–119 (2012).
32. Ghafoor, Q. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Kinase Inhibitors and Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) - Advances in Molecular Diagnostic Techniques to Facilitate Targeted Therapy. *Pathol. Oncol. Res.* **24**, 723–731 (2018).
33. Du, X., Shao, Y., Qin, H.-F., Tai, Y.-H. & Gao, H.-J. ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Thorac. cancer* **9**, 423–430 (2018).
34. Ahmadzada, T. *et al.* An Update on Predictive Biomarkers for Treatment Selection in Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Clin. Med.* **7**, (2018).
35. Rothschild, S. I. & Gautschi, O. Crizotinib in the treatment of non--small-cell lung cancer. *Clin. Lung Cancer* **14**, 473–480 (2013).
36. Skoulidis, F. & Heymach, J. V. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **19**, 495–509 (2019).
37. Xu, F. *et al.* A TP53-associated gene signature for prediction of prognosis and therapeutic responses in lung squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* **9**, 1731943 (2020).
38. Gil, J. & Peters, G. Regulation of the INK4b–ARF–INK4a tumour suppressor locus: all for

- one or one for all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 667–677 (2006).
39. Zou, B., Zhou, X.-L., Lai, S.-Q. & Liu, J.-C. Notch signaling and non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.* **15**, 3415–3421 (2018).
  40. Gkoutakos, A. *et al.* PTEN in Lung Cancer: Dealing with the Problem, Building on New Knowledge and Turning the Game Around. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
  41. McGowan, M. *et al.* PIK3CA mutations as prognostic factor in squamous cell lung carcinoma. *Lung Cancer* **103**, 52–57 (2017).
  42. Miao, J.-L., Liu, R.-J., Zhou, J.-H. & Meng, S.-H. Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gene Amplification in Nonsmall Cell Lung Cancer. *Chin. Med. J. (Engl)*. **129**, 2868–2872 (2016).
  43. Dai, S., Zhou, Z., Chen, Z., Xu, G. & Chen, Y. Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs): Structures and Small Molecule Inhibitors. *Cells* **8**, (2019).
  44. Thomson, S., Petti, F., Sujka-Kwok, I., Epstein, D. & Haley, J. D. Kinase switching in mesenchymal-like non-small cell lung cancer lines contributes to EGFR inhibitor resistance through pathway redundancy. *Clin. Exp. Metastasis* **25**, 843–854 (2008).
  45. Chan, B. A. & Hughes, B. G. M. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Transl. lung cancer Res.* **4**, 36–54 (2015).
  46. Raman, V., Yang, C.-F. J., Deng, J. Z. & D’Amico, T. A. Surgical treatment for early stage non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.* **10**, S898–S904 (2018).
  47. Forde, P. M., Spicer, J. & Lu, S. Neoadjuvant nivolumab plus chemotherapy in resectable lung cancer. *N Engl J Med* **386**, 1973–1985 (2022).
  48. Kobayashi, S. *et al.* EGFR Mutation and Resistance of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N. Engl. J. Med.* **352**, 786–792 (2005).
  49. Jänne, P. A. *et al.* AZD9291 in EGFR Inhibitor–Resistant Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1689–1699 (2015).
  50. Ramalingam, S. S. *et al.* Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **382**, 41–50 (2019).
  51. Itchins, M. *et al.* Treatment of ALK-rearranged non-small cell lung cancer: A review of the landscape and approach to emerging patterns of treatment resistance in the Australian context. *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.* **13 Suppl 3**, 3–13 (2017).
  52. Soria, J.-C. *et al.* First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet (London, England)* **389**, 917–929 (2017).
  53. Larkins, E. *et al.* FDA Approval: Alectinib for the Treatment of Metastatic, ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Following Crizotinib. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 5171–5176 (2016).
  54. Peters, S. *et al.* Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **377**, 829–838 (2017).
  55. Solomon, B. J. *et al.* Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study. *Lancet. Oncol.* **19**, 1654–1667 (2018).
  56. Selinger, C. I. *et al.* Screening for ROS1 gene rearrangements in non-small-cell lung cancers using immunohistochemistry with FISH confirmation is an effective method to

- identify this rare target. *Histopathology* **70**, 402–411 (2017).
57. Socinski, M. A. & Pennell, N. A. Best Practices in Treatment Selection for Patients With Advanced NSCLC. *Cancer Control* **23**, 2–14 (2016).
  58. Odogwu, L. *et al.* FDA Approval Summary: Dabrafenib and Trametinib for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancers Harboring BRAF V600E Mutations. *Oncologist* **23**, 740–745 (2018).
  59. Drilon, A. *et al.* Antitumor activity of crizotinib in lung cancers harboring a MET exon 14 alteration. *Nat. Med.* **26**, 47–51 (2020).
  60. Smit, E. F. *et al.* Trastuzumab deruxtecan (T-DXd; DS-8201) in patients with HER2-mutated metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): Interim results of DESTINY-Lung01. *J. Clin. Oncol.* **38**, 9504 (2020).
  61. Gainor, J. F. *et al.* Pralsetinib for RET fusion-positive non-small-cell lung cancer (ARROW): a multi-cohort, open-label, phase 1/2 study. *Lancet. Oncol.* **22**, 959–969 (2021).
  62. Awad, M. M. *et al.* Acquired Resistance to KRASG12C Inhibition in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **384**, 2382–2393 (2021).
  63. Akhave, N. S., Biter, A. B. & Hong, D. S. Mechanisms of Resistance to KRAS(G12C)-Targeted Therapy. *Cancer Discov.* **11**, 1345–1352 (2021).
  64. Deb, D., Moore, A. C. & Roy, U. B. The 2021 Global Lung Cancer Therapy Landscape. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **17**, 931–936 (2022).
  65. Wölfle, S. J. *et al.* PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *Eur. J. Immunol.* **41**, 413–424 (2011).
  66. Yao, Z. *et al.* A Global Analysis of the Receptor Tyrosine Kinase-Protein Phosphatase Interactome. *Mol. Cell* **65**, 347–360 (2017).
  67. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
  68. Tian, Z., Niu, X. & Weitao, Y. Receptor Tyrosine Kinases in Osteosarcoma Treatment: Which Is the Key Target? *Front. Oncol.* **10**, (2020).
  69. Kovacs, E., Zorn, J. A., Huang, Y., Barros, T. & Kuriyan, J. A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 739–764 (2015).
  70. Nolen, B., Taylor, S. & Ghosh, G. Regulation of Protein Kinases: Controlling Activity through Activation Segment Conformation. *Mol. Cell* **15**, 661–675 (2004).
  71. Hubbard, S. R. Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 464–471 (2004).
  72. Pawson, T. Specificity in Signal Transduction: From Phosphotyrosine-SH2 Domain Interactions to Complex Cellular Systems. *Cell* **116**, 191–203 (2004).
  73. Sudhesh Dev, S., Zainal Abidin, S. A., Farghadani, R., Othman, I. & Naidu, R. Receptor Tyrosine Kinases and Their Signaling Pathways as Therapeutic Targets of Curcumin in Cancer. *Frontiers in Pharmacology* vol. 12 (2021).
  74. Zhimin, L., Guoqiang, J., Peter, B.-J. & Tony, H. Epidermal Growth Factor-Induced Tumor Cell Invasion and Metastasis Initiated by Dephosphorylation and Downregulation of Focal

