



MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN CÁNCER

SUPERANDO LA RESISTENCIA A LAS INMUNOTERAPIAS A TRAVÉS DE LA INHIBICIÓN DE MYC EN CÁNCER DE PULMÓN MUTADO EN KRAS CON PERFILES MUTACIONALES DIVERSOS

Dra. Laura Soucek

VHIO Vall d'Hebron Institut d'Investigació Oncològica

Dr. Silvestre Vicent Cambra

CIMA Universidad de Navarra - FIMA Fundación para la Investigación Médica Aplicada
Navarra

1. Resumen

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad por cáncer en todo el mundo. Las mutaciones más comunes en esta enfermedad activan el oncogén KRAS, lo que confiere un mal pronóstico y un alto riesgo de recurrencia tumoral.

Desafortunadamente, no existen terapias personalizadas disponibles para dirigirse a la mayoría de estas mutaciones. Incluso la inmunoterapia, que ahora está mostrando eficacia para otras indicaciones, presenta una actividad limitada en la mayoría de los tumores con mutaciones en KRAS, posiblemente porque las mutaciones concomitantes que a menudo acompañan a las alteraciones en KRAS conducen a diferentes propiedades inmunológicas.

Por lo tanto, aquí proponemos una estrategia terapéutica alternativa centrada en dirigirse a un nodo *downstream* de KRAS crucial en la patogénesis del cáncer de pulmón: el factor de transcripción MYC. MYC está desregulado en la mayoría de los cánceres —si no en todos—, y no solo promueve la progresión tumoral (lo que induce la proliferación celular), sino que también es responsable de la evasión inmune tumoral, un fenómeno que hace que el cáncer sea invisible para nuestro sistema inmunológico. Aunque todavía no hay un inhibidor directo de MYC disponible en la clínica, ha finalizado con éxito el primer ensayo clínico de la miniproteína Omomyc, un excelente inhibidor de MYC en estudios preclínicos. Hemos demostrado que esta miniproteína tiene un gran impacto terapéutico en modelos preclínicos de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) impulsados por KRAS, y que además es capaz de reclutar linfocitos T en el tumor.

Teniendo esto en cuenta, nuestra hipótesis es que la inhibición de MYC por parte de Omomyc en adenocarcinomas de pulmón impulsados por KRAS que presentan las mutaciones coexistentes más comunes en genes supresores de tumores (TSG) (*Trp53*, *Lkb1* y *Keap1*) no solo detendrá la progresión tumoral, sino que también promoverá un cambio de un microambiente inmunosupresor a uno más inmunoestimulador, lo que fomentará una respuesta inmunitaria antitumoral efectiva que permitiría superar, o potencialmente prevenir, el desarrollo de resistencia a la inmunoterapia.

2. Resultados

Para verificar nuestra hipótesis, hemos utilizado diferentes líneas celulares isogénicas derivadas del modelo de ratón transgénico de cáncer de pulmón KRAS-G12D (KLA), cada una previamente modificada por el Dr. Silvestre Vicent para albergar las mutaciones concomitantes más prevalentes de los genes supresores de tumores (TSG): TP53, STK11 y KEAP1. Estas líneas celulares proporcionaron una plataforma robusta para nuestra investigación. Nuestro objetivo principal fue realizar una caracterización exhaustiva de estas líneas celulares tanto *in vitro* como *in vivo*. Observamos cinéticas de crecimiento similares en todas las líneas celulares KLA, aunque con una desaceleración sutil en aquellas que llevaban mutaciones en STK11 y KEAP1. Luego, cuantificamos los niveles endógenos de MYC en las diferentes variantes de líneas celulares. Sorprendentemente, nuestros análisis de *Western blot* revelaron un aumento notable en los niveles basales de MYC en todas las líneas celulares mutantes de TSG, con una sobreexpresión particularmente significativa observada en los mutantes de STK11 y KEAP1.

Además, realizamos análisis transcriptómicos para caracterizar aún más las diferentes líneas celulares. En este sentido, las células portadoras de mutaciones en TSG mostraron una expresión aumentada de genes relacionados con la migración celular, la reorganización de la matriz extracelular y la respuesta al estrés oxidativo, y una regulación a la baja de los genes relacionados con la respuesta inmune, la cascada del complemento y la migración de leucocitos, en comparación con la línea celular parental.

