



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA
CÀNCER

ESTRATÈGIA TERAPÈUTICA PER A LA LEUCÈMIA BASADA EN LA DISRUPCIÓ DELS LISOSOMES

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. Resum

La leucèmia mieloide aguda (LMA) és una neoplàsia caracteritzada per la ràpida expansió de blasts mieloides immadurs al moll de l'os. El curs de la malaltia es caracteritza per un mal pronòstic i una gran freqüència de recaigudes. Així, doncs, calen noves estratègies terapèutiques per aconseguir remissions duradores i evitar les recaigudes. Per tal de cercar fàrmacs que poguessin revertir esdeveniments primerencs en el procés de transformació leucèmica, es va dissenyar un cribratge *in silico* per identificar molècules bioactives petites que revertissin aquest patró transcripcional. En el cribratge *in silico* es va identificar un grup d'antihistamínics estructuralment relacionats, prèviament descrits com a compostos catiónics i amfifílics (CAD, per la sigla en anglès), i posteriorment es va validar en un cribratge primari *in vitro*. Aquests CAD mostraven efectes antileucèmics potents en línies cel·lulars d'LMA i en mostres primàries de pacients. A més, els efectes sobre cèl·lules sanguínies sanes van resultar molt inferiors. En experiments posteriors de xenotrasplantament es va mostrar que els CAD també tenien activitat antileucèmica *in vivo*, cosa que preservava l'hematopoesi normal. Gràcies a les seves propietats fisicoquímiques, els CAD sovint alteren la integritat i la funció dels lisosomes. Les dades preliminars del laboratori suggereixen que l'efecte antileucèmic diferencial dels CAD es produeix mitjançant la disrupció lisosòmica. Per tant, aquesta projecte té com a objectiu estudiar el potencial dels lisosomes com a orgànul diana de noves teràpies contra l'LMA. Durant la realització d'aquest projecte, s'han nomenat dos compostos nous, EDK-87 i EDK-88, com a caps de sèrie, ja que el seu efecte antileucèmic és altament específic i potent, perquè mimetitzen el mecanisme d'acció descrit abans. L'estudi preclínic no regulatori realitzat dona suport al desenvolupament posterior per poder avaluar-los en condicions clíniques.

2. Resultats

Activitat 1. Identificació d'una família de compostos químics amb activitat antileucèmica intervinguda per la disrupció de l'activitat lisosòmica

Es va fer un cribratge *in silico*, en què vam obtenir com a resultat la identificació de 114 compostos nous amb potencial antileucèmic, prenent com a base els resultats preliminars obtinguts al laboratori (Cornet-Masana, 2017). Es van validar inicialment 9

d'aquests compostos, mentre que 2 compostos van ser seleccionats sobre la base del mecanisme d'acció específic contra la funció lisosòmica. Aquests 2 compostos es van denominar EDK-87 i EDK-88, i van ser els caps de sèrie. Tots dos compostos augmenten l'acumulació de radicals lliures (ROS) en mitocondris, l'activació de les caspases efectores 3/7, la positivitat per a la sonda CytoID i la presència de la isoforma b d'LC3. Els resultats obtinguts en aquesta activitat indiquen que els compostos que són caps de sèrie indueixen programes de mort cel·lular: apoptosi i autofàgia, com era desitjable. El tractament amb aquests compostos compromet la integritat dels lisosomes, en permeabilitzar-los (augment de la formació de puntes de galactina-3), augmentar-ne la mida (massa lisosòmica total) i augmentar l'activitat lisosòmica degradativa (sonda lentiviral *lysosomal-METRIQ*). L'activitat lisosòmica també està greument afectada amb el tractament, ja que augmenta l'activitat del factor de transcripció TFE3, disminueix c-Myc i indueix la diferenciació terminal de les cèl·lules leucèmiques.

Qualsevol tractament potencial contra la leucèmia ha de ser específic per a les cèl·lules leucèmiques, per tant, ha de ser innocu per a les cèl·lules sanes. EDK-87 i EDK-88 no redueixen la viabilitat cel·lular de les cèl·lules sanes de forma biològicament significativa en les concentracions farmacològicament interessants. De fet, la finestra terapèutica calculada indica que el rang d'aquest tractament seria segur en desenvolupaments clínics futurs.

Els estudis de farmacologia i farmacodinàmica per avaluar la viabilitat d'utilitzar aquests compostos nus n'asseguren la viabilitat per a l'ús en humans, i l'administració subcutània és l'òptima. Per tant, el desenvolupament clínic d'aquests compostos està justificat.

