

MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN
CÁNCER

NANOMEDICINAS HUMANIZADAS SELECTIVAMENTE DIRIGIDAS A MATAR LAS CÉLULAS TUMORALES CXCR4+ PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Dr. Jordi Sierra Gil

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau - IRHSCSP Institut de Recerca Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Dr. Antonio Villaverde Corrales

Facultat de Medicina - UAB Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. Lourdes Farré Vallvé

Institut Català d'Oncologia - IDIBELL Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

1. Resumen

La quimioterapia actual en la leucemia mieloide aguda (LMA) está asociada a una toxicidad grave y a efectos secundarios causados por la falta de selectividad. A pesar de que la mayoría de pacientes responden a la quimioterapia, muchos de ellos presentan recidivas y acaban muriendo por la enfermedad, de modo que la supervivencia global a 5 años, en pacientes adultos, es inferior al 30%. Por lo tanto, se necesitan nuevas estrategias que aumenten la efectividad del tratamiento y mejoren la supervivencia de los pacientes. El receptor de quimioquinas CXCR4 está sobreexpresado en las células leucémicas de más de la mitad de los pacientes de LMA. La sobreexpresión de este receptor se correlaciona con una menor supervivencia global y libre de enfermedad, y también se asocia con mayor resistencia a la quimioterapia. Antes de empezar este proyecto, habíamos desarrollado un nuevo nanoconjugado proteico dirigido selectivamente a las células leucémicas CXCR4+, a través del ligando T22, y unido al potente agente antimetabólico monometil auristatina E (MMAE). Nuestra estrategia terapéutica se aprovecha de la sobreexpresión de CXCR4 en los blastos de LMA en comparación con las células normales. El prototipo de este nanoconjugado contiene un dominio GFP que se ha utilizado para localizar la nanopartícula tanto *in vitro* como *in vivo*. Previamente, ya habíamos demostrado que el nanoconjugado T22-GFP-MMAE presenta un elevado efecto antitumoral en modelos animales de LMA diseminados generados con líneas celulares. El objetivo principal de este proyecto ha sido humanizar el nanoconjugado T22-GFP-MMAE, substituyendo el dominio GFP por una proteína humana con el fin de evitar reacciones inmunes en pacientes. Además, hemos utilizado xenoinjertos derivados de muestras de pacientes (*patient-derived xenografts*, PDX) para definir la subpoblación de pacientes que más se beneficiaría de esta terapia. Finalmente, hemos utilizado modelos humanizados de ratón para estudiar su efecto en células hematopoyéticas normales. Como resultado final de este proyecto, hemos obtenido un nuevo nanoconjugado, T22-HSNBT-MMAE, que es un excelente candidato para iniciar las fases preclínicas regulatorias previas a los ensayos clínicos de fase I. Creemos que este nanoconjugado, selectivamente dirigido a las células CXCR4+, será capaz de reducir los efectos secundarios de los tratamientos habituales utilizados en la LMA y mejorar la supervivencia de los pacientes, ya que aumentará la efectividad y disminuirá las recurrencias relacionadas con la sobreexpresión de CXCR4 en células leucémicas.

2. Resultados

1. Generación de un nuevo nanoconjugado humanizado. El principal objetivo del proyecto ha sido generar un nuevo nanoconjugado humanizado derivado de T22-GFP-MMAE, que mantenga su misma estructura y actividad pero que no contenga el dominio GFP, para evitar su inmunogenicidad. Por este motivo, se generaron inicialmente 3 nanoconjugados que contenían diferentes dominios derivados de proteínas humanas que fueron evaluados tanto *in vivo* como *in vitro*. En estos nanoconjugados se sustituyó el dominio GFP por 3 dominios proteicos diferentes, que eran: stefina A (T22-STM-MMAE), gonadotropina coriónica humana (T22-CTP-MMAE) y nidógeno humano (T22-HSNBT-MMAE). Los resultados obtenidos se describen con detalle en un artículo publicado en 2022 (Serna *et al.*, 2022). Basándonos en los datos obtenidos, especialmente en su actividad *in vivo* y en la metodología necesaria para su proceso de producción, se decidió continuar con el desarrollo del nanoconjugado con nidógeno (T22-HSNBT-MMAE) como dominio humanizado para sustituir GFP. Adicionalmente, se realizaron diferentes modificaciones estructurales en el diseño del nanoconjugado así como en la metodología de conjugación de la toxina MMAE que han permitido mejorar la producción y características del nanoconjugado así como aumentar su efectividad tanto *in vitro* como *in vivo*. Por un lado, se modificó el ligador que se usaba en el prototipo para conjugar la nanopartícula a MMAE y se comprobó que el mismo nanoconjugado con un ligador proteolizable es mucho más potente que cuando se utiliza el ligador no proteolizable. Por otro lado, se ha preparado también la metodología para realizar una conjugación dirigida de la MMAE que permite controlar exactamente el sitio de unión del fármaco con la nanopartícula.