- Adhesion Kinase. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4016–4031 (2001).
75. Du, Z. & Lovly, C. M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol. Cancer* **17**, 58 (2018).
  76. Gujral, T. S., Singh, V. K., Jia, Z. & Mulligan, L. M. Molecular mechanisms of RET receptor-mediated oncogenesis in multiple endocrine neoplasia 2B. *Cancer Res.* **66**, 10741–10749 (2006).
  77. Yano, S. *et al.* Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res.* **68**, 9479–9487 (2008).
  78. Saraon, P. *et al.* Receptor tyrosine kinases and cancer: oncogenic mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene* **40**, 4079–4093 (2021).
  79. Yun, C.-H. *et al.* Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* **11**, 217–227 (2007).
  80. Zhao, Q. *et al.* Broad-Spectrum Kinase Profiling in Live Cells with Lysine-Targeted Sulfonyl Fluoride Probes. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 680–685 (2017).
  81. Soda, M. *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **448**, 561–566 (2007).
  82. Shaw, A. T. *et al.* First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2018–2029 (2020).
  83. Chioni, A.-M. & Grose, R. P. Biological Significance and Targeting of the FGFR Axis in Cancer. *Cancers (Basel)*. **13**, (2021).
  84. Ornitz, D. M. & Itoh, N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **4**, 215–266 (2015).
  85. Sobhani, N., Fan, C., O Flores-Villanueva, P., Generali, D. & Li, Y. The fibroblast growth factor receptors in breast cancer: from oncogenesis to better treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2011 (2020).
  86. Xie, Y. *et al.* FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 181 (2020).
  87. Lee, P. L., Johnson, D. E., Cousens, L. S., Fried, V. A. & Williams, L. T. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* **245**, 57–60 (1989).
  88. Kornbluth, S., Paulson, K. E. & Hanafusa, H. Novel tyrosine kinase identified by phosphotyrosine antibody screening of cDNA libraries. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5541–5544 (1988).
  89. Keegan, K., Johnson, D. E., Williams, L. T. & Hayman, M. J. Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 1095–1099 (1991).
  90. Partanen, J. *et al.* FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO J.* **10**, 1347–1354 (1991).
  91. Wiedemann, M. & Trueb, B. Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. *Genomics* **69**, 275–279 (2000).

92. Regeenes, R. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 5 (FGFR5) is a co-receptor for FGFR1 that is up-regulated in beta-cells by cytokine-induced inflammation. *J. Biol. Chem.* **293**, 17218–17228 (2018).
93. Bae, J. H. *et al.* Asymmetric receptor contact is required for tyrosine autophosphorylation of fibroblast growth factor receptor in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 2866–2871 (2010).
94. Mohammadi, M. *et al.* Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 977–989 (1996).
95. Ong, S. H. *et al.* FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 979–989 (2000).
96. Kouhara, H. *et al.* A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* **89**, 693–702 (1997).
97. Cseh, B., Doma, E. & Baccarini, M. 'RAF' neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Lett.* **588**, 2398–2406 (2014).
98. Roskoski, R. J. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* **66**, 105–143 (2012).
99. Mohammadi, M. *et al.* A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5068–5078 (1991).
100. Larsson, H., Klint, P., Landgren, E. & Claesson-Welsh, L. Fibroblast growth factor receptor-1-mediated endothelial cell proliferation is dependent on the Src homology (SH) 2/SH3 domain-containing adaptor protein Crk. *J. Biol. Chem.* **274**, 25726–25734 (1999).
101. Collins, T. N. *et al.* Crk proteins transduce FGF signaling to promote lens fiber cell elongation. *Elife* **7**, (2018).
102. Seo, J.-H., Suenaga, A., Hatakeyama, M., Taiji, M. & Imamoto, A. Structural and functional basis of a role for CRKL in a fibroblast growth factor 8-induced feed-forward loop. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 3076–3087 (2009).
103. Krejci, P. *et al.* Receptor tyrosine kinases activate canonical WNT/ $\beta$ -catenin signaling via MAP kinase/LRP6 pathway and direct  $\beta$ -catenin phosphorylation. *PLoS One* **7**, e35826 (2012).
104. Ong, S. H. *et al.* Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 6074–6079 (2001).
105. Weylie, B., Zhu, J., Singh, U., Ambrus, S. & Forough, R. Phosphatidylinositide 3-kinase is important in late-stage fibroblast growth factor-1-mediated angiogenesis in vivo. *J. Vasc. Res.* **43**, 61–69 (2006).
106. Salazar, L. *et al.* A novel interaction between fibroblast growth factor receptor 3 and the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase: activation-dependent regulation of ERK by p85 in multiple myeloma cells. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1951–1961 (2009).
107. Easton, D. F. *et al.* Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* **447**, 1087–1093 (2007).

108. Su, W.-C. S. *et al.* Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature* **386**, 288–292 (1997).
109. Dudka, A. A., Sweet, S. M. M. & Heath, J. K. Signal transducers and activators of transcription-3 binding to the fibroblast growth factor receptor is activated by receptor amplification. *Cancer Res.* **70**, 3391–3401 (2010).
110. Trusolino, L., Bertotti, A. & Comoglio, P. M. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 834–848 (2010).
111. Lonic, A. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 2 phosphorylation on serine 779 couples to 14-3-3 and regulates cell survival and proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3372–3385 (2008).
112. Peng, Y. & Croce, C. M. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **1**, 15004 (2016).
113. Li, C., Scott, D. A., Hatch, E., Tian, X. & Mansour, S. L. Dusp6 (Mkp3) is a negative feedback regulator of FGF-stimulated ERK signaling during mouse development. *Development* **134**, 167–176 (2007).
114. Lo, T. L. *et al.* The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer. *Cancer Res.* **64**, 6127–6136 (2004).
115. Mohapatra, B. *et al.* Protein tyrosine kinase regulation by ubiquitination: critical roles of Cbl-family ubiquitin ligases. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* **1833**, 122–139 (2013).
116. Ferguson, H. R., Smith, M. P. & Francavilla, C. Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs) and Noncanonical Partners in Cancer Signaling. *Cells* vol. 10 (2021).
117. Helsten, T. *et al.* The FGFR landscape in cancer: analysis of 4,853 tumors by next-generation sequencing. *Clin. cancer Res.* **22**, 259–267 (2016).
118. Weiss, J. *et al.* Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci. Transl. Med.* **2**, 62ra93 (2010).
119. Cihoric, N. *et al.* Prognostic role of FGFR1 amplification in early-stage non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* **110**, 2914–2922 (2014).
120. Yang, W. *et al.* Prognostic value of FGFR1 gene copy number in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *J. Thorac. Dis.* **6**, 803 (2014).
121. Cuny, M. *et al.* Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. *Cancer Res.* **60**, 1077–1083 (2000).
122. Tomiguchi, M. *et al.* Fibroblast growth factor receptor-1 protein expression is associated with prognosis in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor-2-negative primary breast cancer. *Cancer Sci.* **107**, 491–498 (2016).
123. Turner, N. *et al.* FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* **70**, 2085–2094 (2010).
124. von Loga, K. *et al.* FGFR1 Amplification Is Often Homogeneous and Strongly Linked to the

