

DISCURSO DE TOMA DE POSESIÓN COMO ACADÉMICO DE HONOR DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Excma. Sra. Presidenta
Excmo. Sr. Presidente de Honor
Excmos Sras. y Srs. Académicos
Mi querido amigo Dr. Mariano Esteban
Señoras y Señores

Es para mi un gran honor haber sido nombrado Académico de Honor de esta ilustre Real Academia Nacional de Farmacia.

Por ello quiero agradecer en primer lugar al Dr. Mariano Esteban por iniciar la propuesta de nombramiento, a la Presidenta, Dra. María Teresa Miras-Portugal y Junta de Gobierno por aceptarla y al resto de los miembros de la Academia por el apoyo que le han otorgado.

Mi discurso de toma de posesión va a centrarse en hacer un breve recorrido histórico desde los albores de la oncología molecular, con especial énfasis en el descubrimiento y aislamiento de los primeros oncogenes humanos, hasta, dando un salto de casi treinta años, llegar a la situación actual en la que, gracias a la revolución tecnológica que ha potenciado la secuenciación del genoma humano, ya es posible determinar de forma casi rutinaria el genoma de tumores individuales. Pudiendo así, pasar de identificar la primera mutación asociada con un cáncer humano, a conocer en menos de tres décadas, el catálogo completo de todas las mutaciones acumuladas en cada tumor.

La parte final de mi discurso la dedicaré a hacer un breve análisis de cómo, en mi opinión, esta auténtica avalancha de conocimiento e información puede cambiar la práctica clínica en los próximos años, quizás pudiendo llegar algún día, en un futuro no demasiado lejano, a esa medicina personalizada, de la que con tanta ligereza hablan los medios de comunicación y algún que otro político en estos tiempos, como si ya fuera una realidad.

La Oncología Molecular tiene sus orígenes en la identificación de oncogenes, es decir genes capaces de causar cáncer, en virus tanto DNA como es el antígeno T del virus SV40 y el antígeno mT del virus del poliovirus como RNA como es el oncogene *v-src* presente en retrovirus aviarios. A pesar de los avances científicos obtenidos con el estudio de estos oncogenes víricos, gran parte de la comunidad científica internacional, especialmente el mundo clínico, no dio excesivo valor a estas investigaciones por creer que no tenían relación con los tumores humanos.

Este desinterés fue desapareciendo cuando en 1975 los doctores Michael Bishop y Harold Varmus de la universidad de California en San Francisco demostraron que las secuencias del oncogene *v-src* no eran de origen vírico, sino de origen celular, es decir habían sido “transducidas” por estos retrovirus aviares del genoma del pollo. Al año siguiente, estos investigadores demostraron que las secuencias celulares homólogas al oncogén *v-src* estaban conservadas durante la evolución por lo que se encontraban también presentes en el genoma humano, si bien al igual que en el pollo, en un estadio “no oncogenico”, por lo que se les dio el nombre de “proto-oncogen”. Por todas estas investigaciones, Michael Bishop y Harold Varmus fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1989.

Mientras las investigaciones con el oncogén *v-src* se iban abriendo camino, otros investigadores obtenían resultados similares con oncogenes retrovirales aislados de especies de mamíferos, como son los oncogenes *v-ras* aislados de tumores murinos o los oncogenes *v-fes* y *v-fms* aislados de tumores de gatos. También merece mención especial el oncogene *v-ssv* aislado de una subespecie de macacos, los monos lanudos, y que en 1993 se demostró que codificaba el factor de crecimiento de plaquetas (PDGF en las siglas inglesas), descubrimiento que representó la primera identificación del producto de un oncogén vírico con una molécula humana de actividad fisiológica ya conocida.

Si bien todas estas investigaciones establecieron que el genoma humano era portador de múltiples proto-oncogenes que tenían el potencial de convertirse en oncogenes, no demostraron que ninguno de ellos lo hiciera, especialmente dado que las infecciones por retrovirus en seres humanos son prácticamente inexistentes. No obstante, estas investigaciones fueron cruciales para el desarrollo de la Oncología Molecular, ya que establecieron las bases conceptuales para determinar si los tumores humanos podrían ser portadores de oncogenes independientemente de los retrovirus.

