



MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN
CÁNCER

INMUNOTERAPIAS A MEDIDA EN MODELOS 3D DE LINFOMA FOLICULAR (TAIFOL)

Dra. Patricia Pérez Galán

IDIBAPS Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer

Dr. Carlos Eduardo De Andrea

Clínica Universitaria de Navarra - Universidad de Navarra

1. Resumen

Nuestro estudio se ha centrado en el linfoma folicular (FL), el segundo linfoma no Hodgkin más frecuente y considerado indolente. El FL típicamente responde a los regímenes estándar. Sin embargo, a pesar de su naturaleza "indolente", el FL es muy heterogéneo: algunos pacientes muestran remisiones de larga duración, mientras que otros recaen en los 2 primeros años. Por lo tanto, en este proyecto hemos analizado las alteraciones genéticas y el perfil inmunológico en biopsias de una serie de pacientes con FL en el momento del diagnóstico, tratados de manera homogénea con un régimen de inmunoterapia y seguidos durante más de 11 años. Al comparar pacientes que experimentaron recaída con aquellos que no, encontramos una firma de 25 genes sobreexpresados en el grupo de recaída. Entre esos genes, utilizando inmunofluorescencia múltiple, validamos la sobreexpresión de CD70 en células B tumorales, lo cual se correlaciona fuertemente con una menor supervivencia libre de progresión. Además, una fracción de células T del microambiente tumoral también expresa CD70, y se detectaron niveles más altos tanto en células T CD4+ como CD8+ en el grupo de recaída. CD27, el ligando de CD70, también aumentó en la población de células B en pacientes que eventualmente recaen y en células T foliculares ayudantes, mientras que se redujo en células T CD8+ y CD4+ no foliculares. Para investigar el papel de CD70 en la patogénesis del FL, generamos dos líneas celulares CD70 *knock-out* (KO) y células derivadas de pacientes de FL utilizando la técnica CRISPR/Cas9. Al cocultivar las células T de donantes sanos con células FL CD70+ o CD70-, observamos que las células tumorales CD70+ promueven la expresión de CD70 en las células T. En muestras primarias, demostramos que las células B CD70-KO muestran una respuesta reducida a los estímulos proliferativos. Finalmente, para avanzar hacia terapias personalizadas para estos pacientes con FL de alto riesgo, generamos un CAR-T dual CD19-CD70 combinando un producto académico aprobado del Hospital Clínic de Barcelona (CD19-CAR-T, ARI-0001) y un CAR-T de proteína truncada de CD27.

2. Resultados

El perfil transcriptómico de los ganglios linfáticos de FL revela diferencias en el momento del diagnóstico en los pacientes que recaen

Analizamos el transcriptoma de 730 genes relacionados con el sistema inmunológico dentro del panel Nanostring® nCounter PanCancer Immune Profile en una cohorte de pacientes con FL de un solo centro (Hospital Clínic) tratados con inmunoterapia (principalmente, R-CHOP). En nuestro análisis, comparamos pacientes que no recayeron ($n = 20$) con un seguimiento extenso de más de 10 años con pacientes que eventualmente recayeron durante el seguimiento ($n = 12$). Encontramos 31 genes diferencialmente expresados, 25 de los cuales estaban aumentados en el grupo de recaída, mientras que solo 6 estaban aumentados en el grupo sin recaída. Por lo tanto, pudimos demostrar que los pacientes con diferentes respuestas clínicas a la inmunoterapia exhiben un perfil transcriptómico diferente. Un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) utilizando genes aumentados en cada condición mostró que el grupo de recaída tenía una sobrerrepresentación de genes relacionados con la proliferación de células B, activación de células B y T, regulación de citoquinas, matriz extracelular y adhesión celular, así como diferentes vías prooncogénicas (PI3K/Akt, IL6/JAK-STAT, IL4), entre otras. También confirmamos una disminución en la vía del BCR en pacientes sin recaída, acompañada de señalización de interferón I, vía de citotoxicidad T y fagocitosis mediada por Fc γ , lo que podría indicar un mayor beneficio del rituximab, que prolonga la respuesta al tratamiento anti-CD20. En general, evaluamos que hay un perfil inmune diferencial previo al diagnóstico en los pacientes que recaen y en los que no.