2. Evaluación de la actividad antineoplásica *in vitro* e *in vivo* de T22-HSNBT-MMAE. Con este candidato definitivo se han hecho diversos ensayos *in vitro* para evaluar más en detalle su mecanismo de acción. Mediante tinción de Hoescht se pudo determinar que *in vitro* el nanoconjugado produce una fuerte inducción de catástrofe mitótica y de apoptosis. Mediante citometría de flujo se hizo un estudio de la regulación del ciclo celular por el nanoconjugado, y se observó una parada temprana de ciclo en G2/M. Por otro lado, también se cuantificaron los niveles del marcador de daño al ADN γ H2AX y de activación de procaspasa-3, y se observó que ambos marcadores aumentaban en las células leucémicas cuando eran tratadas con el nanoconjugado. Todos estos resultados concuerdan con el mecanismo de acción

descrito para MMAE. Por otro lado, se han realizado diversos ensayos *in vivo*, en un modelo murino de LMA diseminado, para demostrar la actividad antileucémica de T22-HSNBT-MMAE. El modelo animal utilizado se genera por la inyección intravenosa de la línea celular de LMA humana THP1. Previamente habíamos transfectado esta línea con el gen de la luciferasa que nos permite el seguimiento *in vivo* de la diseminación de las células, utilizando el equipo IVIS Spectrum, que mide los niveles de bioluminiscencia emitidos por las células *in vivo*. Así, utilizando este modelo, se realizaron diversos estudios preliminares para determinar las dosis adecuadas que produjeran actividad sin tener toxicidad, y se estableció que 1 dosis diaria de 5 mg/kg de T22-HSNBT-MMAE, durante 8 días, producía un bloqueo completo de la diseminación leucémica, lo que aumentaba hasta casi el triple la supervivencia de los ratones (de 15 días a 35-45 días). Estos resultados se muestran en la figura 1A (niveles de bioluminiscencia) y 1B (curvas de supervivencia Kaplan-Meier). En todos los ensayos *in vivo* se realizó una evaluación exhaustiva de la posible toxicidad del nanoconjugado mediante hemograma, análisis bioquímicos de la función hepática y renal y estudios histopatológicos mediante tinciones de hematoxilina y eosina de todos los órganos y tejidos. En ninguno de los estudios realizados encontramos ningún tipo de toxicidad.