- Squamous Cell Carcinoma Subtype in Esophageal Carcinoma. *PLoS One* **10**, e0141867 (2015).
125. Schäfer, M. H. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification in gastric adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* **46**, 1488–1495 (2015).
  126. Lehnen, N. C. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Histopathology* **63**, 157–166 (2013).
  127. Yao, T.-J. *et al.* AZD-4547 exerts potent cytostatic and cytotoxic activities against fibroblast growth factor receptor (FGFR)-expressing colorectal cancer cells. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **36**, 5641–5648 (2015).
  128. Marek, L. A. *et al.* Nonamplified FGFR1 is a growth driver in malignant pleural mesothelioma. *Mol. Cancer Res.* **12**, 1460–1469 (2014).
  129. Turner, N. *et al.* Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene* **29**, 2013–2023 (2010).
  130. Hur, J. Y. *et al.* High-level FGFR2 amplification is associated with poor prognosis and Lower response to chemotherapy in gastric cancers. *Pathol. Res. Pract.* **216**, 152878 (2020).
  131. Guancial, E. A. *et al.* FGFR3 expression in primary and metastatic urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Med.* **3**, 835–844 (2014).
  132. De Luca, A. *et al.* FGFR fusions in cancer: from diagnostic approaches to therapeutic intervention. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6856 (2020).
  133. Jain, A. *et al.* Cholangiocarcinoma with FGFR genetic aberrations: a unique clinical phenotype. *JCO Precis. Oncol.* **2**, 1–12 (2018).
  134. Sfakianos, J. P. *et al.* Genomic characterization of upper tract urothelial carcinoma. *Eur. Urol.* **68**, 970–977 (2015).
  135. Tamura, R. *et al.* Novel therapeutic strategy for cervical cancer harboring FGFR3-TACC3 fusions. *Oncogenesis* **7**, 1–12 (2018).
  136. Jaakkola, S. *et al.* Amplification of *fgfr4* gene in human breast and gynecological cancers. *Int. J. cancer* **54**, 378–382 (1993).
  137. Brito, L. P. *et al.* The role of fibroblast growth factor receptor 4 overexpression and gene amplification as prognostic markers in pediatric and adult adrenocortical tumors. *Endocr. Relat. Cancer* **19**, L11–L13 (2012).
  138. Tiong, K. H. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) and fibroblast growth factor 19 (FGF19) autocrine enhance breast cancer cells survival. *Oncotarget* **7**, 57633–57650 (2016).
  139. Hagel, M. *et al.* First Selective Small Molecule Inhibitor of FGFR4 for the Treatment of Hepatocellular Carcinomas with an Activated FGFR4 Signaling Pathway. *Cancer Discov.* **5**, 424–437 (2015).
  140. Frullanti, E. *et al.* Meta and pooled analyses of FGFR4 Gly388Arg polymorphism as a cancer prognostic factor. *Eur. J. cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ.* **20**, 340–347 (2011).
  141. Peng, T. *et al.* Effects of FGFR4 G388R, V10I polymorphisms on the likelihood of cancer. *Sci. Rep.* **11**, 1–12 (2021).

142. Ulaganathan, V. K., Sperl, B., Rapp, U. R. & Ullrich, A. GermLine variant FGFR4 p.G388R exposes a membrane-proximal STAT3 binding site. *Nature* **528**, 570–574 (2015).
143. Quintanal-Villalonga, Á. *et al.* Prognostic Role of the FGFR4-388Arg Variant in Lung Squamous-Cell Carcinoma Patients With Lymph Node Involvement. *Clin. Lung Cancer* **18**, 667-674.e1 (2017).
144. Mosesson, Y., Mills, G. B. & Yarden, Y. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 835–850 (2008).
145. Pacini, L., Jenks, A. D., Lima, N. C. & Huang, P. H. Targeting the Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Family in Lung Cancer. *Cells* **10**, (2021).
146. George, J. *et al.* Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* **524**, 47–53 (2015).
147. Qin, A. *et al.* Detection of Known and Novel FGFR Fusions in Non–Small Cell Lung Cancer by Comprehensive Genomic Profiling. *J. Thorac. Oncol.* **14**, 54–62 (2019).
148. Ding, L. *et al.* Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* **455**, 1069–1075 (2008).
149. Perez-Moreno, P., Brambilla, E., Thomas, R. & Soria, J.-C. Squamous cell carcinoma of the lung: molecular subtypes and therapeutic opportunities. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 2443–2451 (2012).
150. Kim, H. R. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification is associated with poor survival and cigarette smoking dosage in patients with resected squamous cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 731–737 (2013).
151. Bogatyrova, O. *et al.* FGFR1 overexpression in non-small cell lung cancer is mediated by genetic and epigenetic mechanisms and is a determinant of FGFR1 inhibitor response. *Eur. J. Cancer* **151**, 136–149 (2021).
152. Wang, R. *et al.* FGFR1/3 Tyrosine Kinase Fusions Define a Unique Molecular Subtype of Non–Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **20**, 4107–4114 (2014).
153. Wei, W. *et al.* Fibroblast growth factor receptor 4 as a prognostic indicator in triple-negative breast cancer. *Transl. Cancer Res.* **9**, 6881–6888 (2020).
154. Marks, J. L. *et al.* Mutational analysis of EGFR and related signaling pathway genes in lung adenocarcinomas identifies a novel somatic kinase domain mutation in FGFR4. *PLoS One* **2**, e426 (2007).
155. Krook, M. A. *et al.* Fibroblast growth factor receptors in cancer: genetic alterations, diagnostics, therapeutic targets and mechanisms of resistance. *Br. J. Cancer* **124**, 880–892 (2021).
156. Krook, M. A. *et al.* Fibroblast growth factor receptors in cancer: genetic alterations, diagnostics, therapeutic targets and mechanisms of resistance. *Br. J. Cancer* **124**, 880–892 (2021).
157. Chae, Y. K. *et al.* Inhibition of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) pathway: the current landscape and barriers to clinical application. *Oncotarget* **8**, 16052–16074 (2017).
158. Pulte, E. D. *et al.* FDA Approval Summary: Revised Indication and Dosing Regimen for Ponatinib Based on the Results of the OPTIC Trial. *Oncologist* **27**, 149–157 (2022).
159. Fala, L. Ofev (Nintedanib): First Tyrosine Kinase Inhibitor Approved for the Treatment of

- Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. Heal. drug benefits* **8**, 101–104 (2015).
160. Hibi, M. *et al.* FGFR gene alterations in lung squamous cell carcinoma are potential targets for the multikinase inhibitor nintedanib. *Cancer Sci.* **107**, 1667–1676 (2016).
  161. FDA approves regorafenib (Stivarga) for metastatic colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)*. **26**, 896 (2012).
  162. FDA approves regorafenib (Stivarga) for GIST. *Oncology (Williston Park)*. **27**, 164 (2013).
  163. Heo, Y.-A. & Syed, Y. Y. Regorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Drugs* **78**, 951–958 (2018).
  164. Nguyen, D. T. & Shayahi, S. Pazopanib: approval for soft-tissue sarcoma. *J. Adv. Pract. Oncol.* **4**, 53–57 (2013).
  165. Shen, G. *et al.* Anlotinib: a novel multi-targeting tyrosine kinase inhibitor in clinical development. *J. Hematol. Oncol.* **11**, 120 (2018).
  166. Goodman, V. L. *et al.* Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 1367–1373 (2007).
  167. Staehler, M. *et al.* Adjuvant sunitinib in patients with high-risk renal cell carcinoma: safety, therapy management, and patient-reported outcomes in the S-TRAC trial. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **29**, 2098–2104 (2018).
  168. Blumenthal, G. M. *et al.* FDA approval summary: sunitinib for the treatment of progressive well-differentiated locally advanced or metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncologist* **17**, 1108–1113 (2012).
  169. Sharma, M. *et al.* Phase II study of Dovitinib in recurrent glioblastoma. *J. Neurooncol.* **144**, 359–368 (2019).
  170. Boisseau, W. *et al.* Molecular Profiling Reclassifies Adult Astroblastoma into Known and Clinically Distinct Tumor Entities with Frequent Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Alterations. *Oncologist* **24**, 1584–1592 (2019).
  171. Mazzaferro, V. *et al.* Derazantinib (ARQ 087) in advanced or inoperable FGFR2 gene fusion-positive intrahepatic cholangiocarcinoma. *Br. J. Cancer* **120**, 165–171 (2019).
  172. Thompson, P. A. *et al.* eFT226, a first in class inhibitor of eIF4A, targets FGFR1/2 and HER2 driven cancers. in *Molecular Cancer Therapeutics* vol. 18 (AMER ASSOC CANCER RESEARCH 615 CHESTNUT ST, 17TH FLOOR, PHILADELPHIA, PA ..., 2019).
  173. Sun, Y. *et al.* Safety, pharmacokinetics, and antitumor properties of anlotinib, an oral multi-target tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced refractory solid tumors. *J. Hematol. Oncol.* **9**, 105 (2016).
  174. Wang, Y. *et al.* Preclinical evaluation of MAX-40279, a FLT3/FGFR dual kinase inhibitor for treatment of acute myeloid leukemia. *Blood* **132**, 3997 (2018).
  175. Sayegh, N., Tripathi, N., Agarwal, N. & Swami, U. Clinical Evidence and Selecting Patients for Treatment with Erdafitinib in Advanced Urothelial Carcinoma. *Onco. Targets. Ther.* **15**, 1047–1055 (2022).
  176. Kang, C. Infigratinib: First Approval. *Drugs* **81**, 1355–1360 (2021).
  177. Patel, T. H. *et al.* FDA Approval Summary: Pemigatinib for Previously Treated,

- Unresectable Locally Advanced or Metastatic Cholangiocarcinoma with FGFR2 Fusion or Other Rearrangement. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **29**, 838–842 (2023).
178. Wu, D. *et al.* Crystal Structure of the FGFR4/LY2874455 Complex Reveals Insights into the Pan-FGFR Selectivity of LY2874455. *PLoS One* **11**, e0162491 (2016).
  179. Perera, T. P. S. *et al.* Discovery and Pharmacological Characterization of JNJ-42756493 (Erdafitinib), a Functionally Selective Small-Molecule FGFR Family Inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **16**, 1010–1020 (2017).
  180. Tsimafeyeu, I. *et al.* Targeting FGFR2 with alofanib (RPT835) shows potent activity in tumour models. *Eur. J. Cancer* **61**, 20–28 (2016).
  181. Gandhi, S. U. *et al.* FDA Approval Summary: Futibatinib for Unresectable Advanced or Metastatic, Chemotherapy Refractory Intrahepatic Cholangiocarcinoma with FGFR2 Fusions or Other Rearrangements. *Clin. Cancer Res.* **29**, 4027–4031 (2023).
  182. Kalyukina, M. *et al.* TAS-120 Cancer Target Binding: Defining Reactivity and Revealing the First Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) Irreversible Structure. *ChemMedChem* **14**, 494–500 (2019).
  183. Bai, A. *et al.* GP369, an FGFR2-IIIb-specific antibody, exhibits potent antitumor activity against human cancers driven by activated FGFR2 signaling. *Cancer Res.* **70**, 7630–7639 (2010).
  184. Sommer, A. *et al.* Preclinical Efficacy of the Auristatin-Based Antibody-Drug Conjugate BAY 1187982 for the Treatment of FGFR2-Positive Solid Tumors. *Cancer Res.* **76**, 6331–6339 (2016).
  185. Catenacci, D. V. T. *et al.* Bemarituzumab with modified FOLFOX6 for advanced FGFR2-positive gastroesophageal cancer: FIGHT Phase III study design. *Futur. Oncol.* **15**, 2073–2082 (2019).
  186. O'Donnell, P. *et al.* 621 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* 191–192 (2012).
  187. Trudel, S. *et al.* A phase I study of the safety and pharmacokinetics of escalating doses of MFGR1877S, a fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) antibody, in patients with relapsed or refractory t (4; 14)-positive multiple myeloma. *Blood* **120**, 4029 (2012).
  188. Surguladze, D. *et al.* LY3076226, a novel anti-FGFR3 antibody drug conjugate exhibits potent and durable anti-tumor activity in tumor models harboring FGFR3 mutations or fusions. (2019).
  189. Siefker-Radtke, A. O. *et al.* FIERCE-22: Clinical activity of vofatamab (V) a FGFR3 selective inhibitor in combination with pembrolizumab (P) in WT metastatic urothelial carcinoma, preliminary analysis. (2019).
  190. Harding, T. C. *et al.* Blockade of nonhormonal fibroblast growth factors by FP-1039 inhibits growth of multiple types of cancer. *Sci. Transl. Med.* **5**, 178ra39 (2013).
  191. Verdager, H., Saurí, T. & Macarulla, T. Predictive and prognostic biomarkers in personalized gastrointestinal cancer treatment. *J. Gastrointest. Oncol. Vol 8, No 3 (June 23, 2017) J. Gastrointest. Oncol. (Novel Biol. Era Precis. Med.* (2016).
  192. Guo, H. *et al.* Biomarker-Targeted Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer: Current

