



# MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN  
CÁNCER

## ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA LA LEUCEMIA BASADA EN LA DISRUPCIÓN DE LOS LISOSOMAS

### **Dr. Francesc Solé Ristol**

Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras

### **Dr. Jordi Esteve Reyner**

Institut Clínic de Malalties Hematològiques i Oncològiques - IDIBAPS Institut  
d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer

## 1. Resumen

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia hematológica caracterizada por la expansión rápida de blastos mieloides inmaduros en la médula ósea. El curso de la enfermedad está marcado por un mal pronóstico y las recaídas frecuentes. Por lo tanto, es necesario identificar nuevas aproximaciones terapéuticas para poder inducir su remisión completa y prevenir una recaída. Con el objetivo de encontrar nuevos fármacos que puedan revertir los eventos de transformación tempranos en la LMA, se realizó un cribado *in silico* para identificar moléculas de pequeño tamaño bioactivas que pudiesen inducir este patrón de transformación. En un cribado *in vitro* primario, se identificó y validó un grupo de antihistamínicos estructuralmente relacionados, previamente descritos como fármacos anfifílicos y catiónicos (CAD). Estos CAD producían un potente efecto antileucémico en células de LMA, tanto en líneas celulares como en muestras primarias de pacientes, y producían un efecto irrelevante en las células hematopoyéticas sanas cuando eran tratadas con estos CAD. Los experimentos de xenotrasplante en ratón mostraron que los CAD se comportaban como agentes antineoplásicos *in vivo* de forma específica. Estos CAD interfieren con la integridad y funcionalidad de los lisosomas gracias a sus propiedades físico-químicas. Los datos preliminares generados en el laboratorio sugieren que este efecto antileucémico diferencial está mediado por la disrupción selectiva de los lisosomas. Por lo tanto, este proyecto tenía como objetivo estudiar la potencialidad de los lisosomas como nuevas dianas terapéuticas en la LMA. Durante la realización de esta propuesta, se han denominado dos compuestos nuevos, EDK-87 y EDK-88, como cabezas de serie, debido a que su efecto antileucémico es altamente específico y potente, ya que mimetiza el mecanismo de acción antes descrito. El estudio preclínico no regulatorio realizado apoya su posterior desarrollo para poder ser evaluados en condiciones clínicas.

## 2. Resultados

### **Actividad 1. Identificación de una familia de compuestos químicos con actividad antileucémica mediada por la disrupción de la actividad lisosomal**

Se realizó un cribado *in silico* que obtuvo como resultado la identificación de 114 compuestos nuevos con potencial antileucémico, tomando como base los resultados

preliminares obtenidos en el laboratorio (Cornet-Masana, 2017). Se validaron inicialmente 9 de estos compuestos, mientras que 2 compuestos fueron seleccionados por su mecanismo de acción específico contra la función lisosomal. Estos dos compuestos fueron denominados EDK-87 y EDK-88, y fueron los cabezas de serie. Ambos compuestos aumentan la acumulación de radicales libres (ROS) en mitocondrias, la activación de las caspasas efectoras 3/7, la positividad para la sonda CytoID y la presencia de la isoforma b de LC3. Los resultados obtenidos en esta actividad indican que los compuestos que son cabezas de serie inducen ambos programas de muerte celular: apoptosis y autofagia, como era deseable. El tratamiento con estos compuestas compromete la integridad de los lisosomas, al permeabilizarlos (aumento de la formación de puntas de galactina-3), aumentar su tamaño (masa lisosomal total) y aumentar la actividad lisosomal degradativa (sonda lentiviral *lysosomal-METRIQ*). La actividad lisosomal también está gravemente afectada con el tratamiento, al aumentar la actividad del factor de transcripción TFEB, disminuir c-Myc e inducir la diferenciación terminal de las células leucémicas.

Cualquier tratamiento potencial contra la leucemia tiene que ser específico para las células leucémicas, y debe ser inocuo para las células sanas. EDK-87 y EDK-88 no reducen la viabilidad celular de las células sanas de forma biológicamente significativa en las concentraciones farmacológicamente interesantes. De hecho, la ventana terapéutica calculada indica que el rango de este tratamiento sería seguro en futuros desarrollos clínicos.

Los estudios de farmacología y farmacodinámica para evaluar la viabilidad de usar estos compuestos desnudos aseguran la viabilidad para su uso en humanos, siendo la administración subcutánea la óptima. Por lo tanto, el desarrollo clínico de estos compuestos está justificado.