Siguiendo nuestras investigaciones *in vitro*, evaluamos el comportamiento de las líneas celulares en un contexto *in vivo*. Tras establecer las condiciones adecuadas de inoculación, determinamos que las células KLA-Keap1 mostraban un crecimiento acelerado *in vivo* en comparación con las otras variantes de líneas celulares. Luego, procedimos a caracterizar el infiltrado inmunológico en presencia de las diferentes mutaciones en TSG mediante citometría de flujo. Con este fin, analizamos diferentes poblaciones de células inmunes 3 y 5 semanas después de la implantación tumoral. Los resultados mostraron que el infiltrado inmunológico tumoral experimenta cambios temporales, de manera que se desplaza progresivamente hacia un fenotipo más inmunosuprimido con el tiempo, independientemente del perfil mutacional del tumor.

Sin embargo, el fenotipo inmunosuprimido fue más profundo en los tumores mutantes de STK11, lo que refleja las observaciones realizadas en pacientes portadores de esta mutación.

Seguidamente volvimos al entorno *in vitro* para investigar la respuesta a la inhibición de MYC por Omomyc de las diferentes líneas celulares. Una dosis estándar de Omomyc resultó en una reducción significativa del crecimiento celular en todas las líneas celulares KLA en comparación con los controles no tratados. Omomyc también cambió el perfil del ciclo celular, e indujo un arresto intrigante en la fase S en todas las líneas celulares mutantes de TSG pero no en la parental.

Posteriormente, para estudiar cómo la inhibición de MYC podría influir en la respuesta inmune antitumoral, analizamos, mediante qPCR, genes relacionados con la evasión inmune y la presentación de antígenos. Los resultados indicaron alteraciones significativas en estos genes tras el tratamiento con Omomyc en todas las líneas celulares deficientes en TSG, con cambios más pronunciados observados en el modelo KLA-P53. Es importante destacar que cada línea celular mostró patrones distintos de regulación al alza o a la baja de los genes en respuesta a Omomyc. Además, análisis transcriptómicos adicionales revelaron que, en respuesta a Omomyc, todas las líneas celulares mutantes experimentaron una regulación a la baja de genes relacionados con las vías de señalización de los receptores y una regulación al alza de los genes relacionados con la respuesta inmune antitumoral.

A raíz de esto, examinamos la respuesta a la inhibición de MYC *in vivo* y observamos que los animales tratados con Omomyc mostraban un crecimiento tumoral significativamente reducido en comparación con los animales control en las líneas celulares parentales (KLA-NT), las mutantes de P53 y de KEAP1, con una reducción más pronunciada en el modelo mutante de P53.

También se observó una modulación del microambiente inmunológico tumoral tras el tratamiento con Omomyc. Los cambios inmunológicos más profundos se observaron en aquellos modelos en los que Omomyc pudo reducir mejor el crecimiento tumoral, en concreto en los modelos NT y mutante de P53. En contraste, los modelos mutantes de STK11 y KEAP1 no mostraron cambios significativos en el microambiente inmunológico tumoral. Basándonos en estos hallazgos, procedimos a la combinación *in vivo* de

Omomyc con inmunoterapia en los modelos mutantes de NT y P53. Dicha combinación aumentó la supervivencia media obtenida en comparación con ambos agentes por separado, ya que casi todos los ratones tratados mostraron una respuesta parcial (PR) o completa (CR) en comparación con la mitad de los ratones tratados solo con inmunoterapia.

Además de evaluar la combinación de Omomyc con inhibidores de puntos de control inmunológico, este proyecto proporcionó la oportunidad de explorar la sinergia de Omomyc con otros tratamientos contra el cáncer comúnmente empleados para el NSCLC mutado en KRAS, específicamente inhibidores de KRAS y MEK1/2. Nuestros hallazgos subrayaron la notable eficacia terapéutica de combinar estos inhibidores con Omomyc, lo que abre el camino para seguir investigando en esta prometedora línea de investigación.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Los fármacos contra el cáncer actuales se dirigen a funciones degeneradas y redundantes de las células cancerosas, que evolucionan y compensan la función bloqueada, lo que lleva a la recurrencia y resistencia a la enfermedad. Además, a menudo causan efectos secundarios no deseados y toxicidad. En este proyecto financiado por La Marató proponemos un enfoque innovador para atacar MYC, una función no redundante que controla la división celular, el reconocimiento de células inmunes y la resistencia a la terapia. OMO-103 (Omomyc) es un inhibidor directo de MYC de primera clase del que se ha completado recientemente con éxito un ensayo clínico de primera administración en humanos (FIH) en pacientes con tumores sólidos avanzados. Los resultados del ensayo han demostrado una excelente seguridad, un bloqueo de MYC dependiente de la dosis en los pacientes y los primeros signos de actividad clínica. El impacto clínico potencial de este enfoque no tiene precedentes, ya que un inhibidor de MYC eficiente de primera clase podría servir para tratar varios tipos de cáncer (si no todos).

