



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA  
CÀNCER

## **SIGNATURA GENÈTICA I IMMUNE PER PREDIR LA RESPOSTA A QUIMIOTERÀPIA NEOADJUVANT EN PACIENTS AMB CÀNCER DE BUFETA**

**Dra. Cecilia Cabrera Navarro**

IrsiCaixa Institut de Recerca de la Sida - IIGTiP Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol

**Dr. Alejo Rodríguez-Vida Rodríguez**

IMIM Institut de Recerca Hospital del Mar

## 1. Resum

El càncer de bufeta és una de les formes més comunes de càncer i una de les principals causes de mort per càncer en homes. La quimioteràpia neoadjuvant amb cisplatí (NAC) abans de l'extracció posterior de la bufeta (coneguda com a *cistectomia radical*) és el tractament estàndard per als pacients amb càncer de bufeta musculoinvasiu (MIBC). Malauradament, més del 50% dels pacients no responen a aquest tractament. La identificació de biomarcadors fiables que permetin classificar els pacients que no respondran al tractament és crucial per agilitzar la cirurgia, reduir els costos i minimitzar la morbiditat.

L'objectiu d'aquest estudi és identificar un biomarcador que pugui predir la resposta a la NAC en pacients amb MIBC. Per a això, s'ha reclutat una cohort de pacients, dels quals s'han obtingut mostres de sang perifèrica i teixit tumoral, tant fresc com conservat en parafina. Aquestes mostres s'han sotmès a una caracterització exhaustiva de la resposta immune.

## 2. Resultats

Hem reclutat 45 pacients amb un MIBC urotelial T2-4N0M0 i candidats a quimioteràpia neoadjuvant amb mostres de sang i teixit fresc. A més, també hem reclutat 20 pacients amb MIBC T2-4N0M0 i candidats a quimioteràpia neoadjuvant amb mostres de parafina. També hem reclutat controls sense tumor.

Hem fet una anàlisi de citometria de flux multiparamètrica en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) i teixit de la bufeta de pacients amb MIBC pT2-T4N0 en el pretractament ( $n = 17$ ) i després del tractament neoadjuvant [cirurgia de cistectomia radical (RC),  $n = 21$ ]. Mostres aparellades de pretractament i posttractament estaven disponibles per a 8 pacients. Set individus sense càncer es van incloure com a controls. La no resposta es va determinar a la cistectomia i els pacients es van classificar com a no responedors o responedors.

Hem trobat que la resposta immune en els pacients responedors i no responedors és diferent.

- L'expressió de l'ATPasa lligada a la membrana CD39 en cèl·lules T CD4+ de sang perifèrica es va expressar diferencialment en els pacients que van respondre i els que no van respondre al tractament neoadjuvant. El percentatge de cèl·lules CD4+ CD39+T circulants va ser significativament més alt en els pacients que no van respondre al tractament neoadjuvant en el moment de la TURBT, i s'observa la mateixa tendència també en la cirurgia de cistectomia radical (RC), en comparació amb els pacients que hi van respondre, fet que suggereix que aquestes cèl·lules podrien tenir un paper en la resistència al tumor. La proporció d'aquestes cèl·lules en els individus no responedors a la TURBT també va ser més alta que en els pacients MIBC que hi van respondre i que en la població control. En les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC), el CD39 està particularment enriquit en cèl·lules T CD4+ de memòria efectora i memòria central, i les diferències entre els pacients responedors i els no responedors van ser significativament més altes si es comparaven aquestes cèl·lules de memòria central i efectora. Les cèl·lules T CD4+ que expressen CD39 tenen una expressió més alta de l'inhibidor del punt de control immune PD-1 i una reducció d'enzims citolítics com la granzima-1 (GrzB) i la perforina, en comparació amb els nivells trobats en la població CD39-. A més, en les cèl·lules T CD4+ de sang, el CD39 es correlaciona positivament amb FoxP3+ i TIGIT+, i negativament amb GrzB i perforina. Aquests resultats també es van observar en el compartiment immune del teixit de la bufeta de pacients amb MIBC, ja que la freqüència de cèl·lules CD39+ CD4+ intratumorals va ser significativament més alta en els pacients que no van respondre al tractament neoadjuvant que en els pacients que hi van respondre, i aquestes cèl·lules CD39+ també van mostrar una correlació positiva amb les cèl·lules CD4+T tumorals que expressaven TIGIT, ICOS i FoxP3.

