



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA
CÀNCER

IMMUNOTERÀPIES A MIDA EN MODELS 3D DE LIMFOMA FOL·LICULAR (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. Resum

El nostre estudi s'ha centrat en el limfoma fol·licular (FL), el segon limfoma no Hodgkin (NHL) més freqüent i considerat indolent. L'FL típicament respon a règims estàndard d'immunoquimioteràpia. No obstant això, malgrat la seva naturalesa "indolent", l'FL és molt heterogeni: alguns pacients mostren remissió de llarga durada, mentre que d'altres recauen en els 2 primers anys. Així, en aquest projecte hem analitzat les alteracions genètiques i el perfil immune en biòpsies derivades d'FFPE en una sèrie de pacients amb FL en el moment del diagnòstic, tractats de manera homogènia amb un règim d'immunoquimioteràpia i amb un seguiment durant més d'11 anys. Comparant els pacients que van experimentar una recaiguda amb aquells que no, hem trobat una signatura de 25 gens sobreexpressats en el grup de recaiguda. Entre aquests gens, utilitzant immunofluorescència múltiple, hem validat la sobreexpressió de CD70 en les cèl·lules B tumorals, que es correlaciona fortament amb una supervivència lliure de progressió inferior. A més, una fracció de cèl·lules T del microambient tumoral també expressa CD70, i es van detectar nivells més alts tant en cèl·lules T CD4+ com CD8+ en el grup de recaiguda. CD27, el lligand de CD70, també va augmentar en la població de cèl·lules B en pacients que finalment van recaure i en cèl·lules T fol·liculars ajudants, mentre que es va reduir en cèl·lules T CD8+ i CD4+ no fol·liculars. Per investigar el paper de CD70 en la patogènesi de l'FL, vam generar dues línies cel·lulars CD70 *knock-out* (KO) i cèl·lules derivades de pacients d'FL utilitzant la tècnica CRISPR/Cas9. En cocultivar les cèl·lules T de donants sans amb cèl·lules FL CD70+ o CD70-, vam observar que les cèl·lules tumorals CD70+ promouen l'expressió de CD70 en les cèl·lules T. En mostres primàries, hem demostrat que les cèl·lules B CD70-KO mostren una resposta reduïda als estímuls proliferatius. Finalment, per avançar cap a teràpies personalitzades per a aquests pacients amb FL d'alt risc, hem generat un CAR-T dual CD19-CD70 combinant un producte acadèmic aprovat de l'Hospital Clínic de Barcelona (CD19-CAR-T, ARI-0001) i un CAR-T de proteïna CD27 truncada.

2. Resultats

El perfil transcriptòmic del limfoma fol·licular en ganglis limfàtics desxifra diferències en el moment del diagnòstic en els pacients que tenen recaigudes

El perfil transcriptòmic del gangli limfàtic d'FL revela diferències en el diagnòstic en pacients que recauen. Vam analitzar el transcriptoma de 730 gens relacionats amb el sistema immune dins del panel Nanostring® nCounter PanCancer Immune Profile en una cohort de pacients amb FL d'un sol centre (Hospital Clínic) tractats amb immunoquimioteràpia (principalment, R-CHOP). En la nostra anàlisi, vam comparar els pacients que no van recaure ($n = 20$) amb un seguiment extens de més de 10 anys amb pacients que finalment van recaure durant el seguiment ($n = 12$). Vam trobar 31 gens expressats diferencialment, 25 dels quals estaven sobreexpressats en el grup amb recaiguda, mentre que només 6 van augmentar en el grup sense recaiguda. Així, vam poder demostrar que els pacients amb diferents respostes clíniques a la immunoquimioteràpia mostren un perfil transcriptòmic diferent. Una anàlisi d'enriquiment de conjunts de gens (GSEA) utilitzant gens sobreexpressats en cada condició va mostrar que el grup de recaiguda tenia una sobrerrepresentació de gens relacionats amb la proliferació de cèl·lules B, l'activació de cèl·lules B i T, la regulació de citocines, la matriu extracel·lular i l'adhesió cel·lular, així com diferents vies pronocogèniques (PI3K/Akt, IL6/JAK-STAT, IL4), entre d'altres. També vam confirmar una disminució a la via del BCR en pacients sense recaiguda, acompanyada de la senyalització d'interferó de tipus I, la via de citotoxicitat T i la fagocitosi mediada per Fc γ , la qual cosa podria indicar un benefici més gran del rituximab, que allarga la resposta al tractament anti-CD20. En general, vam avaluar que els pacients tenen un perfil immune diferencial previ al diagnòstic en funció de si recauen o no.

