



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA
CÀNCER

NANOMEDICINES HUMANITZADES SELECTIVAMENT DIRIGIDES A MATAR LES CÈL·LULES TUMORALS CXCR4+ PER AL TRACTAMENT DE LA LEUCÈMIA 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. Resum

La quimioteràpia actual en leucèmia mieloide aguda (LMA) s'associa a toxicitat greu i efectes secundaris causats per la manca de selectivitat. Malgrat que la majoria de pacients responen a la quimioteràpia, molts d'ells presenten recidives i acaben morint per la malaltia. Hi ha una supervivència global a 5 anys, en pacients adults, inferior al 30%. Per tant, calen noves estratègies terapèutiques que millorin l'efectivitat del tractament i millorin la supervivència dels pacients. El receptor de quimiocines CXCR4 està sobreexpressat en les cèl·lules leucèmiques de més de la meitat dels pacients d'LMA. La sobreexpressió d'aquest receptor es correlaciona amb una supervivència global i lliure de malaltia més baixa i també s'associa a una resistència més gran a la quimioteràpia. Abans de començar el projecte, havíem desenvolupat un nou nanoconjugat proteic dirigit selectivament a les cèl·lules leucèmiques CXCR4+, a través del lligand T22, i unit al potent agent antimitòtic monometil auristatina E (MMAE). La nostra estratègia terapèutica treu profit de la sobreexpressió de CXCR4 en els blasts d'LMA en comparació amb les cèl·lules normals. El prototipus inicial d'aquest nanoconjugat conté un domini GFP que s'ha utilitzat per localitzar la nanopartícula tant *in vitro* com *in vivo*. Prèviament, ja havíem demostrat que el nanoconjugat T22-GFP-MMAE presenta un elevat efecte antitumoral en models animals d'LMA disseminats generats amb línies cel·lulars. L'objectiu principal d'aquest projecte ha estat humanitzar el nanoconjugat T22-GFP-MMAE, substituint el domini GFP per una proteïna humana, per evitar reaccions immunes en pacients. A més, hem utilitzat xenoempelts derivats de mostres de pacients (*patient-derived xenografts*, PDX) per definir la subpoblació de pacients que més es beneficiarà d'aquesta teràpia. Finalment, hem utilitzat models humanitzats de ratolí per estudiar el seu efecte en cèl·lules hematopoètiques normals. Com a resultat final d'aquest projecte hem obtingut un nou nanoconjugat, T22-HSNBT-MMAE, que és un candidat excel·lent per iniciar les fases preclíniques regulatòries prèvies als assajos clínics de fase I. Creiem que aquest nanoconjugat, selectivament dirigit a les cèl·lules CXCR4+, serà capaç de reduir els efectes secundaris dels tractaments habituals utilitzats en l'LMA i millorar la supervivència dels pacients, gràcies a un augment de l'efectivitat i una disminució de les recurrències relacionades amb la sobreexpressió de CXCR4 en les cèl·lules leucèmiques.

2. Resultats

1. Generació d'un nou nanoconjugat humanitzat. L'objectiu principal del projecte ha estat generar un nou nanoconjugat humanitzat derivat del prototip T22-GFP-MMAE, que mantingui la mateixa estructura i activitat però que no contingui el domini GFP, per evitar-ne la immunogenicitat. Per aquest motiu, es van generar inicialment 3 nanoconjugats que contenien diferents dominis derivats de proteïnes humanes que es van avaluar tant *in vivo* com *in vitro*. En aquests nanoconjugats es va substituir el domini GFP per 3 dominis proteics diferents, que eren: stefina A (T22-STM-MMAE), gonadotropina coriònica humana (T22-CTP-MMAE) i nidogen humà (T22-HSNBT-MMAE). Els resultats obtinguts es descriuen amb detall en un article publicat l'any 2022 (Serna *et al.*, 2022). Basant-nos en les dades obtingudes, especialment en l'activitat *in vivo* i en la metodologia necessària per al procés de producció, es va decidir continuar amb el desenvolupament del nanoconjugat amb nidogen (T22-HSNBT-MMAE) com a domini humanitzat per substituir GFP. Addicionalment es van fer diferents modificacions estructurals en el disseny del nanoconjugat i també en la metodologia de conjugació de la toxina MMAE, les quals han permès millorar la producció i les característiques del nanoconjugat així com augmentar-ne l'efectivitat tant *in vitro* com *in vivo*. D'una banda es va modificar el lligador que fins ara s'utilitzava per conjuguar la nanopartícula a MMAE i es va comprovar que el mateix nanoconjugat amb un lligador proteolitzable és molt més potent que quan s'utilitza el lligador no proteolitzable. D'altra banda s'ha posat a punt també la metodologia per realitzar una conjugació dirigida de l'MMAE que permet controlar exactament el lloc d'unió del fàrmac a la nanopartícula.