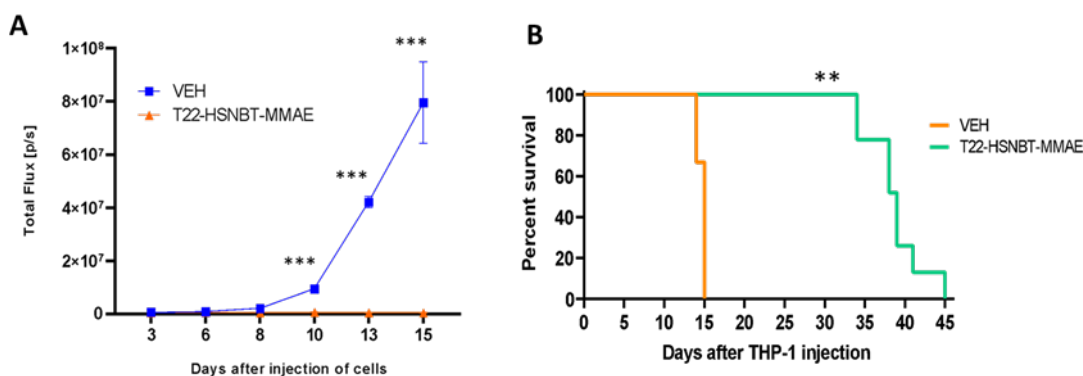


Figura 1. (A) Niveles de bioluminiscencia durante el experimento *in vivo* utilizando el modelo diseminado de LMA con células THP1-Luci. A los ratones del grupo tratado se les administró 1 dosis diaria de 5 mg/kg de T22-HSNBT-MMAE durante 8 días. **(B)** Curvas de supervivencia Kaplan-Meier que muestran el aumento estadísticamente significativo de la supervivencia del grupo de animales tratados con T22-HSNBT-MMAE. ** p < 0,01; *** p < 0,001.

3. Generación de modelos murinos derivados de muestras de pacientes de

LMA. Durante todo el proyecto se han recogido un total de 136 muestras de médula ósea de pacientes del Hospital de Sant Pau en el momento del diagnóstico, a 92 de los cuales les han diagnosticado finalmente LMA. Todas las muestras han sido

criopreservadas y se han utilizado para los estudios posteriores *in vitro* e *in vivo*. Se ha generado una base de datos con toda la información clínica y molecular de los pacientes, se han evaluado los niveles de CXCR4 de las muestras y se ha establecido un umbral a partir del cual se consideran CXCR4+. Este umbral se ha determinado en función del nivel de expresión de CXCR4 de las muestras de médula ósea de los donantes sanos. El porcentaje de pacientes CXCR4+ es de aproximadamente el 50%. Las muestras de médula ósea de donantes sanos tienen unos niveles de receptor de CXCR4 muy bajos, tal como se muestra en los resultados obtenidos por citometría de flujo (figura 2A), y en la imagen representativa de la IHQ de CXCR4 (figura 2B). En la figura 2C se puede observar cómo se distribuye parte de las muestras de pacientes analizadas, y se establece el umbral para definir si son CXCR4+ o CXCR4- en función del nivel del receptor cuantificado en la muestra del donante sano.

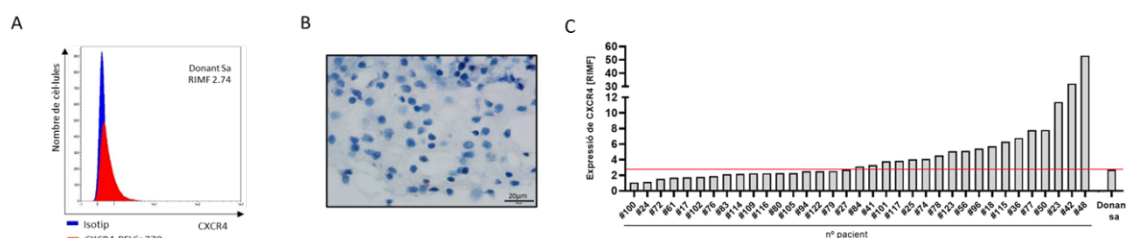


Figura 2. (A) Niveles de expresión de CXCR4 de una de las muestras de médula ósea obtenida de un donante sano mediante citometría de flujo. **(B)** Imagen representativa de una IHQ de CXCR4 de una muestra de médula ósea de donante sano. **(C)** Nivel de expresión de CXCR4 de pacientes de LMA y establecimiento del umbral de positividad en base a los niveles del donante sano.

Finalmente, hemos evaluado la actividad del nanoconjugado seleccionado T22-HSNBT-MMAE en muestras de pacientes de LMA *ex vivo*. Para determinar la dependencia del receptor CXCR4 en la actividad antitumoral del nanoconjugado, hemos utilizado muestras de pacientes con LMA CXCR4+ (#133, #151, #137) pero también muestras de pacientes que no expresan el receptor (#126) y de médula ósea de donante sano. En la figura 3A se presentan los niveles de CXCR4 de las muestras y el umbral para considerarlas CXCR4+ o CXCR4-. En la figura 3B se muestran los resultados de la evaluación de la viabilidad celular *ex vivo*, donde se observa que las muestras CXCR4- no son sensibles al nanoconjugado, mientras que las CXCR4+ presentan una fuerte disminución en la viabilidad cuando son tratadas durante 48 horas con el nanoconjugado. Así, el umbral que hemos establecido para considerar una muestra CXCR4+ o CXCR4- según la expresión del receptor en muestras de médula ósea de

donantes sanos también nos sirve para determinar qué pacientes podrán ser sensibles o no al nanoconjugado.