## **Actividad 2. La actividad antileucémica de los cabezas de serie es sinérgica con el tratamiento convencional**

En la práctica clínica, los tratamientos en monoterapia son la opción menos recomendable por la potencial inducción de resistencias y la reducción de la efectividad. Tanto EDK-87 como EDK-88 presentan un efecto sinérgico significativo con citarabina (Ara-C), el esqueleto del tratamiento de la LMA. Como los compuestos EDK-87 y EDK-88, los denominados cabezas de serie, afectan simultáneamente a los lisosomas y las

mitocondrias, se identificaron fármacos aprobados para enfermedades hematológicas que tuviesen un mecanismo de acción que generase un daño en algún orgánulo o en ambos. De hecho, el trióxido de arsénico (ATO) ha demostrado establecer sinergias con EDK-87 y EDK-88 de manera significativa estadísticamente. Este sinergismo se observa tanto a nivel de citotoxicidad como de capacidad clonogénica.

### **Actividad 3. Estudio de LAPTM4B como diana terapéutica**

LAPTM4B es una proteína de membrana localizada preferentemente en lisosoma, cuya expresión a nivel de ARNm está relacionada con la respuesta al tratamiento y la supervivencia en LMA. De hecho, la expresión de LAPTM4B está aumentada en los episodios de recaída, en comparación con el debut en el momento del diagnóstico. La sobreexpresión de LAPTM4B induce la adquisición de un fenotipo de quimiorresistencia a citarabina (Ara-C), asociado a la activación de genes relacionados con la inactivación intracelular de la misma, y la expresión del factor TFEB. A nivel de señalización intracelular, LAPMT4B señala en un entorno leucémico por mediación del elemento de respuesta SER, perteneciente a la ruta MAP-Erk. La sobreexpresión de LAPTM4B incrementa la capacidad de regeneración de la leucemia en modelos animales de xenotrasplante, lo que demuestra su potencial como diana terapéutica.

### **Actividad 4. Estudio mutacional y de expresión génica del subgrupo de LMA sin definición molecular**

Para poder determinar el perfil mutacional asociado al compartimento lisosomal, se realizó una secuenciación global (RNA-Seq) y una secuenciación del exoma completo (WES) en muestras de pacientes de LMA sin definición molecular. Hay 11 variantes patogénicas que se encuentran en estas muestras: 6 que afectan a genes relacionadas con síndromes de predisposición a cáncer (*ATM*, *DDX41*, *CHEK2*) y 5 relacionados con síndromes de fracaso de la médula ósea (*FANCA*, *FANCM*, *SBDS*, *DNAJC21*, *CSF3R*). Además, se observan genes de fusión no detectados por métodos citogenéticos convencionales (reordenamiento de *NUP98*, *ETV6*, *NRIP1*).

### 3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Los resultados obtenidos han permitido:

1. Identificar una familia química con propiedades físico-químicas compatibles con los procesos de desarrollo de fármacos y con actividad específica antileucémica en modelos *in vivo* relevante para su uso en clínica.
2. Nombrar cabezas de serie los compuestos EDK-87 y EDK-88 , aptos para el desarrollo clínico.
3. Validar LPTM4B como una diana terapéutica en la leucemia mieloide aguda.
4. Describir mutaciones nuevas en la línea germinal con alta prevalencia en pacientes adultos de LMA, ya que constituyen nuevas mutaciones con valor como marcadores nuevos de predisposición a la LMA en la línea germinal.

### 4. Bibliografía científica generada

Este proyecto ha generado las siguientes publicaciones:

Bataller A, Garrido A, Guijarro F, Oñate G, Diaz-Beyá M, Arnan M, Tormo M, Vives S, de Llano MPQ, Coll R, Gallardo D, Vall-Llovera F, Escoda L, Garcia-Guiñon A, Salamero O, Sampol A, Merchan BM, Bargay J, Castaño-Díez S, Esteban D, Oliver-Caldés A, Rivero A, Mozas P, López-Guerra M, Pratcorona M, Zamora L, Costa D, Rozman M, Nomdedéu JF, Colomer D, Brunet S, Sierra J, **Esteve J**.

*European LeukemiaNet 2017 risk stratification for acute myeloid leukemia: validation in a risk- adapted protocol.*

Blood Adv. 2022 Feb 22;6(4):1193-1206.

Carbó JM, Cornet-Masana JM, Cuesta-Casanovas L, Delgado-Martínez J, Banús-Mulet A, Clément- Demange L, Serra C, Catena J, Llebaria A, **Esteve J, Risueño RM**.