2. Avaluació de l'activitat antineoplàstica *in vitro* i *in vivo* de T22-HSNBT-MMAE. Amb aquest candidat definitiu s'han fet diversos assajos *in vitro* per avaluar més detalladament el seu mecanisme d'acció. Mitjançant tinció de Hoescht, es va poder determinar que *in vitro* el nanoconjugat produeix una forta inducció de catàstrofe mitòtica i d'apoptosi. Mitjançant citometria de flux es va fer un estudi de la regulació del cicle cel·lular pel nanoconjugat, i es va observar una aturada primerenca de cicle a G2/M. D'altra banda, també es van quantificar els nivells del marcador de dany al DNA γ H2AX i d'activació de procaspasa-3, i es va observar que tots dos marcadors augmentaven en les cèl·lules leucèmiques quan eren tractades amb el

nanoconjugat. Tots aquests resultats concorden amb el mecanisme d'acció descrit per a MMAE.

D'altra banda, s'han fet diversos estudis *in vivo*, en un model murí d'LMA disseminat, per demostrar l'activitat antileucèmica de T22-HSNBT-MMAE. El model animal utilitzat es genera per la injecció intravenosa de la línia cel·lular d'LMA humana THP1. Prèviament havíem transfectat aquesta línia amb el gen de la luciferasa que ens permet seguir *in vivo* la disseminació de les cèl·lules, utilitzant l'equipament IVIS Spectrum, que mesura els nivells de bioluminescència emesos per les cèl·lules *in vivo*. Així, doncs, utilitzant aquest model, es van fer diversos estudis preliminars per determinar les dosis adequades que produïen activitat sense tenir toxicitat, i es va establir que 1 dosi diària de 5 mg/kg de T22-HNSBT-MMAE, durant 8 dies, produïa un bloqueig total de la disseminació leucèmica i incrementava fins a gairebé el triple la supervivència dels ratolins (de 15 dies a 35-45 dies). Aquests resultats es mostren en la figura 1A (nivells de bioluminescència) i 1B (corbes de supervivència Kaplan-Meier). En tots els assajos *in vivo* es va fer una avaluació exhaustiva de la possible toxicitat del nanoconjugat mitjançant un hemograma, anàlisis bioquímiques de la funció hepàtica i renal i estudis histopatològics mitjançant tincions d'hematoxilina i eosina de tots els òrgans i teixits. En cap dels assajos *in vivo* realitzats vam observar cap tipus de toxicitat.