Cuando en 1978 conseguí independizarme y formar mi propio grupo de investigación, decidí mantener una línea de investigación centrada en los oncogenes felinos *v-fes* y *v-fms* con objeto de conseguir unos niveles de productividad que me aseguraran de cierta forma mi futuro como investigador. Al mismo tiempo decidí explorar, como línea de investigación mucho más interesante, y sin duda mucho más arriesgada, si los tumores humanos eran portadores o no de oncogenes.

En esta decisión jugaron un papel fundamental las investigaciones que, en aquel momento, estaba llevando a cabo el Dr. Ángel Pellicer en el laboratorio del Dr. Richard Axel de la Universidad de Columbia en Nueva York, como parte de su formación postdoctoral. Ángel me contaba en largas conversaciones al final del día cómo había conseguido transferir el gen de la timidina quinasa humano a células de ratón deficientes en este enzima usando DNA genómico total. Resultados que luego aparecieron en la prestigiosa revista *Cell*. Según proféticas palabras de Ángel: “*Si se tiene un sistema de selección lo suficientemente robusto, es posible aislar mediante transfección, cualquier gen humano*”.

Por aquel entonces yo disponía de una línea celular derivada de células de pulmón de visón transformadas por una copia única del oncogén de origen felino *v-fes*. Ni corto ni perezoso me cogí el *Metroliner* un fin de semana y me fui al laboratorio de Ángel para aprender a aislar DNA genómico y hacer transfecciones tal y como las hacía él. Ya de vuelta en mi laboratorio, repetí su experimento pero usando la transformación morfológica como criterio de selección. A las dos semanas aparecieron en las células receptoras (células NIH3T3 de origen murino) unos preciosos focos de células transformadas, pudiendo demostrar unos días después que todos aquellos focos contenían el oncogén *v-fes*. Estos resultados establecían las bases experimentales para intentar el asalto al descubrimiento de los oncogenes humanos, asumiendo -por supuesto- que existieran.

La primera ronda de transfecciones usando DNA genómico aislado de células con una morfología muy distintiva (células muy refractarias etc.) no proporcionó ningún resultado. Sin embargo, al segundo intento, obtuve focos de células transformadas con DNA aislado de una célula derivada de un cáncer de vejiga denominada T24. Los meses siguientes, además de seguir ensayando más DNAs aislados de otras líneas celulares, así como directamente de tejido tumoral, tarea llevada a cabo por mi primera investigadora posdoctoral, la Dra. Simonetta Pulciani, los dediqué a identificar las secuencias oncogénicas a nivel molecular. Afortunadamente, el genoma humano contiene secuencias repetitivas ubicadas cada pocas kilobases, gracias a las cuales pudimos identificar, sin mayores dificultades, las secuencias humanas transformantes.

En aquel momento, el Dr. Eugenio Santos se incorporó al laboratorio con la tarea, nada fácil por aquel entonces, de clonar dichas secuencias. A pesar de nuestra falta de experiencia, Eugenio consiguió clonar las secuencias transformantes, es decir el primer oncogén humano, en tiempo récord, pudiendo publicar nuestros resultados a la par que los grupos del Dr. Robert Weinberg y

del Dr. Michael Wigler, nuestros acompañantes en tan excitante carrera científica.

Dos meses después de esta primera publicación, publicamos la homología de nuestras secuencias transformantes con el oncogén retrovívico *v-H-ras* y sólo cuatro meses después, identificamos el mecanismo de activación de este oncogén humano, mediante una sola mutación puntual en las secuencias codificantes: la primera mutación asociada al cáncer humano.

Antes de acabar el año de 1982, designado como el año del oncogén por la revista *Nature*, publicamos este trabajo considerado como crucial en aquel momento, ya que demostramos que estos oncogenes estaban también presentes en tumores directamente obtenidos de pacientes, acallando así a importantes sectores de la comunidad científica internacional que decían que estas mutaciones eran consecuencia del crecimiento *in vitro* de las líneas tumorales humanas y que no tenían relación directa con el cáncer humano. Finalmente, un año después, al principio de 1984, publicamos lo que considero como el cierre de esta época: demostrar que la mutación responsable de la activación oncogénica del oncogen humano *K-RAS* estaba presente en el tejido tumoral, pero no en el tejido normal adyacente de un paciente con cáncer de pulmón. Estos resultados sirvieron para eliminar cualquier posibilidad de que estas mutaciones no estuvieran específicamente asociadas con el proceso tumoral.

