

Título: Personalización del tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda pediátrica mediante dynamic BH3 profiling

Equipo investigador: Joan Montero (Universidad de Barcelona/IBEC), Clara Alcon (IBEC), Albert Manzano (IBEC)

Resumen:

El tipo de cáncer pediátrico más común es la leucemia linfoblástica aguda (LLA). Los pacientes recaídos presentan pocas opciones terapéuticas, una mala prognosis y resistencia a la muerte celular por apoptosis. En este proyecto usaremos un nuevo ensayo funcional llamado *dynamic BH3 profiling* (o DBP), que detecta cambios tempranos en la vía de la apoptosis para así predecir en menos de 24 horas qué tratamiento(s) serán más efectivos para erradicar a un determinado cáncer. El DBP ya se está usando actualmente en múltiples tumores y se ha aplicado con éxito en modelos murinos (PDXs) de LLA así como en muestras de pacientes. Nuestro objetivo principal es el de usar el DBP para encontrar mejores terapias para personalizar el tratamiento de los pacientes pediátricos con LLA, trabajando con oncólogos de la SEHOP (Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas), incluyendo el grupo especializado en recaídas de LLA (ReALLNet).

Background

El tipo de cáncer pediátrico más común es la leucemia linfoblástica aguda (LLA), que afecta a 3 de cada 4 pacientes con leucemia. Se caracteriza por distintas alteraciones genéticas que pueden afectar desde receptores a factores de transcripción, llevando al desarrollo tumoral. Entre dichas alteraciones podemos encontrar cromosoma Philadelphia positivo (Ph+), fusiones en JAK2, incremento de expresión de CRLF2, la fusión ETV6-RUNX1, reorganizaciones MLL (KMT2A), entre otras. A pesar de la heterogeneidad, los tratamientos actuales basados en quimioterapia consiguen respuestas excepcionales del 90% (Adamson, CA Cancer J Clin, 2015). Desgraciadamente, el ~10% de los pacientes pediátricos con LLA recaen y experimentan progresión de la enfermedad, con lo que se necesitan nuevos tratamientos. Por ello, el cáncer pediátrico sigue representando la mayor cause de muerte en niños de menos de 15 años, y, dada la baja tasa de mutaciones que presentan, hay pocos biomarcadores y terapias dirigidas (Grobner et al., Nature, 2018). Además, en tratamiento de estos cánceres pediátricos suelen acarrear efectos secundarios severos tales como reducción del coeficiente intelectual, cardiotoxicidades y complicaciones tardías en general (Sarosiek et al., Cancer Cell, 2017).

Una de las características principales de los pacientes con LLA en recaída es la resistencia que presentan a la apoptosis. De hecho, la mayoría de alteraciones genéticas descritas anteriormente regulan la familia de proteínas BCL-2, mayormente llevando a una mayor disponibilidad de proteínas antiapoptóticas. Por ejemplo, la proteína de fusión BCR-ABL producida por Ph+ aumenta la expresión de BCL-2; la señalización por JAK2 también aumenta BCL-2, y BCL-xL y MCL-1; ETV6-RUNX1 aumenta BCL-xL... (Seyfried et al., Cell Death Dis. 2019; Brown et al., J Biol Chem, 2017; Del Gaizo Moore et al., Blood, 2008). En este sentido, entendiendo como las células de LLA se adaptan a la terapia y adquieren un

fenotipo antiapoptótico, podremos diseñar mejores estrategias terapéuticas para tratar mejor a pacientes recaídos.