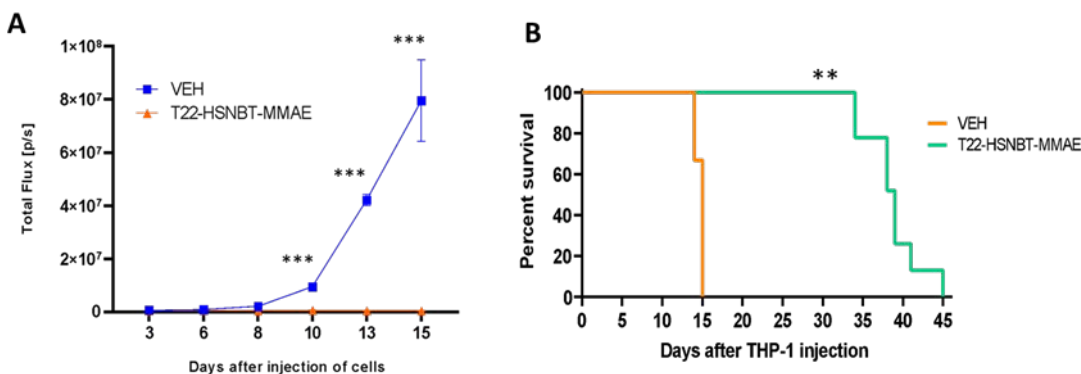


Figura 1. (A) Nivells de bioluminescència durant l'experiment *in vivo* utilitzant el model disseminat d'LMA amb cèl·lules THP1-Luci. Als ratolins del grup tractat se'ls va administrar 1 dosi diària de 5 mg/kg de T22-HSNBT-MMAE durant 8 dies. **(B)** Corbes de supervivència Kaplan-Meier que mostren l'augment estadísticament significatiu de la supervivència del grup d'animals tractats amb T22-HSNBT-MMAE. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3. Generació de models murins derivats de mostres de pacients d’LMA. Durant tot el projecte s’han recollit un total de 136 mostres de medul·la òssia de pacients de l’Hospital de Sant Pau en el moment del diagnòstic, a 92 dels quals finalment els han diagnosticat LMA. Totes les mostres s’han criopreservat i s’han utilitzat per als posteriors estudis *in vitro* i *in vivo*. S’ha generat una base de dades amb tota la informació clínica i molecular dels pacients, s’han avaluat els nivells de CXCR4 de les mostres i s’ha establert un llindar a partir del qual es consideren CXCR4+. Aquest llindar s’ha determinat en funció del nivell d’expressió de CXCR4 de les mostres de medul·la òssia dels donants sans. El percentatge de pacients CXCR4+ és d’aproximadament el 50%. Les mostres de medul·la òssia de donants sans tenen uns nivells de receptor CXCR4 molt baixos, tal com es veu en els resultats obtinguts per citometria de flux (figura 2A), i en la imatge representativa de la IHQ de CXCR4 (figura 2B). En la figura 2C es pot observar com es distribueixen algunes de les mostres dels pacients analitzades, i s’estableix el llindar per definir si son CXCR4+ o CXCR4– en el nivell mesurat en la mostra del donant sa.

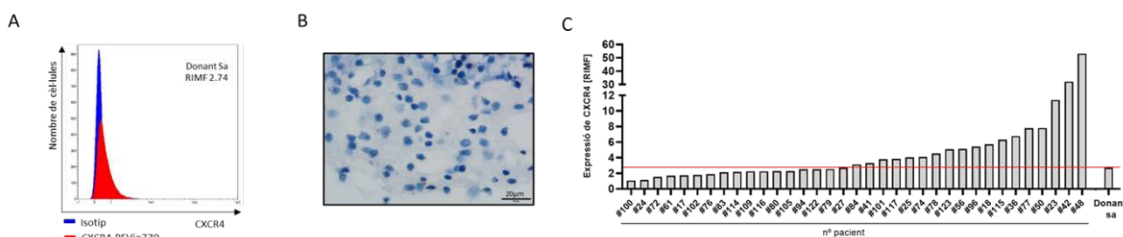


Figura 2. (A) Nivells d’expressió de CXCR4 d’una de les mostres de medul·la òssia obtinguda d’un donant sa mitjançant citometria de flux. **(B)** Imatge representativa d’una IHQ de CXCR4 d’una mostra de medul·la òssia de donant sa. **(C)** Nivell d’expressió de CXCR4 d’alguns dels pacients d’LMA i establiment del llindar de positivitat en funció dels nivells del donant sa.

Finalment, hem avaluat l’activitat del nanoconjugat seleccionat T22-HSNBT-MMAE en mostres de pacients d’LMA *ex vivo*. Per determinar la dependència del receptor CXCR4 en l’activitat antitumoral del nanoconjugat, hem utilitzat mostres de pacients d’LMA CXCR4+ (#133, #151, #137) però també mostres de pacients que no expressen el receptor (#126) i de medul·la òssia de donant sa. En la figura 3A es mostren els nivells de CXCR4 de les mostres i el punt de tall per considerar-les positives o negatives. En la figura 3B es mostren els resultats de l’avaluació de la viabilitat cel·lular *ex vivo*, on s’observa que les mostres CXCR4– no son sensibles al nanoconjugat mentre que les CXCR4+ presenten una forta disminució en la viabilitat quan són tractades durant 48 hores amb el nanoconjugat. Així, doncs, el llindar que hem establert per considerar una

mostra CXCR4+ o CXCR4- en funció de l'expressió del receptor en mostres de medul·la òssia de donants sans també ens serveix per determinar quins pacients poden ser sensibles o no al nanoconjugat.