CD70 está aumentado en el grupo de recaída y está asociado a una menor carga mutacional

Puede ser útil descifrar un perfil inmune diferencial entre pacientes que recaen o no, no solo para mejorar el pronóstico de FL, sino también para comprender mejor la biología de la enfermedad y diseñar nuevas terapias para pacientes que recaen repetidamente, lo que empeora su pronóstico. Entre los genes aumentados en pacientes que recaen, nos enfocamos aún más en CD70, ya que se ha definido como un factor oncogénico en muchos cánceres, incluido el linfoma de células B, y se expresa en la membrana celular, lo que lo hace fácilmente objeto de intervención terapéutica. Curiosamente, CD70 no solo está aumentado en la recaída, sino que también está asociado con un tiempo de supervivencia libre de progresión (SLP) más corto, cerca de la significación ($p = 0,067$). Seguidamente, investigamos si la expresión de CD70 estaba correlacionada con otros genes. Entre los 730 genes incluidos en el panel Nanostring® Immune Profile, CD70 se correlaciona significativamente con 30 genes, e inversamente

con solo 5 genes. Notablemente, algunos de los genes más representados que se correlacionan directamente con CD70 son citoquinas y quimioquinas, como el quimioatrayente Th17/Treg CCL20, CCL22, una citoquina relevante en el microambiente tumoral de FL, e IRF4, relacionado con la transformación del FL en DLBCL. El perfil mutacional de los pacientes utilizados en nuestra serie también ha sido publicado por Mozas *et al.* Curiosamente, hallamos una tendencia a una menor carga mutacional en pacientes con mayores niveles de ARN de CD70. En pacientes que poseen menos de 8 mutaciones, los recuentos de CD70 fueron significativamente más altos que en pacientes con 8 mutaciones o más. Al analizar mutaciones individuales, encontramos diferencias significativas en la expresión de CD70 en CARD11, CIITA y TNFSRSF14, también conocido como HVEM. En todos ellos, los pacientes con alteraciones en estos genes tienen niveles más bajos de CD70.

La expresión de las proteínas CD70 y CD27 está aumentada en las células de FL de pacientes en recaída

Para validar nuestros resultados en cuanto a proteínas, realizamos inmunofluorescencia múltiplex en biopsias de ganglios linfáticos (LN) de FL de nuestra cohorte.

Confirmamos que CD70 está aumentado en las células tumorales de pacientes que eventualmente recaen. Estos datos nos llevaron a anticipar una sobreactivación del eje CD27/CD70. Aunque no hallamos diferencias en los niveles de ARN de CD27, observamos un aumento en la expresión de la proteína CD27 en el grupo de recaída y se correlacionó con un menor tiempo de supervivencia libre de progresión (PFS).

CD70 también se expresa en las células T del microambiente tumoral de FL y muestra niveles más altos en pacientes en recaída

Además, dado que el papel de CD70 también ha sido destacado en el microambiente tumoral de FL, utilizamos la técnica de inmunofluorescencia múltiplex para descifrar la expresión de CD70 entre las células T. Para obtener una imagen completa y precisa de la expresión de CD70 y CD27 en los diferentes subtipos de células T, construimos un panel de 6 colores que incluía CD4, CD8, FOXP3, CXCR5, CD27 y CD70. Como cabía esperar, las células CD4+ son más abundantes en FL-LN que las células CD8+.

Notablemente, se observó una mayor expresión de la proteína CD70 en las poblaciones de células CD4 y CD8 en el grupo de recaída. Dentro de las células CD4+, las células TFH, Treg y T colaboradoras no foliculares en pacientes en recaída tienen una mayor expresión de CD70, y TFH es la población con un aumento más pronunciado. En la