CD70 està sobreexpressat en el grup de recaiguda i està associat a una càrrega mutacional més baixa

Pot ser útil descodificar un perfil immune diferencial entre pacients que recauen o no, no només per millorar el pronòstic de l'FL, sinó també per comprendre millor la biologia de la malaltia i dissenyar noves teràpies per a pacients que recauen repetidament, de manera que el seu pronòstic empitjora. Entre els gens sobreexpressats en pacients que recauen, ens centrem especialment en CD70, ja que s'ha definit com un factor oncogènic en molts càncers, incloent-hi el limfoma de cèl·lules B, i s'expressa a la membrana cel·lular, fet que el fa fàcilment objecte d'intervenció terapèutica. És interessant observar que CD70 no només s'incrementa en el grup de recaiguda, sinó que també està associat amb un temps de supervivència lliure de progressió (SLP) més curt, a prop del límit de significació ($p = 0,067$). A continuació, vam investigar si

l'expressió de CD70 es correlacionava amb altres gens. Entre els 730 gens inclosos en el panel d'Immunoprofile de Nanostring®, CD70 es correlaciona significativament amb 30 gens, i inversament amb només 5 gens. Especialment, alguns dels gens més representats que es correlacionen directament amb CD70 són citocines i quimiocines, com ara el quimioattractant de Th17/Treg CCL20, CCL22, una citocina rellevant en el microambient de l'FL, i IRF4, relacionat amb la transformació de l'FL en DLBCL. El perfil mutacional dels pacients utilitzats en la nostra sèrie també ha estat publicat per Mozas *et al.* Sorprenentment, vam trobar una tendència a una càrrega mutacional més baixa en pacients amb nivells més alts de CD70 RNA. En pacients amb menys de 8 mutacions, l'expressió de CD70 era significativament més alta que en pacients amb 8 mutacions o més. En analitzar mutacions individuals, vam trobar diferències significatives en l'expressió de CD70 en CARD11, CIITA i TNFSRSF14, també conegut com a HVEM. En tots ells, els pacients amb alteracions en aquests gens tenen nivells més baixos de CD70.

L'expressió de les proteïnes CD70 i CD27 s'incrementa en les cèl·lules d'FL de pacients en recaiguda

Per validar els nostres resultats a escala de proteïna, vam realitzar immunofluorescència múltiple en biòpsies FFPE de ganglis limfàtics d'FL de la nostra cohort amb mostres disponibles. Vam confirmar que CD70 està sobreexpressat en les cèl·lules tumorals de pacients que finalment recauen. Aquestes dades ens van portar a anticipar una sobreactivació de l'eix CD27/CD70. Tot i que no vam trobar diferències en els nivells d'RNA de CD27, vam observar un increment de l'expressió de la proteïna CD27 en el grup de recaiguda, i això es va correlacionar amb un temps de supervivència lliure de progressió més curt.

CD70 també s'expressa en les cèl·lules T del microambient tumoral d'FL i mostra nivells més alts en pacients en recaiguda

A més, com que el paper de CD70 també ha estat destacat en el microambient tumoral d'FL, vam utilitzar la tècnica d'immunofluorescència múltiple per desxifrar l'expressió de CD70 entre les cèl·lules T. Per obtenir una imatge completa i precisa de l'expressió de CD70 i CD27 en els diferents subtipus de cèl·lules T, vam construir un panel de 6 colors que incloïa CD4, CD8, FOXP3, CXCR5, CD27 i CD70. Com esperàvem, les cèl·lules CD4+ són més abundants en l'FL-LN que les cèl·lules CD8+. Notablement vam observar una expressió més gran de la proteïna CD70 en les poblacions de cèl·lules

CD4 i CD8 en el grup de recaiguda. Dins de les cèl·lules CD4+, les cèl·lules TFH, Treg i T col·laboradores no fol·liculars en pacients en recaiguda tenen una expressió més alta de CD70, i TFH és la població amb un augment més pronunciat. En aquesta mateixa línia, l'expressió alta de CD70 en totes les poblacions de cèl·lules T es va relacionar amb un PFS més baix, excepte per a TFR. Per completar la nostra anàlisi, vam descriure l'expressió de CD27 en les diferents poblacions de cèl·lules T en FL-LN. Se sap que CD27 és una molècula coestimuladora i un marcador de cèl·lules T naïfs que es perd després del contacte amb antígens. Igual que amb CD70, vam analitzar l'expressió de CD27 en les diferents subpoblacions de CD4+. Mentre que les cèl·lules TFH en el grup de recaiguda tenen nivells més alts de proteïna CD27 i els pacients amb CD27 alt tenen un PFS notablement més curt, la seva expressió està disminuïda en les cèl·lules T col·laboradores no fol·liculars i els pacients amb CD27 baix tenen una supervivència pitjor. En general, vam poder demostrar una regulació a l'alça de CD70 en cèl·lules B i T, mentre que CD27 també està augmentat en les cèl·lules B, però té un patró heterogeni en les cèl·lules T.