En este proyecto nos hemos centrado en el NSCLC mutante de KRAS que presenta mutaciones concomitantes en los genes supresores de tumores más comunes (*TP53*, *KEAP1* y *STK11*). Los pacientes con mutaciones en KRAS son el segmento de pacientes

más desatendido, ya que no hay fármacos dirigidos efectivos disponibles para ellos, por lo que actualmente se los está tratando con quimioterapias altamente tóxicas e ineficaces. De hecho, la mayoría de las terapias dirigidas para el cáncer de pulmón impulsado por KRAS han fracasado debido a la aparición de mecanismos de resistencia compensatorios o adaptativos. Esta es una clara limitación, que exige el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para cubrir todo el espectro de mutaciones de KRAS. Para abordar esta necesidad no satisfecha, en este proyecto hemos demostrado que la inhibición de MYC es una estrategia terapéutica efectiva para tratar tumores mutantes de KRAS, incluso en presencia de diferentes mutaciones concomitantes en TSG, y ha demostrado la máxima eficacia en los tumores con mutaciones combinadas de KRAS y P53, seguidos por los que tienen solo mutaciones en KRAS. Además, hemos observado una modulación profunda de la respuesta inmune antitumoral después del tratamiento con Omomyc, y el microambiente inmunosupresor ha cambiado hacia un estado más inmunoestimulante. Con estos resultados, hemos proporcionado la prueba de concepto de que la inhibición de MYC es beneficiosa para los pacientes con NSCLC impulsado por KRAS con diferentes perfiles mutacionales, un hecho que podría influir en la decisión clínica de añadir a estos pacientes a ensayos clínicos que evalúen una terapia anti-MYC.

La inmunoterapia ha sido aprobada recientemente como monoterapia de primera línea o en combinación con quimioterapia estándar para el tratamiento de pacientes con NSCLC avanzado. Sin embargo, a pesar de mostrar respuestas notables en algunos pacientes, los inhibidores de puntos de control inmunológico (ICI) no muestran eficacia contra la gran mayoría de tumores mutantes de KRAS, debido a la resistencia innata o adquirida. Esto puede explicarse por la presencia de diferentes patrones de compromiso del sistema inmunológico desencadenados por mutaciones concomitantes en genes supresores de tumores como *P53*, *STK11* y *KEAP1*. Los resultados derivados de este proyecto sostienen esta hipótesis, ya que hemos demostrado que el microambiente inmunológico tumoral es diferente entre los tumores que presentan estos perfiles mutacionales y que se vuelve más inmunosupresor a medida que los tumores evolucionan. Este grado de inmunosupresión depende del perfil mutacional, y los tumores con mutaciones en KRAS y P53 o con mutación solo en KRAS son menos suprimidos. Curiosamente, estos dos perfiles mutacionales fueron los que mostraron un cambio inmune más profundo después del tratamiento con Omomyc.

Basándonos en estos hallazgos, realizamos experimentos para evaluar la sinergia entre la inhibición de MYC y dos inmunoterapias clínicamente disponibles. Nuestros resultados demostraron la notable sinergia terapéutica lograda mediante estos tratamientos combinados. Identificar estrategias de combinación con actividad antitumoral sinérgica, diseñadas para contrarrestar la resistencia a la inmunoterapia, podría ofrecer terapias de primera clase para pacientes con NSCLC, lo que permitiría personalizar los tratamientos contra el cáncer para los diferentes subgrupos de pacientes y, así, revelar nuevas estrategias de intervención para el tratamiento de este grupo de pacientes aún desatendido. Es importante destacar que, dado que Omomyc se está probando actualmente en ensayos clínicos, los resultados de este proyecto pueden tener un impacto clínico significativo, ya que proporcionan una sólida justificación para brazos adicionales en estudios de fase I o II para pacientes con mutaciones de KRAS con diversos perfiles mutacionales. En estos casos, Omomyc podría usarse como terapia combinada para erradicar potencialmente los tumores actualmente considerados resistentes a la inmunoterapia. Dado que, hasta la fecha, no hay opciones terapéuticas efectivas para los tumores con mutaciones de KRAS, este proyecto proporciona la prueba de concepto para nuevas combinaciones de fármacos que podrían brindar a los pacientes con cáncer de pulmón terapias más efectivas y menos tóxicas, lo que reduciría sustancialmente los costes actuales de atención médica y mejoraría la calidad de vida de los pacientes. Es importante destacar que, dado que las mutaciones de KRAS son predominantes también en los cánceres de páncreas y colorrectales, la aplicación potencial de estos tratamientos combinados a estos tipos de tumores altamente prevalentes promete tener un impacto clínico aún más sustancial. En conclusión, este proyecto de La Marató ha promovido una nueva línea de investigación que puede permitir un avance clínico rápido y sustancial. En este contexto, también estamos explorando activamente la sinergia terapéutica lograda al combinar Omomyc con inhibidores de KRAS recientemente aprobados, una línea de investigación que ya ha proporcionado resultados altamente prometedores.