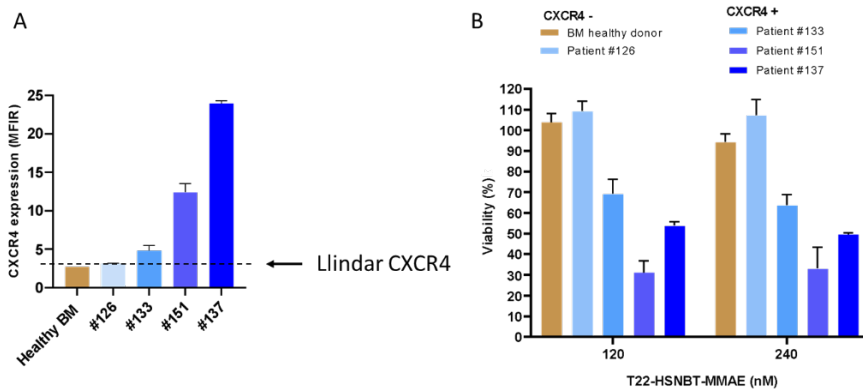


Figura 3. Anàlisi de l'activitat del nanoconjugat en mostres de pacients d'LMA *ex vivo*. **(A)** Nivells d'expressió de CXCR4 de les mostres de medul·la òssia de pacients d'LMA i d'un donant sa mesurats per citometria de flux. **(B)** Assajos de viabilitat cel·lular en les mostres prèviament descrites avaluant l'efecte del nanoconjugat després de 48 hores de tractament a 120 nM i 240 nM.

Aquests resultats estan pendents de ser validats *in vivo* utilitzant els diferents models murins derivats de PDX que hem enllestit durant el projecte. Al llarg del projecte s'han generat un total de 8 models de PDX derivats de mostres de pacients amb diferents nivells d'expressió de CXCR4. En tots els models s'ha determinat la setmana postinjecció a partir de la qual detectàvem cèl·lules CD45 humanes en sang perifèrica, la supervivència dels animals, el percentatge d'empelt i s'ha fet un estudi exhaustiu de tots els òrgans i teixits al final de l'assaig. També s'ha validat que les cèl·lules leucèmiques humanes aïllades de la medul·la òssia dels ratolins mantenen les mateixes alteracions genètiques presents en el pacients de qui provenien.

4. Generació de models murins humanitzats i avaluació de l'activitat de T22-HSNBT-MMAE. En aquest projecte s'han optimitzat dues metodologies per generar models murins humanitzats, utilitzant limfòcits T humans obtinguts de PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) o cèl·lules CD34+ provinents de mostres de cordó umbilical. Per als models murins humanitzats amb limfòcits T, els millors resultats d'humanització els hem obtingut quan s'ha partit d'un *pool* de PBMC de diversos donants. Considerant que un model s'ha humanitzat quan s'hi detecta un mínim de 20% de cèl·lules CD45+ humanes circulants en sang perifèrica, en aquest model s'ha assolit la humanització a partir dels 20 dies postinjecció, cosa que s'observa en més del 90% dels animals. A més, en els diferents experiments realitzats la reacció "empelt

contra hoste" ha estat un fenomen molt poc freqüent que no ha superat el 5% dels animals. L'inconvenient principal d'aquest model és que la finestra experimental és curta, ja que el sacrifici s'ha de fer com a màxim 40 dies després de la injecció. Per aquest motiu s'ha escollit el model humanitzat generat amb cèl·lules CD34+ de cordó umbilical per avaluar el nanoconjugat. Per generar aquest model hem utilitzat ratolins NSG de 4 setmanes, prèviament condicionats amb busulfan, als quals hem injectat un total de $1-2 \times 10^5$ cèl·lules CD34+ provinents de mostres comercials de cordó umbilical. A partir de les 10-15 setmanes postinjecció, depenent del donant, ja hem observat la presència de cèl·lules CD45+ humanes en sang perifèrica. A partir de les 15-18 setmanes ja s'observa l'aparició de limfòcits T CD4+ i CD8+. En aquest punt es va establir que era el moment més adequat per injectar les cèl·lules THP1 bioluminescents per generar el model murí humanitzat de leucèmia en què es va avaluar l'efecte del nanoconjugat T22-HSNBT-MMAE. Un cop generada la leucèmia, es va poder analitzar l'efecte antitumoral del nanoconjugat, i va confirmar que la seva activitat antitumoral no es veia alterada i que, a més, no s'observava toxicitat rellevant ni efectes adversos.