*A Novel Family of Lysosomotropic Tetracyclic Compounds for Treating Leukemia.*

Cancers (Basel). 2023 Mar 22;15(6):1912.

Cuesta-Casanovas L, Delgado-Martínez J, Cornet-Masana JM, Carbó JM, Banús-Mulet A, Guijarro F, **Esteve J, Risueño RM**.

*Prolactin receptor signaling induces acquisition of chemoresistance and reduces clonogenicity in acute myeloid leukemia.*

Cancer Cell Int. 2023 May 19;23(1):97.

Guijarro F, López-Guerra M, Morata J, Bataller A, Paz S, Cornet-Masana JM, Banús-Mulet A, Cuesta-Casanovas L, Carbó JM, Castaño-Díez S, Jiménez-Vicente C, Cortés-Bullich A, Triguero A, Martínez-Roca A, Esteban D, Gómez-Hernando M, Álamo Moreno JR, López-Oreja I, Garrote M, **Risueño RM**, Tonda R, Gut I, Colomer D, Díaz-Beya M, **Esteve J**.

*Germ line variants in patients with acute myeloid leukemia without a suspicion of hereditary hematologic malignancy syndrome.*

Blood Adv. 2023 Oct 10;7(19):5799-5811.

Calvente O, Mestre J, **Risueño RM**, Manzanares A, Acha P, Xicoy B, Sole F. *Two-Time Multiplexed Targeted Next-Generation Sequencing Might Help the Implementation of Germline Screening Tools for Myelodysplastic Syndromes/Hematologic Neoplasms.*

Biomedicines, 2023 Dec 5;11(12):3222.

Castaño-Díez S, Pomares H, Esteban D, Guijarro F, Jiménez-Vicente C, Zugasti I, Álamo JR, Mayayo VT, López-Guerra M, de la Fuente C, Charry P, Cortés-Bullich A, Bataller Á, Maluquer C, Colomer D, Rozman M, Arnan M, Xicoy B, **Esteve J**, Díaz-Beyá M.

*Characteristics and long-term outcome in a large series of chronic myelomonocytic leukaemia patients including 104 formerly referred to as oligomonocytic.*

Br J Haematol. 2024 Mar;204(3):892-897.

Los resultados obtenidos se han presentado en los siguientes congresos:

ASH 2020 Meeting (virtual):

- Alex Bataller A, Garrido A, Guijarro F, Diaz-Beyá M, Oñate G, Hoyos M, Arnan M, Tormo M, Vives S, Queipo De Llano MP, Salamero O, Coll R, Gallardo D, Vall-Llovera F, Escoda L, Sampol A, Garcia-Guiñon A, Merchan B, Bargay J, Lopez-Guerra M, Pratcorona M, Zamora L, Brunet S, Nomdedeu JF, Sierra J, **Esteve J**.

*Validation of the European Leukemianet 2017 Prognostic Classification for Patients with De Novo Acute Myeloid Leukemia Treated with a Risk-Adapted Protocol (CETLAM*

2012).

○ Castaño-Díez S, Lopez-Guerra M (PhD), Guijarro F (MD), Bataller Torralba A (MD), Esteban D, Castillo C (MD), Jiménez-Vicente C (MD), Charry P (MD), Colomer D, Rozman M (MD), **Esteve J**, Diaz-Beyá M (MD).

*Emergence of NPM1 Wild-Type Myeloid Neoplasms after Chemotherapy for Acute Leukemia with NPM1 Mutation: Proposed Mechanisms of Clonal Evolution.*

○ Jiménez-Vicente C, Charry P, Suárez-Lledó M, et al.

*Validation of ELN 2022 Risk Classification in Patients Diagnosed with AML Undergoing Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation.*

EHA 2022 Congress (Viena, Austria):

○ Delgado-Martínez J, Cornet-Masana JM, Cuesta-Casanovas L, Carbó JM, Clément-Demange L, **Risueño RM**.

*Role of lysosomal-associated gene LAPT4B in leukemia.*

Junio de 2022, Asociación Europea de Hematología.

Se ha presentado una tesis doctoral relacionada con este proyecto:

- Jennifer Delgado Martínez.

*Papel de la proteína lisosomal LAPT4B en leucemia mieloide aguda.*

6 de julio de 2023, Universidad de Barcelona.

Directora de tesis: Ruth Muñoz Risueño.