En las dos décadas siguientes se identificaron más de trescientos genes mutados en distintos tipos de tumores, incluyendo tanto oncogenes como genes supresores de tumores. Estos oncogenes fueron identificados mediante aproximaciones experimentales muy distintas como fueron: translocaciones cromosómicas (*MYC*, *BCL2*, *BCR-ABL*), amplificaciones (*GLI*), transfecciones (*TRK*, *RET*) y sobre todo deleciones cromosómicas (*RB*, *PI6*, *PTEN*) en el caso de los genes supresores de tumores.

Esta situación, en la que los genes implicados en cáncer eran identificados uno a uno, ha cambiado radicalmente con la llegada de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, también denominadas “Deep sequencing” o “Ultrasequencing”, desarrolladas gracias al proyecto del desciframiento del genoma humano, completado a finales del año 2000. A partir de entonces los oncogenes se identifican gracias al uso de secuenciación masiva, primero de familias de genes, principalmente quinasas, como fue la identificación del oncogén *B-RAF* en 2002, una quinasa selectiva de residuos serina y treonina y del gen codificante de la subunidad catalítica de la fosfatidilinositol-3 quinasa (*PI3KCA*) en 2004.

Ya en 2008 somos testigos de secuenciaciones masivas del genoma centradas en distintos tipos de tumores, especialmente aquéllos más agresivos y con menos esperanza de supervivencia a cinco años como son los tumores de pulmón, los glioblastomas multiformes y sobre todo los adenocarcinomas ductales de páncreas, un tumor iniciado por mutaciones en el oncogén *K-RAS*, como demostró también el Dr. Manuel Perucho hace ya muchos años, y que cuenta con el menor porcentaje de supervivencia a cinco años.

¿Dónde nos va a llevar esta capacidad de secuenciar cientos, si no ya miles, de genomas tumorales?. ¿Será posible determinar el genoma de un tumor como un procedimiento rutinario en nuestros hospitales?. Hoy en día, la secuenciación del genoma de un tumor (regiones exómicas exclusivamente, pero que representan una cobertura de más del $\geq 95\%$ de todas las mutaciones) cuesta poco más de 1.000 euros y su análisis puede ser completado en 2-3 semanas. Es decir, como prueba diagnóstica, la secuencia del exoma de un tumor humano está ya al nivel, en cuanto a coste y tiempo, de un PET-TAC. Estos parámetros serán mejorados sustancialmente en un futuro próximo debido a la reducción del coste a 500 euros por exoma, gracias a nuevas tecnologías de secuenciación, y al tiempo de análisis que se reducirá a 3-4 días gracias a la mejora en la capacidad de computación.

Ahora bien, ¿cuál es la utilidad clínica, en este momento, de conocer la secuencia del genoma de un tumor determinado?, es decir ¿de conocer todas (más del $\geq 95\%$) las mutaciones presentes en dicho tumor?. Todos somos conscientes de que conocer las armas del enemigo no es suficiente para poder vencerle. Para ello tenemos que desarrollar armas mejores y más potentes.

Pero antes de llegar a este último punto permítanme que les describa un experimento que ilustra cuán lejos hemos llegado en el conocimiento de las causas del cáncer y cómo ha progresado la Oncología Molecular, esa rama de la ciencia que apenas cuenta con medio siglo de vida. Investigadores del *Sanger Centre* en el Reino Unido han secuenciado el exoma de 32 regiones de un solo tumor: un adenocarcinoma ductal de páncreas. Mientras

siete de las regiones secuenciadas no contenían mutaciones (es decir se trataba de tejido normal), quince regiones contenían el mismo patrón de mutaciones consistente en mutaciones que afectaban treinta y cinco genes mutados. Es decir, se trataba del tumor primario o mayoritario. El resto de las regiones secuenciadas no solo contenían estos treinta y cinco genes mutados sino que presentaban mutaciones adicionales hasta llegar, en ciertas regiones a más de

sesenta genes mutados, regiones que obviamente correspondían con áreas tumorales que habían incrementado su capacidad oncogénica respecto del tumor primario. Estos investigadores también analizaron tres metástasis al peritoneo, al hígado y al pulmón. Si bien las metástasis a hígado y pulmón provenían de las regiones más mutadas, la metástasis del peritoneo era prácticamente idéntica al tumor primario. Estos resultados, impensables de obtener hace sólo cuatro o cinco años, demuestran hasta donde hemos llegado gracias a la Oncología Molecular y a las técnicas de ultrasecuenciación.