- Status and Perspectives. *Cells* **11**, (2022).
193. Thakur, M. K. & Gadgeel, S. M. Predictive and Prognostic Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **37**, 760–770 (2016).
  194. Liang, W., Zhong, R. & He, J. Osimertinib in EGFR-Mutated Lung Cancer. *The New England journal of medicine* vol. 384 675 (2021).
  195. Guo, R. *et al.* MET Exon 14-altered Lung Cancers and MET Inhibitor Resistance. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **27**, 799–806 (2021).
  196. Sitthideatphaiboon, P. *et al.* STK11/LKB1 Mutations in NSCLC Are Associated with KEAP1/NRF2-Dependent Radiotherapy Resistance Targetable by Glutaminase Inhibition. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **27**, 1720–1733 (2021).
  197. Di Federico, A. *et al.* Resistance to KRAS G12C Inhibition in Non-small Cell Lung Cancer. *Curr. Oncol. Rep.* **25**, 1017–1029 (2023).
  198. Jung, S. *et al.* Contribution of p53 in sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Sci. Rep.* **11**, 19667 (2021).
  199. Kim, H. R. *et al.* Co-clinical trials demonstrate predictive biomarkers for dovitinib, an FGFR inhibitor, in lung squamous cell carcinoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **28**, 1250–1259 (2017).
  200. Malchers, F. *et al.* Mechanisms of Primary Drug Resistance in FGFR1-Amplified Lung Cancer. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 5527–5536 (2017).
  201. Quintanal-Villalonga, Á. *et al.* FGFR1 and FGFR4 oncogenicity depends on n-cadherin and their co-expression may predict FGFR-targeted therapy efficacy. *EBioMedicine* **53**, 102683 (2020).
  202. Da, C. *et al.* N-cadherin promotes thyroid tumorigenesis through modulating major signaling pathways. *Oncotarget* **8**, 8131 (2017).
  203. Saadatmand, S. *et al.* Expression of cell adhesion molecules and prognosis in breast cancer. *J. Br. Surg.* **100**, 252–260 (2013).
  204. Drivalos, A. *et al.* Expression of  $\alpha 5$ -integrin,  $\alpha 7$ -integrin, E-cadherin, and N-cadherin in localized prostate cancer. in *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* vol. 34 165-e11 (Elsevier, 2016).
  205. Hui, L. *et al.* Prognostic significance of twist and N-cadherin expression in NSCLC. *PLoS One* **8**, e62171 (2013).
  206. Muramaki, M., Miyake, H., Terakawa, T., Kusuda, Y. & Fujisawa, M. Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in urothelial carcinoma of the upper urinary tract is associated with disease recurrence in patients undergoing nephroureterectomy. *Urology* **78**, 1443-e7 (2011).
  207. Seo, D. D. *et al.* Neural cadherin overexpression is a predictive marker for early postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 1112–1118 (2008).
  208. Assidi, M. High N-Cadherin Protein Expression in Ovarian Cancer Predicts Poor Survival and Triggers Cell Invasion. *Front. Oncol.* **12**, 870820 (2022).
  209. Kaszak, I. *et al.* Role of Cadherins in Cancer-A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).

210. Derycke, L. *et al.* Soluble N-cadherin in human biological fluids. *Int. J. cancer* **119**, 2895–2900 (2006).
211. Cao, Z.-Q., Wang, Z. & Leng, P. Aberrant N-cadherin expression in cancer. *Biomed. Pharmacother.* **118**, 109320 (2019).
212. Hult, J. *et al.* N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res.* **67**, 3106–3116 (2007).
213. Cavallaro, U. N-cadherin as an invasion promoter: a novel target for antitumor therapy. *Curr Opin Investig Drugs* **5**, 1274–1278 (2004).
214. Prekeris, R. The art of “cut and run”: the role of Rab14 GTPase in regulating N-cadherin shedding and cell motility. *Dev. Cell* **22**, 909–910 (2012).
215. Hsu, C.-C. *et al.* Interplay of N-Cadherin and matrix metalloproteinase 9 enhances human nasopharyngeal carcinoma cell invasion. *BMC Cancer* **16**, 1–14 (2016).
216. Cao, Z.-Q., Wang, Z. & Leng, P. Aberrant N-cadherin expression in cancer. *Biomed. Pharmacother.* **118**, 109320 (2019).
217. Qian, X. *et al.* N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties. *Oncogene* **33**, 3411–3421 (2014).
218. Tanaka, H. *et al.* Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat. Med.* **16**, 1414–1420 (2010).
219. Shintani, Y., Hollingsworth, M. A., Wheelock, M. J. & Johnson, K. R. Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH2-terminal kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Res.* **66**, 11745–11753 (2006).
220. Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L. & Aaronson, S. A. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J. Cell Biol.* **148**, 779–790 (2000).
221. Li, G., Satyamoorthy, K. & Herlyn, M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* **61**, 3819–3825 (2001).
222. Grinberg-Rashi, H. *et al.* The expression of three genes in primary non-small cell lung cancer is associated with metastatic spread to the brain. *Clin. Cancer Res.* **15**, 1755–1761 (2009).
223. Yamauchi, M. *et al.* N-cadherin expression is a potential survival mechanism of gefitinib-resistant lung cancer cells. *Am. J. Cancer Res.* **1**, 823 (2011).
224. Ambrogio, C. *et al.* KRAS Dimerization Impacts MEK Inhibitor Sensitivity and Oncogenic Activity of Mutant KRAS. *Cell* **172**, 857-868.e15 (2018).
225. Drosten, M. *et al.* Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival. *EMBO J.* **29**, 1091–1104 (2010).
226. Zheng, S. *et al.* SynergyFinder Plus: Toward Better Interpretation and Annotation of Drug Combination Screening Datasets. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **20**, 587–596 (2022).
227. LOEWE, S. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung.* **3**, 285–290 (1953).
228. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large

- gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).
229. Sherman, B. T. *et al.* DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res.* **50**, W216–W221 (2022).
  230. Li, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv: Genomics* (2013).
  231. Lai, Z. *et al.* VarDict: a novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Res.* **44**, e108 (2016).
  232. Garrison, E. & Marth, G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. (2012).
  233. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **38**, e164 (2010).
  234. Karczewski, K. J. *et al.* The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Res.* **45**, D840–D845 (2017).
  235. Peña-Chilet, M. *et al.* CSVS, a crowdsourcing database of the Spanish population genetic variability. *Nucleic Acids Res.* **49**, D1130–D1137 (2021).
  236. Tate, J. G. *et al.* COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* **47**, D941–D947 (2019).
  237. Cheng, D. T. *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. Diagnostics* **17**, 251–264 (2015).
  238. Tamborero, D. *et al.* Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations. *Genome Med.* **10**, 25 (2018).
  239. Sondka, Z. *et al.* The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 696–705 (2018).
  240. Talevich, E., Shain, A. H., Botton, T. & Bastian, B. C. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLOS Comput. Biol.* **12**, 1–18 (2016).
  241. Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A. & Kingsford, C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods* **14**, 417–419 (2017).
  242. Soneson, C., Love, M. I. & Robinson, M. D. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences [version 2; peer review: 2 approved]. *F1000Research* **4**, (2016).
  243. Schubert, M. *et al.* Perturbation-response genes reveal signaling footprints in cancer gene expression. *Nat. Commun.* **9**, 20 (2018).
  244. Package, T., Heatmaps, T. P. & Kolde, A. R. Package ‘pheatmap’. 1–8 (2022).
  245. Paik, P. K. *et al.* A Phase Ib Open-Label Multicenter Study of AZD4547 in Patients with Advanced Squamous Cell Lung Cancers. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 5366–5373 (2017).
  246. Gavine, P. R. *et al.* AZD4547: An Orally Bioavailable, Potent, and Selective Inhibitor of the