Activitat 2. L'activitat antileucèmica dels caps de sèrie és sinèrgica amb el tractament convencional

A la pràctica clínica, els tractaments en monoteràpia són l'opció menys recomanable per la potencial inducció de resistències i la reducció de l'efectivitat. Tant EDK-87 com EDK-88 presenten un efecte sinèrgic significatiu amb citarabina (Ara-C), l'esquelet del tractament de l'LMA. Com que els compostos EDK-87 i EDK-88, els anomenats *caps de sèrie*, afecten simultàniament els lisosomes i mitocondris, es van identificar fàrmacs aprovats per a malalties hematològiques que tinguessin un mecanisme d'acció que

generés un dany en algun òrganul o en tots dos. De fet, el triòxid d'arsènic (ATO) ha demostrat que estableix sinergies amb EDK-87 i EDK-88 de manera significativa estadísticament. Aquest sinergisme s'observa tant pel que fa a la citotoxicitat com a la capacitat clonogènica.

Activitat 3. Estudi de LAPTM4B com a diana terapèutica

LAPTM4B és una proteïna de membrana localitzada preferentment en lisosomes, l'expressió de la qual a escala d'mRNA està relacionada amb la resposta al tractament i la supervivència a LMA. De fet, l'expressió de LAPTM4B està augmentada en els episodis de recaiguda, en comparació amb el debut en el moment del diagnòstic. La sobreexpressió de LAPTM4B induïx l'adquisició d'un fenotip de quimioresistència a citarabina (Ara-C), associat a l'activació de gens relacionats amb la seva inactivació intracel·lular, i l'expressió del factor TFEB. Quant a la senyalització intracel·lular, LAPMT4B senyalitza en un entorn leucèmic per mediació de l'element de resposta SER, pertanyent a la ruta MAP-Erk. La sobreexpressió de LAPTM4B incrementa la capacitat de regeneració de la leucèmia en models animals de xenotrasplantament, fet que demostra el seu potencial com a diana terapèutica.

Activitat 4. Estudi mutacional i d'expressió gènica del subgrup d'LMA sense definició molecular

Per poder determinar el perfil mutacional associat al compartiment lisosòmic, es va fer una seqüenciació global (RNA-Seq) i una seqüenciació de l'exoma complet (WES) en mostres de pacients d'LMA sense definició molecular. Hi ha 11 variants patogèniques que es troben en aquestes mostres: 6 afecten gens relacionats amb síndromes de predisposició al càncer (*ATM*, *DDX41*, *CHEK2*) i 5 estan relacionats amb síndromes de fracàs de la medul·la òssia (*FANCA*, *FANCM*, *SBDS*, *DNAJC21*, *CSF*). A més, s'observen gens de fusió no detectats per mètodes citogenètics convencionals (reordenament de *NUP98*, *ETV6*, *NRIP1*).

3. Rellevància i possibles implicacions futures

Els resultats obtinguts han permès:

1. Identificar una família química amb propietats fisicoquímiques compatibles amb els processos de desenvolupament de fàrmacs i amb activitat específica antileucèmica en

models *in vivo* rellevant per al seu ús a la clínica.

2. Nomenar caps de sèrie els compostos EDK-87 i EDK-88, aptes per al desenvolupament clínic.
3. Validar LAPTM4B com una diana terapèutica en leucèmia mieloide aguda.
4. Descriure mutacions noves en la línia germinal amb alta prevalença en pacients adults d'LMA, ja que constitueixen noves mutacions amb valor com a marcadors nous de predisposició a l'LMA en la línia germinal.

4. Bibliografia científica generada

Aquest projecte ha generat les publicacions següents:

- 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.

Els resultats obtinguts s'han presentat en els congressos següents:

- 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 NPM1Wild-Type Myeloid Neoplasms after Chemotherapy for Acute Leukemia withNPM1Mutation: 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, Àustria):
 - Delgado-Martínez J, Cornet-Masana JM, Cuesta-Casanovas L, Carbó JM, Clément-Demange L, **Risueño RM.**

Role of lysosomal-associated gene LPTM4B in leukemia.

Juny del 2022, Associació Europea d'Hematologia.

S'ha presentat una tesi doctoral relacionada amb aquest projecte:

- Jennifer Delgado Martínez.

Papel de la proteína lisosomal LPTM4B en leucemia mieloide aguda.

6 de juliol de 2023, Universitat de Barcelona.

Directora de tesi: Ruth Muñoz Risueño.