En este proyecto utilizaremos el novedoso ensayo funcional DBP, que tiene la capacidad de predecir con precisión en menos de 24 horas qué tratamiento(s) serán más efectivo(s) directamente en biopsias de pacientes (Montero et al., Cell, 2015). Cuando una célula tumoral se trata eficazmente, se pueden detectar rápidamente cambios tempranos en la familia de proteínas BCL-2 ('priming') antes de que se produzca la activación de la apoptosis y la muerte de la célula. Mediante el uso de péptidos BH3 sintéticos, como BIM BH3, que actúa como catalizador para inducir la apoptosis, podemos anticipar la efectividad de las terapias. En otras palabras, el DBP mide cuán efectivo es un tratamiento para inducir apoptosis ($\Delta\%$ priming), lo que es predictivo del destino celular, y permite un análisis rápido de muchas muestras y tratamientos a la vez. Ha sido probado con éxito in vitro, en modelos murinos y en muestras de pacientes (Montero et al., Cell, 2015; Montero et al., Cancer Discov, 2017). Actualmente utilizamos este ensayo de DBP por citometría de flujo (Montero y Letai, CDDiff, 2018; Ryan et al., Biol Chem, 2016), donde las células se tiñen con anticuerpos contra marcadores moleculares tumorales, que nos permite seleccionar subpoblaciones celulares específicas en muestras de pacientes. Esta tecnología representa una enorme ventaja técnica, ya que evita el deterioro de la muestra debido al cultivo ex vivo corto y permite probar directamente terapias en células tumorales aisladas de pacientes con una excelente capacidad predictiva (evaluada por análisis de curva ROC). Además, el DBP se ha utilizado con éxito en modelos xenograft derivados de pacientes (PDXs) para determinar la respuesta a inhibidores de JAK2 y MDM2 (Townsend et al., Cancer Cell, 2016; Wu et al., Cancer Cell, 2015), justificando así sus uso para encontrar nuevos tratamientos para la LLA. Esta tecnología es claramente superior a otros biomarcadores existentes y ahora se está evaluando para su uso en clínica en múltiples tipos de cáncer; concretamente para la medicina de precisión. De hecho, mi equipo ya está utilizando con éxito esta estrategia en tumores pediátricos (Alcon et al., Cell Death Dis. 2020), incluida la LLA (Manzano-Muñoz et al., Front Cell Dev Biol., 2021). Estamos explorando en particular su potencial uso para guiar los miméticos BH3 como el venetoclax que están demostrando ser muy prometedores para el tratamiento de la LLA pediátrica (Seyfried et al., Cell Death Dis. 2019; Brown et al., J Biol Chem, 2017; Del Gaizo Moore et al., Blood, 2008; Manzano-Muñoz et al., Front Cell Dev Biol., 2021). En este proyecto colaboraremos estrechamente con oncólogos pediátricos para identificar y probar nuevos tratamientos directamente en muestras de pacientes pediátricos con LLA (centrándose en recaídas) para mejorar el tratamiento personalizado y reducir los devastadores efectos secundarios que a menudo se observan en la clínica (Sarosiek et al., Cancer Cell 2017).

Bibliografía

1. Adamson, P.C. (2015). Improving the outcome for children with cancer: Development of targeted new agents. CA Cancer J Clin 65, 212-220.
2. Brown, L.M., et al. (2017). Dysregulation of BCL-2 family proteins by leukemia fusion genes. J Biol Chem 292, 14325-14333.

3. Del Gaizo Moore, et al. (2008). BCL-2 dependence and ABT-737 sensitivity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 111, 2300-2309.
4. Grobner, S.N., et al. (2018). The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature* 555, 321-327.
5. Montero, J., and Letai, A. (2018). Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? *Cell Death Differ* 25, 56-64.
6. Montero, J., et al. (2015). Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. *Cell* 160, 977-989.
7. Montero, J., et al. (2017). Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm Is Dependent on BCL2 and Sensitive to Venetoclax. *Cancer Discov* 7, 156-164.
8. Ryan, J., et al. (2016). iBH3: simple, fixable BH3 profiling to determine apoptotic priming in primary tissue by flow cytometry. *Biol Chem* 397(7), 671-8.
9. Sarosiek, K.A., et al. (2017). Developmental Regulation of Mitochondrial Apoptosis by c-Myc Governs Age- and Tissue-Specific Sensitivity to Cancer Therapeutics. *Cancer Cell* 31, 142-156.
10. Seyfried, F., et al. (2019). Prediction of venetoclax activity in precursor B-ALL by functional assessment of apoptosis signaling. *Cell Death Dis.* 10(8):571.
11. Townsend, E.C., et al. (2016). The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice. *Cancer Cell* 30, 183.
12. Wu, S.C., et al. (2015). Activity of the Type II JAK2 Inhibitor CHZ868 in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* 28, 29-41.
13. Alcon, C., et al. (2020) Sequential combinations of therapies with BH3 mimetics to treat rhabdomyosarcoma and avoid resistance. *Cell Death Dis.* 11(8):634. #Corresponding author
14. Manzano-Muñoz A, et al. (2021) MCL-1 Inhibition Overcomes Anti-apoptotic Adaptation to Targeted Therapies in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Cell Dev Biol.* 9, 695225. #Corresponding author

Hipótesis y objetivos.