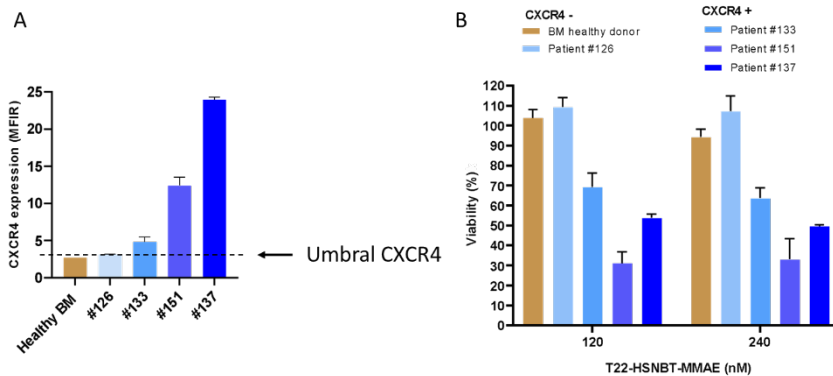


Figura 3. Análisis de la actividad del nanoconjugado T22-HSNBT-MMAE en muestras de pacientes de LMA *ex vivo*. **(A)** Niveles de expresión de CXCR4 de las muestras de médula ósea de pacientes de LMA y de un donante sano cuantificados por citometría de flujo. **(B)** Ensayos de viabilidad celular en las muestras previamente descritas evaluando el efecto del nanoconjugado tras 48 horas de tratamiento a 120 nM y 240 nM.

Estos resultados están pendientes de ser validados *in vivo* utilizando los distintos modelos murinos PDX que hemos preparado durante el proyecto. A lo largo del proyecto se han generado un total de 8 modelos PDX derivados de muestras de pacientes con distintos niveles de expresión de CXCR4. En todos los modelos se ha determinado la semana posinyección a partir de la cual detectamos células CD45+ humanas en sangre periférica, la supervivencia de los animales, el porcentaje de injerto y se ha hecho un estudio exhaustivo de todos los órganos y tejidos al final del ensayo. Finalmente, se ha validado que las células leucémicas humanas aisladas de la médula ósea de los ratones mantenían las mismas alteraciones genéticas presentes en los pacientes de quienes provenían.

4. Generación de modelos murinos humanizados y evaluación de la actividad de T22-HSNBT-MMAE. En este proyecto se han optimizado dos metodologías para la generación de modelos murinos humanizados, utilizando linfocitos T humanos obtenidos de PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) o células CD34+ provenientes de muestras de cordón umbilical. Para los modelos murinos humanizados con linfocitos T, los mejores resultados de humanización los hemos obtenido cuando hemos partido de un *pool* de PBMC de varios donantes. Considerando que un modelo se ha humanizado cuando se detecta un mínimo de 20% de células CD45+ humanas circulantes en sangre periférica, en este modelo se ha alcanzado la humanización a

partir de los 20 días posinyección, algo que se observa en más del 90% de los animales. Además, en los distintos experimentos realizados la reacción “injerto contra huésped” ha sido un fenómeno muy poco frecuente que no ha superado el 5% de los animales. El principal inconveniente de este modelo es que la ventana experimental es corta, ya que el sacrificio de los ratones se tiene que realizar en un máximo de 40 días posinyección. Por este motivo, se ha elegido el modelo humanizado generado con células CD34+ de cordón umbilical para la evaluación del nanoconjugado. Para generar este modelo hemos utilizado ratones NSG de 4 semanas, previamente condicionados con busulfán, a los que hemos inyectado un total de $1-2 \times 10^5$ células provenientes de muestras comerciales de cordón umbilical. A partir de las 10-15 semanas posinyección, dependiendo del donante, ya hemos observado la presencia de células CD45+ humanas en sangre periférica. A partir de las 15-18 semanas ya se observa la aparición de linfocitos T CD4+ y CD8+. En este punto se estableció que era el momento más adecuado para inyectar las células THP1 bioluminiscentes para generar el modelo murino humanizado de leucemia en el que se evaluó el efecto del nanoconjugado T22-HSNBT-MMAE. Una vez generada la leucemia, se analizó el efecto antitumoral del nanoconjugado y se confirmó que su actividad antitumoral no se veía alterada y que, además, no se observaba toxicidad relevante ni efectos adversos.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