- Fibroblast Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Family. *Cancer Res.* **72**, 2045–2056 (2012).
247. Xu, P. *et al.* NOS1 inhibits the interferon response of cancer cells by S-nitrosylation of HDAC2. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**, 483 (2019).
248. Chen, F. Expression and Clinical Value Analysis of CSF2RA in Malignant Tumor Based on Database. *J. Biosci. Med.* **09**, 149–157 (2021).
249. Guerrero-Rodríguez, S. L., Mata-Cruz, C., Pérez-Tapia, S. M. & Velasco-Velázquez, M. A. Role of CD36 in cancer progression, stemness, and targeting. *Front. cell Dev. Biol.* **10**, 1079076 (2022).
250. Vargas, T. *et al.* ColoLipidGene: signature of lipid metabolism-related genes to predict prognosis in stage-II colon cancer patients. *Oncotarget; Vol 6, No 9* (2015).
251. Zhang, B. *et al.* ARL14 as a Prognostic Biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Inflamm. Res.* **14**, 6557–6574 (2021).
252. Li, Y., Wang, C., Gao, Y. & Zhou, L. Identification and Validation of PIK3CA as a Marker Associated with Prognosis and Immune Infiltration in Renal Clear Cell Carcinoma. *J. Oncol.* **2021**, 3632576 (2021).
253. Papadakos, S. P., Stergiou, I. E., Gkolemi, N., Arvanitakis, K. & Theocharis, S. Unraveling the Significance of EPH/Ephrin Signaling in Liver Cancer: Insights into Tumor Progression and Therapeutic Implications. *Cancers (Basel)*. **15**, (2023).
254. Fearon, A. E. *et al.* PHLDA1 Mediates Drug Resistance in Receptor Tyrosine Kinase-Driven Cancer. *Cell Rep.* **22**, 2469–2481 (2018).
255. Pyszynska, B. *et al.* Multifunctional protein APPL2 contributes to survival of human glioma cells. *Mol. Oncol.* **7**, 67–84 (2013).
256. Lee, K.-L. *et al.* Sustaining the Activation of EGFR Signal by Inflammatory Cytokine IL17A Prompts Cell Proliferation and EGFR-TKI Resistance in Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. **15**, (2023).
257. Stengel, A. *et al.* Whole transcriptome sequencing detects a large number of novel fusion transcripts in patients with AML and MDS. *Blood Adv.* **4**, 5393–5401 (2020).
258. Lilljebjörn, H., Orsmark-Pietras, C., Mitelman, F., Hagström-Andersson, A. & Fioretos, T. Transcriptomics paving the way for improved diagnostics and precision medicine of acute leukemia. *Semin. Cancer Biol.* **84**, 40–49 (2022).
259. Feng, L., Zhang, H., Wang, W., Zheng, J. & Chen, D. Compartmentalizing proximal FGFR1 signaling in ovine placental artery endothelial cell caveolae. *Biol. Reprod.* **87**, 40 (2012).
260. Feng, L. *et al.* Caveolin-1 orchestrates fibroblast growth factor 2 signaling control of angiogenesis in placental artery endothelial cell caveolae. *J. Cell. Physiol.* **227**, 2480–2491 (2012).
261. Wang, J. *et al.* Ligand-associated ERBB2/3 activation confers acquired resistance to FGFR inhibition in FGFR3-dependent cancer cells. *Oncogene* **34**, 2167–2177 (2015).
262. Breslin, S. & O’Driscoll, L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget* **7**, 45745–45756 (2016).
263. Manchado, E. *et al.* A combinatorial strategy for treating KRAS-mutant lung cancer.

- Nature* **534**, 647–651 (2016).
264. Ricciuti, B. *et al.* Comparative Analysis and Isoform-Specific Therapeutic Vulnerabilities of KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **28**, 1640–1650 (2022).
  265. Lito, P. *et al.* Disruption of CRAF-mediated MEK activation is required for effective MEK inhibition in KRAS mutant tumors. *Cancer Cell* **25**, 697–710 (2014).
  266. Krauthammer, M. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat. Genet.* **47**, 996–1002 (2015).
  267. Yadav, B., Wennerberg, K., Aittokallio, T. & Tang, J. Searching for Drug Synergy in Complex Dose–Response Landscapes Using an Interaction Potency Model. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **13**, 504–513 (2015).
  268. Carvajal-Hausdorf, D. E., Schalper, K. A., Neumeister, V. M. & Rimm, D. L. Quantitative measurement of cancer tissue biomarkers in the lab and in the clinic. *Lab. Investig.* **95**, 385–396 (2015).
  269. Gavini K, P. K. Western Blot. *reasure Island (FL): StatPearls Publishing* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542290/> (2023).
  270. Yagüe, P. Generación de modelos preclínicos predictivos para la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas para pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico con mutación en KRAS. (Universidad Complutense de Madrid, 2022).
  271. Parra, E. R. & Hernández Ruiz, S. Western Blot as a Support Technique for Immunohistochemistry to Detect Programmed Cell Death Ligand 1 Expression. in *Lung Cancer: Methods and Protocols* (ed. Santiago-Cardona, P. G.) 49–57 (Springer US, 2021). doi:10.1007/978-1-0716-1278-1\_5.
  272. de Gonzalo-Calvo, D. *et al.* Consensus guidelines for the validation of qRT-PCR assays in clinical research by the CardioRNA consortium. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **24**, 171–180 (2022).
  273. Rocha-Martins, M., Njaine, B. & Silveira, M. S. Avoiding Pitfalls of Internal Controls: Validation of Reference Genes for Analysis by qRT-PCR and Western Blot throughout Rat Retinal Development. *PLoS One* **7**, e43028 (2012).
  274. Jung, S.-H. *et al.* Polycystin-1 Enhances Stemness Potential of Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
  275. Lu, Y. *et al.* Case report: EGFR-mutant lung adenocarcinoma with the TP53 and RB1 mutations showed resistance to TKI therapy. *Annals of palliative medicine* vol. 10 12886–12893 (2021).
  276. de Bruin, E. C. *et al.* Reduced NF1 expression confers resistance to EGFR inhibition in lung cancer. *Cancer Discov.* **4**, 606–619 (2014).
  277. van der Wekken, A. J. *et al.* Overall survival in EGFR mutated non-small-cell lung cancer patients treated with afatinib after EGFR TKI and resistant mechanisms upon disease progression. *PLoS One* **12**, e0182885 (2017).
  278. Cowell, J. K. & Hu, T. Mechanisms of resistance to FGFR1 inhibitors in FGFR1-driven leukemias and lymphomas: implications for optimized treatment. *Cancer drug Resist. (Alhambra, Calif.)* **4**, 607–619 (2021).
  279. Judd, J. *et al.* Characterization of KRAS mutation subtypes in non-small cell lung cancer.