Proponemos utilizar este nuevo ensayo funcional para estudiar la biología de la LLA y estudiar la relación entre las vías de señalización activas y la apoptosis para superar la resistencia a la terapia. Utilizaremos el DBP para evaluar nuevas estrategias terapéuticas por primera vez directamente en muestras de pacientes pediátricos en recaída para ayudar a personalizar y mejorar su. Trabajaremos en colaboración con el Dr. Manuel Ramírez Orellana (Jefe de Unidad de Terapias Avanzadas, Servicio de Oncohematología, Hospital Universitario Niño Jesús) y oncólogos de la SEHOP - incluyendo la red de recaídas de leucemia linfoblástica aguda (ReALLNet) coordinada por el Dr. Pablo Velasco (Vall d'Hebron) y el Dr. José Luís Fuster (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca) con quien ya comenzamos a colaborar

realizando análisis de DBP. Creemos que este proyecto representa uno de los mayores esfuerzos en medicina de precisión funcional para mejorar el tratamiento de los pacientes pediátricos con LLA en recaída que presentan tasas de supervivencia muy bajas, y que creemos se van a beneficiar de las terapias identificadas en esta colaboración.

OBJETIVO 1. Identificación de los reguladores de la apoptosis y nuevas terapias en líneas celulares de LLA. Identificar qué fármacos inducen la apoptosis: Seleccionaremos tratamientos representativos de diferentes clases de agentes anticancerígenos y evaluaremos su inducción de la apoptosis. Primero probaremos la capacidad predictiva de DBP en las líneas celulares de LLA e identificaremos los tratamientos más prometedores.

Utilizaremos múltiples líneas celulares de LLA pediátricas y de adultos jóvenes (como NALM-6, SEM, Jurkat y otras), incluidas las LLA de células B y T, las expondremos a diferentes tratamientos y realizaremos DBP por citometría de flujo. Anticipamos el uso de 5-10 líneas celulares de LLA. A partir de la información disponible de cada línea celular, seleccionaremos tratamientos representativos de agentes anticancerígenos y realizaremos DBP para identificar cuáles inducen un mayor aumento de “priming” y posterior apoptosis. Nos centraremos en el estudio de receptores de membrana clave (BCR-ABL, FLT3...), vías de señalización relevantes (como MAPK, PI3K/mTOR, WNT, proteínas JAK...), ciclo celular, reparación del ADN y otras. En este sentido, priorizaremos familias representativas de compuestos: quimioterapia convencional (citarabina, daunorrubicina, L-asparaginasa, vincristina, metotrexato, prednisona y otros), terapias dirigidas (incluyendo imatinib, dasatinib, ruxolitinib, sunitinib, trametinib, inhibidores de FLT3, inhibidores de WNT, etc.), miméticos BH3 (venetoclax, A-133, DT2216 o S63845) y otros, priorizando aquellos que están aprobados para su uso clínico o en ensayos clínicos. Brevemente, haremos hincapié no sólo en los fármacos que se utilizan actualmente, sino que identificaremos nuevos compuestos citotóxicos que exploten su adicción oncogénica. Anticipamos trabajar con un panel inicial de aproximadamente 15-30 compuestos o combinaciones. Si se identifican otros fármacos de interés, como nuevas clases de compuestos activos o nuevos agentes contra objetivos específicos, los incluiremos en nuestro panel. Realizaremos el DBP, determinaremos si se dará la apoptosis y validaremos dichas predicciones con análisis de muerte celular por citotoxicidad in vitro (usando Anexina/PI). Estos primeros experimentos se realizarán como prueba de principio, precediendo a los análisis de muestras de pacientes en el Objetivo 2. Usaremos estas pruebas para comparar $\Delta\%$ priming con %muerte celular y ejecutaremos un análisis de curva ROC para determinar qué tan buena capacidad predictiva tiene el DBP en LLA. En este sentido, ya tenemos resultados preliminares prometedores que apuntan en esta dirección con las líneas celulares NALM-6 y SEM.

OBJETIVO 2. Personalización del tratamiento de LLA en la clínica.

En colaboración con los oncólogos expertos en LLA de la SEHOP y ReALLNet, probaremos tanto los tratamientos estándares actuales como nuevas terapias seleccionadas del Objetivo 1 para realizar perfiles de respuesta a los medicamentos mediante DBP. Utilizaremos la experiencia adquirida para analizar muestras primarias de LLA pediátricas y ayudar a los oncólogos a mejorar el tratamiento en la clínica,

especialmente para pacientes en recaída, en un esfuerzo de medicina de precisión sin precedentes integrado en la ReALLNet.