3. Rellevància i possibles implicacions futures

La principal implicació clínica que tenen els resultats obtinguts en aquest projecte és la incorporació d'un nou tractament per als pacients d'LMA que sobreexpressen el receptor CXCR4. Un cop finalitzat el projecte, continuem desenvolupant el nanoconjugat en col·laboració amb l'empresa Nanoligent, que té llicenciada la patent. Està previst que un cop s'acabin tots els estudis de regulatòria pertinents es podrà planificar un primer assaig clínic de fase I en què s'inclourien també pacients amb altres tipus de càncer que tinguin nivells alts de CXCR4. Per tant, la intenció és fer un assaig clínic de fase I agnòstic de tumor en què se seleccionin els pacients segons l'expressió del receptor CXCR4. Per tant, les possibles implicacions clíniques d'aquest projecte van més enllà del tractament dels pacients amb LMA, ja que aquest nanoconjugat podria aplicar-se també a altres tipus tumorals.

L'abordatge plantejat en el desenvolupament del nanoconjugat obtingut en aquest projecte és innovador i prometedor per diferents motius:

- El **direccionament específic** d'un fàrmac a les cèl·lules CXCR4+ promet una millora en l'eficàcia del tractament, ja que permet augmentar la concentració del fàrmac en les cèl·lules tumorals, mentre que se'n redueix la toxicitat en disminuir molt la seva distribució als teixits normals.
- El **receptor diana** escollit permetrà fer aquest abordatge terapèutic no només amb pacients de diferents tipus de càncer, sinó que va destinat especialment als pacients amb menys probabilitats de respondre a la teràpia convencional i que tenen pitjor pronòstic. El receptor CXCR4 s'ha associat a mal pronòstic, més capacitat metastàtica, quimioresistència i més risc de recaiguda en diferents tipus de tumors sòlids i hematològics. Estem, doncs, desenvolupant una teràpia antitumoral especialment dirigida a pacients de mal pronòstic.
- **Efecte antimetastàtic.** En la majoria de tipus tumorals les metàstasis són la principal causa de mort, i el tumor primari, en general, és més controlable mitjançant cirurgia o radioteràpia o quimioteràpia. Com que l'expressió de CXCR4 està tan relacionada amb la capacitat metastàtica de les cèl·lules tumorals, podem considerar que el nanoconjugat aquí desenvolupat podria ser efectiu també bloquejant les metàstasis en tumors sòlids, tal com hem observat en la reducció tan forta de la disseminació leucèmica.
- **Impacte social.** El desenvolupament i l'aprovació regulatòria d'un nanoconjugat antitumoral per a l'LMA no només tindria un impacte clínic directe, sinó que també podria tenir un efecte significatiu en la societat. Aquesta innovació pot portar a una millora de la qualitat de vida dels pacients i les seves famílies, així com a una reducció dels costos associats al tractament i a la gestió de les complicacions de l'LMA.

4. Bibliografia científica generada

Articles científics

Serna N, Carratalá JV, Conchillo-Solé O, Martínez-Torró C, Unzueta U, Mangues 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, Manges 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, Manges 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 doctorals

Títol: *Simple biochemistry for complex protein materials*

Doctorand: Héctor López Laguna

Programa de doctorat: Biotecnologia (Universitat Autònoma de Barcelona)

Data de lectura: 31/03/2023

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

Doctoranda: Yaiza Núñez Amela

Programa de doctorat: Biomedicina (Universitat de Barcelona)

Data de lectura: 12/04/2023

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

Doctorand: Eric Voltà Durán

Programa de doctorat: Biotecnologia (Universitat Autònoma de Barcelona)

Data de lectura: 12/09/2023

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

Doctoranda: Annabel Garcia León

Programa de doctorat: Biomedicina (Universitat de Barcelona)

Data d'inici: setembre del 2021