Per tant, hem identificat l'expressió de CD39 en cèl·lules T CD4+ totals i en diferents subconjunts de maduració com un biomarcador prometedor per predir la resposta al tractament neoadjuvant en pacients amb MIBC. A més, les nostres dades suggereixen que dirigir-se al CD39 podria proporcionar una nova estratègia terapèutica per millorar els resultats clínics en individus amb MIBC.

- L'expressió d'altres marcadors en cèl·lules T CD8+ com el marcador inhibidor NKG2A o PD-1 en les cèl·lules de memòria efectora primerenca també va ser diferent entre els pacients responedors i els no responedors.

També s'han observat diferències funcionals. Les cèl·lules dels pacients que responen al tractament secreten una producció més alta d'IL4 tant en les cèl·lules T CD4+ com en les cèl·lules T CD8+ que els pacients que no hi responen. Això suggereix una associació entre la resposta i la presència de cèl·lules amb un fenotip Th2. En canvi, les cèl·lules NK d'aquests pacients que hi responen van produir menys IL-21. L'IL-21 actua prevenint l'activació de les cèl·lules NK, motiu pel qual podríem assumir que en aquest cas els pacients amb una bona resposta podrien tenir un compartiment NK més activat. Aquesta idea la reforcen els resultats observats amb l'IL-17. Els pacients que no van respondre al tractament tenien nivells més alts d'IL-17 i s'ha descrit que l'IL-17 promou la tumorigènesi i la metàstasi, per tant, limita l'activitat antitumoral i antiviral de les cèl·lules NK mitjançant la inhibició de la maduració de les cèl·lules NK. Els pacients amb una bona resposta també tenen cèl·lules T CD8+ més polifuncionals (que secreten més d'una citocina) que els pacients sense resposta. La resposta immune també es va mesurar segons l'activació de les cèl·lules T i l'expressió superficial de diferents receptors. Aquest assaig detecta cèl·lules que s'activen com a resultat de l'estimulació específica de l'antigen mitjançant l'augment dels marcadors de superfície induïts per l'activació CD137 i OX40. Aquestes anàlisis mostren que els pacients que no hi van respondre tenien significativament menys activació immune que aquells pacients que van tenir una bona resposta, tant en les cèl·lules T CD4+ com en les cèl·lules T CD8+.

En general, l'anàlisi funcional indica que el perfil d'activació de certes poblacions de cèl·lules immunològiques de la sang també es pot utilitzar per diferenciar la resposta dels pacients amb MIBC al tractament neoadjuvant. Tot i que cal una comprensió més profunda dels mecanismes biològics involucrats en aquestes diferències, els nostres resultats semblen indicar que les cèl·lules dels pacients que responen al tractament tendeixen a tenir més activació immune, la qual cosa podria ser un altre factor per explicar per què aquests pacients obtenen millors resultats clínics.

A més, hem emmagatzemat mostres de suspensions de cèl·lules individuals criopreservades viables de sang perifèrica (PBMC) i mostres de tumor en nitrogen líquid, i hem realitzat l'RNA-Seq de cèl·lules individuals en un total de 16 mostres de teixit [9 mostres en el moment de la detecció del tumor, mitjançant la resecció transuretral del tumor de bufeta (RTU), i 6 mostres aparellades d'RTU i cistectomia, a més d'1 mostra de teixit no tumoral]. En 2 d'aquests individus, també s'ha realitzat

l'RNA-Seq de cèl·lules individuals en mostres aparellades de PBMC (tant en el moment de l'RTU com de la cistectomia). Les nostres dades preliminars mostren el següent:

- Després del procés d'anotació de cèl·lules (utilitzant Seurat), hem estat capaços d'identificar un gran nombre de poblacions immunes, tant del sistema immunològic innat com de l'adaptatiu, així com cèl·lules T i no T, així com diferents fenotips com ara cèl·lules esgotades, reguladores o proliferatives. També hem estat capaços de detectar cèl·lules no immunes com ara cèl·lules endotelials, cèl·lules musculars o fibroblasts. Utilitzant la puntuació del cicle cel·lular de Seurat, hem pogut calcular els punts del cicle cel·lular i observar les cèl·lules immunològiques que estaven proliferant. Vam observar una proliferació molt baixa en les cèl·lules epitelials a causa del baix rendiment obtingut amb aquestes cèl·lules tumorals.
- S'ha dut a terme una anàlisi de l'abundància diferencial per als pacients que van respondre a l'RTU-cistectomia i els que no hi van respondre. Hem observat que els pacients que hi van respondre tenen canvis significatius ( $p. \text{adj.} < 0,1$ ) en diversos tipus de cèl·lules, mentre que no es poden observar canvis significatius en els no responedors. Les diferències entre les diferents poblacions s'estan analitzant amb més profunditat.
- Anàlisi d'RNA-Seq de cèl·lules individuals i TCR-Seq de cèl·lules individuals. En dos pacients (a l'RTU i a la cistectomia) i en teixit i PBMC, es va realitzar una RNA-Seq i una TCR-Seq de cèl·lules individuals. En aquestes mostres, podem observar que s'ha detectat com a mínim una seqüència de TCR i, com era d'esperar, hi ha una molt bona superposició entre les cèl·lules amb TCR i les cèl·lules anotades com a cèl·lules T. Vam avaluar la clonalitat dels TCR en mostres de teixit i PBMC i en l'RTU (PRE) i en la cistectomia (POST), i, curiosament, en tots dos pacients vam observar un augment de la clonalitat després del tractament. A més, vam observar que les cèl·lules T infiltrants al tumor tenen un canvi més gran en la clonalitat que les cèl·lules T perifèriques. Això és consistent amb l'expansió de les cèl·lules T associada a una resposta antitumoral. Si avaluem el perfil de TCR en el teixit en l'RTU i en la cistectomia utilitzant un UMAP, podem observar que en el posttractament (en la cistectomia) la distribució dels clonotips a través dels estats cel·lulars canvia dràsticament en tots dos individus. El que es pot observar en tots dos pacients és una expansió dels efectors CD8 que ja estan presents en el tumor abans del tractament (RTU).

- Perfil de TCR (seqüenciació de la cadena beta variable del TCR) en mostres FFPE. S'ha fet la seqüenciació de les regions CDR3 de les cadenes TCR $\beta$  humanes utilitzant l'assaig ImmunoSEQ® (AdaptiveBiotechnologies) a partir de DNA obtingut de parafina de 10 individus seqüencials (en l'RTU i la cistectomia) amb diferent resposta al tractament. Estem analitzant totes les seqüències i preliminarment podem observar que les seqüències de TCR no es comparteixen en altes freqüències entre els individus a les mostres d'RTU o cistectomia. En canvi, i com va mostrar l'anàlisi de cèl·lules individuals, un gran nombre de TCR es comparteixen en el mateix pacient en la mostra d'RTU i la de cistectomia. Actualment, s'està duent a terme una anàlisi més profunda.
- Transcriptòmica espacial en mostres FFPE. Per completar l'anàlisi de la caracterització cel·lular en les mostres d'RTU i de cistectomia d'una manera més profunda i específica, s'estan analitzant 8 mostres d'aquesta cohort de pacients utilitzant la transcriptòmica espacial.