La principal implicación clínica que tienen los resultados obtenidos en este proyecto es la incorporación de un nuevo tratamiento para los pacientes de LMA que sobreexpresen el receptor CXCR4. Una vez finalizado el proyecto, continuamos desarrollando el nanoconjugado en colaboración con la empresa Nanoligent, que tiene licenciada la patente. Está previsto que tras finalizar todos los estudios de regulatoria pertinentes se pueda planificar un primer ensayo clínico de fase I en el que se incluirían también pacientes con otros tipos de cáncer que tengan niveles altos de CXCR4. Por lo tanto, la intención es realizar un ensayo clínico de fase I agnóstico de tumor en el que se seleccionen los pacientes según la expresión del receptor CXCR4. Por este motivo, las posibles implicaciones clínicas de este proyecto van más allá del tratamiento de pacientes con LMA, ya que este nanoconjugado podría aplicarse también a otros tipos tumorales.

El abordaje planteado en el desarrollo del nanoconjugado obtenido en este proyecto es innovador y prometedor por diferentes motivos:

- El **direccionamiento específico** de un fármaco a las células CXCR4+ promete una mejora en la eficacia del tratamiento, ya que permite un aumento de la concentración del fármaco en las células tumorales mientras que se reduce la toxicidad al disminuir mucho su distribución en tejidos normales.
- El **receptor diana** escogido permitirá no solo realizar este abordaje terapéutico en pacientes de diferentes tipos de cáncer, sino que va destinado especialmente a aquellos pacientes con menos probabilidades de responder a la terapia convencional y con peor pronóstico. El receptor CXCR4 se ha asociado a mal pronóstico, mayor capacidad metastásica, quimiorresistencia y mayor riesgo de recaída en diferentes tipos de tumores sólidos y hematológicos. Estamos, pues, desarrollando una terapia antitumoral especialmente dirigida a pacientes de mal pronóstico.
- **Efecto antimetastásico.** En la mayoría de tipos tumorales las metástasis son la principal causa de muerte, y el tumor primario, en general, es más controlable mediante cirugía o radioterapia o quimioterapia. Al estar tan relacionada la expresión de CXCR4 con la capacidad metastásica de las células tumorales, podemos considerar que el nanoconjugado aquí desarrollado podría ser efectivo también bloqueando las metástasis en tumores sólidos, tal como hemos observado en la fuerte reducción de la diseminación leucémica.
- **Impacto social.** El desarrollo y la aprobación regulatoria de un nanoconjugado antitumoral para la LMA no solo tendría un impacto clínico directo, sino que también podría tener un efecto significativo en la sociedad. Esta innovación puede comportar una mejora de la calidad de vida de los pacientes y de sus familias, así como una reducción de los costes asociados al tratamiento y al manejo de las complicaciones de la LMA.

4. Bibliografía científica generada

Artículos científicos

Serna N, Carratalá JV, Conchillo-Solé O, Martínez-Torró C, Unzueta U, Manges R, Ferrer-Miralles N, Daura X, Vázquez E, Villaverde A.

Antibacterial Activity of T22, a Specific Peptidic Ligand of the Tumoral Marker CXCR4.
Pharmaceutics. 2021 Nov 13;13(11):1922. doi: 10.3390/pharmaceutics13111922.

Pallarès V, Núñez Y, Sánchez-García L, Falgàs A, Serna N, Unzueta U, Gallardo A, Alba Castellón L, Álamo P, Sierra J, Villaverde A, Vázquez E, Casanova I, Manges R.
Antineoplastic effect of a diphtheria toxin-based nanoparticle targeting acute myeloid leukemia cells overexpressing CXCR4.
J Control Release. 2021 Jul 10;335:117-129. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.05.014.