misma línea, la expresión alta de CD70 en todas las poblaciones de células T se relacionó con un menor PFS, excepto para TFR. Para completar nuestro análisis, describimos la expresión de CD27 en las diferentes poblaciones de células T en FL-LN. Se sabe que CD27 es una molécula coestimuladora y un marcador de células T naífs que se pierde después del contacto con antígenos. Al igual que con CD70, analizamos la expresión de CD27 en las diferentes subpoblaciones de CD4+. Mientras que las células TFH en el grupo de recaída tienen niveles más altos de proteína CD27 y los pacientes con CD27 alto tienen un PFS notablemente más corto, su expresión está disminuida en las células T colaboradoras no foliculares y los pacientes con CD27 bajo tienen una peor supervivencia. En general, pudimos demostrar una regulación al alza de CD70 en células B y T, mientras que CD27 también está aumentado en las células B pero tiene un patrón heterogéneo en las células T.

La expresión de CD70 en las células B induce niveles más altos de CD70 en las células T

Analizamos la correlación entre CD70+ en células B con CD70 o CD27 en las diferentes poblaciones analizadas. El porcentaje de células CD70+ dentro de la población tumoral se correlaciona significativamente con CD70+ en células CD8+ y células CD4+. Para comprender esta regulación mutua del eje CD70-CD27 en células B y T, generamos, mediante tecnología CRISPR/Cas9, 2 líneas celulares derivadas de FL CD70-KO, WSU-FSCCL y SC-1, que son altamente positivas para CD70. Después de cocultivar células T de donantes sanos con líneas celulares de FL CD70+ o CD70-, analizamos los niveles de CD27 y CD70 en las células T. Notablemente, cuando se cocultivaron con una línea celular CD70+, la expresión de CD70 tanto en células CD4+ como CD8+ T se reguló al alza, como se observó en las muestras de pacientes. Por el contrario, cuando las células de FL no expresan CD70, este aumento no ocurre, lo que indica un efecto específico de CD70. En cuanto a CD27, después de la activación las células T mantuvieron un alto porcentaje de positividad. Esta expresión se atenuó cuando las células T fueron cultivadas con células de FL CD70+, pero no con células de FL CD70-. En general, pudimos recapitular el aumento de la expresión de CD70 y la disminución de la expresión de CD27 observada por inmunofluorescencia múltiple en células CD8+ y CD4+.

La expresión de CD70 está relacionada con la proliferación de células B en muestras primarias de FL

CRISPR/Cas9 también se aplicó a muestras primarias de FL. Cuando las células de FL fueron estimuladas en cocultivo con YK6 (línea celular derivada de células dendríticas foliculares) que expresan CD40L e IL21 (YK6-CD40L-IL21) y suplementadas con citoquinas IL-4 e IL-15, observamos que las células CD70+ tenían un mayor porcentaje de células en fase S, indicativo de un índice de proliferación más alto. Por lo tanto, esta validación experimental respalda un papel oncogénico de CD70 en la biología de FL y refuerza su intervención terapéutica.

Un CAR-T truncado basado en el ligando dirigido a CD70 tiene una alta eficacia antilinfoma y puede combinarse con CD19 CAR-T para obtener un nuevo CAR-T dual

Las células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19 han revolucionado el tratamiento del linfoma de células B. Sin embargo, una fracción de los pacientes no tiene respuestas duraderas y una fracción de ellos experimenta una recaída por pérdida del antígeno CD19. Como demostramos que CD70 está altamente expresado en las células tumorales en pacientes que recaen, hipotetizamos que CD70 podría representar un objetivo prometedor para la terapia CAR-T en el linfoma folicular, especialmente en el contexto de un CAR-T dual CD19-CD70. En nuestro enfoque, hemos diseñado un CAR-T basado en el ligando utilizando su ligando natural, CD27. Se realizaron experimentos de citotoxicidad utilizando los CAR-T individuales CD27 y ARI-0001 (CD19-CAR-T). Utilizando células presentadoras artificiales K562 modificadas para expresar CD19 y CD70, demostramos que CD27-CAR-T mostraba una eficacia similar a ARI-0001. En ensayos a largo plazo de cocultivo de líneas celulares de FL CD19+CD70+ con números más bajos de CAR-T, demostramos que CD27-CAR-T fue tan eficaz como ARI-0001 en presencia de ambos antígenos. En general, consideramos que este nuevo CD27-CAR-T será utilizado para generar un CAR-T dual CD19-CD70. La cotransducción y el análisis preclínico adicional están en progreso y están financiados a través de una subvención internacional de la Fundación del Linfoma Folicular.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Gracias al proyecto financiado por La Marató, hemos podido identificar una firma génica que puede predecir en el momento del diagnóstico qué pacientes podrían sufrir una recaída. Dentro de esta firma, hemos identificado CD70 como un nuevo biomarcador de recaída y un nueva diana terapéutica en el FL. En este sentido, y gracias al programa de terapias avanzadas del Hospital Clínic-IDIBAPS, hemos desarrollado un nuevo CAR-T dual CD19-CD70 que puede mejorar la supervivencia de estos pacientes con el mayor riesgo. Además, este nuevo producto terapéutico podría aplicarse a otros linfomas B agresivos, donde el CAR-T-CD19 ofrece remisiones más cortas, incluido el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de células del manto. Por lo tanto, una vez que finalicemos los estudios preclínicos, realizaremos una solicitud a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) para proponerle un ensayo clínico de CAR-T-CD19-CD70 que incluya estos diferentes tipos de linfoma B.