4. Bibliografía científica generada

Los resultados derivados de este proyecto han sido presentados en numerosos conferencias nacionales e internacionales, tanto en formato de póster como de comunicación oral:

○ Íñigo González-Larreategui *et al.*

MYC inhibition by an Omomyc-based therapy abrogates tumor progression and induces immune cell recruitment in models of KRAS-driven NSCLC.

I Congress of Naïve Immunologists from Catalan Society of Immunology, Barcelona, septiembre de 2022.

Póster.

○ Íñigo González-Larreategui *et al.*

Characterization of KRAS-driven NSCLC cell lines with diverse mutational landscape and their response to MYC inhibition.

Summer School in Translational Cancer Research (Cancer Core Europe), Algarve (Portugal), octubre de 2022.

Póster.

○ Íñigo González-Larreategui *et al.*

Characterization of KRAS-driven NSCLC cell lines with diverse mutational landscape and their response to MYC inhibition.

Molecular Targets and Cancer Therapeutics Symposium (EORTC-NCI-AACR), Barcelona, octubre de 2022.

Póster.

○ Sílvia Casacuberta-Serra *et al.*

MYC inhibition by OMO-103 induces immune cell recruitment in preclinical models of NSCLC and modulates the cytokine and chemokine profiles of Phase I patients showing stable disease.

XVI Congress of the Catalan Society of Immunology (SCI) - Advanced Immunotherapies. Barcelona, noviembre de 2022.

Comunicación oral.

○ Íñigo González-Larreategui *et al.*

Characterization of KRAS-driven NSCLC cell lines with diverse mutational landscape and their response to MYC inhibition.

XVI Jornada Científica Vall d'Hebron, Barcelona, diciembre de 2022.

Póster.

○ *A new generation of mini proteins for cancer treatment.*

Módulo de Biología del Cáncer en la Brunel University, Londres (Reino Unido), febrero de 2023.

Ponente invitado.

○ Laura Soucek *et al.*

Identification of potential biomarkers of response to OMO-103, a first- in-modality pan-MYC inhibitor, in patients with advanced solid tumors.

Presentado en el Biomarkers of Response in Novel Molecular Therapeutics

Minisymposium, en el AACR 2023 Annual Meeting, Orlando (EE. UU.), abril de 2023.

Ponente seleccionado.

○ Íñigo González-Larreategui *et al.*

Characterization of KRAS-driven NSCLC cell lines with diverse mutational landscape and their response to MYC inhibition.

Defence is the Best Attack: Immuno-Oncology Breakthroughs, organizado por la European Association for Cancer Research (EACR), Barcelona, mayo de 2023.

Póster.

○ Laura Soucek *et al.*

Progress in the development of a clinically viable MYC inhibitor.

EACR 2023 Congress: Innovative Cancer Science, Turín (Italia), junio de 2023.

Póster.

○ Íñigo González-Larreategui *et al.*

Therapeutic impact and immune modulation by MYC inhibition in KRAS-driven NSCLC with diverse mutational landscapes.

XVII Annual Scientific Congress of the Catalan Society of Immunology (SCI), Barcelona, noviembre de 2023.

Comunicación oral.

○ Íñigo González-Larreategui *et al.*

Therapeutic impact and immune modulation by MYC inhibition in KRAS-driven NSCLC with diverse mutational landscapes.

17th Vall d'Hebron Scientific Meeting, Barcelona, noviembre de 2023. Póster.

El desarrollo de este proyecto ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- Casacuberta-Serra S, González-Larreategui I, Capitán-Leo D, Soucek L.

MYC and KRAS Cooperation: From Historical Challenges to Therapeutic Opportunities in Cancer.

En segunda revisión en Signal Transduction and Targeted Therapy (IF 39.2).

- Casacuberta-Serra S, Gonzalez-Larreategui I, Soucek L.

eIF4A dependency: the hidden key to unlock KRAS mutant non-small cell lung cancer's vulnerability.

Transl Lung Cancer Res. 2023 (comentario editorial).

Publicaciones científicas adicionales que abarcan todos los resultados derivados de este proyecto se encuentran actualmente en preparación para su presentación en revistas de alto impacto.