Aproximadamente 300 nuevos casos se diagnostican cada año en España, una cuarta parte de todos los tumores malignos pediátricos, según el Registro Español de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP). Con los regímenes de tratamiento actuales, alrededor del 15% de los pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda recaen (Ped R/R ALL según sus siglas en inglés) y, después de la recaída, la supervivencia general se reduce a menos del 50%. Trabajaremos con ReALLNet y SEHOP, que acordaron compartir con nosotros aspirados de médula ósea purificados por Ficoll o sangre periférica de muestras de pacientes pediátricos con LLA en recaída. ReALLNet tiene una junta de expertos clínicos y biológicos para evaluar exhaustivamente los casos de LLA recaídos presentados por los médicos que los tratan: este grupo ya está constituido y es funcional (ReALLBoard). Dentro del ReALLBoard actualmente estamos desarrollando los recursos para crear un biobanco nacional para Ped R/R ALL y los recursos para facilitar el diagnóstico oncogenómico y funcional para todos los centros que lo necesiten, así como para conectar estas redes dentro de los recursos creados para dar respuesta a los casos más complicados. En este contexto, la Junta de ReALLNet ha acordado que el equipo del Dr. Montero realizará un estudio de perfil de respuesta funcional a los fármacos dentro del proyecto por DBP, integrando los resultados de su análisis a las pruebas oncogenómicas y orientando así las recomendaciones terapéuticas de una manera más eficaz.

El laboratorio del Dr. Montero en la Universidad de Barcelona (Campus Clínic), en colaboración con el IBEC, trabajará tanto con muestras recién obtenidas como viablemente congeladas. Anticipamos que el estudio reclutará a 30-40 pacientes con LLA en recaída por año. Trabajaremos en colaboración con el laboratorio del Prof. Pablo Menéndez (del Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras), ya que también realizarán análisis de perfiles de respuesta a fármacos ex vivo. Los pacientes con LLA en recaída presentan pocas opciones terapéuticas, pero podrían beneficiarse del uso compasivo de fármacos y usaremos el DBP para encontrar mejores tratamientos para los casos más complicados. Las muestras proporcionadas se recogerán en el marco de otros proyectos de investigación dentro de su institución clínica, a través del consentimiento informado. Las condiciones y el propósito de dichas donaciones se detallarán claramente al paciente antes de la extracción por personal calificado del hospital, incluido el hecho de que las muestras donadas se utilizarán exclusivamente para la investigación y que sus datos personales y clínicos estarán protegidos de acuerdo con la legislación nacional y europea de protección de datos. Estimamos que ~ 20% de los pacientes con consentimiento podrían no ser óptimos para dichos análisis. Los pacientes con LLA incluidos en esta propuesta proporcionarán resultados significativos para cumplir con el Objetivo 2. Se usarán distintos análisis estadísticos como Kaplan-Meier para evaluar el impacto del ensayo funcional celular y su efecto sobre la DFS y OS. Según la predicción de respuesta, la prueba pareada de McNemar determinará el rendimiento del perfil previo y posterior al tratamiento después de la categorización de las variables por parte de los oncólogos.

Recursos y costos del proyecto

El grupo del Dr. Montero estará ubicado en el Departamento de Biomedicina de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Barcelona (UB), en colaboración con el Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC) y el Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras. La UB es una de las mejores universidades de investigación de España. El laboratorio del Dr. Montero tendrá acceso a todos los servicios y tecnologías que ofrecen los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCITUB) que incluyen Microscopía Avanzada, citometría, proteómica e instalaciones para animales, entre otros. El laboratorio de Biología Celular (Dpto. de Biomedicina) se encuentra en el Campus Clínic, y facilitará el desarrollo de esta propuesta. De hecho, el Campus Clínic acoge varias instituciones: la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud (UB), el Hospital Clínic, el Instituto de Investigación Biomédica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), el Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Esto facilitará la colaboración del laboratorio del Dr. Montero con investigadores clínicos, y también el acceso al Biobanco del IDIBAPS y a las plataformas científicas del IDIBAPS, siendo la instalación de Citometría y Clasificación Celular, de especial interés para esta investigación. El equipo implicado en este proyecto estará compuesto por el Dr. Joan Montero (PI), la Dra. Clara Alcón (Técnico Superior) y Albert Manzano (estudiante de doctorado de últimos año), que ya generaron resultados preliminares que inspiraron esta propuesta.

Se solicitan fondos para adquirir líneas celulares, medios de cultivo celular, factores de crecimiento, suero, tripsina, material de plástico, anticuerpos marcados por fluorescencia, péptidos sintéticos, enzimas para la digestión de muestras, sondas fluorescentes, reactivos y consumibles necesarios para experimentos in vivo y otros reactivos químicos. También solicitamos fondos para el uso de servicios científicos como instalaciones de citometría de flujo (CCITUB/IDIBAPS).