- Mol. Cancer Ther.* **20**, 2577–2584 (2021).
280. Yang, Y., Li, S., Wang, Y., Zhao, Y. & Li, Q. Protein tyrosine kinase inhibitor resistance in malignant tumors: molecular mechanisms and future perspective. *Signal Transduct. Target. Ther.* **7**, 329 (2022).
  281. Li, B. *et al.* Conjoined hyperactivation of the RAS and PI3K pathways in advanced GIST. *J. Clin. Oncol.* **34**, e22520–e22520 (2016).
  282. Papadimitrakopoulou, V. A. *et al.* Analysis of resistance mechanisms to osimertinib in patients with EGFR T790M advanced NSCLC from the AURA3 study. *Ann. Oncol.* **29**, viii741 (2018).
  283. Niemantsverdriet, M. *et al.* KRAS Mutation as a Resistance Mechanism to BRAF/MEK Inhibition in NSCLC. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* vol. 13 e249–e251 (2018).
  284. Lim, T. K. H. *et al.* KRAS G12C in advanced NSCLC: Prevalence, co-mutations, and testing. *Lung Cancer* **184**, (2023).
  285. Cavalloni, G. *et al.* Establishment of a patient-derived intrahepatic cholangiocarcinoma xenograft model with KRAS mutation. *BMC Cancer* **16**, 90 (2016).
  286. Pardo-Sánchez, J. M. *et al.* Increased Tumor Growth Rate and Mesenchymal Properties of NSCLC-Patient-Derived Xenograft Models during Serial Transplantation. *Cancers (Basel)*. **13**, (2021).
  287. Lee, T.-G., Kang, H.-M., Kim, S. Y., Kim, H.-R. & Kim, C. H. The combination of osimertinib with Raf inhibitor overcomes osimertinib resistance induced by KRAS amplification in EGFR-mutated lung cancer cells. *Exp. Cell Res.* **430**, 113722 (2023).
  288. Yuan, H. *et al.* FGF2/FGFR1 regulates autophagy in FGFR1-amplified non-small cell lung cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 72 (2017).
  289. Kim, S. Y. *et al.* Acquired resistance to LY2874455 in FGFR2-amplified gastric cancer through an emergence of novel FGFR2-ACSL5 fusion. *Oncotarget* **8**, 15014–15022 (2017).
  290. Imbeault, S. *et al.* The extracellular matrix controls gap junction protein expression and function in postnatal hippocampal neural progenitor cells. *BMC Neurosci.* **10**, 13 (2009).
  291. Daulagala, A. C. & Kourtidis, A. ECM Substrates Impact RNAi Localization at Adherens Junctions of Colon Epithelial Cells. *Cells* **11**, (2022).
  292. Falk, M. M., Kells, R. M. & Berthoud, V. M. Degradation of connexins and gap junctions. *FEBS Lett.* **588**, 1221–1229 (2014).
  293. Hastings, J. F., Skhinas, J. N., Fey, D., Croucher, D. R. & Cox, T. R. The extracellular matrix as a key regulator of intracellular signalling networks. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 82–92 (2019).
  294. Stains, J. P. & Civitelli, R. Gap junctions regulate extracellular signal-regulated kinase signaling to affect gene transcription. *Mol. Biol. Cell* **16**, 64–72 (2005).
  295. Miyamoto, Y., Sakane, F. & Hashimoto, K. N-cadherin-based adherens junction regulates the maintenance, proliferation, and differentiation of neural progenitor cells during development. *Cell Adh. Migr.* **9**, 183–192 (2015).
  296. Nguyen, T. *et al.* Enhanced cell–cell contact stability and decreased N-cadherin-mediated migration upon fibroblast growth factor receptor-N-cadherin cross talk. *Oncogene* **38**,

- 6283–6300 (2019).
297. Yue, S. *et al.* FGFR-TKI resistance in cancer: current status and perspectives. *J. Hematol. Oncol.* **14**, 23 (2021).
298. Englinger, B. *et al.* Abstract 2119: Acquired nintedanib resistance in FGFR1-driven small cell but not non-small cell lung cancer is mediated by ABCB1. *Cancer Res.* **76**, 2119 (2016).
299. Lebedev, T. *et al.* Growth factor signaling predicts therapy resistance mechanisms and defines neuroblastoma subtypes. *Oncogene* **40**, 6258–6272 (2021).
300. Dekker, Y., Le Dévédec, S. E., Danen, E. H. J. & Liu, Q. Crosstalk between Hypoxia and Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Genes (Basel)*. **13**, (2022).
301. Sadrkhanloo, M. *et al.* STAT3-EMT axis in tumors: Modulation of cancer metastasis, stemness and therapy response. *Pharmacol. Res.* **182**, 106311 (2022).
302. Wang, X. *et al.* The Secretome Engages STAT3 to Favor a Cytokine-rich Microenvironment in Mediating Acquired Resistance to FGFR Inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* **18**, 667–679 (2019).
303. Liu, Z., Ma, L., Sun, Y., Yu, W. & Wang, X. Targeting STAT3 signaling overcomes gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cell Death Dis.* **12**, 561 (2021).
304. Zheng, Q. *et al.* A novel STAT3 inhibitor W2014-S regresses human non-small cell lung cancer xenografts and sensitizes EGFR-TKI acquired resistance. *Theranostics* **11**, 824–840 (2021).
305. Adachi, Y. *et al.* Inhibition of FGFR Reactivates IFN $\gamma$  Signaling in Tumor Cells to Enhance the Combined Antitumor Activity of Lenvatinib with Anti-PD-1 Antibodies. *Cancer Res.* **82**, 292–306 (2022).
306. Zhang, Y. *et al.* Activation of PGK1 under hypoxic conditions promotes glycolysis and increases stem cell-like properties and the epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma cells via the AKT signalling pathway. *Int. J. Oncol.* **57**, 743–755 (2020).
307. Kei, I. *et al.* MP72-05 IL-6-triggered positive feedback loop for NF $\kappa$ B signaling induces TKI resistance through metabolic alterations on renal cell carcinoma cells. *J. Urol.* **199**, e953–e954 (2018).
308. Noel, B. M. *et al.* Multiomic Profiling of Tyrosine Kinase Inhibitor-Resistant K562 Cells Suggests Metabolic Reprogramming To Promote Cell Survival. *J. Proteome Res.* **18**, 1842–1856 (2019).
309. Rysman, E. *et al.* De novo Lipogenesis Protects Cancer Cells from Free Radicals and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation. *Cancer Res.* **70**, 8117–8126 (2010).
310. Tan, W. *et al.* TNF- $\alpha$  is a potential therapeutic target to overcome sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine* **40**, 446–456 (2019).
311. Gimenez-Xavier, P. *et al.* Deep analysis of acquired resistance to FGFR1 inhibitor identifies MET and AKT activation and an expansion of AKT1 mutant cells. *Oncotarget* **9**, 31549–31558 (2018).
312. Fumarola, C. *et al.* Expanding the Arsenal of FGFR Inhibitors: A Novel Chloroacetamide