Ahora bien, la pregunta que se desprende de éstos, y otros resultados similares obtenidos por otros investigadores implicados en secuenciación masiva de tumores es ¿qué hacemos con un tumor primario con 35 genes mutados y con unas metástasis con mas de 60 genes mutados? La respuesta es, desgraciadamente, bastante simple: En este momento poca cosa. Tratar al paciente con agentes citotóxicos para prolongar un poco la supervivencia.

Un análisis funcional de los genes mutados en éste y otros adenocarcinomas de páncreas ha revelado que, al menos, doce rutas de señalización distintas están afectadas en estos tumores. Para complicar aún un poco más la situación, en cada tumor los genes mutados dentro de una misma ruta de señalización son distintos con la excepción de *K-RAS*, muy probablemente, el oncogén iniciador. Así pues, el reto para el futuro estriba en determinar si será necesario bloquear todas estas vías de señalización mutadas, o si será suficiente con bloquear unas pocas, las más relevantes.

Es decir: ¿Cuántas dianas será necesario inhibir para parar/frenar el crecimiento de estos tumores? ¿Cuántos fármacos serán necesarios?. Incluso nos podemos preguntar ¿Será posible desarrollar fármacos contra todas, o al menos las principales rutas mutadas en cáncer? Si bien utilizar combinaciones de fármacos es algo ya utilizado en clínica y generalmente aceptado dentro de la comunidad clínica internacional, la posibilidad de tener que usar cócteles de doce o más fármacos es algo que aún no se considera factible. Como decía anteriormente, conocer las armas del enemigo no es suficiente para vencerle. Hay que tener armas mas poderosas y utilizarlas de forma eficaz y juiciosa.

Desgraciadamente la oncología actual tiene un *armamentarium* muy limitado. Aparte de los agentes citotóxicos, el número de fármacos dirigidos contra dianas moleculares es todavía muy reducido y, salvo excepciones, de poca eficiencia terapéutica. Por ejemplo, en el capítulo de los agentes biológicos, en su gran mayoría anticuerpos monoclonales, sólo existen tres fármacos dirigidos contra

tumores sólidos, Transtuzumab (Herceptina®), Bevacuzimab (Avastin®) y Cetuximab (Erbix®).

En cuanto a quimiotipos de bajo peso molecular el *armamentarium* en un poco más extenso, con poco más de diez fármacos ya aprobados (sin contar los fármacos de segunda generación”). Desgraciadamente, ninguno de ellos ha igualado la eficacia del primer fármaco, Imatinib (Gleevec®), utilizado contra la leucemia mielógena crónica y contra ciertos sarcomas de partes blandas (GIST). Es muy probable que estos tumores tengan una complejidad mutacional mucho más reducida que los tumores sólidos anteriormente mencionados. De hecho, Imatinib ya no es efectivo cuando la leucemia mielógena crónica entra en fase blástica.

Como consuelo nos queda saber que cada vez los tiempos transcurridos desde que se identifica la diana mutada hasta que se aprueba el fármaco selectivo van disminuyendo. Desde los cuarenta y un años transcurridos desde que se identificó el cromosoma de Filadelfia característico de la leucemia mielógena crónica, hasta los 5 años transcurridos desde que se identificó la fusión del oncogén *ELM4-ALK* en cáncer de pulmón hasta la aprobación del inhibidor Crizotinib por la *Food and Drug Administration* (FDA).

El futuro de la Oncología va a depender del uso multidisciplinar de técnicas de diagnóstico, incluyendo técnicas de imagen (TAC, PET), anatomopatología clásica, biomarcadores moleculares, ultrasecuenciación, incluida la ultrasecuenciación epigenética ya en avanzado nivel de desarrollo, etc. etc. Pero es evidente, que todas estas tecnologías tendrán un impacto relativamente menor, sobre todo en aquellos tumores detectados en estadios avanzados, sino incrementamos y mejoramos el *armamentarium* terapéutico. Sólo un mejor conocimiento de la biología de las rutas de señalización implicadas en cáncer, junto con una mejor y más rápida química médica y una mejor farmacología que conviertan a buenos inhibidores en buenos fármacos en el menor tiempo posible, nos podrá dar garantías de seguir avanzando en la lucha contra el cáncer, en particular aquellos cánceres para los cuales no existen aún terapias eficaces.

Por lo tanto, es evidente que el futuro del cáncer va a depender, en gran medida de la contribución que hagan las ciencias farmacéuticas, representadas en esta Real Academia, para incrementar y mejorar el *armamentarium* terapéutico contra el cáncer.

He dicho.