Falgàs A, Pallarès V, Unzueta U, Núñez Y, Sierra J, Gallardo A, Alba-Castellón L, Manges MA, Álamo P, Villaverde A, Vázquez E, Manges R, Casanova I.
Specific Cytotoxic Effect of an Auristatin Nanoconjugate Towards CXCR4+ Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cells.
Int J Nanomedicine. 2021 Mar 5;16:1869-1888. doi: 10.2147/IJN.S289733.

Serna N, Falgàs A, García-León A, Unzueta U, Núñez Y, Sánchez-Chardi A, Martínez-Torró C, Manges R, Vazquez E, Casanova I, Villaverde A.
Time-Prolonged Release of Tumor-Targeted Protein-MMAE Nanoconjugates from Implantable Hybrid Materials.
Pharmaceutics. 2022 Jan 14;14(1):192. doi: 10.3390/pharmaceutics14010192.

Pallarès V, Unzueta U, Falgàs A, Aviñó A, Núñez Y, García-León A, Sánchez-García L, Serna N, Gallardo A, Alba-Castellón L, Álamo P, Sierra J, Cedó L, Eritja R, Villaverde A, Vázquez E, Casanova I, Manges R.
A multivalent Ara-C-prodrug nanoconjugate achieves selective ablation of leukemic cells in an acute myeloid leukemia mouse model.
Biomaterials. 2022 Jan;280:121258. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121258.

Serna N, Pallarès V, Unzueta U, Garcia-Leon A, Voltà-Durán E, Sánchez-Chardi A, Parladé E, Rueda A, Casanova I, Falgàs A, Alba-Castellón L, Sierra J, Villaverde A, Vázquez E, Manges R.
Engineering non-antibody human proteins as efficient scaffolds for selective, receptor targeted drug delivery.
J Control Release. 2022 Mar;343:277-287. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.01.017.

Falgàs A, Garcia-León A, Núñez Y, Serna N, Sánchez-García L, Unzueta U, Voltà-Durán E, Aragó M, Álamo P, Alba-Castellón L, Sierra J, Gallardo A, Villaverde A, Vázquez E, Mangues R, Casanova I.

A diphtheria toxin-based nanoparticle achieves specific cytotoxic effect on CXCR4+ lymphoma cells without toxicity in immunocompromised and immunocompetent mice. Biomed Pharmacother. 2022 Jun;150:112940. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112940.

Núñez Y, Garcia-León A, Falgàs A, Serna N, Sánchez-García L, Garrido A, Sierra J, Gallardo A, Unzueta U, Vázquez E, Villaverde A, Mangues R, Casanova I.
T22-PE24-H6 Nanotoxin Selectively Kills CXCR4-High Expressing AML Patient Cells In Vitro and Potently Blocks Dissemination in Vivo. Pharmaceutics. 2023 Feb 22;15(3):727. doi: 10.3390/pharmaceutics15030727.

Tesis doctorales

Título: *Simple biochemistry for complex protein materials*

Doctorando: Héctor López Laguna

Programa de doctorado: Biotecnología (Universitat Autònoma de Barcelona)

Fecha de lectura: 31/03/2023

Título: *Nanopartícules dirigides a cèl·lules mare CXCR4+ per al tractament de la leucèmia mieloide aguda*

Doctoranda: Yaiza Núñez Amela

Programa de doctorado: Biomedicina (Universitat de Barcelona)

Fecha de lectura: 12/04/2023

Título: *Exploring and exploiting multi-domain recombinant proteins as targeted nanomedical tools*

Doctorando: Eric Voltà Durán

Programa de doctorado: Biotecnología (Universitat Autònoma de Barcelona)

Fecha de lectura: 12/09/2023

Título: *Desenvolupament preclínic de nanoconjugats humanitzats dirigits selectivament a cèl·lules CXCR4+ en models murins de leucèmia mieloide aguda*

Doctoranda: Annabel Garcia León

Programa de doctorado: Biomedicina (Universitat de Barcelona)

Fecha de inicio: septiembre de 2021