- Derivative as a New Irreversible Agent With Anti-proliferative Activity Against FGFR1-Amplified Lung Cancer Cell Lines. *Front. Oncol.* **9**, 179 (2019).
313. Bockorny, B. *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.* **17**, 1526–1539 (2018).
314. Niepel, M. *et al.* Common and cell-type specific responses to anti-cancer drugs revealed by high throughput transcript profiling. *Nat. Commun.* **8**, 1186 (2017).
315. Ihle, N. T. *et al.* Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 228–239 (2012).
316. Bordi, P., Del Re, M., Danesi, R. & Tiseo, M. 2PD Monitoring of secondary drug resistance mutations in circulating tumor DNA of patients with advanced ALK positive NSCLC. *J. Thorac. Oncol.* **11**, S57 (2016).
317. Fu, Y. *et al.* Advanced NSCLC Patients With EGFR T790M Harboring TP53 R273C or KRAS G12V Cannot Benefit From Osimertinib Based on a Clinical Multicentre Study by Tissue and Liquid Biopsy. *Frontiers in Oncology* vol. 11 (2021).
318. Fukuda, K. *et al.* Trametinib overcomes KRAS-G12V-induced osimertinib resistance in a leptomeningeal carcinomatosis model of EGFR-mutant lung cancer. *Cancer Sci.* **112**, 3784–3795 (2021).
319. Liu, Y. *et al.* Enhancing the Therapeutic Efficacy of KRAS(G12C) Inhibitors in Lung Adenocarcinoma Cell Models by Cotargeting the MAPK Pathway or HSP90. *J. Oncol.* **2021**, 2721466 (2021).
320. Wlodkowic, D., Telford, W., Skommer, J. & Darzynkiewicz, Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol.* **103**, 55–98 (2011).
321. Park, J. & Baek, S. H. Combination Therapy with Cinnamaldehyde and Hyperthermia Induces Apoptosis of A549 Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells via Regulation of Reactive Oxygen Species and Mitogen-Activated Protein Kinase Family. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
322. Londoño-Berrio, M., Castro, C., Cañas, A., Ortiz, I. & Osorio, M. Advances in Tumor Organoids for the Evaluation of Drugs: A Bibliographic Review. *Pharmaceutics* vol. 14 (2022).
323. Pham, N.-A. *et al.* Patient-derived tumor xenograft and organoid models established from resected pancreatic, duodenal and biliary cancers. *Sci. Rep.* **11**, 10619 (2021).
324. Chae, Y. K. *et al.* Phase II Study of AZD4547 in Patients With Tumors Harboring Aberrations in the FGFR Pathway: Results From the NCI-MATCH Trial (EAY131) Subprotocol W. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **38**, 2407–2417 (2020).
325. Sanchez-Céspedes, M. *et al.* Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res.* **62**, 3659–3662 (2002).
326. Eichner, L. J. *et al.* HDAC3 is critical in tumor development and therapeutic resistance in Kras-mutant non-small cell lung cancer. *Sci. Adv.* **9**, eadd3243 (2023).
327. Bridgeman, V. L. *et al.* Preclinical Evidence That Trametinib Enhances the Response to Antiangiogenic Tyrosine Kinase Inhibitors in Renal Cell Carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 172–183 (2016).

328. Blumenschein, G. R. J. *et al.* A randomized phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib (GSK1120212) compared with docetaxel in KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC)<sup>†</sup>. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **26**, 894–901 (2015).
329. Gadgeel, S. M. *et al.* Phase II Study of Docetaxel and Trametinib in Patients with KRAS Mutation Positive Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC; SWOG S1507, NCT-02642042). *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **29**, 3641–3649 (2023).
330. Oxnard, G. R. *et al.* TATTON: a multi-arm, phase Ib trial of osimertinib combined with selumetinib, savolitinib, or durvalumab in EGFR-mutant lung cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **31**, 507–516 (2020).
331. Huijberts, S. *et al.* Phase I study of afatinib plus selumetinib in patients with KRAS mutation-positive colorectal, non-small cell lung and pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* **38**, 3613 (2020).
332. Huijberts, S. C. F. A. *et al.* Phase I study of lapatinib plus trametinib in patients with KRAS-mutant colorectal, non-small cell lung, and pancreatic cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **85**, 917–930 (2020).
333. Arbour, K. C. *et al.* Phase 1 Clinical Trial of Trametinib and Ponatinib in Patients With NSCLC Harboring KRAS Mutations. *JTO Clin. Res. reports* **3**, 100256 (2022).
334. Skoulidis, F. *et al.* Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N. Engl. J. Med.* **384**, 2371–2381 (2021).
335. Dhillon, S. Adagrasib: First Approval. *Drugs* **83**, 275–285 (2023).
336. Garutti, M. *et al.* BRAF and MEK Inhibitors and Their Toxicities: A Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. **15**, (2022).
337. Lanman, B. A. *et al.* Discovery of a Covalent Inhibitor of KRASG12C (AMG 510) for the Treatment of Solid Tumors. *J. Med. Chem.* **63**, 52–65 (2020).
338. Chen, C. *et al.* Synthesis of Adagrasib (MRTX849), a Covalent KRASG12C Inhibitor Drug for the Treatment of Cancer. *Org. Lett.* **25**, 944–949 (2023).
339. Zhang, S. S., Lee, A. & Nagasaka, M. CodeBreak 200: Sotorasib Has Not Broken the KRAS(G12C) Enigma Code. *Lung Cancer (Auckland, N.Z.)* **14**, 27–30 (2023).
340. Ryan, M. B. *et al.* Vertical Pathway Inhibition Overcomes Adaptive Feedback Resistance to KRASG12C Inhibition. *Clin. Cancer Res.* **26**, 1633–1643 (2020).
341. Misale, S. *et al.* KRAS G12C NSCLC Models Are Sensitive to Direct Targeting of KRAS in Combination with PI3K Inhibition. *Clin. Cancer Res.* **25**, 796–807 (2019).
342. Macaya, I. *et al.* Signature-driven repurposing of Midostaurin for combination with MEK1/2 and KRASG12C inhibitors in lung cancer. *Nat. Commun.* **14**, 6332 (2023).
343. Molina-Arcas, M. *et al.* Development of combination therapies to maximize the impact of KRAS-G12C inhibitors in lung cancer. *Sci. Transl. Med.* **11**, (2019).
344. Lau, D. K., Jenkins, L. & Weickhardt, A. Mechanisms of acquired resistance to fibroblast growth factor receptor targeted therapy. *Cancer drug Resist. (Alhambra, Calif.)* **2**, 568–579 (2019).