L'expressió de CD70 en les cèl·lules B induïx nivells més alts de CD70 en les cèl·lules T

Vam analitzar els punts de correlació entre CD70+ en les cèl·lules B amb CD70 o CD27 en les diferents poblacions analitzades. El percentatge de cèl·lules CD70+ dins la població tumoral es correlaciona significativament amb CD70+ en les cèl·lules CD8+ i CD4+. Per entendre aquesta regulació mutual de l'eix CD70-CD27 en les cèl·lules B i T, vam generar, mitjançant la tecnologia CRISPR/Cas9, 2 línies cel·lulars derivades d'FL CD70-KO, WSU-FSCCL i SC-1, que són altament positives per a CD70. Després de cocultivar les cèl·lules T de donants sans amb línies cel·lulars FL CD70+ o CD70-, vam analitzar els nivells de CD27 i CD70 en les cèl·lules T. Remarcablement, quan es cocultiven amb una línia cel·lular CD70+, l'expressió de CD70 tant en cèl·lules CD4+ com CD8+ T s'incrementa significativament, com s'ha observat en mostres de pacients. En canvi, quan les cèl·lules FL no expressen CD70, aquest increment no es produeix, cosa que indica que hi ha un efecte específic de CD70. Pel que fa a CD27, després de la activació, les cèl·lules T van mantenir un alt percentatge de positivitat. Aquesta expressió es va veure reduïda quan les cèl·lules T van ser cultivades amb cèl·lules FL CD70+ però no amb cèl·lules FL CD70-. En conclusió, vam poder recapitular l'augment de l'expressió de CD70 i la disminució de l'expressió de CD27 observada per immunofluorescència múltiple en cèl·lules CD8+ i CD4+.

L'expressió de CD70 està relacionada amb la proliferació de cèl·lules B en mostres primàries d'FL

També es va aplicar CRISPR/Cas9 a mostres primàries d'FL. Quan les cèl·lules d'FL es van estimular en cocultiu amb YK6 (línia cel·lular derivada de cèl·lules dendrítiques fol·liculars) que expressen CD40L i IL21 (YK6-CD40L-IL21) i es van suplementar amb citocines IL-4 i IL-15, vam observar que les cèl·lules CD70+ tenien un percentatge més alt de cèl·lules en fase S, indicatiu d'un índex proliferatiu més alt. Així, aquesta validació experimental dona suport a un paper oncogènic de CD70 en la biologia de l'FL i reforça la seva intervenció terapèutica.

Un CAR-T basat en un lligand truncat que té com a diana CD70 té una alta eficàcia antilinfoma i es pot combinar amb el CAR-T CD19 per obtenir un nou CAR-T dual

Les cèl·lules CAR-T (de l'anglès, que significa 'receptor antigènic quimèric') anti-CD19 han revolucionat el tractament del limfoma de cèl·lules B. Tot i això, una part dels pacients no tenen respostes duradores i poden patir una recaiguda amb pèrdua de l'antigen CD19. Com que hem demostrat que CD70 està altament expressat en cèl·lules tumorals en pacients que recauen, vam hipotetitzar que CD70 podria representar una diana prometedora per a la teràpia CAR-T en limfoma fol·licular, especialment en el context d'un CAR-T dual CD19-CD70.

La nostra estratègia ha estat dissenyar un CAR-T basat en lligand, utilitzant el seu lligand natural, CD27. Els experiments de citotoxicitat s'han fet utilitzant els CAR-T individuals CD27 i ARI-0001 (CAR-T CD19). Utilitzant cèl·lules presentadores artificials K562, modificades per expressar CD19 i CD70, hem demostrat que el CAR-T CD27 té una eficàcia similar a l'ARI-0001. En assajos a llarg termini cocultivant línies cel·lulars d'FL CD19+CD70+ amb un nombre baix de CAR-T hem demostrat que el CAR-T CD27 és tan eficaç com l'ARI-0001 en la presència dels 2 antígens. Globalment, considerem que aquest nou CAR-T CD27 es podrà utilitzar en un CAR-T dual CD19-CD70. La cotransducció i altres anàlisis preclíniques estan en procés i les hem finançat mitjançant una beca internacional de la Follicular Lymphoma Foundation.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Gràcies al projecte finançat per La Marató, hem pogut identificar una signatura gènica que pot predir, en el moment del diagnòstic, quins pacients poden patir una recaiguda. Dins d'aquesta signatura, hem identificat CD70 com un nou biomarcador de recaiguda i un nova diana terapèutica en l'FL. En aquest sentit, i gràcies al programa de teràpies avançades de l'Hospital Clínic - IDIBAPS, hem desenvolupat un nou CAR-T dual CD19-CD70 que pot millorar la supervivència d'aquests pacients amb el risc més alt. A més, aquest nou producte terapèutic podria aplicar-se a altres limfomes B agressius, en què el CAR-T CD19 ofereix remissions més curtes, incloent-hi el limfoma difús de cèl·lules B grans i el limfoma de cèl·lules del mantell. Així, un cop acabem els estudis preclínic, presentarem una sol·licitud a l'Agència Espanyola de Medicaments i Productes Sanitaris (AEMPS) per proposar-los un assaig clínic de CART CD19-CD70 que inclogui aquests tipus diferents de limfomes B.

4. Bibliografia 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.