### **3. Rellevància i possibles implicacions futures**

Les implicacions clíniques dels resultats obtinguts en el projecte global encara no es poden extrapolar, ja que una gran quantitat de dades encara s'està processant, així com l'anàlisi integrada de totes aquestes dades. No obstant això, els resultats preliminars del projecte indiquen que podrem obtenir una caracterització en profunditat tant de la composició (fenotip) com de la funcionalitat de les cèl·lules immunològiques presents tant en la sang perifèrica com en el teixit abans i després del tractament amb quimioteràpia neoadjuvant. Aquestes dades mostren que la resposta immunològica (el fenotip i la funcionalitat) dels pacients que van respondre al tractament i els que no hi van respondre és diferent. Un dels camins que podria tenir un paper important en la patogènesi del càncer de bufeta i en la resposta al tractament és la via CD39/CD73. Aquesta via, que és la via ATP-adenosina, ha emergit en els últims anys com un objectiu prometedor per a la teràpia del càncer en altres tipus de tumors. En aquest sentit, hem identificat l'expressió de CD39 en cèl·lules T CD4+ totals i en diferents subconjunts de maduració com un biomarcador prometedor per predir la resposta a la quimioteràpia en pacients amb MIBC, que té el potencial d'utilitzar-se en la clínica mitjançant estudis de validació addicionals. A més, les nostres dades suggereixen que el CD39 podria tenir un paper de resistència al tumor i, per tant, la inhibició del CD39

podria proporcionar noves estratègies terapèutiques per dirigir-se al MIBC i la seva resistència a la quimioteràpia. Les dades de transcriptòmica de cèl·lules individuals i espacials, així com el perfil de TCR, ens proporcionaran una corroboració de les nostres dades de citometria, així com d'altres vies cel·lulars que participen en la resposta al tractament i que podrien ajudar en una millor gestió clínica dels pacients. En aquest sentit, vam observar que en els pacients amb càncer de bufeta i en el teixit tumoral hi ha una expansió de les cèl·lules T, associada probablement amb una resposta antitumoral, i al fet que aquestes cèl·lules responedores ja estan presents en la mostra d'RTU. Aquestes dades suggereixen que les respostes antitumorals no es generen *de novo* després del tractament i, per tant, aquestes cèl·lules immunològiques infiltrants podrien ser expandides i utilitzades com a possibles estratègies terapèutiques.

#### 4. Bibliografia científica generada

Els resultats d'aquest projecte s'han presentat en els congressos següents:

- Senserrich J, Buisan O, Servian P, Clotet B, Cabrera C.

*CD4 T-cell CD39 as a predictive biomarker of response to neoadjuvant chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer patients.*

ASEICA 40th Anniversary Congress, A Coruña, 14-16 de novembre de 2023.

- Buisan Rueda O, Senserrich Velasco J, Servian Vives P, Sanchez Rodriguez M, Garcia Rodriguez E, Pagés Oliveras J, Freixa Sala R, Colomer Gallardo A, García Puche M, Segura Alabart M, Ferreiro Pareja C, Vignes Julia F, Areal Calama J, Clotet Sala B, Bellmunt Molins J, Cabrera Navarro C.

*Role of the CD39 pathway in modulating the response to neoadjuvant therapy in muscle invasive bladder cancer patients.*

XXXVII Reunión Nacional del Grupo de Urología Oncológica, Santander, 25 i 26 de abril. Premi al millor pòster sobre bufeta.

Part dels resultats es presentaran a la reunió de l'ASCO 2024:

- Bellmunt J, Hully M, Epstein I, Liria Veiga S, Xie Y, Kukreja S, Muñoz M, Garoz Martínez P, Fernández Martínez N, Cabrera C, Choueiri TK, Long H, Cejas P.

*Combined high resolution H3K27ac epigenomic and single cell transcriptional profiling identifies a signature predictive of response to neoadjuvant immune checkpoint inhibitors (ICI) in Urothelial Cancer (UC).*

S'ha enviat un resum amb els resultats a la reunió de l'ESMO 2024:

- Buisan O, Senserrich J, Servian P, Sánchez M, Garcia E, Pagès J, Freixa R, Colomer A, García M, Segura M, Cervera J, Ferreiro C, Vignes F, Areal JJ, Clotet B, Bellmunt J, Cabrera C.

*Role of the CD39 pathway in modulating the response to neoadjuvant therapy in muscle-invasive bladder cancer patients.*