4. Bibliografía científica generada

Carbone A, Roulland S, Gloghini A, Younes A, von Keudell G, López-Guillermo A, et al. *Follicular lymphoma*.

Nat Rev Dis Primers. 2019;5(1).

Huet S, Sujobert P, Salles G.

From genetics to the clinic: a translational perspective on follicular lymphoma.

Nat Rev Cancer. 2018;18(4):224-39.

Dobaño-lópez C, Araujo-ayala F, Serrat N, Valero JG, Pérez-Galán P.

Follicular lymphoma microenvironment: An intricate network ready for therapeutic intervention.

Cancers (Basel). 2021;13(4):1-22.

Bolen CR, McCord R, Huet S, Frampton GM, Bourgon R, Jardin F, et al.

Mutation load and an effector T-cell gene signature may distinguish immunologically distinct and clinically relevant lymphoma subsets.

Blood Adv. 2017;1(22):1884-90.

Huet S, Tesson B, Jais JP, Feldman AL, Magnano L, Thomas E, *et al.*

A gene-expression profiling score for prediction of outcome in patients with follicular lymphoma: a retrospective training and validation analysis in three international cohorts.

Lancet Oncol. 2018;19(4):549-61.

Mozas P, López C, Grau M, Nadeu F, Clot G, Valle S, *et al.*

Genomic landscape of follicular lymphoma across a wide spectrum of clinical behaviors.

Hematol Oncol. 2023 Oct;41(4):631-643.

Martínez-Cibrián N, Ortiz-Maldonado V, Español-Rego M, Blázquez A, Cid J, Lozano M, *et al.*

The academic point-of-care anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell product varnimcabtagene autoleucel (ARI-0001 cells) shows efficacy and safety in the treatment of relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma.

Br J Haematol. 2024 Feb;204(2):525-533.

Yang ZZ, Ansell SM.

The tumor microenvironment in follicular lymphoma.

Clinical Advances in Hematology and Oncology. 2012;10(12):810-8.

Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM.

CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce Foxp3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25 T cells.

Blood. 2007 Oct 1;110(7):2537-44.

Yang ZZ, Grote DM, Xiu B, Ziesmer SC, Price-Troska TL, Hodge LS, *et al.*

TGF-beta upregulates CD70 expression and induces exhaustion of effector memory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma.

Leukemia. 2014 Sep;28(9):1872-84.

Ansell SM, Flinn I, Taylor MH, Sikic BI, Brody J, Nemunaitis J, *et al.*
Safety and activity of varlilumab, a novel and first-in-class agonist anti-CD27 antibody, for hematologic malignancies.
Blood Adv. 2020 May 12;4(9):1917-1926.

Balsas P, Veloza L, Clot G, Sureda-Gómez M, Rodríguez ML, Masaoutis C.
SOX11, CD70, and Treg cells configure the tumor-immune microenvironment of aggressive mantle cell lymphoma.
Blood. 2021 Dec 2;138(22):2202-2215.